

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas
Mestrado em Bioquímica e Fisiologia

**Avaliação das Atividades Citotóxica, Antitumoral,
Antiinflamatória e Analgésica do Extrato Bruto e de uma
Fração Parcialmente Purificada da Vagem de *Caesalpinia
ferrea* Mart. ex Tul. var. *ferrea***

Ana Carina Cavalcanti Silva

Orientadora: Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia

Co-orientadora: Profa. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva

Recife, 2008

Silva, Ana Carina Cavalcanti

Avaliação das atividades citotóxica, antitumoral, antiinflamatória e analgésica do extrato bruto e de uma fração parcialmente purificada da vagem de *Caesalpinia ferrea* Mart. ex Tul. var. *ferrea*. / Ana Carina Cavalcanti Silva. – Recife: A Autora, 2008.

73 fls. .: il.

Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Fisiologia) – UFPE.
CCB

1. Bioquímica 2. *Caesalpinia ferrea* 3. Câncer
4. Citotoxicidade I.Título

577.1

CDU (2ª. Ed.)

UFPE

572

CDD (22ª. Ed.)

CCB – 2008 – 20

Ana Carina Cavalcanti Silva

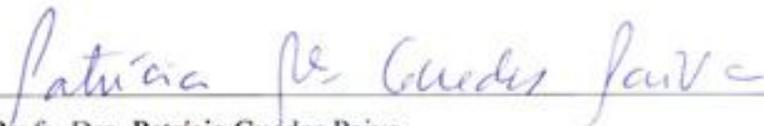
**Avaliação das Atividades Citotóxica, Antitumoral,
Antiinflamatória e Analgésica do Extrato Bruto e de uma
Fração Parcialmente Purificada da Vagem de *Caesalpinia
ferrea* Mart. ex Tul. var. *ferrea***

Dissertação apresentada para o cumprimento parcial das exigências para a obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco.

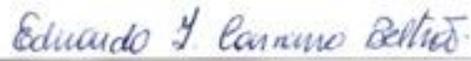
Aprovada por:



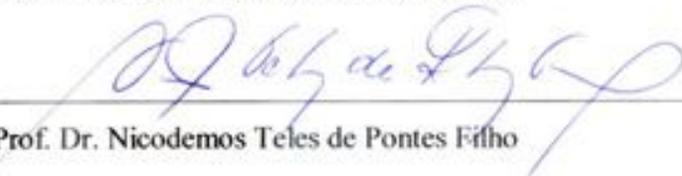
Profa. Dra. Maria Tereza dos Santos Correia



Profa. Dra. Patricia Guedes Paiva



Prof. Dr. Eduardo Isidoro Carneiro Beltrão



Prof. Dr. Nicodemos Teles de Pontes Filho

Fevereiro/2008

“A falsa ciência gera ateus; a verdadeira ciência leva os homens a se curvarem diante da Divindade”.

Voltaire

SUMÁRIO

Página

| | |
|--|----|
| AGRADECIMENTOS | |
| LISTA DE ABREVIATURAS | |
| LISTA DE FIGURAS | |
| LISTA DE TABELAS | |
| RESUMO | |
| ABSTRACT | |
| 1 INTRODUÇÃO | 13 |
| 1.1 O câncer como uma doença genética | 13 |
| 1.1.1 As características gerais das células cancerosas | 14 |
| 1.1.2 Tratamento do câncer | 15 |
| 1.1.2.1 Os agentes antineoplásicos e seus mecanismos de ação | 15 |
| 1.2 O processo inflamatório | 18 |
| 1.2.1 Momentos da inflamação | 18 |
| 1.2.1.1 Fenômenos irritativos | 19 |
| 1.2.1.1.1 Mediadores da inflamação | 19 |
| 1.2.1.1.1.1 Aminas vasoativas | 19 |
| 1.2.1.1.1.2 Substâncias plasmáticas | 20 |
| 1.2.1.1.1.3 Citocinas | 21 |
| 1.2.1.1.1.4 Lipídeos ácidos | 22 |
| 1.2.1.1.2 Fenômenos vasculares | 23 |
| 1.2.1.1.3 Fenômenos exsudativos | 24 |
| 1.2.1.1.4 Fenômenos celulares: extravasamento de leucócitos e fagocitose | 24 |
| 1.2.1.1.5 Fenômenos alterativos | 25 |
| 1.2.1.1.6 Resolução da inflamação: fenômenos reparativos | 25 |
| 1.2.2 O papel do óxido nítrico (NO) | 26 |
| 1.2.3 Os agentes antiinflamatórios e seus mecanismos de ação | 27 |
| 1.2.3.1 Antiinflamatórios não-esteróides | 27 |
| 1.2.3.2 Antiinflamatórios esteróides | 28 |
| 1.3 O complexo fenômeno da dor | 29 |
| 1.3.1 Os principais tipos de dor | 29 |
| 1.3.2 Nocicepção: a percepção da dor | 30 |
| 1.3.3 A condução do estímulo doloroso | 32 |

| | |
|--|----|
| 1.3.4 Modulação da dor: vias da analgesia | 33 |
| 1.3.5 Os agentes analgésicos e seus mecanismos de ação | 34 |
| 1.3.5.1 Analgésicos opióides | 35 |
| 1.3.5.2 Analgésicos não-opióides: AINEs | 35 |
| 1.4 O uso de produtos naturais na medicina popular | 37 |
| 1.4.1 As aplicações de <i>Caesalpinia ferrea</i> | 38 |
| 2 OBJETIVOS | 40 |
| 2.1 Objetivo geral | 40 |
| 2.2 Objetivos específicos | 40 |
| 3 ARTIGOS | 41 |
| 3.1 ARTIGO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY | 41 |
| 3.2 ARTIGO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO PHYTOMEDICINE | 49 |
| 4 CONCLUSÕES | 59 |
| 5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 60 |
| 6 ANEXOS | 73 |

AGRADECIMENTOS

A Deus, Criador de tudo, responsável pela beleza e complexidade da natureza, a qual exaustivamente tentamos compreender. Obrigada por tudo que tenho conquistado e por estar sempre comigo!

Às amigas Profas. Dras. Maria Tereza dos Santos Correia (orientadora) e Teresinha Gonçalves da Silva (co-orientadora), pela confiança e pela oportunidade de trabalhar com pessoas tão especiais, competentes e compreensivas.

Aos Profs. Drs. Nicodemos Teles, Adriana Argolo (eternos professores...) e Patrícia Paiva pela amizade e apoio.

À doutoranda Neila Ximenes, que me ensinou como trabalhar com a vagem do pau-ferro e, acima de tudo me apoiou em tudo que precisei. Obrigada amiga!!!

À Coordenação e professores do Mestrado em Bioquímica e Fisiologia e aos funcionários dos Departamentos de Bioquímica e Antibióticos, principalmente às técnicas Maria Reis (do Laboratório de Glicoproteínas – Departamento de Bioquímica) e Maria Rodrigues (Departamento de Antibióticos) pelo empenho e ajuda.

A Miron Oliveira e Neide Ferreira, pela dedicação, amizade e apoio eternos.

A todos os meus amigos do Laboratório de Glicoproteínas e do Departamento de Antibióticos; deste último, especialmente Jaciana Aguiar, Laudelina Magalhães e Thiago Lins, pela ajuda dedicada.

Aos meus colegas de Mestrado que percorreram comigo estes dois anos de curso, enfrentando todas as dificuldades. Agradecimento especial à Maria Catarina Gadêlha, Jackeline Maciel e Valdeene Jansen. Obrigada pelo apoio e pela amizade de vocês.

Aos meus familiares, pela confiança e pelo amor dispensados; e ao meu noivo Flávio Pereira, presença constante neste momento tão importante da minha vida.

Aos amigos, especialmente ao meu melhor amigo Gustavo da Costa, uma pessoa adorável com quem sempre pude e posso contar nas horas difíceis.

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

Enfim, obrigada a todos que tornaram este trabalho possível, direta ou indiretamente.

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|------------------------|--|
| AINE | Drogas antiinflamatórias não-esteroidais |
| AMPA | Ácido α -amino-3-hidroxi-5-metilisoxazol-4-propiónico |
| CCK | Colecistocinina |
| CE | Extrato bruto (do inglês crude extract) |
| CEEA-UFPE | Comissão de Ética em Experimentação Animal da UFPE |
| CGRP | Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina |
| CNPq | Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico |
| CoA | Coenzima A |
| COX | Cicloxigenase |
| CO₂ | Gás carbônico |
| CSF | Fator estimulador de colônias |
| DAG | Diacil-glicerol |
| DMEM | Minimum Essential Medium Eagle Modified Dulbecco's |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DNA | Ácido desoxirribonucléico |
| EDTA | Ácido etilenodiamino tetra-acético |
| eNOS | Óxido nítrico sintase endotelial |
| F80 | Fração 0-80% |
| GABA | Ácido γ -aminobutírico |
| G-CSF | Fator de estimulação de colônias de granulócitos |
| GM-CSF | Fator de estimulação de colônias de granulócitos-macrófagos |
| G0 | Fase de repouso do ciclo celular |
| G1 | Fase pré-sintética do ciclo celular |
| G2 | Fase pós-mitose do ciclo celular |
| HeLa | Células de câncer cervical humano |
| HepG2 | Células derivadas de hepatoma humano |
| HEp-2 | Células derivadas de tumor primário da laringe humana |
| Hep3B | Células derivadas de hepatoma humano |
| HL60 | Células de leucemia humana |
| IASP | Associação Internacional para o Estudo da Dor |
| IC₅₀ | Concentração que inibe 50% do crescimento celular em relação ao controle |
| IFN | Interferon |

| | |
|-----------------------------------|---|
| IgE | Imunoglobulina E |
| IL | Interleucina |
| iNOS | Óxido nítrico sintase induzível |
| IP₃ | Inositol trifosfato |
| LD₅₀ | Dose letal aguda para 50% dos animais |
| LT | Leucotrieno |
| M | Fase de mitose do ciclo celular |
| mGlu | Receptor metabotrópico de glutamato |
| MTT | Brometo-3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difeniltetrazólio |
| MTX | Metotrexato |
| NaCl | Cloreto de sódio |
| NaNO₂ | Nitrito de sódio |
| NAP | Neurônio aferente primário |
| NCI | Instituto Nacional do Câncer (do inglês National Cancer Institute) |
| NCI-H292 | Células mucoepitelióides obtidas a partir de carcinoma de pulmão humano |
| NK | Células natural killer |
| NMDA | N-metil-D-aspartato |
| nNOS | Óxido nítrico sintase neuronal |
| NO | Óxido nítrico |
| NOS | Óxido nítrico sintase (do inglês nitric oxide synthase) |
| NO₂⁻ | Nitrito |
| NSAID | Drogas antiinflamatórias não esteroidais (do inglês non-steroidal antiinflammatory drugs) |
| OD | Densidade óptica (do inglês optical density) |
| OECD | Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (do inglês Organization for Economic Cooperation and Development) |
| PAF | Fator de ativação das plaquetas |
| PBS | Tampão fosfato de sódio |
| PG | Prostaglandina |
| pH | Potencial hidrogeniônico |
| PIP₂ | Fosfoinositol-4,5-bifosfato |
| PKC | Proteína quinase C |
| PMN | Polimorfonuclear |
| PMNL | Leucócito polimorfonuclear (do inglês polymorphonuclear leukocyte) |

| | |
|-------------------------------|---|
| RD | Rabdomiossarcoma |
| RNA | Ácido ribonucléico |
| S | Fase de síntese do ciclo celular |
| SAID | Drogas antiinflamatórias esteroidais (do inglês steroidal antiinflammatory drugs) |
| S.E.M. | Standard error medium |
| SNC | Sistema nervoso central |
| SNP | Sistema nervoso periférico |
| TGF-β | Fator transformante do crescimento β |
| Th1 | Célula T helper 1 |
| TNF | Fator de necrose tumoral (do inglês tumour necrosis factor) |
| TX | Tromboxano |
| VIP | Peptídeo intestinal vasoativo |

LISTA DE FIGURAS

| FIGURA | Página |
|---|---------------|
| Figura 1 – Formação do exsudato inflamatório agudo. Fonte: Stevens e Lowe (2002). | 24 |
| Figura 2 – Transmissão neurológica do estímulo doloroso. Fonte: Hamilton (2007), ilustração de Jason McAlexander. Copyright © Wild Iris Medical Education. | 32 |
| Figura 3 – Árvore (A), flor (B) e fruto (C) de <i>C. ferrea</i> Mart. ex Tul. var. <i>ferrea</i> . Fonte: Lorenzi (2002). | 39 |

LISTA DE FIGURAS DOS ARTIGOS

| ARTIGO 1: | Página |
|---|---------------|
| Figure 1 – Effects of CE, F80 and MTX (methotrexate) on the growth of Sarcoma-180 in Swiss albino male mice. Each column represents the mean of six animals and vertical lines show the S.E.M. Asterisk denotes the significance level in comparison to control value: $*P<0.05$. | 45 |
| ARTIGO 2: | |
| Figure 1 – Effect of pre-treatment with dexamethasone, piroxicam, indomethacin (standard drugs), CE and F80 on migration of polymorphonuclear leukocytes (PMNL) (number of PMNL/mL exsudate) in carrageenan-induced peritonitis in mice. Each column represents the mean of six animals and vertical lines show the S.E.M. Asterisk denotes the significance level in comparison to control value: $*P<0.05$. | 52 |
| Figure 2 – Inhibitory effects of standard drugs dexamethasone and piroxicam, CE and F80 in relation to control group on NO production. Each column represents the mean of six animals and vertical lines show the S.E.M. Asterisk denotes the significance level in comparison to control value: $*P<0.05$. | 54 |
| Figure 3 – Effects of standard drugs piroxicam and dipyrrone, CE and F80 in relation to control group in writhing induced in mice by intraperitoneal injection of acetic acid. Each column represents the mean of six animals and vertical lines show the S.E.M. Asterisk denotes the significance level in comparison to control value: $*P<0.05$. | 55 |

LISTA DE TABELAS DOS ARTIGOS

| TABELA | Página |
|--|---------------|
| Table 1 – Evaluation of antiinflammatory activity of standard drugs (dexamethasone, piroxicam and indomethacin), CE and F80 on carrageenan-induced peritonitis in pre-treated mice. | 52 |
| Table 2 – Anti-nociceptive effect of standard drugs (piroxicam and dipyrone), CE and F80 by acetic acid-induced writhing response test in mice. | 55 |

RESUMO

A busca por agentes anticâncer, antiinflamatórios e analgésicos com poucos efeitos colaterais é um dos maiores desafios na pesquisa moderna, e cada vez mais está relacionada aos usos etnomédicos de plantas e outros produtos naturais. *Caesalpinia ferrea* é uma árvore largamente distribuída no Brasil e usada popularmente para muitos fins, inclusive na prevenção do câncer e no tratamento da inflamação e da dor. O objetivo deste trabalho foi avaliar as atividades citotóxica, antitumoral, antiinflamatória e analgésica do extrato bruto aquoso (CE) e de uma fração (F80) da vagem de *C. ferrea*, utilizando as linhagens celulares NCI-H292 e HEp-2 e, em camundongos, o tumor sólido Sarcoma-180, peritonite induzida por carragenina e contorções abdominais induzidas por ácido acético. Os resultados das atividades citotóxica e antitumoral revelaram que apenas F80 inibiu o crescimento das células NCI-H292 (25,6%; 14,3% e 7,8%, nas concentrações 50; 25; e 12,5 µg/mL, respectivamente); e que a redução no peso do tumor Sarcoma-180 promovida por F80 não foi significativa (8,68%, 100 mg/kg peso corporal). CE e F80 não reduziram o crescimento das células HEp-2. A LD₅₀ para ambos os preparados ficou estabelecida em 2500 mg/kg peso corporal. Os dados obtidos da atividade antiinflamatória revelaram que CE e F80 (100 mg/kg) apresentam efeito antiinflamatório significativo, evidenciado pela redução (40,9% e 38,2%, respectivamente) do número de leucócitos no exsudato inflamatório. Ambos os preparados provocaram um decréscimo no conteúdo de nitrito; enquanto CE reduziu-o a um nível mínimo, abaixo dos obtidos com as drogas padrão piroxicam e dexametasona, F80 apresentou resultado similar a estas. Com relação à atividade analgésica, CE e F80 (100 mg/kg) reduziram em 56,60% e 72,72%, respectivamente, o número de contorções induzidas por ácido acético. Em conclusão, CE e F80 não apresentam atividades citotóxica e antitumoral significativas contra as células e o tumor testados; porém, a baixa toxicidade permite seu uso com certa segurança em outras situações. Contudo, possuem atividades antiinflamatória e analgésica, corroborando a base farmacológica do uso etnomédico de *C. ferrea*.

Palavras-chave: *Caesalpinia ferrea*; Citotoxicidade; LD₅₀; Atividade antitumoral; Atividade antiinflamatória; Óxido nítrico; Atividade analgésica

ABSTRACT

The search for anticancer, antiinflammatory and analgesic agents with few side effects is one of the biggest challenges in the modern research, and more and more is related to the ethnomedical uses of plants and other natural products. *Caesalpinia ferrea* is a tree largely distributed in Brazil and used popularly for many purposes, including cancer prevention, inflammation and pain treatment. The aim of this study was to evaluate the cytotoxic, antitumor, antiinflammatory and analgesic effects of the crude aqueous extract (CE) and a fraction (F80) of *C. ferrea* pod, using NCI-H292 and HEP-2 cell lines, and, in mice, the solid tumor Sarcoma-180, carrageenan-induced peritonitis and acetic acid-induced writhing response. Results from cytotoxic and antitumor activities revealed that only F80 inhibited NCI-H292 cell growth (25.6%; 14.3% and 7.8%, at 50; 25; and 12.5 $\mu\text{g/mL}$, respectively); and the Sarcoma-180 tumor weight reduction promoted by F80 was not significant (8.68%, at 100 mg/kg body weight). CE and F80 did not reduce HEP-2 cell line growth. LD₅₀ for both preparations was determined as 2500 mg/kg body weight. Data obtained from antiinflammatory test revealed that CE and F80 (100 mg/kg body weight) showed significant antiinflammatory activity, evidenced by the reduction (40.9% and 38.2%, respectively) of leukocyte number in the inflammatory exsudate. Both preparations tested provoked a decrease in the nitrite level; while CE reduced it to a minimum level, smaller than those obtained from standard drugs piroxicam and dexamethasone, F80 presented a result similar to these ones. In regard to analgesic activity, CE and F80 (100 mg/kg body weight) caused an inhibition at the rate of 56.60% and 72.72%, respectively, on the number of writhes induced by acetic acid. In conclusion, CE and F80 have no significant cytotoxic and antitumor activities over cell lines and solid tumor tested; otherwise, their low toxicity allows the use of CE and F80 with a certain safety in other situations. Although, both preparations present antiinflammatory and analgesic activities, corroborating the pharmacological basis of *C. ferrea* ethnomedical use.

Keywords: *Caesalpinia ferrea*; Cytotoxicity; LD₅₀; Antitumor activity; Antiinflammatory activity; Nitric oxide; Analgesic activity

1 INTRODUÇÃO

1.1 O câncer como uma doença genética

A renovação dos tecidos requer um controle complexo que coordene o comportamento da célula com as necessidades do organismo como um todo. Obviamente, em um organismo complexo, não há dano se uma única célula apresentar um comportamento anormal. Mas um descontrole potencialmente devastador pode ocorrer quando uma única célula sofre alterações genéticas que lhe permitem sobreviver e se multiplicar quando não deveria, produzindo células-filhas também anômalas. A organização dos tecidos, e eventualmente do organismo, pode, então, tornar-se alterada pela expansão de um clone de células anormais. É esta catástrofe que acontece no câncer, a segunda causa mais comum de mortalidade em humanos na maioria dos países desenvolvidos (ALBERTS et al., 1999; SCHREIBER, 1999; STEVENS; LOWE, 2002; RANG et al., 2004).

Segundo Mendelsohn (1995) os termos *câncer*, *neoplasia* e *processo maligno* são geralmente utilizados como sinônimos, tanto na literatura técnica quanto na popular.

O câncer é uma doença genética que pode ocorrer em todos os tipos de tecido do organismo. É consequência de uma mudança patológica na informação contida no DNA. Tem origem a partir de mutações que alteram a expressão de genes codificadores de proteínas comprometidas com o controle da proliferação e da diferenciação celular ou, ainda, envolvidas nos mecanismos de reparo do DNA. Em consequência dessas alterações – atualmente reconhecidas como marcas comuns de todos os tipos de câncer, como por exemplo, mutações no gene p53 – as células adquirem vantagens proliferativas sobre as suas congêneres normais, formando tumores, invadindo tecidos circunvizinhos e podendo propagar-se à distância (ALBERTS et al., 1999; CERQUEIRA, 2000; KLUG; CUMMINGS, 2002; THOMAS, 2003).

Embora frequentemente visto como uma doença única, o câncer é na verdade um complexo grupo de doenças. Pode ser encontrado em muitas formas, incluindo formações em tecidos sólidos e tumores de células isoladas (leucemias e linfomas) (CERQUEIRA, 2000; DESCH, 2002; KLUG; CUMMINGS, 2002; THOMAS, 2003).

Fatores específicos incluindo dieta, radiação ionizante, agentes químicos e físicos e alguns vírus (como o de Epstein-Barr, o da hepatite B, e os papilomavírus humanos 16 e 18) – conhecidos como carcinógenos, ou seja, agentes causadores de câncer – também desempenham um papel nas alterações genéticas causadoras de câncer, estimando-se que 80% dos cânceres em humanos surgem desse modo (VOET; VOET, 1999; FERNANDES JÚNIOR, 2000; DESCH, 2002; KLUG; CUMMINGS, 2002).

Na maioria dos casos de câncer, as mutações são *somáticas*, ou seja, surgem em células individuais dispersas no corpo já desenvolvido, e não são passadas para as gerações futuras através das células germinativas, das quais derivam todas as outras células de um organismo multicelular. Contudo, em cerca de 1% dos casos, mutações da linhagem germinativa de vários genes são

transmitidas à progênie e causam susceptibilidade ao câncer (ALBERTS et al., 1999; CALLERY; GANNETT, 2002; KLUG; CUMMINGS, 2002).

Ocasionalmente, então, são encontrados indivíduos que herdaram mutações em sua linhagem germinativa em um *gene supressor de tumor* (genes de antiproliferação presentes na célula normal, que codificam proteínas auxiliares na aplicação dos “freios” que suspendem o ciclo celular em pontos de checagem) ou em um *oncogene* (gene responsável pela transformação de uma célula normal em cancerosa; tipicamente, uma forma mutante de um gene normal – *proto-oncogene* – que codifica produtos protéicos reguladores do crescimento, da divisão e da adesão celulares). Para os portadores dessas modificações genéticas, o número de mutações adicionais para o desenvolvimento do câncer é menor, e a doença ocorre em maior frequência e numa idade menor. As famílias que possuem essas mutações são, portanto, propensas ao desenvolvimento de câncer (ALBERTS et al., 1999; SILVERTHORN, 2003).

O câncer raramente é o resultado de uma única mutação ou perda de um alelo supressor. Há evidências de que é necessário mais que uma única mutação para transformar uma célula normal em uma célula cancerosa. Estas mutações não ocorrem todas ao mesmo tempo, mas em seqüências, normalmente por um período de muitos anos. Certos tumores sólidos, como o câncer de cólon, resultam de uma cascata de eventos que ocorrem durante muitos anos (ALBERTS et al., 1999; DESCH, 2002).

As alterações genômicas associadas ao câncer podem envolver mudanças de pequena escala, como substituições de um único nucleotídeo, ou eventos de larga escala, como rearranjos cromossômicos, perda ou ganho de cromossomos, ou mesmo a integração de genomas virais dentro de sítios cromossômicos. As alterações de larga escala são uma característica comum do câncer; a maioria dos tumores humanos são caracterizados por mudanças cromossômicas (KLUG; CUMMINGS, 2002).

Apesar da compreensão crescente da genética do câncer, os mecanismos pelos quais as mutações, a perda de supressores e as alterações genéticas ocorrem não são conhecidos. Alguns indivíduos provavelmente têm uma predisposição a quebras do DNA e à incapacidade de reparar erros (DESCH, 2002).

1.1.1 As características gerais das células cancerosas

A doença denominada *câncer* é mais bem definida por quatro características que descrevem o modo pelo qual as células cancerosas atuam de modo diferente das normais (MENDELSON, 1995): (1) origem clonal (KORSMEYER, 1995); (2) autonomia, ou seja, são independentes de estímulos fisiológicos de crescimento; (3) anaplasia e (4) capacidade de metástase, principalmente por invasão local e disseminações linfática, vascular e transcelômica (MENDELSON, 1995;

ALBERTS et al., 1999; CALLERY; GANNETT, 2002; STEVENS; LOWE, 2002; THOMAS, 2003).

Propriedades semelhantes a cada uma dessas características podem ser expressas por células normais não malignas em determinados momentos apropriados – por exemplo, durante a embriogênese e o processo de cicatrização –; todavia, nas células cancerosas a característica exibida é inapropriada ou excessiva. Os tumores benignos são clonais, geralmente apresentam crescimento lento e exibem certo grau de autonomia, porém permanecem diferenciados e não sofrem metástase, podendo, normalmente, ser completamente removidos por cirurgia. O processo pelo qual uma célula normal é convertida numa outra que exhibe esses quatro traços característicos é denominado *transformação maligna* (MENDELSON, 1995; CALLERY; GANNETT, 2002; STEVENS; LOWE, 2002).

Vários estudos têm focado nas características estruturais das células cancerosas, como modificações na superfície externa (glicocálix) e perda de junções celulares, pontos importantes nas interações célula-célula e célula-matriz e provavelmente envolvidos no potencial metastático de tumores (BROOKS, 2000; BROOKS; CARTER, 2001; THIES et al., 2001; SILVERTHORN, 2003).

As células cancerosas podem viver de forma independente em cultura (*in vitro*). A maioria dos cânceres não necessita dos fatores de crescimento e hormônios dos quais os tecidos normais exigiriam para crescer fora do corpo. Além disso, células cancerosas cultivadas tendem a crescer *in vitro* de forma desorganizada, frequentemente crescendo umas sobre as outras, ao contrário das células normais, que exibem inibição por contato. Algumas células malignas não sofrem morte celular programada normal, ou apoptose. Em consequência, tornam-se imortais, e são resistentes à quimioterapia e à radiação ionizante. Os tumores malignos também têm a habilidade de criar o seu próprio suprimento sanguíneo, um processo denominado *angiogênese* (DESCH, 2002).

1.1.2 Tratamento do câncer

Existem três enfoques principais para o tratamento do câncer estabelecido – excisão cirúrgica, irradiação e quimioterapia –, e o papel de cada um deles irá depender do tipo de tumor, localização e do estágio de seu desenvolvimento. A quimioterapia pode ser utilizada como terapia propriamente dita ou como adjuvante de outras formas de tratamento (FERNANDES JÚNIOR, 2000; SILVA; ALMEIDA, 2000; SOARES, 2000; CALLERY; GANNETT, 2002; RANG et al., 2004).

1.1.2.1 Os agentes antineoplásicos e seus mecanismos de ação

Os agentes farmacológicos utilizados no tratamento do câncer incluem uma grande variedade de compostos que atuam de várias formas, interferindo nos mecanismos de sobrevivência, proliferação e migração celulares. Apesar do desenvolvimento dirigido no sentido de torná-los

capazes de ação seletiva sobre os tecidos neoplásicos, os agentes atualmente disponíveis manifestam toxicidade significativa sobre os tecidos normais como maior complicação do seu uso, devendo-se considerar criteriosamente o risco *versus* benefício quando se usam esses agentes (BOENTE; SAMPAIO FILHO; DEL GIGLIO, 2002; BITTENCOURT; BRUNSTEIN, 2004). A toxicidade ou efeitos colaterais estão relacionados ao seu mecanismo de ação (SILVA; ALMEIDA, 2000).

As drogas antineoplásicas devem entrar na célula para produzir os efeitos citotóxicos desejados. Algumas delas podem passar pela membrana celular por difusão passiva, com a diferença de concentração do gradiente dentro e fora da célula fazendo com que ocorra sua captação. Outras requerem a ligação a proteínas de transporte, que levam a droga através da membrana celular e a liberam do lado citosólico (LAZO; LARNER, 1997).

A maior parte desses agentes atua sobre o DNA, impedindo a duplicação celular. Na descrição dos mecanismos de ação é comum a referência à fase de duplicação do DNA no ciclo celular. As fases do ciclo são: G0 (fase de repouso) G1 (fase pré-sintética), S (fase de síntese celular, especialmente do DNA), G2 (fase pós-síntese) e M (fase da mitose). Os antineoplásicos, atuando em uma ou mais fases, devem, por princípio, acarretar morte celular (BOENTE; SAMPAIO FILHO; DEL GIGLIO, 2002; BITTENCOURT; BRUNSTEIN, 2004).

Os antineoplásicos podem exercer uma ação letal em todas as fases do ciclo ou em uma específica. A partir da maior atividade em determinadas fases, as drogas antineoplásicas podem ser classificadas em ciclo-específicas/fase-específicas (como os antimetabólitos, alcalóides da vinca, epipodofilotoxinas) ou, no ciclo, como um todo, em ciclo-específicas/fase não-específicas (incluindo agentes alquilantes, antibióticos, nitrosuréias, cisplatina e hormônios); ambas necessitando do ciclo celular para exercer seus efeitos citotóxicos. Há ainda aquelas que não agem necessariamente em fases do crescimento celular, mas em células em G0, sendo denominadas ciclo não-específicas (BOENTE; SAMPAIO FILHO; DEL GIGLIO, 2002; BARROWS, 2004; BITTENCOURT; BRUNSTEIN, 2004). Tanto os fármacos dependentes do ciclo celular como os independentes mostram-se eficazes em vários tipos de tumores (BOENTE; SAMPAIO FILHO; DEL GIGLIO, 2002; BITTENCOURT; BRUNSTEIN, 2004).

Os agentes antineoplásicos podem ser convenientemente divididos em várias categorias. Algumas dessas categorias baseiam-se em propriedades químicas e mecânicas, enquanto outras estão relacionadas com a origem de produtos naturais (BARROWS, 2004).

Os *agentes alquilantes* (mostardas nitrogenadas, etileniminas, alquilsulfonatos, nitrosuréias e triazenos) interferem na replicação e transcrição do DNA por alquilarem moléculas orgânicas como DNA, RNA e proteínas, levando à apoptose (BOENTE; SAMPAIO FILHO; DEL GIGLIO, 2002; CALLERY; GANNETT, 2002; THOMAS, 2003; BARROWS, 2004; BITTENCOURT; BRUNSTEIN, 2004). Isso ocorre em células neoplásicas e sadias, podendo levar à mutagênese e carcinogênese se não houver mecanismos de reparo celular (RAJEWSKY et al., 2000).

Os *compostos de platina* (cisplatina, carboplatina, oxaliplatina) são complexos de metal pesado com atividade citotóxica. Induzem ligações de maneira similar aos agentes alquilantes (CHU, 1994).

Os *antimetabólitos* (análogos das purinas, análogos das pirimidinas e análogos do ácido fólico) incluem um grupo variado de compostos que interferem em diversos processos bloqueando as vias metabólicas normais que operam nas células, o que resulta em interrupção da síntese de ácidos nucleicos. Apresentam estrutura similar a compostos existentes na natureza, como aminoácidos ou nucleosídeos e são dependentes do ciclo celular, atuando em fase específica (fase S). Podem agir de dois modos: por substituição de um composto endógeno normal da célula por outro cuja incorporação no sistema resulta em um produto que não mais desempenha qualquer papel na via; ou por inibição de uma enzima-chave do metabolismo celular. São mais eficazes em células com alta fração de crescimento (LAZO; LARNER, 1997; BOENTE; SAMPAIO FILHO; DEL GIGLIO, 2002; CALLERY; GANNETT, 2002; THOMAS, 2003; BARROWS, 2004; BITTENCOURT; BRUNSTEIN, 2004).

O metotrexato, antagonista do ácido fólico fase S-específico, é o único antimetabólito do folato que está em uso clínico. Inibe competitivamente a diidrofolato redutase. É usado para tratar vários tipos de câncer, incluindo tumores da cabeça e do pescoço, câncer de mama, sarcomas, linfomas e tumores germinativos, e, em doses baixas, a artrite reumatóide. Pode causar vômito, náusea, ulceração oral e gástrica e depressão da medula óssea, assim como outros efeitos colaterais indesejáveis (BERTINO, 1992; WINKELSTEIN, 1992; BOENTE; SAMPAIO FILHO; DEL GIGLIO, 2002; THOMAS, 2003; BARROWS, 2004).

Os *inibidores da topoisomerase* são produtos naturais que compreendem os inibidores da topoisomerase I (os análogos da camptotecina) e os inibidores da topoisomerase II (epipodofilotoxinas) cujos efeitos citotóxicos levam à apoptose (SLICHENMEYER et al., 1993; STAKER et al., 2002; BITTENCOURT; BRUNSTEIN, 2004).

Os *agentes intercaladores* são medicamentos naturais, semi-sintéticos (oriundos de microorganismos) ou sintéticos, cujos representantes são daunorrubicina, doxorrubicina, idarrubicina, valrubicina e epirubicina (antraciclinas), mitoxantrona (antracenediona) e dactinomomicina. Intercalam-se entre os pares de bases da hélice do DNA, induzindo seu desenrolamento (RICHARDSON; JOHNSON, 1997).

Os *agentes que atuam nos microtúbulos, inibidores do fuso celular ou antimitóticos*, são agentes naturais, derivados de plantas. Compreendem alcalóides da vinca (*Catharanthus rosea*) e taxanos. Agem inibindo etapas de divisão do ciclo celular, através de inibição da formação de microtúbulos, interferindo no fuso mitótico (LAZO; LARNER, 1997; BOENTE; SAMPAIO FILHO; DEL GIGLIO, 2002; CALLERY; GANNETT, 2002; BARROWS, 2004; BITTENCOURT; BRUNSTEIN, 2004).

Há ainda os *agentes hormonais* (prednisona, tamoxifeno, flutamida, leuprolida, goserelina e outros), que agem atravessando a membrana citoplasmática e se ligando a receptores citoplasmáticos, resultando em alterações das reações fisiológicas ou bioquímicas; e vários *antibióticos* (como bleomicina, actinomicina D e mitomicina C), ciclo-específicos, que atuam danificando ou perturbando o DNA, interferindo nas topoisomerasas ou alterando a estrutura do DNA (LAZO; LARNER, 1997; BARROWS, 2004).

1.2 O processo inflamatório

A inflamação ou flogose é clinicamente definida como um processo patofisiológico inicial dos tecidos vivos diante de uma variedade de estímulos lesivos (como traumatismos e infecções) que leva ao acúmulo local de fluido plasmático e células sanguíneas. É caracterizada por vermelhidão (ou rubor), edema (ou tumor) e calor, além de dor e perda de função celular ou estrutural (SOSA et al., 2002; STEVENS; LOWE, 2002; WANNMACHER; FERREIRA, 2004a; HANSEL; DINTZIS, 2007). Esta resposta é relativamente inespecífica, ou seja, o padrão inicial é independente do agente ou do evento causal (STEVENS; LOWE, 2002; SILVERTHORN, 2003).

O rubor e a hipertermia da inflamação aguda são resultado da dilatação dos vasos e aumento do fluxo sanguíneo na região inflamada, e o edema inflamatório é provocado pelo acúmulo de líquido e células inflamatórias (exsudato) nos espaços intersticiais, particularmente dos componentes fluidos. A dor resulta de uma combinação de fatores incluindo a pressão nas terminações nervosas, pelo edema, e de um efeito direto de determinados fatores químicos liberados durante a resposta inflamatória. A perda da função, total ou parcial, na área inflamada, pode ser uma consequência direta da injúria ou secundária ao edema e dor marcantes provocados pelo próprio dano (STEVENS; LOWE, 2002; HANSEL; DINTZIS, 2007).

A resposta inflamatória aguda possui três funções principais: (1) facilitar o encaminhamento das defesas locais (células e moléculas) para supressão da infecção; (2) destruir e eliminar um agente causal infectante pelos componentes do exsudato, gerando uma barreira física para evitar a disseminação da infecção; e (3) reparar o tecido lesado (STEVENS; LOWE, 2002; ROMERO et al., 2006; HANSEL; DINTZIS, 2007). Consiste de uma liberação seqüencial de mediadores e do recrutamento de leucócitos circulantes, os quais se tornam ativados no sítio da injúria e liberam mais mediadores. Deve ser de vida curta e depende, acima de tudo, de um controle cuidadoso entre mediadores pró- e antiinflamatórios (CHANG; LEE; LIN, 2001; HANADA; YOSHIMURA, 2002; KORHONEN et al., 2005; RAISON; CAPURON; MILLER, 2006).

1.2.1 Momentos da inflamação

Os componentes básicos de um processo inflamatório consistem em eventos celulares e humorais interdependentes que culminam com a reparação do tecido e a restauração da função (CARVALHO, 2002). Logo, a inflamação pode ser resumida em injúria inicial (por agentes físicos,

químicos ou biológicos) que causa a liberação de mediadores inflamatórios – denominada fase irritativa; vasodilatação e aumento na permeabilidade vascular – fase vascular; exsudação plasmática e celular – fase exsudativa; e proliferação de células de tecido conectivo – fase reparativa (BORNE, 2002).

1.2.1.1 Fenômenos irritativos

Os fenômenos irritativos constituem um conjunto de modificações provocadas pelo agente inflamatório que resultam na liberação de mediadores químicos responsáveis pelos fenômenos subseqüentes da inflamação (PEREIRA, 2006).

Em nível molecular, ocorrem modificações na estrutura protéica devido à ação de enzimas líticas (proteases, esterases, collagenases) liberadas pela lesão tissular ou pela ruptura da membrana dos lisossomas, em consequência da ação de fagócitos. A alteração protéica é o ponto de partida para a ativação de uma série de sistemas que sintetizam e liberam vários mediadores, como histamina, serotonina, bradicinina, prostaglandinas, leucotrienos e vários fatores quimiotáticos (fator do complemento C5a, fator de ativação das plaquetas – PAF, leucotrieno B₄), além de várias citocinas (interleucina-1, interleucina-8, fator de necrose tumoral), responsáveis por vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, hiperalgesia, migração leucocitária e agregação plaquetária (KRAYCHETE, 2002a; WANNMACHER; FERREIRA, 2004a).

1.2.1.1.1 Mediadores da inflamação

Uma variedade de mediadores químicos endógenos, incluindo fatores imunológicos e quimiotáticos de diferentes fontes (leucócitos e plaquetas ativados, do metabolismo do ácido araquidônico como prostaglandinas e leucotrienos, das cascatas da coagulação e do complemento, etc.), tem sido reconhecida por exercer papéis importantes no processo inflamatório (BRODY, 1997; BORNE, 2002).

Os mediadores podem ser considerados de ação rápida, como as aminas vasoativas (histamina, serotonina), ou de ação prolongada (substâncias plasmáticas, citocinas e lipídeos ácidos).

1.2.1.1.1.1 Aminas vasoativas

A fase inicial da inflamação (1 – 1,5 horas) envolve a liberação de histamina e serotonina (LEE; KATAYAMA, 1992).

A histamina é encontrada na maioria dos tecidos do corpo, porém está presente em elevadas concentrações no pulmão, na pele e no trato gastrointestinal. Em nível celular é armazenada pré-formada em grânulos em mastócitos teciduais e basófilos sanguíneos, associada à heparina. É liberada dos mastócitos por exocitose durante as reações inflamatórias ou alérgicas, quando os componentes do complemento C3a e C5a interagem com receptores de membrana específicos ou quando o antígeno interage com IgE fixada a células; ou ainda, por meio de outros estímulos, como

substância P, poliaminas, citocinas, entre outros. A histamina promove vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, além de desempenhar um papel central na hipersensibilidade imediata e respostas alérgicas, secreção gastrointestinal e neurotransmissão (SIMONS; SIMONS, 1992; NELSON, 2002; RANG et al., 2004; WHITE, 2004).

A serotonina (5-hidroxitriptamina) é um dos principais neurotransmissores no cérebro e também está envolvida em uma gama de ações periféricas. Pode ser encontrada no sangue em altas concentrações nas plaquetas, que a acumulam a partir do plasma através de um sistema de transporte ativo, liberando-a quando sofrem agregação em locais de lesão tecidual. Funciona como mediador inflamatório e está envolvida na sensibilização de nociceptores e controle microvascular (GLENNON; DUKAT, 2002; RANG et al., 2004).

1.2.1.1.2 Substâncias plasmáticas

O plasma contém diversas cascatas de enzimas envolvidas na mediação da inflamação, compostas de uma série de proteases ativadas sequencialmente. São caracterizadas por um pequeno número inicial de proteínas que é amplificado a cada reação enzimática sucessiva. O sistema de cascata rapidamente produz uma grande resposta (HANSEL; DINTZIS, 2007). As substâncias plasmáticas podem ser divididas basicamente em: sistema do complemento, sistema das cininas, sistema de coagulação e sistema fibrinolítico.

O sistema do complemento é um componente do sistema de defesa do hospedeiro que auxilia na eliminação de vários microorganismos e antígenos do sangue e outros tecidos, e seu papel na inflamação é de considerável interesse (FRANK; FRIES, 1991; KINOSHITA, 1991; BORNE, 2002). Consiste em um grupo de cerca de 30 proteínas plasmáticas, normalmente presentes nos líquidos e nos tecidos corporais em sua forma inativa, que atuam em conjunto para atacar patógenos e induzir respostas inflamatórias, ajudando a combater a infecção (KIRSCHFINK, 1997; HANSEL; DINTZIS, 2007). Os fatores derivados do complemento participam dos fenômenos vasculares, adesão, quimiotaxia e ativação dos leucócitos e fagocitose (BORNE, 2002; KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

O sistema das cininas constitui uma cascata de enzimas que resulta na produção de diversos peptídeos vasoativos, através de proteases específicas chamadas caliceínas sobre substratos protéicos, denominados cininogênios. A ativação desse sistema resulta na liberação da bradicinina. Esta provoca vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e estimulação direta das terminações nervosas para a dor (ou, de forma indireta, por ativar a produção de outros mediadores como prostanóides e aminas simpáticas, que sensibilizam os neurônios nociceptivos simpáticos) entre outros efeitos (COUTURE et al., 2001; PETHO; DEROW; REEH, 2001; RANG et al., 2004).

O sistema de coagulação e a inflamação são processos que estão intimamente relacionados. Este sistema consiste numa cascata de enzimas proteolíticas e co-fatores. O principal evento consiste

na conversão do fibrinogênio solúvel em filamentos insolúveis de fibrina pela trombina (que participa da ativação dos sistemas do complemento e das cininas). Uma cascata fibrinolítica é iniciada concomitantemente com a de coagulação através de vários ativadores do plasminogênio (liberados do endotélio, leucócitos e outros tecidos), resultando na formação, dentro do coágulo, da plasmina, que digere a fibrina. Desta forma, o sistema fibrinolítico também contribui para os eventos vasculares durante a inflamação (RANG et al., 2004; KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

1.2.1.1.1.3 Citocinas

A resposta inflamatória é um processo dinâmico e complexo que envolve um balanço entre citocinas pró- e antiinflamatórias (DE DOOY; MAHIEU; VAN BEVER, 2001).

O termo *citocina* refere-se a fatores protéicos solúveis produzidos pelas várias células do sistema imunológico que influenciam o comportamento de outras células, coordenando a reposta imune (CAMPBELL, 2000; ROITT; RABSON, 2003). A maioria das células pode produzir citocinas, embora apresentem diferenças no repertório delas. Muitas citocinas são produzidas em sítios de inflamação (HANSEL; DINTZIS, 2007).

As citocinas podem ser classificadas em: interferons, interleucinas, quimiocinas, fatores de estimulação de colônias e fatores de necrose tumoral.

Os *interferons* (IFN) são citocinas que induzem células a resistirem à replicação viral (IFN- α e IFN- β) ou exercem um papel significativo na regulação da resposta imune específica, como o IFN γ , produzido quase que exclusivamente por células NK e certos subgrupos de células T ativadas (ABBAS; MURPHY; SHER, 1996; LYNCH et al., 2003; HANSEL; DINTZIS, 2007).

As *interleucinas* (IL) são polipeptídeos produzidos por leucócitos e que atuam intensamente em todas as fases da inflamação, participando do controle das células envolvidas com as respostas imunes específicas e inespecíficas. A interleucina-1 é um importante mediador na resposta inflamatória inicial por recrutar e ativar células inflamatórias e causar a liberação de outras citocinas (inclusive dela mesma), além de ativar células endoteliais, aumentar a expressão de moléculas de adesão, a atividade da fosfolipase e assim a biossíntese de prostaglandinas (BAYNES; DOMINICZACK, 2000; CALL et al., 2001; DE DOOY; MAHIEU; VAN BEVER, 2001; BORNE, 2002; ROITT; RABSON, 2003).

As *quimiocinas* compreendem uma família de fatores secretados por leucócitos e células endoteliais em resposta ao dano tecidual e a outros mediadores inflamatórios. São pequenas proteínas quimioatraentes que interagem fisicamente com os componentes da matriz extracelular, controlando a migração de leucócitos (LINDLEY; WESTWICK; KUNKEL, 1993; RANSOHOFF; GLABINSKI; TANI, 1996; MACKAY, 2001; STEVENS; LOWE, 2002; ROT; VON ANDRIAN, 2004; MANTOVANI; BONECCHI; LOCATI, 2006; HANSEL; DINTZIS, 2007).

Os *fatores estimuladores de colônias* (CSF) não apenas estimulam a proliferação de determinadas células progenitoras comprometidas, como também induzem diferenciação irreversível. O GM-CSF (fator de estimulação de colônias de granulócitos-macrófagos), que é produzido por muitos tipos de células, influencia pelo menos cinco das oito linhagens de desenvolvimento de células sanguíneas. O G-CSF (fator de estimulação de colônias de granulócitos) é produzido principalmente por monócitos, fibroblastos e células endoteliais e controla primariamente o desenvolvimento dos neutrófilos (RANG et al., 2004; HANSEL; DINTZIS, 2007).

O *fator de necrose tumoral* (TNF) é produzido por macrófagos e células T e pode ser citotóxico. O TNF e a IL-1 são as duas principais citocinas que participam do processo inflamatório, responsáveis pelas respostas sistêmicas da fase aguda (febre, perda de apetite, etc.) associadas a infecções ou traumas (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005; HANSEL; DINTZIS, 2007).

Todavia, as citocinas são mais comumente agrupadas em razão de seus principais efeitos ou papéis (BAYNES; DOMINICZACK, 2000).

As *citocinas pró-inflamatórias* estão envolvidas na resposta imune inicial, ajudando a guiar a eliminação dos patógenos e a resolução do processo inflamatório. As primárias incluem TNF- α e a IL-1. São liberadas por macrófagos e por muitas outras células, podendo desencadear uma cascata de citocinas secundárias, como as quimiocinas. Vários fatores de crescimento (por exemplo, fator de crescimento derivado de plaquetas, fator de crescimento dos fibroblastos, fator de crescimento endotelial vascular) são importantes nos processos de reparo e estão implicados na inflamação crônica (RANG et al., 2004; SCHULTZBERG et al., 2007).

As *citocinas antiinflamatórias* diminuem as funções celulares e a síntese de citocinas pró-inflamatórias. Incluem TGF- β (fator transformante do crescimento β), IL-4, IL-10 e IL-13. Essas citocinas podem inibir a produção de quimiocinas, e as três últimas têm a capacidade de inibir respostas mediadas por células Th1, isto é, as células cuja ativação inapropriada está envolvida em diversas doenças (RANG et al., 2004; SCHULTZBERG et al., 2007).

1.2.1.1.1.4 Lipídeos ácidos

Os mediadores lipídicos incluem prostaglandinas (PGs), tromboxanos (TXs) e leucotrienos (LTs), metabólitos inflamatórios derivados do ácido araquidônico pela ação das cicloxigenases e lipoxigenases, e o PAF. Este último atua como um potente vasodilatador, além de causar o aumento da permeabilidade vascular, da adesão leucocitária ao endotélio, quimiotaxia e síntese de outros mediadores (BORNE, 2002; RANG et al., 2004; WANNMACHER; FERREIRA, 2004a; KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005; PEREIRA, 2006; BLOEMEN et al., 2007).

Tanto os LTs quanto as PGs são liberados principalmente por células endoteliais e macrófagos e contribuem muito para os sintomas da inflamação. Os leucotrienos LTC₄, LTD₄ e LTE₄ causam intensa vasoconstrição, broncoespasmo e ampliam a permeabilidade vascular;

enquanto que o LTB_4 é um potente agente quimiotático e ativador das respostas dos neutrófilos, como agregação e adesão ao endotélio venular, geração de radicais livres e liberação de enzimas lisossomais (BRODY, 1997; KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

As PGs em geral são vasodilatadoras, promovendo o edema e a infiltração de leucócitos, e ainda sensibilizam as terminações nervosas periféricas à ação de histamina, bradicinina (exacerbando suas propriedades produtoras de dor) e outros mediadores liberados localmente quando da inflamação. Além disso, estimulam os centros hipotalâmicos de termorregulação (BRODY, 1997; ROBERTS II; MORROW, 2001; WANNMACHER; FERREIRA, 2004a; HOWLAND; MYCEK, 2006).

As PGs principais são: PGE_2 – produzida em muitos tecidos e especialmente em macrófagos, é vasodilatadora, controla a atividade de linfócitos (efeito imunossupressor) e tem efeito citoprotetor; PGI_2 (prostaciclina) – secretada pelo endotélio, é antiagregadora plaquetária e vasodilatadora; $PGF_{2\alpha}$ – vasoconstritora e aumenta a permeabilidade vascular; e PGD_2 – derivada particularmente dos macrófagos, é vasodilatadora e inibidora da agregação plaquetária. O TXA_2 , produzido nas plaquetas, é um potente agregante plaquetário e vasoconstritor (RANG et al., 2004; PEREIRA, 2006).

1.2.1.2 Fenômenos vasculares

Os fenômenos vasculares desempenham um papel importante na inflamação aguda. Normalmente as proteínas plasmáticas estão presas no interior dos vasos e se movem na direção do fluxo sanguíneo. Na inflamação, os vasos sanguíneos sofrem várias alterações que visam facilitar o movimento de proteínas plasmáticas e células sanguíneas da circulação para o local da lesão ou da infecção (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

Os eventos vasculares são representados por modificações hemodinâmicas e reológicas da microcirculação, comandadas pelos mediadores químicos (como histamina, substância P e bradicinina, entre outros) liberados durante os fenômenos irritativos e, menos frequentemente, por ação direta do agente flogógeno. Consistem em dilatação inicial das pequenas arteríolas, resultando em aumento do fluxo sanguíneo, seguido de redução, e a seguir, estase do sangue e aumento da permeabilidade das vênulas pós-capilares, com exsudação de líquido. A vasodilatação é produzida por diversos mediadores (histamina, PGE_2 , PGI_2 , etc.) formados em decorrência da interação do microorganismo com o tecido. Alguns desses mediadores (por exemplo, histamina, PAF, e citocinas) também são responsáveis pela fase inicial de aumento da permeabilidade vascular (FANTONE; WARD, 1999; RANG et al., 2004; PEREIRA, 2006).

Logo no início da vasodilatação, quando se inicia a fase de fluxo mais lento, os leucócitos deixam a região central da corrente sanguínea e começam a se deslocar na margem do fluxo (PEREIRA, 2006).

1.2.1.3 Fenômenos exsudativos

São fenômenos complexos e variados, conferindo às inflamações características próprias e muito utilizadas na sua classificação e nomenclatura. Constan da saída de elementos do sangue – plasma e células – do leito vascular para o interstício (do latim *exsudare*, passar através de). Embora independentes, em geral a exsudação plasmática precede a exsudação celular; e a predominância de uma ou da outra varia de caso para caso. A exsudação de leucócitos é o elemento mais característico das inflamações (PEREIRA, 2006).

A exsudação plasmática começa geralmente nas fases iniciais da hiperemia e continua durante o processo inflamatório. O exsudato líquido pode ser rico ou pobre em proteínas (inflamações fibrinosas e serosas, respectivamente), e a sua quantidade é muito variável (PEREIRA, 2006).

O exsudato inflamatório (**Figura 1**) é constituído basicamente de: *fluido* – contendo sais e uma alta concentração de proteínas, inclusive imunoglobulinas; *fibrina* – uma proteína filamentosa insolúvel; muitos *neutrófilos polimórficos*; poucos *macrófagos* e alguns *linfócitos*. Todos esses componentes são derivados do sangue como resultado das alterações que ocorrem nos vasos sanguíneos ao redor da área lesada (STEVENS; LOWE, 2002).

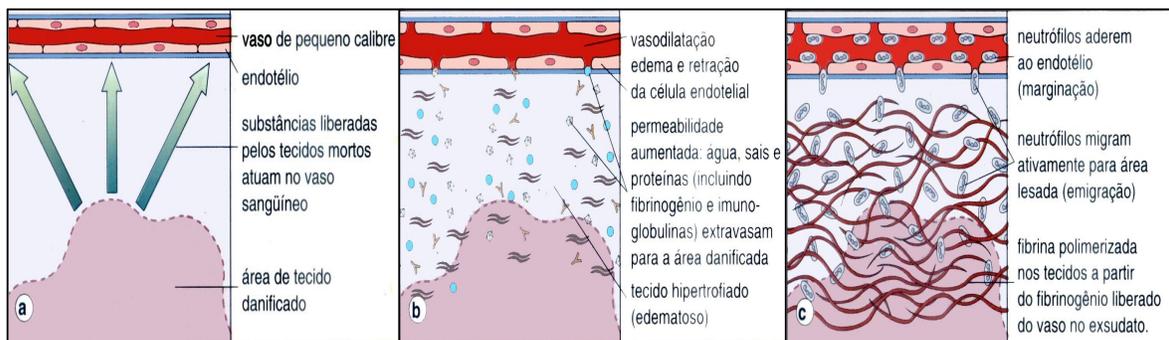


Figura 1 – Formação do exsudato inflamatório agudo. Fonte: Stevens e Lowe (2002).

1.2.1.4 Fenômenos celulares: extravasamento de leucócitos e fagocitose

Uma função crítica da inflamação é o encaminhamento de células especializadas à lesão e sua ativação para que desempenhem as funções normais de defesa do hospedeiro (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

Duas classes importantes de células interagem na inflamação aguda: *células inflamatórias derivadas de progenitores da medula óssea*, como os leucócitos e as plaquetas, que têm acesso à área de inflamação a partir do sangue; e *células tissulares* (células endoteliais, mastócitos e macrófagos teciduais), que estão normalmente presentes nos tecidos. Os leucócitos são células ativamente móveis, que podem ser divididas em duas classes: células polimorfonucleares (PMNs, ou granulócitos) – que incluem neutrófilos, eosinófilos e basófilos; e células mononucleares – monócitos e linfócitos (RANG et al., 2004; HANSEL; DINTZIS, 2007).

Os principais eventos celulares na inflamação aguda, todos induzidos por mediadores químicos, são: ativação do endotélio por produtos do dano tecidual e citocinas, permitindo a adesão dos leucócitos; ativação destes para favorecer suas funções de fagocitose, destruição de bactérias e geração de mediadores inflamatórios; desenvolvimento de motilidade ativa, de maneira direcionada, a partir dos vasos sanguíneos, para o local de lesão tecidual. Os neutrófilos são os principais mediadores dos efeitos da inflamação aguda (STEVENS; LOWE, 2002).

Na maioria das vezes, a inflamação é caracterizada pela infiltração imediata de um sítio específico ou lesão com PMNs, seguidos por monócitos e finalmente linfócitos. A sequência de eventos na jornada dos leucócitos do lúmen vascular para o tecido intersticial (extravasamento), pode ser dividida nas seguintes etapas: 1) marginação, captura e rolamento sobre o endotélio; ativação e adesão firme; 2) transmigração através das aberturas entre as células endoteliais (diapedese); e 3) migração nos tecidos intersticiais em direção ao estímulo quimiotático. Estes eventos dependem primeiramente de moléculas de adesão na superfície do endotélio e dos leucócitos, como as selectinas e integrinas e de citocinas quimioatraentes (JOHNSTON; BUTCHER, 2002; CUZZOCREA, 2005; KELLY; HWANG; KUBES, 2007).

Chegando ao local da lesão, inicia-se a eliminação do agente nocivo através da fagocitose e liberação de moléculas pelos leucócitos (principalmente neutrófilos) e macrófagos.

1.2.1.5 Fenômenos alterativos

Os fenômenos alterativos da inflamação (degenerações e necrose) são produzidos por ação direta ou indireta do agente inflamatório e podem aparecer no início ou no decurso da inflamação (PEREIRA, 2006).

1.2.1.6 Resolução da inflamação: fenômenos reparativos

É de se esperar que um sistema de defesa do hospedeiro tão potente, com sua capacidade inerente de causar dano tecidual, precise de um controle rígido para minimizar o dano. Instalada uma inflamação aguda, se o patógeno foi atacado adequadamente, a inflamação entra em declínio e pode ocorrer cura completa, com o tecido tornando-se praticamente normal. Se o patógeno persistir, é provável que a condição evolua para a inflamação crônica (SOSA et al., 2002; STEVENS; LOWE, 2002; RANG et al., 2004; KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005; HANSEL; DINTZIS, 2007).

O decréscimo da resposta inflamatória significa que, desaparecendo a irritação, diminui também a produção de mediadores, que, além disso, possuem uma meia-vida curta e são degradados após serem liberados. Em conseqüência, os fenômenos vasculares e exsudativos se reduzem (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005; PEREIRA, 2006).

No entanto, não é só a redução dos mediadores que leva ao término da inflamação. Durante o desenvolvimento da resposta inflamatória, há também a produção de mediadores antiinflamatórios, que aumentam à medida que o processo progride e atuam ativamente para terminar a reação. Esses

mecanismos ativos incluem uma mudança nos derivados do ácido araquidônico, de leucotrienos para as lipoxinas antiinflamatórias; a liberação de uma citocina antiinflamatória, o TGF- β , dos macrófagos e de outras células; e impulsos neurais (descarga colinérgica) que inibem a produção de TNF nos macrófagos. Desse modo, quando reduz a produção de mediadores pró-inflamatórios, aumenta a de antiinflamatórios naturais, que passam a inibir os fenômenos da inflamação. Além disso, a reação de fase aguda contribui com efeitos antiinflamatórios, especialmente pelas antiproteases e removedores de radicais livres (NATHAN, 2002; TRACEY, 2002; KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005; PEREIRA, 2006).

Geralmente a inflamação aguda pode ter um destes três resultados finais: *resolução completa* – que ocorre normalmente quando a lesão é limitada, de curta duração ou quando houve pouca destruição tissular e as células parenquimatosas danificadas podem ser regeneradas, restaurando a normalidade no local da inflamação; *cicatrização pela substituição do tecido conjuntivo (fibrose)* – ocorre após uma lesão tecidual considerável, quando a lesão inflamatória envolve tecidos incapazes de se regenerar, ou quando existe um abundante exsudato de fibrina; e *progressão da resposta tecidual à inflamação crônica* (STEVENS; LOWE, 2002; KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

1.2.2 O papel do óxido nítrico (NO)

Os macrófagos envolvidos na atividade imunológica contra patógenos nos hospedeiros além de eliminar agentes estranhos por fagocitose, também geram mediadores inflamatórios. Dentre estes, as espécies reativas de oxigênio, em particular o óxido nítrico (NO), iniciam uma gama de reações oxidativas tóxicas causando danos ao tecido (LASKIN; PENDINO, 1995; BOGDAN, 2001; REIS et al., 2001).

O NO é uma molécula pequena, eletricamente neutra, produzida *in vivo* numa variedade de tecidos pela enzima óxido nítrico sintase (*nitric oxide synthase*, NOS) durante a transformação catalítica da L-arginina em citrulina. Três isoformas de NOS têm sido identificadas: a neuronal (nNOS) e a endotelial (eNOS), as quais são constitutivamente expressas em neurônios e no endotélio, gerando baixas concentrações de NO; e a NOS induzível (iNOS), a qual é estimulada por produtos bacterianos ou citocinas inflamatórias (BOGDAN, 2001) e expressa nos macrófagos nas formas citosólica e associada à membrana, resultando na produção contínua de NO em altas concentrações (REIS et al., 2001; CHI et al., 2003; THOMAS, 2003). O NO está envolvido no controle da pressão arterial, na transmissão dos impulsos nervosos e no sistema imune (CAMPBELL, 2000; THOMAS, 2003).

Essas formas da NOS refletem dois modos gerais de ação distintos do NO. Com nNOS e eNOS, são produzidos pulsos de NO que transmitem a mensagem às células-alvo sem lesão para as outras células. Com a iNOS, a enzima é responsável pela produção contínua de NO em concentrações suficientes para lesar e matar as células que podem ou não ser benéficas ao

organismo. Por exemplo, as células imunes ativadas produzem quantidades de NO que são letais para células-alvo nocivas, tais como aquelas encontradas no câncer e parasitas invasores, mas a produção excessiva do NO já foi associada à morte das células pancreáticas β no diabetes melitus insulino-dependente (THOMAS, 2003).

O NO possui uma vida biológica curta, sofrendo metabolismo rápido em nitrato, nitrito e outras espécies. Essa vida curta significa que o óxido nítrico não é capaz de se difundir ao longo de qualquer distância através do sistema antes que ocorra uma diminuição significativa de sua concentração. Como resultado, seus alvos devem estar próximos à sua fonte (STEVENS; LOWE, 2002; THOMAS, 2003).

A produção excessiva destas espécies reativas no processo inflamatório e em muitos processos patológicos (LASKIN; PENDINO, 1995; BOGDAN, 2001) pode danificar biomoléculas celulares como ácidos nucleicos, proteínas, carboidratos e lipídios, causando dano celular e tecidual, o que por sua vez aumenta o estado da inflamação (COCHRANE, 1991). Portanto, compostos que possuem a capacidade de “limpar” estes radicais – suprimindo em particular o NO – podem assim apresentar potencial terapêutico para muitas doenças inflamatórias (TRENAM; BLAKE; MORRIS, 1992; PARK et al., 2006).

1.2.3 Os agentes antiinflamatórios e seus mecanismos de ação

Os agentes farmacológicos que inibem a resposta inflamatória aguda ou crônica pertencem a dois grandes grupos: drogas antiinflamatórias não-esteroidais (AINE, ou em inglês, NSAID – non-steroidal antiinflammatory drugs), cujo protótipo é a aspirina; e as drogas antiinflamatórias esteroidais (SAID – steroidal antiinflammatory drugs) cujo protótipo é a hidrocortisona (LEE; KATAYAMA, 1992; WANNMACHER; FERREIRA, 2004a).

1.2.3.1 Antiinflamatórios não-esteróides

Os antiinflamatórios não-esteroidais (AINEs) constituem um grupo de fármacos com estrutura química variada que exercem atividade analgésica, antipirética, antitrombótica, uricosúrica e antiinflamatória (COSSERMELLI; PASTOR, 1995).

Sua ação redutora de inflamação decorre da inibição da síntese de prostaglandinas na periferia e no sistema nervoso central (SNC) e tromboxano, efetuada mediante a inativação das cicloxigenases (COX). A COX-1 (constitutiva) é benéfica na manutenção renal e do trato gastrointestinal por estimular a secreção de bicarbonato e muco e reduzir a secreção de ácido. Já a COX-2 (induzível) pode ser induzida por citocinas no músculo liso, fibroblastos e células epiteliais, surgindo nos sítios inflamatórios. A inibição da COX-1 é, pelo menos em parte, responsável por alguns efeitos adversos dos AINEs, como as toxicidades renal e gastrointestinal. A COX-2 atualmente é alvo de diversas pesquisas na busca de antiinflamatórios específicos para esta enzima, visando reduzir os efeitos adversos supracitados (VANE; BOTTING, 1995; BRODY, 1997;

BOTTING, 1999; CHEER; GOA, 2001; ROBERTS II; MORROW, 2001; BORNE, 2002; KRAYCHETE, 2002a; HANSON, 2004).

Os AINEs diferem entre si quanto à farmacocinética, potência antiinflamatória e efeitos colaterais. Em sua maioria são substâncias ácidas que atuam onde o pH é baixo (rins, estômago, lesões inflamatórias) e produzem uma injúria primária devido ao dano ácido direto e uma difusão de íons hidrogênio. A injúria secundária resulta da inibição da biossíntese de prostaglandinas no trato gastrointestinal. Estes dois níveis de injúria levam ao dano gástrico (COSSERMELLI; PASTOR, 1995; TEIXEIRA; VALLE, 2001; BORNE, 2002).

Podem ser devidamente classificados, de acordo com a seletividade para inibição das COX em: inibidores seletivos da COX-1 (aspirina), inibidores não-seletivos da COX-1 (indometacina, piroxicam, diclofenaco, ibuprofeno, nabumetona), inibidores seletivos da COX-2 (meloxicam, etodolaco, nimesulida) e inibidores altamente seletivos da COX-2, como celecoxib, rofecoxib entre outros (KRAYCHETE, 2002a).

Pelo bloqueio da atividade da cicloxigenase, os salicilatos e AINEs correlatos previnem a formação dos endoperóxidos e dos subseqüentes metabólitos das prostaglandinas. A via da lipoxigenase, que transforma o ácido araquidônico em leucotrienos, é inibida por diclofenaco e indometacina, porém não pelos salicilatos (BRODY, 1997; ROBERTS II; MORROW, 2001; BORNE, 2002).

1.2.3.2 Antiinflamatórios esteróides

Os corticosteróides são uma classe de hormônios adrenais que pode ser dividida em dois grupos: os glicocorticóides (cuja atividade está relacionada aos carboidratos) e os mineralocorticóides (relacionados à regulação de eletrólitos). Destes, apenas os glicocorticóides apresentam atividade antiinflamatória.

Os glicocorticóides sintéticos (betametasona, dexametasona, cortisona, etc.) mimetizam ações do cortisol endógeno, atuando através da ligação a um receptor citoplasmático específico para glicocorticóides. São os mais eficazes antiinflamatórios disponíveis, apresentando ainda ação imunodepressora. Promovem melhora sintomática de uma série de manifestações clínicas, sem afetar a evolução da doença básica. Ao lado dos esperados benefícios, há risco de potenciais efeitos adversos, observados numa variedade de tecidos orgânicos, na dependência de doses empregadas e, sobretudo, da duração do tratamento (MARGIORIS; GRAVANIS; CHROUSOS, 1997; WANNMACHER; FERREIRA, 2004b; HOWLAND; MYCEK, 2006).

Exercem sua ação analgésica e antiinflamatória impedindo a liberação de ácido araquidônico da membrana das células lesadas (pela inibição das fosfolipases), diminuindo também a transcrição de alguns genes responsáveis pela expressão de algumas citocinas, ou ainda pela inibição de funções específicas de linfócitos e alteração em grau de fibrose (CHROUSOS, 1995; BORNE, 2002;

COCICOV et al., 2004; WANNMACHER; FERREIRA, 2004b; HOWLAND; MYCEK, 2006); afetando nitidamente elementos e etapas da reação inflamatória. Além disso, inibem múltiplos sítios do sistema imunitário, interferindo tanto na imunidade humoral quanto na celular (WANNMACHER; FERREIRA, 2004b).

1.3 O complexo fenômeno da dor

A dor é uma condição complexa, muitas vezes de etiologia indefinida, com valor biológico fundamental. Sem dor seria impossível a vida normal; ela funciona como um mecanismo de defesa, sendo uma resposta adaptativa e protetora ao estresse ambiental. Porém é um sintoma desagradável e individual, causando limitações, incapacidade e sofrimento, afetando tanto o físico quanto o psíquico (SILVA; MORAES, 2000; TEIXEIRA; SOUZA, 2001; SILVERTHORN, 2003).

O comitê de taxonomia da Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) conceitua a dor como *uma experiência sensorial e emocional desagradável, que é associada ou descrita em termos de lesões teciduais* (WALL; MELZACK, 1994; PRADO, 2001). Entretanto, muitas vezes, manifesta-se mesmo na ausência de agressões teciduais vigentes, envolvendo aspectos emocionais, psicológicos e comportamentais da percepção da dor (SMITH, 1992a; TEIXEIRA, 2001a; HANSON, 2004; WANNMACHER; FERREIRA, 2004c).

Os estímulos e as condições que causam a dor podem variar e dependem em parte do tecido específico e da natureza, intensidade e duração do estímulo. Em geral, os estímulos que são percebidos como dolorosos têm o potencial de causar dano aos tecidos (SMITH, 1992a).

Associada à lesão tecidual prolongada ou processo degenerativo de origem central ou periférica, a dor resulta de múltiplas e complexas modificações em vias nociceptivas, incluindo desde alterações de excitabilidade de fibras nervosas aferentes até mudanças de fenótipo celular, estrutura neural, sinapses e expressão de novas moléculas, incluindo enzimas, neurotransmissores e receptores. Alterações estruturais, particularmente após lesões de nervos periféricos, também podem ser vistas, incluindo perda de interneurônios medulares, rearranjo inadequado de processos nervosos aferentes na medula espinhal e proliferação de fibras simpáticas em gânglios sensitivos. A ocorrência dessa multiplicidade de processos não é uniforme, dependendo de tecido lesado, envolvimento de tipos específicos de fibras aferentes e participação do sistema imune (PLEUVRY; LAURETTI, 1996; MACFARLANE et al., 1997; FERREIRA; TORRES, 2004).

1.3.1 Os principais tipos de dor

Essencialmente, devemos reconhecer dois tipos de dor: a aguda e a crônica (PRADO, 2001).

A *dor aguda* ou *fisiológica* resulta da estimulação nociva intensa ou potencialmente injuriante, é bem localizada, e tem curta duração quando não ocorre dano tecidual, frequentemente esvaecendo-se sem que medidas especiais sejam adotadas. Geralmente é causada por processos identificáveis, sejam inflamatórios, espásticos ou isquêmicos. O papel dessa dor é simples, mas

importante, como sinal de alerta, indicando perigo, risco, já que informa ao corpo sobre o perigo potencial e, via de regra, inicia respostas reflexas de retirada do segmento corporal da fonte do estímulo nocivo. É funcionalmente garantida por NAPs (neurônios aferentes primários) especializados, capazes de codificar o estímulo nocivo quanto à sua modalidade, intensidade, duração e localização (BROWN; BOTTOMLEY, 1990; TURK; MELZACK, 1992; PRADO, 2001).

Já a *dor crônica*, ou *patológica*, ocorre em resposta à lesão tecidual e é caracterizada pela sensação de dor em resposta a estímulos normalmente inócuos ou mesmo pela ocorrência de dor espontânea, persistindo por mais tempo do que o esperado para a cura da lesão. Muitas vezes apresenta etiologia incerta, não desaparece com o emprego dos procedimentos terapêuticos convencionais e é causa de incapacidades e inabilidades prolongadas. Representa um fenômeno de *sensibilização nociceptiva*, com redução do limiar à dor (alodinia), amplificação da resposta a estímulos nocivos (hiperalgesia) e sensação de dor prolongada após estimulação (hiperpatia). Mesmo a dor crônica possui uma fase aguda, geralmente associada a dano tecidual e inflamação. Na fase crônica, a dor está geralmente associada a alterações ou danos ao tecido nervoso, caracterizando-se a *dor neuropática*, comum especialmente em idosos. Nesta condição, a dor aparentemente perde qualquer função adaptativa e torna-se de fato patológica (BROWN; BOTTOMLEY, 1990; FEUERSTEIN; HICKEY, 1992; PLEUVRY; LAURETTI, 1996; MACFARLANE et al., 1997; WOOLF; MARNION, 1999; FERREIRA, 2001; PERISSINOTTI, 2001; PRADO, 2001; TURK; OKIFUJI, 2001; MCQUAY, 2002; FERREIRA; TORRES, 2004).

Segundo Wannmacher e Ferreira (2004c), a dor pode ser classificada, ainda, segundo critérios topográficos (localizada e generalizada; tegumentar e visceral), fisiopatológicos (orgânica e psicogênica) e de intensidade (leve, moderada e intensa).

1.3.2 Nociceção: a percepção da dor

A *nociceção* é um fenômeno subjetivo que pode variar através das dimensões de intensidade e severidade, duração, qualidade (aguda, sutil, em queimação, etc.), frequência, recorrência, padrão e localização (SMITH, 1992a). Refere-se à percepção e à resposta do corpo à dor, ou seja, é atividade do sistema nervoso aferente, induzida por estímulos nocivos, tanto exógenos (mecânicos, químicos, físicos e biológicos) quanto endógenos (inflamação, aumento de peristaltismo, isquemia tecidual). Sua recepção em nível periférico se dá em estruturas específicas denominadas *nociceptores* (PRADO, 2001; WANNMACHER; FERREIRA, 2004c).

Os nociceptores (do latim *nocere*, machucar) são estruturas responsáveis pela sensação periférica inicial do fenômeno doloroso. Representam as terminações livres do axônio periférico do NAP, e muitos deles são “silenciosos” em condições normais, sendo ativados apenas em condições patológicas (por exemplo, em processos inflamatórios). Estão localizados em todo o corpo (superfície cutânea e mucosa), exceto no cérebro e tecido ósseo, e existem desde o início da sexta

semana, o que se pressupõe *sensações dolorosas primitivas*, mesmo nos fetos no início da gestação (REDBURN; DAHL, 1998; CORDEIRO; COELI, 2000; PRADO, 2001; TEIXEIRA, 2001b).

São classificados conforme o tipo de estímulo capaz de ativá-los e as características da resposta. Os *mecanonociceptores* (ou mecanorreceptores) são nociceptores A δ de alto limiar, normalmente responsivos apenas a estímulos mecânicos nocivos intensos, mas a aplicação repetitiva de estímulos térmicos nocivos é capaz de sensibilizá-los. Os *nociceptores polimodais* (tipo C) representam cerca de 95% das unidades sensoriais da pele humana e respondem a estímulos nocivos mecânicos, térmicos ou químicos. Os *nociceptores para o frio* (tipo A δ ou C) são sensíveis à intensa estimulação nociva provocada por baixas temperaturas. Os *quimiorreceptores* são particularmente sensíveis a agentes irritantes em potencial, como altos níveis de potássio, extremos no pH do tecido, bradicinina e histamina (CAMPBELL et al., 1989; REDBURN; DAHL, 1998; CORDEIRO; COELI, 2000; PRADO, 2001).

Os nociceptores são os únicos dentre os receptores sensoriais cuja sensibilidade a estímulos aumenta depois que o tecido na área próxima à terminação nervosa tenha sido danificado, num processo chamado *hiperalgesia primária*, que ocorre no sítio da injúria. Mudanças podem também ocorrer em neurônios do SNC, como exibição de limiares diminuídos, e/ou aumento do tamanho do campo receptivo (*hiperalgesia secundária*). Tanto a hiperalgesia primária quanto a secundária estão ligadas a uma liberação maior que o normal de substâncias neuroativas que sensibilizam receptores sensoriais próximos ou neurônios centrais (REDBURN; DAHL, 1998).

Os gânglios da raiz dorsal, onde se encontram os corpos celulares dos NAPs, sintetizam diversas substâncias com potencial para atuar como neurotransmissores ou neuromoduladores da dor. A partir do corpo celular do NAP, estas substâncias podem ser transportadas tanto para o ramo periférico quanto para o ramo central do NAP, exercendo papel na dor tanto periférica quanto centralmente. Substância P, glutamato, neurocinina A, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), colecistocinina (CCK), nociceptina e peptídeo intestinal vasoativo (VIP) são substâncias produzidas no gânglio da raiz dorsal e capazes de estimular células espinhais nociceptivas. Peptídeos opióides (encefalinas e dinorfinas), somatostatina e galanina são também produzidos no gânglio da raiz dorsal, mas possuem predominantemente ação inibitória sobre células nociceptivas espinhais (PRADO, 2001).

Os terminais periféricos dos NAPs (nociceptores) são sensibilizados pela ação de substâncias químicas, denominadas algio gênicas, presentes no ambiente tecidual. Entre elas destacam-se a bradicinina (receptores tipo B₂), prostaglandinas dos tipos I₂ (prostaciclina) e E₂, opióides (receptores tipos μ e δ), histamina, serotonina, noradrenalina (receptor tipo β_2), tromboxano, substância P, interleucinas e acetilcolina, substâncias que podem ser liberadas em tecidos lesados durante a inflamação, o que acaba por facilitar a geração local de estímulos, chamada de fenômeno

de *hipersensibilização* ou *hiperalgesia periférica* (CAMPBELL et al., 1989; CORDEIRO; COELI, 2000; PRADO, 2001; TEIXEIRA, 2001b; SILVERTHORN, 2003).

1.3.3 A condução do estímulo doloroso

Segundo Teixeira (2001c), em condições normais, a informação sensorial é captada pelas estruturas do sistema nervoso periférico (SNP) e transmitida para unidades do SNC, onde é decodificada e interpretada (**Figura 2**).

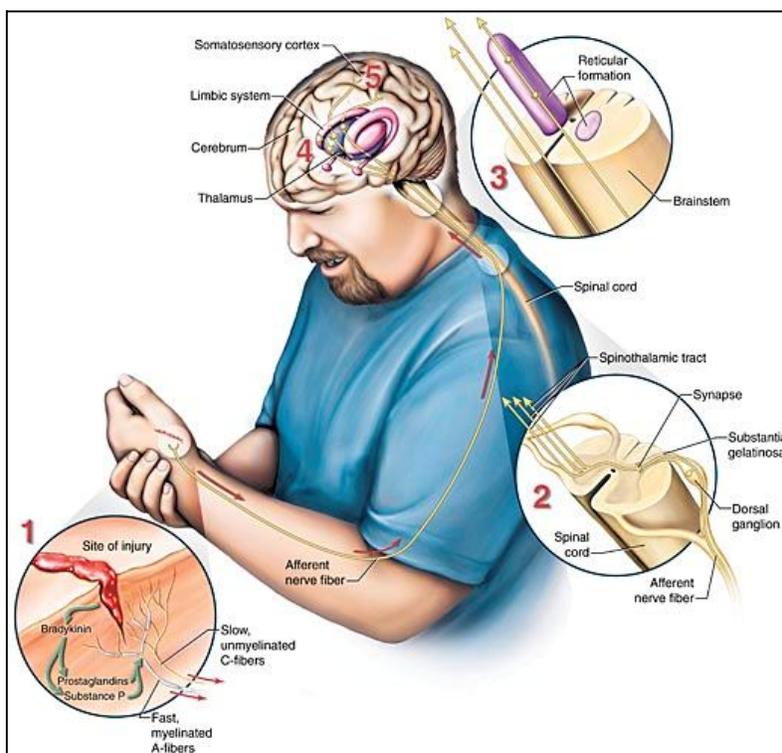


Figura 2 – Transmissão neurológica do estímulo doloroso. Fonte: Hamilton (2007), ilustração de Jason McAlexander. Copyright © Wild Iris Medical Education.

Os fenômenos apreendidos pelos nociceptores são traduzidos como atividade elétrica e levados às terminações nervosas periféricas, sendo conduzidos até o gânglio da raiz dorsal. A partir desse gânglio, a informação continua sendo conduzida até a medula espinhal, ao longo do axônio central do NAP (CORDEIRO; COELI, 2000; PRADO, 2001). Estes impulsos, além de informar sobre todos os componentes da dor, ativam também estruturas cerebrais capazes de modular a passagem de novos impulsos nociceptivos do NAP para células espinhais (PRADO, 2001).

Os estímulos dolorosos são transmitidos por vias aferentes que penetram no SNC (onde se tornam uma sensação consciente) por dois sistemas de fibras. As fibras sensitivas denominadas A δ (A-delta, pequenas e pouco mielinizadas, de condução rápida) e C (pequenas e amielínicas, de condução mais lenta) são representantes do SNP e levam o estímulo nervoso até a medula espinhal

(DEWEY; BRASE; WELCH, 1997; GANONG, 1998; CORDEIRO; COELI, 2000; SILVERTHORN, 2003).

As fibras A δ , que correspondem à *via neoespino-talâmica* (somatotópica, filogeneticamente mais recente e constituída pelo trato espino-talâmico lateral), são responsáveis pela sensação da dor primária, rápida, às vezes denominada *dor somática* (descrita como uma sensação intensa aguda, penetrante, cortante ou em ferroadada, e localizada). Possuem um limiar alto (isto é, exigem um poderoso estímulo mecânico) e penetram na medula espinhal através do corno dorsal (DEWEY; BRASE; WELCH, 1997; CORDEIRO; COELI, 2000; SILVERTHORN, 2003; MACHADO, 2006).

As fibras C, correspondentes à *via paleoespino-talâmica* (não-somatotópica, mais antiga, constituída pelo trato espino-reticular e as fibras reticulo-talâmicas), são responsáveis pela sensação de dor secundária, lenta, às vezes denominada *visceral* (difusa e espalhada, constante, ardida, em queimação), a qual persiste mesmo após o cessar do estímulo doloroso. São polimodais (isto é, medeiam estímulos mecânicos, térmicos e químicos). Essas fibras C também penetram na medula espinhal através do corno dorsal (DEWEY; BRASE; WELCH, 1997; CORDEIRO; COELI, 2000; SILVERTHORN, 2003; MACHADO, 2006).

Na medula espinhal, a informação dolorosa caminha rapidamente para a substância gelatinosa no corno dorsal, cruza para o lado oposto da medula, onde ascende em direção ao cérebro através dos tratos espino-talâmicos até o tálamo e outros centros, como a formação reticular, o sistema límbico e o córtex somatossensorial, onde o sinal é interpretado e inicia-se a modulação da dor (GARRISON, 1990; CORDEIRO; COELI, 2000; WANNMACHER; FERREIRA, 2004c). Contudo, há reflexos que não exigem integração no encéfalo, sendo denominados *reflexos medulares* (SILVERTHORN, 2003).

De acordo com Wannmacher e Ferreira (2004c), toda a atividade nervosa está vinculada à presença de neurotransmissores e neuromoduladores, tanto nas vias aferentes (substância P, GABA, colecistocinina, somatostatina, encefalinas) quanto nas eferentes (acetilcolina, dopamina, noradrenalina, serotonina e encefalinas).

1.3.4 Modulação da dor: vias da analgesia

Nossa percepção da dor está sujeita à modulação em vários níveis do sistema nervoso. Uma vez percebida, o cérebro realiza sua modulação, mediante vias eferentes inibitórias e liberação de neuromoduladores como os opióides endógenos, ou ainda, a dor é modulada antes mesmo de ser percebida pelo cérebro (SILVERTHORN, 2003; WANNMACHER; FERREIRA, 2004c).

Vários peptídeos opióides endógenos e receptores opióides relacionados à regulação da dor já foram identificados. Estes peptídeos são ligantes naturais para receptores específicos, produzidos naturalmente pelo organismo, e compreendem três grandes famílias: as encefalinas, as endorfinas e

as dinorfinas (GUTSTEIN; AKIL, 2001; KRAYCHETE, 2002b; FERREIRA; HIDALGO; CAUMO, 2004).

Os opióides endógenos exercem sua ação analgésica nos sítios espinhal e supraespinhal. Eles também produzem analgesia por um mecanismo periférico de ação associado com o processo inflamatório. No SNC, exercem uma ação neuromodulatória ou de neurotransmissão inibitória (hiperpolarizando as membranas celulares pré- ou pós-sinápticas, levando à menor liberação de neurotransmissores excitatórios como acetilcolina, norepinefrina, dopamina, serotonina e substância P na fenda sináptica) nos neurônios aferentes sinalizadores da dor no corno dorsal da medula espinhal e nas vias neuronais interconectadas para sinais dolorosos dentro do cérebro (FRIES, 2002; KRAYCHETE, 2002b).

Os sistemas de controle da dor descem pela medula espinhal através do funículo dorsolateral até o corno dorsal, onde inibem os neurônios que são ativados por estímulos nociceptivos. Os centros superiores conectados a esses sistemas descendentes incluem a região cinzenta periaquedutal e várias sub-regiões do bulbo. Estas regiões contêm receptores opióides e a capacidade da morfina de inibir a percepção dos estímulos nociceptivos pode envolver a ativação dessas vias descendentes (DEWEY; BRASE; WELCH, 1997).

A dor pode também ser suprimida no lado dorsal da medula espinhal antes que o estímulo seja enviado para os tratos ascendentes da medula espinal. Normalmente, os interneurônios estão tonicamente ativos dentro da medula, inibindo as vias ascendentes para a dor. As fibras C que partem da sinapse dos nociceptores estão sobre os neurônios inibitórios. Quando ativadas por um estímulo doloroso, as fibras C simultaneamente excitam as vias ascendentes e bloqueiam a inibição tônica. Essa ação permite que o sinal da dor vindo da fibra C viaje livremente para o encéfalo (SILVERTHORN, 2003).

Na *teoria da passagem* da modulação da dor, os neurônios A β e A δ provenientes dos receptores somáticos não irritáveis também fazem sinapse com os neurônios inibitórios, aumentando assim a atividade dos mesmos. Se um estímulo simultâneo chega aos neurônios inibitórios vindo das fibras A e C, a resposta integrada é uma inibição parcial da via ascendente da dor. Assim, a dor percebida pelo encéfalo é menor (SILVERTHORN, 2003).

1.3.5 Os agentes analgésicos e seus mecanismos de ação

Vários procedimentos podem contribuir para reduzir a dor e o sofrimento. A avaliação das características da dor é fundamental para a instalação das medidas terapêuticas apropriadas (TEIXEIRA, 2001d).

O tratamento da dor aguda e da crônica é multimodal e envolve o uso de intervenções farmacológicas, psíquicas, físicas, a utilização de bloqueios anestésicos regionais e métodos neurocirúrgicos (KRAYCHETE, 2002a).

Realiza-se *analgesia* quando se atinge um estado em que o indivíduo não sente mais dor, através da interrupção dos impulsos nociceptivos (BATISTETTI, 2001; WANNMACHER; FERREIRA, 2004c). Já a *anestesia* significa, literalmente, a perda da sensação dolorosa e de outras sensações, associada à perda de consciência (anestesia geral) ou não (anestesia local) (SMITH, 1992b; SUNG; HOLTZMAN, 1997; BEATTIE, 2001; FRIES, 2002; JOHNSON, 2004; WANNMACHER; FERREIRA, 2004c).

Várias classes de fármacos são utilizadas na prevenção e no tratamento da dor, dependendo da intensidade, duração e da natureza do estímulo doloroso (DEWEY; BRASE; WELCH, 1997; TEIXEIRA; VALLE, 2001). Incluem não apenas analgésicos opióides, mas também anestésicos locais, anestésicos gerais, AINEs (aspirina, acetaminofeno, ibuprofeno, etc.) e medicamentos adjuvantes (FOLEY; MACALUSO, 1992; PATT, 1992; SMITH, 1992a).

1.3.5.1 Analgésicos opióides

Analgésicos opióides (morfina, codeína, metadona, fentanil, etc.), historicamente chamados analgésicos narcóticos, são fármacos que mimetizam a ação dos peptídeos opióides endógenos quando da ligação aos receptores específicos. Desde o início da civilização, têm sido um dos compostos mais importantes para o alívio das dores agudas e crônicas (DEWEY; BRASE; WELCH, 1997; FRIES, 2002; KRAYCHETE, 2002b; SMITH, 1992a; FERREIRA; HIDALGO; CAUMO, 2004; HANSON, 2004). Os opióides podem ser classificados como agonistas, agonistas-antagonistas e antagonistas, diferindo nos mecanismos de ação e ações farmacológicas de acordo com o receptor e suas características (HOUDE, 1979; FERRER-BRECHNER; GANZ, 1984; PATT, 1992; SPIEGEL, 2001; CARVALHO, 2002; KRAYCHETE, 2002b).

De uma forma geral, o efeito analgésico relaciona-se com depressão de mecanismos centrais envolvidos na nocicepção (redução da transmissão medular de impulsos periféricos e reforço dos sistemas eferentes inibitórios) e, sobretudo, com a interferência na interpretação afetiva da dor, pois também atuam no sistema límbico (HOUDE, 1979; FERRER-BRECHNER; GANZ, 1984; FOLEY; MACALUSO, 1992). Há inibição direta da transmissão ascendente da informação nociceptiva, a partir do corno dorsal da medula espinhal, redução da liberação dos neurotransmissores pelas terminações das fibras C e ativação de circuitos de controle de dor que descendem para a medula (GUTSTEIN; AKIL, 2001; SAKATA, 2001). Também se propõem ações analgésicas periféricas para esses fármacos (FERREIRA; HIDALGO; CAUMO, 2004).

1.3.5.2 Analgésicos não-opióides: AINEs

Os *analgésicos não-opióides* têm propriedades analgésica, antitérmica e antiinflamatória relacionadas à inibição das COX; e não apresentam o risco do vício. São indicados para dores leves ou moderadas, associadas ou não à reação inflamatória periférica, com a vantagem de induzir efeitos

adversos menos graves que os opióides (PRESCOTT, 2000a; 2000b; FERREIRA; WANNMACHER, 2004; HANSON, 2004).

A inibição da atividade das COX pode resultar em acúmulo de ácido araquidônico e desvio dessa substância para metabolismo pelas lipoxigenases e epoxioxigenases. Isso provocaria alterações nos níveis de metabólitos não-prostanóides que podem estar envolvidos no processo nociceptivo. Outros autores, entretanto, sugerem que os AINEs ao aumentarem os níveis de ácido araquidônico facilitariam o impulso nociceptivo através da liberação de neuromediadores pré-sinápticos (glutamato). Por outro lado, a literatura relata que o aumento do 12-HPETE pode produzir depressão sináptica e analgesia (KRAYCHETE, 2002a).

O fato de existirem agentes (como acetaminofeno) que inibem fracamente ou não interferem na atividade das prostaglandinas, mas que possuem ação analgésica, evitando a hiperalgesia, fortalece a hipótese de que existem outros mecanismos de ação para os AINEs, provavelmente relacionados à inibição da hiperexcitabilidade neuronal central e periférica durante a transmissão nociceptiva, sinérgica aos agonistas alfa-2 e opiáceos (GEBHART; MCCORMACK, 1994; KRAYCHETE, 2002a; BASSANEZZI; OLIVEIRA FILHO, 2006).

É possível, ainda, que os AINEs atuem na membrana plasmática, alterando a viscosidade e a conformação da subunidade alfa da proteína G. Isso interfere no processo decorrente da ação de neurotransmissores excitatórios (aspartato, glutamato, substância P) em receptores metabotrópicos (mGlu) e a coativação de receptores ionotrópicos (NMDA, AMPA, cainato), alterando a atuação da fosfolipase C sobre segundos mensageiros ($PIP_2 - IP_3 - DAG - PKC$) necessários para o aumento do fluxo intracelular de cálcio e a atuação da fosfolipase A_2 . A fosfolipase A_2 levaria ao aumento das prostaglandinas espinhais e NO, que iniciam e perpetuam o processo de sensibilização medular à dor. Outra possibilidade é que os AINEs podem interferir na beta-oxidação do ácido palmítico, competindo pela cadeia longa da acil-CoA sintetase. O palmitoil-CoA regula a atividade da glutaminase que indiretamente modula a síntese do glutamato. A redução da concentração do glutamato no SNC diminui a transmissão da dor (KRAYCHETE, 2002a).

Com relação à ação sobre as vias descendentes inibitórias da dor, existem relatos de que os AINEs provoquem analgesia devido ao aumento dos níveis centrais de dopamina. Essa substância regularia a atividade da glutamato-alfa descarboxilase, que é uma enzima que catalisa a formação do GABA através do glutamato, afetando, assim, as vias gabaérgicas inibitórias. Outra possibilidade descrita para explicar a inibição da dor a nível central seria a elevação dos níveis de serotonina e noradrenalina, agentes que interferem na permeabilidade da membrana celular aos íons potássio e cloro. Esse efeito é decorrente da ação competitiva dos AINEs sobre os sítios de ligação do triptofano ou peptídeos precursores das proteínas circulantes (KRAYCHETE, 2002a).

Apesar da dipirona e do acetaminofeno (paracetamol) serem as medicações analgésicas e antipiréticas mais populares, apresentam pouca eficácia como antiinflamatórios nas doses

terapêuticas, e seus mecanismos de ação permanecem controversos (ROBERTS II; MORROW, 2001; BASSANEZI; OLIVEIRA FILHO, 2006). Alguns estudos sugerem que a inibição da COX-2 ou ainda a sensibilidade diferenciada das enzimas em diferentes tecidos possam explicar seus efeitos farmacológicos (BRODY, 1997; CAMPOS et al., 1999; ROBERTS II; MORROW, 2001).

Avaliando o líquido humano, Levy et al. (1998) demonstraram a redução de tromboxano após a utilização de dipirona (derivado da pirazolona), o que poderia explicar seu efeito analgésico e antitérmico. Outros autores descreveram a COX-3, provavelmente uma variante da COX-1, presente principalmente no córtex cerebral, cuja inibição seletiva poderia representar o mecanismo primário central da ação analgésica de drogas como a dipirona e o acetaminofeno (CHANDRASEKHARAN et al., 2002).

1.4 O uso de produtos naturais na medicina popular

Produtos naturais têm sido a maior fonte de drogas por séculos. Atualmente, 25% dos produtos farmacêuticos usados provêm de compostos naturais, levando a um forte interesse em pesquisas nesta área (CLARK, 2002). Muitos autores têm se dedicado a avaliar os benefícios no estudo de plantas (BORRIS, 1996; BOYD, 1996; ELISABETSKY; COSTA-CAMPOS, 1996; SOEJARTO, 1996; TURNER, 1996).

Recentemente, apesar de várias drogas clássicas derivadas de plantas terem perdido muito espaço para os de origem sintética, outras têm aparecido e recebido atenção especial e status terapêutico. Um indício do “renascimento” de fármacos derivados de fontes vegetais é a grande quantidade e o progresso de pesquisas clínicas, especialmente nas áreas dos agentes anticancerígenos (taxol, podofilotoxina e camptotecinas) e dos antimaláricos, como a artemisina (DAVID; DAVID, 2002).

O uso de produtos naturais como agentes anticâncer tem uma longa história que começou com a medicina popular e através dos anos tem sido incorporado na medicina alopática (COSTA-LOTUFO et al., 2005; NATESAN et al., 2007). Produtos derivados de plantas como flavonóides, terpenos e alcalóides (KEITH et al., 1990; OSAWA; KAWAKISHI; NAMIKI, 1990; DI CARLO et al., 1999), entre outros, têm recebido considerável atenção por causa de suas potenciais propriedades farmacológicas, incluindo efeitos citotóxicos, antitumorais e quimiopreventivos (ROJA; HEBLE, 1994; INDAP et al., 2006; KINTZIOS, 2006). Muitas drogas frequentemente utilizadas em quimioterapia como vincristina, taxol, e outras foram isoladas de espécies vegetais ou derivadas de protótipos naturais (GUPTA et al., 2004; COSTA-LOTUFO et al., 2005). Ainda hoje, muitos compostos vegetais têm sido testados em busca de atividade anticâncer e/ou investigados fitoquimicamente para o entendimento de suas ações tumoricidas (PREMALATHA; RAJGOPAL, 2005).

Por outro lado, o uso de plantas medicinais, de forma combinada ou isolada, como drogas antiinflamatórias e analgésicas na medicina popular é uma prática comum, proporcionando alívio de sintomas comparável àquele obtido com medicamentos alopáticos, embora na maioria das vezes os princípios ativos das plantas sejam desconhecidos (ABAD et al., 1996; JAVAN et al., 1997).

A maioria das drogas clinicamente importantes para o tratamento de várias doenças inflamatórias pertence a terapêuticas químicas esteroidais ou não-esteroidais. Embora estas drogas tenham atividade poderosa, elas possuem vários e severos efeitos adversos. Por essa razão, os agentes de origem natural com poucos efeitos colaterais são necessários como substitutos para as terapêuticas químicas (VERPOORTE, 1999; CHOI; HWANG, 2003).

O uso de extratos de plantas medicinais é um hábito bem difundido no Brasil especialmente em áreas rurais (NAPOLITANO et al., 2005). Este hábito pode ser explicado pela crença de que as plantas apresentam efeitos terapêuticos sem causar toxicidade ao organismo (BOSSOLANI, 2000), e também pelo fato de o país possuir uma flora abundante – estimada em cerca de 40000 a 60000 espécies – e apresentar uma medicina tradicional rica, devido provavelmente à população multi-racial (FARNSWORTH; SOEJARTO, 1991). Estudos relacionados às atividades antiinflamatória, antimicrobiana, antitumoral e citotóxica de algumas espécies vegetais encontradas no Brasil têm sido realizados (HOLETZ et al., 2002; SUYENAGA et al., 2002; SANTOS PIMENTA et al., 2003).

Embora a utilização dessas drogas tenha uma tradição, e seus usos medicinais e segurança sejam bem conhecidos pelos povos nativos, seu lugar ainda necessita ser organizado na terapêutica, através de estudos científicos requeridos para testar sua eficácia, propriedades e limitações (ABAD et al., 1996; DAVID; DAVID, 2002). A avaliação dos efeitos farmacológicos de extratos brutos vegetais pode ainda ser usada como uma estratégia de pesquisa lógica para a busca de novas drogas (JAVAN et al., 1997).

1.4.1 As aplicações de *Caesalpinia ferrea*

Caesalpinia ferrea Mart. ex Tul. var. *ferrea* é uma árvore que pertence à família Leguminosae-Caesalpinioideae (Caesalpinaceae) e que cresce em todo o Brasil (BRAGANÇA, 1996; LORENZI, 2002), sendo largamente distribuída nas regiões Norte e Nordeste, principalmente em Pernambuco e no Ceará (ALZUGARAY, 1984). Em Pernambuco acha-se predominantemente nas áreas pobres da Região do São Francisco e nos municípios de Floresta e de Buíque. É conhecida vulgarmente como pau-ferro ou jucá.

Possui flores amarelas pequenas e em cachos; frutos de cor marrom escura, do tipo legume (vagem), com sementes escuras; folhas compostas; altura de 10-15 m, com tronco curto de 40-60 cm de diâmetro, que fornece madeira para construção civil e lenha. A árvore é bastante ornamental (**Figura 3**), podendo ser empregada na arborização de ruas e avenidas e aproveitada para plantios em áreas degradadas (PIO CORRÊA, 1984; LORENZI, 2002). Além disso, o pau-ferro é

considerado uma forrageira importante no Nordeste, tanto pela sua adaptação natural à região, como também por fornecer forragem durante a seca (NASCIMENTO et al., 2002).

Algumas das propriedades terapêuticas de *C. ferrea* têm sido descritas, e incluem tratamento de ferimentos e contusões, alívio de tosse crônica e asma (BRAGA, 1976; HASHIMOTO, 1996). Além disso, algumas pesquisas mostram que o jucá possui ação antifúngica e antibacteriana (LIMA et al., 1994; XIMENES, 2004), antiulcerogênica (BACCHI; SERTIE, 1994; BACCHI et al., 1995) e antiinflamatória; bem como propriedades analgésicas (THOMAS; ARAÚJO; SOUZA, 1988; CARVALHO et al., 1996). Os frutos têm sido usados também no tratamento de diabetes (BALBACH, 1972) e na prevenção do câncer (NAKAMURA et al., 2002a). Os constituintes extraídos dos extratos alcoólicos já foram avaliados *in vivo* quanto ao seu efeito antitumoral em processos carcinogênicos de pele, no segundo estágio (NAKAMURA et al., 2002b).

As raízes do pau-ferro são utilizadas como antipiréticas e antidiarréicas, e a decocção da madeira é anticatarral e cicatrizante (PENNA, 1964; PIO CORRÊA, 1984; LEWIS, 1987). A casca do caule é usada como descongestionante, no tratamento da enterocolite, diarreia (BALBACH, 1972), para o tratamento de diabetes e contra reumatismo (BRAGANÇA, 1996; GOMES, 2003), mostrando ainda possíveis benefícios no sistema cardiovascular dos usuários (MENEZES et al., 2007). Um estudo fitoquímico preliminar do extrato hidroalcoólico da casca do caule e das folhas demonstrou a presença de flavonóides, saponinas, taninos, cumarinas, esteróides e compostos fenólicos (GONZALEZ; BARROS; BACCHI, 2004).

O extrato aquoso de *C. ferrea* mostrou-se, ainda, eficaz no estímulo da mielopoiese frente à listeriose e tumor ascítico de Ehrlich em ratos, promovendo certa proteção contra dose letal de *Listeria monocytogenes* e aumentando a sobrevivência dos animais, respectivamente (QUEIROZ et al., 2001).

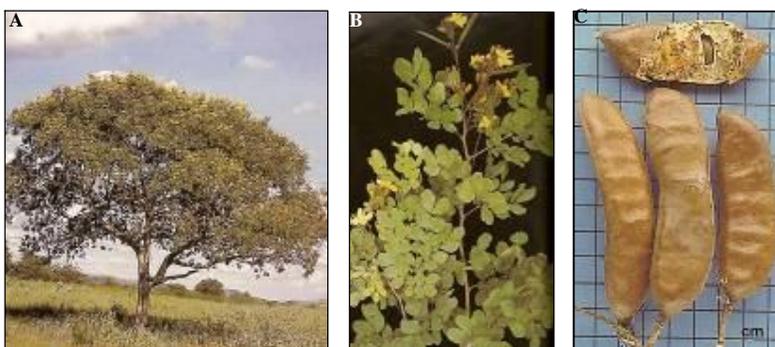


Figura 3 – Árvore (A), flor (B) e fruto (C) de *C. ferrea* Mart. ex Tul. var. *ferrea*. Fonte: Lorenzi (2002).

A utilização e a comercialização de extratos aquosos e alcoólicos, farinha de diversos tecidos e da vagem de *C. ferrea* para aplicações na medicina popular desperta o interesse desta planta para estudos biotecnológicos (XIMENES, 2004).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar atividades citotóxica, antitumoral, antiinflamatória e analgésica do extrato bruto aquoso e de uma fração parcialmente purificada obtidos da vagem de *C. ferrea*.

2.2 Objetivos específicos

2.2.1 Obter o extrato bruto aquoso (CE); e a fração parcialmente purificada (F80) através de precipitação com sulfato de amônio;

2.2.2 Avaliar atividade citotóxica *in vitro* de CE e F80 utilizando as linhagens celulares NCI-H292 e HEp-2;

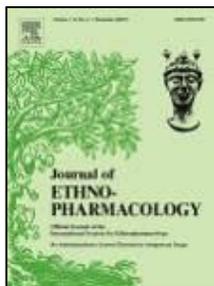
2.2.3 Determinar a LD₅₀ para CE e F80;

2.2.4 Avaliar *in vivo* atividade antitumoral de CE e F80 utilizando as células do tumor Sarcoma-180;

2.2.5 Avaliar as atividades antiinflamatória e analgésica de CE e F80.

3 ARTIGOS

3.1 ARTIGO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY



CYTOTOXIC AND ANTITUMOR ACTIVITY EVALUATION OF A CRUDE EXTRACT AND A FRACTION FROM THE POD OF *Caesalpinia ferrea* MART. EX TUL. VAR. *ferrea*

A. C. C. Silva^a, N. C. A. Ximenes^a, J. S. Aguiar^b, S. C. Nascimento^b, L. C. B. B. Coelho^a, M. G. Carneiro-da-Cunha^a, T. G. Silva^b, M. T. S. Correia^{a*}

^aLaboratório de Glicoproteínas – Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Brazil

^bLaboratório de Bioensaios para Pesquisa de Fármacos – Departamento de Antibióticos, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Brazil
Av. Prof. Moraes Rego s/n – Cidade Universitária – CEP: 50670-420 Recife, PE, Brazil

*Corresponding author: Tel: +55-81-2126.8540; Fax: +55-81-3271.8354; E-mail address: terezacorreia@hotmail.com

Abstract

Caesalpinia ferrea (Leguminosae) is a tree largely distributed in Brazil and used popularly for many purposes, including cancer prevention. The aim of this study was to evaluate the cytotoxic and antitumor effects of the crude aqueous extract (CE) and a fraction (F80) from its pod, using NCI-H292 and HEp-2 cell lines for MTT *in vitro* test and the solid tumor Sarcoma-180 for *in vivo* assay. Results revealed that only F80 inhibited NCI-H292 cell growth (25.6%; 14.3% and 7.8%, at 50; 25; and 12.5 $\mu\text{g/mL}$, respectively); and the Sarcoma-180 tumor weight reduction promoted by F80 was not significant (8.68%, at 100 mg/kg body weight). CE and F80 did not reduce HEp-2 cell line growth. LD₅₀ for both preparations was determined as 2500 mg/kg body weight. Therefore, we conclude that CE and F80 have no significant cytotoxic and antitumor activities over cell lines and solid tumor tested; otherwise, their low toxicity allows the use of CE and F80 with a certain safety in other situations.

Keywords: *Caesalpinia ferrea*; Cytotoxicity; LD₅₀; Antitumor activity

1 Introduction

Tumor growth inhibition has been a continuous effort in cancer treatment. A reduction in cell growth and an induction in cell death are two major means to inhibit tumor growth (Wu et al., 2002).

Natural products have been considered as a valuable source for anticancer drug discovery and many medical herbs have been long used, playing an important role in the treatment of cancer (Pezzuto, 1997; Kawada et al., 2001; Mujoo et al., 2001; Prozesky et al., 2001; Schwartzmann et al., 2002). In fact, most new clinical applications of plant derivatives over the last half century have been tried with the aim of combating cancer (Newman et al., 2000, 2003; Butler, 2004). Many drugs frequently used in chemotherapy, as vincristine, taxol, camptothecins and others, were isolated from plants or derived from natural prototypes (Gupta et al., 2004; van der Heijden et al., 2004; Costa-Lotufo et al., 2005).

Caesalpinia ferrea Mart. ex Tul. var. *ferrea* (Leguminosae) is a tree that grows throughout Brazil, specially in North and Northeast regions (Bragança, 1996; Lorenzi, 2002).

C. ferrea aqueous and alcoholic preparations are used popularly for treatment of a number of diseases such as diabetes, rheumatism, cancer; and symptoms, as diarrhea, inflammation, pain and others (Balbach, 1972; Bragança, 1996; Hashimoto, 1996; Nakamura et al., 2002a; Gomes, 2003). Some of its therapeutic properties have been

studied, including its antitumor effect (Nakamura et al., 2002a, 2002b).

The purpose of the present study was to evaluate the cytotoxic and antitumor activities of crude aqueous extract and a fraction of the *C. ferrea* pod against two different cancer cell lines and a solid tumor, in order to validate one of the popular medicinal uses of this plant.

2 Materials and methods

2.1 Plant material

C. ferrea pods were collected from Ibirimir City, State of Pernambuco, Northeast Brazil, in August (period of fruit abundance), 2006.

2.2 CE and F80 preparations

Crude aqueous extract (CE) was prepared using pod powder in 0.9% NaCl (10% w/v) by gentle shaking for 16 h, at 4 °C, passed through gauze, centrifuged (10000 x g) for 15 min and filtered. Thereafter, proteins were precipitated during 4 h by 0-80% ammonium sulphate fractionation at room temperature, and the resuspended precipitate was dialyzed against distilled water followed by 0.9% NaCl (obtaining F80). Samples were stored at -20 °C and subsequently lyophilized. The yield of total dried powder was 25% and 2.94% for CE and F80, respectively.

2.3 Animals

Swiss albino female and male mice (*Mus musculus*) weighting approximately 33 g (\pm 50-day-old), were obtained from the

Bioterium of the Antibiotics Department of the Federal University of Pernambuco (UFPE) and maintained under constant conditions (temperature: 20 ± 2 °C, humidity: 40-60%, 12-h light/ 12-h dark cycle). The mice were allowed to access standard rodent chow diet (Purina®) and water *ad libitum*. These experiments were approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of the Biological Sciences Center of the Federal University of Pernambuco, Brazil (CEEA – UFPE).

2.4 Cytotoxic activity evaluation

Cell lines:

- NCI-H292: corresponding to a continuous line of mucoepithelioid cells from human lung carcinoma.
- HEp-2 (Human Epidermoid Cancer Cells): derived from human larynx primary tumor.

Cell culture: Cell cultures were maintained in *Minimum Essential Medium Eagle Modified Dulbecco's*, DMEM (Sigma), supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% antibiotic solution (penicillin 1000 UI/mL with streptomycin 250 mg/mL and 1% L-glutamin 200 mM).

Cell viability: It was used vital stainer Trypan Blue 0.4% (w/v) in sodium phosphate buffer (PBS). It penetrates easily in the damaged cells staining them in blue, while the intact ones remain colorless, allowing the determination of living and dead cells percentages. Cells were counted with an inverted microscope

LEITZ and an hemocytometer, fulfilled with an homogeneous cell suspension aliquot.

Cytotoxicity: To determine cytotoxicity, a cell suspension (10^5 cells/mL) was prepared and distributed in wells of flat-bottom microtiter culture plates. They were incubated in a humidified 5% CO₂ air atmosphere at 37 °C for 24 h. After 24 h, CE and F80 samples in different concentrations (50; 25; 12.5; 6.25 µg/mL) were added and incubated under same conditions for 72 h (Pereira et al., 1994). Control wells received only 0.9% sterile NaCl solution. After that, 25 µL MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-biphenyl tetrazolium bromide) in PBS (5 mg/mL, w/v) was added and the plates were maintained at 37 °C for 2 h. Culture medium with MTT was suctioned and DMSO (dimethylsulphoxide) was added for formazan crystals dissolution (Alley et al., 1998). MTT assay is based on the living cells capability of reducing tetrazolium salt, of yellow color, to insoluble formazan, purple (Slater et al., 1963) that precipitates because of the mitochondrial enzyme succinate dehydrogenase, active only in living cells (Hess and Pearse, 1963). Optical density was carried out at 595 nm. Mean optical density (OD) of the test wells was compared to control wells mean OD to determine IC₅₀ (concentration that inhibits 50% of cell growth in relation to control). According to National Cancer Institute (NCI), values of IC₅₀ ≤ 30 µg/mL for non-pure products (*e.g.* extracts) are considered significative (Geran et al., 1972).

2.5 Acute oral toxicity

Products were evaluated following the steps of Guideline 423 (OECD, 2001), using female mice. They were fasted overnight prior to the experiment. Three animals for each preparation were given orally single starting doses of 300 mg/kg (mg of product/kg of body weight) and observed for 14 days (during the first hour after treatment and then once per day). CE and F80 were dissolved in a 0.9% sterile NaCl solution and the calculation of the exact dose for each mouse was based on individual weights. This first step was repeated in the same way for confirmation of results and a higher dose (2000 mg/kg) was administrated, both using other female mice.

2.6 Antitumor activity

Studies were carried out in male mice, six animals per group, aiming to investigate the *in vivo* antitumor activity of CE and F80 against Sarcoma-180.

CE, F80 and MTX (methotrexate) dosages were calculated according to animal body weight index (100 mg/kg for CE and F80; and 2.5 mg/kg for MTX). Malign tumor cells (Sarcoma-180) from tumor carrier animals with 8 days of implanting were used. All animals were previously higienized in an experimental surgery room. Donor mice were anaesthetized for tumor suctioning and the ascitic form of the tumor was introduced under the right axilla of the receptor animals. Therapeutics, by *i. p.* route, was begun 24 h after tumor implanting for 7 days. The negative control group received only saline

solution (0.9% NaCl) and the standard group (positive) received MTX as referential antitumor drug. In the eighth day, the animals were sacrificed by cervical dislocation and solid tumors excised and weighted. Tumor inhibition was expressed as the mean of tumor weight for the treated animal group (T) in comparison to the untreated control group (C). The tumor inhibition was then calculated according to: percentage tumor inhibition = $[(C-T)/C] \times 100$. Animal experiments were performed according to the NCI protocol (Geran et al., 1972).

2.7 Statistical analysis

Data were expressed as mean \pm S.E.M. and statistically assessed using one-way ANOVA (Origin[®] 5.0). $P < 0.05$ was considered significant.

3 Results

3.1 Cytotoxicity

The assays revealed that, at 50; 25; and 12.5 μ g/mL, F80 inhibited 25.6%; 14.3% and 7.8% (respectively) the NCI-H292 cell growth. At 6.25 μ g/mL and for HEp-2 cell line there was no growth inhibition. CE did not show significant cytotoxic activity for both cell lines. Low inhibition rate did not allow the IC₅₀ calculation for both preparations.

3.2 Acute oral toxicity – LD₅₀ determination

At the doses of 300 mg/kg and 2000 mg/kg, mice did not present weight loss or death with both preparations. LD₅₀ (medium acute lethal dose) cut-off of CE and F80 was

determined as 2500 mg/kg body weight, being both preparations considered as safe (Category 5) (OECD, 2001).

3.3 Antitumor activity

F80 showed a tumor growth inhibition of 8.68%, but this value is not significant when compared with the control group. CE did not present antitumor activity (Figure 1).

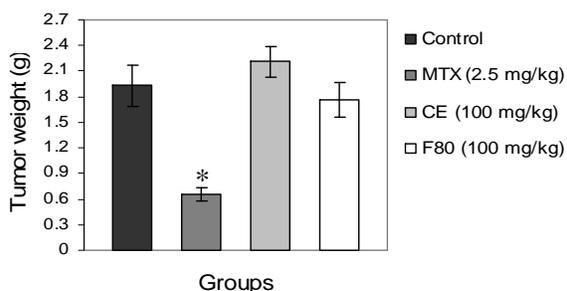


Figure 1 – Effects of CE, F80 and MTX (methotrexate) the growth of Sarcoma-180 in Swiss albino male mice. Each column represents the mean of six animals and vertical lines show the S.E.M. Asterisk denotes the significance level in comparison to control value: * $P < 0.05$.

4. Discussion and conclusions

Among preparations tested, only F80 showed some cytotoxic activity. In spite of CE did not present cytotoxicity against cell lines used, several studies have demonstrated that plant extracts and derivative compounds have an anticancer potential *in vitro* or *in vivo*. Nakamura et al. (2002a) tested distinct *C. ferrea* pod extracts using the *in vitro* Epstein-Barr virus early-antigen activation assay and found that the ethyl acetate extract exhibited the strongest inhibitory activity. Nozaki et al.

(2007), also working with *C. ferrea*, showed that paufferol, a compound obtained from the stem, possesses a cell proliferation inhibitory activity through the induction of apoptosis in human leukemia HL60 cells.

Lee et al. (2002) demonstrated that a water extract of *Paeoniae lactiflora* could induce apoptosis in HepG2 and Hep3B hepatoma cells. Moreover, Natesan et al. (2007) showed that the methanol extract of *Careya arborea* exhibited potent cytotoxicity against the cancerous HeLa (human cervix cancer cell), HEP-2, and RD (rhabdomyosarcoma) cell lines.

Despite widespread use (herbal medicine is used by up to 80% of the population in developing countries), few scientific studies have been undertaken to ascertain the safety and efficacy of traditional remedies (Veerappan et al., 2007). The present investigation shows that the aqueous extract of the pods of *C. ferrea* are practically non-toxic via oral route in mice, indicating that the popular use of this kind of extract can be considered as safe.

Mukinda and Syce (2007) also concluded that the aqueous extract obtained from *Artemisia afra* leaves may be described as relatively non-toxic, based on an animal study using rodents.

Regarding to antitumor activity, our study revealed that CE and F80 did not reduce tumor weight significantly. Although, Nakamura et al. (2002b) isolated two constituents (gallic acid and methyl gallate) from the pod of *C. ferrea* and tested them

against skin carcinogenesis in mice, finding a reduction in the average number of papillomas per mouse. Studying another *Caesalpinia* species, *C. bonducella*, Gupta et al. (2004) evaluated the antitumor effect of the methanol leaves extract against Ehrlich ascites carcinoma in mice. In this work, these researchers discovered that the extract promotes a significant increase of mean survival time of the mice and a decrease of tumor volume, when compared with control group.

This fact led us to deduce that the antitumor effect of *Caesalpinia* sp. may vary according to extract (and/or isolated constituents) and tumor types used.

In conclusion, CE and F80 have no significant cytotoxic and antitumor activities over NCI-H292 and HEp-2 cell lines and solid tumor (Sarcoma-180) tested. However, further studies are necessary to evaluate these activities using other cell lines and tumors to elucidate which of them these preparations work in, once this plant is used popularly for cancer prevention. Otherwise, their low toxicity allows the use of CE and F80 with a certain safety in other situations.

Acknowledgements

This work was financially supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

References

Alley, M.C., Scudiero, D.A., Monks, A., Hursey, M.L., Czerwinski, M.J., Fine, D.L., Abbott, B.J., Mayo, J.G., Shoemaker, R.H.,

Boyd, M.R., 1998. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Research* 48, 589-601.

Balbach, A., 1972. *As plantas que curam*. Três, São Paulo, pp. 302-303.

Bragança, L.A.R., 1996. *Plantas medicinais antidiabéticas*. EDUFF Press, Niterói, p. 172.

Butler, M.S., 2004. The role of natural product chemistry in drug discovery. *Journal of Natural Products* 67 (12), 2141-2153.

Costa-Lotufo, L.V., Khan, M.T.H., Ather, A., Wilke, D.V., Jimenez, P.C., Pessoa, C., Moraes, M.E.A., Moraes, M.O., 2005. Studies of the anticancer potential of plants used in Bangladeshi folk medicine. *Journal of Ethnopharmacology* 99, 21-30.

Geran, R.I., Greenber, N.H., Macdonald, M.M., Schumacher, R.I., Abbott, B.J., 1972. Protocols for screening chemical agents and natural-products against tumors and other biological systems. *Cancer Chemotherapy Reports Part 3*, n. 3, v. 2.

Gomes, M., 2003. *As plantas da saúde – guia de tratamentos naturais*. 3. ed. Paulinas, São Paulo, p. 232.

Gupta, M., Mazumdar, U.K., Kumar, R.S., Sivakumar, T., Vamsi, M.L.M., 2004. Antitumor activity and antioxidant status of *Caesalpinia bonducella* against Ehrlich ascites carcinoma in Swiss albino mice. *Journal of Pharmacological Sciences* 94, 177-184.

Hashimoto, G. (ed.), 1996. *Illustrated Cyclopedia of Brazilian Medicinal Plants*. Aboc-Sha, Kamakura, p. 646.

Hess, R., Pearse, A.G.E., 1963. Pathways of reduced pyridine nucleotide oxidation in rat brain homogenate demonstrated by tetrazolium method. *Biochemical et Biophysica Acta* 71, 285-294.

Kawada, M., Ohno, Y., Ri, Y., Ikoma, T., Yuuetu, H., Asai, T., Watanabe, M., Yasuda, N., Akao, S., Takemura, G., Minatoguchi, S.,

- Gotoh, K., Fujiwara, H., Fukuda, K., 2001. Anti-tumor effect of gallic acid on LL-2 lung cancer cells transplanted in mice. *Anticancer Drugs* 12 (10), 847-852.
- Lee, S.M., Li, M.L., Tse, Y. C., Leung, S.C., Lee, M.M., Tsui, S.K., Fung, K.P., Lee, C.Y., Waye, M.M., 2002. *Paeoniae radix*, a Chinese herbal extract, inhibits hepatoma cells growth by inducing apoptosis in a p53 independent pathway. *Life Sciences* 71 (19), 2267-2277.
- Lorenzi, H., 2002. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 4. ed., v. 1. Instituto Plantarum de Estudos da Flora, Nova Odessa, p. 162.
- Mujoo, K., Haridas, V., Hoffmann, J.J., Wachter, G.A., Hutter, L.K., Lu, Y., Blake, M.E., Jayatilake, G.S., Bailey, D., Mills, G.B., Gutterman, J.U., 2001. Triterpenoid saponins from *Acacia victoriae* (Benth) decrease tumor cell proliferation and induce apoptosis. *Cancer Research* 61 (14), 5486-5490.
- Mukinda, J.T., Syce, J.A., 2007. Acute and chronic toxicity of the aqueous extract of *Artemisia afra* in rodents. *Journal of Ethnopharmacology* 112, 138-144.
- Nakamura, E.L.S., Kurosaki, F., Arisawa, M., Mukainaka, T., Okuda, M., Tokuda, H., Nishino, H., Pastore Jr, F., 2002a. Cancer chemopreventive effects of constituents of *Caesalpinia ferrea* and related compounds. *Cancer Letters* 177, 119-124.
- Nakamura, E.L.S., Kurosaki, F., Arisawa, M., Mukainaka, T., Takayasu, J., Okuda, M., Tokuda, H., Nishino, H., Pastore Jr, F., 2002b. Cancer chemopreventive effects of a Brazilian folk medicine, juca, on *in vivo* two-stage skin carcinogenesis. *Journal of Ethnopharmacology* 81, 135-137.
- Natesan, S., Badami, S., Dongre, S.H., Godavarthi, A., 2007. Antitumor activity and antioxidant status of the methanol extract of *Careya arborea* bark against Dalton's lymphoma ascites-induced ascitic and solid tumor in mice. *Journal of Pharmacological Sciences* 103, 12-23.
- Newman, D.J., Cragg, G.M., Snader, K.M., 2000. The influence of natural products upon drug discovery. *Natural Product Reports* 17 (3), 215-234.
- Newman, D.J., Cragg, G.M., Snader, K.M., 2003. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *Journal of Natural Products* 66 (7), 1022-1037.
- Nozaki, H., Hayashi, K., Kido, M., Kakumoto, K., Ikeda, S., Matsuura, N., Tani, H., Takaoka, D., Inuma, M., Akao, Y., 2007. Paufferol A, a novel chalcone trimer with a cyclobutane ring from *Caesalpinia ferrea* Mart exhibiting DNA topoisomerase II inhibition and apoptosis-inducing activity. *Tetrahedron Letters* 48, 8290-8292.
- OECD – Organization for Economic Cooperation and Development, 2001. OECD Guideline for Testing of Chemicals. Guideline 423: Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method. 14 p.
- Pereira, E.C., Nascimento, S.C., Lima, R.C., Silva, N.H., Oliveira, A.F., Bandeira, E., Boitard, M., Beriel, H., Vicente, C., Legaz, M.E., 1994. Analysis of *Urnea fasciata* crude extracts with antineoplastic activity. *Tokai Journal of Experimental Clinical Medicine* 19 (12), 47-52.
- Pezzuto, J.M., 1997. Plant-derived anticancer agents. *Biochemical Pharmacology* 53 (2), 121-133.
- Prozesky, E.A., Meyer, J.J., Louw, A.I., 2001. In vitro antiplasmodial activity and cytotoxicity of ethnobotanically selected South African plants. *Journal of Ethnopharmacology* 76 (3), 239-245.
- Schwartzmann, G., Ratain, M.J., Cragg, G.M., Wong, J.E., Saijo, N., Parkinson, D.R., Fujiwara, Y., Pazdur, R., Newman, D.J., Dagher, R., Di Leone, L., 2002. Anticancer drug discovery and development throughout the world. *Journal of Clinical Oncology* 20 (18), 47S-59S.

Slater, S.F., Sawter, R., Strauli, U., 1963. Studies on succinate-tetrazolium reductase system III. Points of coupling of different tetrazolium salts. *Biochemical et Biophysica Acta* 77, 383-393.

Van der Heijden, R., Jacobs, D.I., Snoeijer, W., Hallard, D., Verpoorte, R., 2004. The *Catharanthus* alkaloids: pharmacognosy and biotechnology. *Current Medicinal Chemistry* 11 (5), 607-628.

Veerapan, A., Miyazaki, S., Kadarkaraisamy, M., Ranganathan, D., 2007. Acute and subacute toxicity studies of *Aegle marmelos* Corr., an Indian medicinal plant. *Phytomedicine* 14, 209-215.

Wu, J., Wu, Y., Yang, B.B., 2002. Anticancer activity of *Hemsleya amabilis* extract. *Life Sciences* 71, 2161-2170.

3.2 ARTIGO A SER SUBMETIDO AO PERIÓDICO PHYTOMEDICINE



ANTIINFLAMMATORY AND ANALGESIC ACTIVITIES OF A CRUDE EXTRACT AND A FRACTION FROM THE POD OF *Caesalpinia ferrea* MART. EX TUL. VAR.

ferrea

A. C. C. Silva^a, N. C. A. Ximenes^a, T. U. L. Lins^b, L. R. Magalhães^b, L. C. B. B. Coelho^a, M. G. Carneiro-da-Cunha^a, T. G. Silva^b, M. T. S. Correia^{a*}

^aLaboratório de Glicoproteínas – Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Brazil

^bLaboratório de Bioensaios para Pesquisa de Fármacos – Departamento de Antibióticos, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Brazil

*Corresponding author: Tel: +55-81-2126.8540; Fax: +55-81-3271.8354; E-mail address: terezacorreia@hotmail.com

Abstract

Caesalpinia ferrea (Leguminosae) is a tree largely distributed in Brazil and used popularly for many purposes, including inflammation and pain treatment. The aim of this study was to evaluate *in vivo* the antiinflammatory (including nitrite analysis) and analgesic effects of the crude aqueous extract (CE) and a partially purified fraction (F80) of its pod, using the carrageenan-induced peritonitis and acetic acid-induced writhing response in mice, respectively. Results revealed that CE and F80 (100 mg/kg body weight) showed significant antiinflammatory activity, evidenced by the reduction of the leukocyte number in inflammatory exsudate (40.9% for CE and 38.2% for F80). Preparations tested led to a decrease in the nitrite level; while CE reduced it to a minimum level, smaller than those obtained from standard drugs piroxicam and dexamethasone, F80 presented a result similar to these ones. Regarding to analgesic activity, CE and F80 (100 mg/kg body weight) caused a writhing inhibition at the rate of 56.60% and 72.72%, respectively. We conclude that CE and F80 present antiinflammatory and analgesic activities compared to some standard drugs, corroborating the pharmacological basis of *C. ferrea* ethnomedical use.

Keywords: *Caesalpinia ferrea*; Antiinflammatory activity; Nitric oxide; Analgesic activity

1 Introduction

Pain relief and antiinflammatory drugs with weak adverse effects are two of the most important goals in modern research, and natural products, specially plant derivative substances, play a role in this journey towards the ideal treatment.

Inflammation is the body's way of dealing with infections and tissue damage, but there is a fine balance between the beneficial effects of inflammation cascades and their potential for long-term tissue destruction. It is a complex process, which is frequently associated with pain and involves several events, such as: release of mediators, the increase of vascular permeability, increase of granulocytes and mononuclear cells migration, and others (Simmons, 2006; Andrade et al., 2007).

Caesalpinia ferrea Mart. ex Tul. var. *ferrea* (Leguminosae) is a tree largely distributed in Brazil, where its preparations are used popularly for treatment of a number of diseases such diabetes, rheumatism, asthma; and symptoms, as diarrhea, inflammation, pain and others (Balbach, 1972; Braga, 1976; Bragança, 1996; Hashimoto, 1996; Nakamura et al., 2002; Gomes, 2003).

In the light of its ethnomedical use, we decided to investigate the effects of a crude aqueous extract and a fraction obtained from the *C. ferrea* pod on the first moments of inflammation and nociception, using carrageenan-induced peritonitis and acetic acid-induced writhing response in mice, respectively.

2 Materials and methods

2.1 Plant material

C. ferrea pods were collected from Ibimirim City, State of Pernambuco, Northeast Brazil, during the month of August, 2006.

2.2 CE and F80 preparations

Crude aqueous extract (CE) was prepared using pod powder in 0.9% NaCl (10% w/v) by gentle shaking for 16 h, at 4 °C, passed through gauze, centrifuged (10000 x g) for 15 min and filtered. Thereafter, proteins were precipitated during 4 h using 0-80% ammonium sulphate fractionation at room temperature, and the resuspended precipitate was dialyzed against distilled water followed by 0.9% NaCl (obtaining F80). Samples were stored at -20 °C and subsequently lyophilized. The yield of total dried powder was 25% and 2.94% for CE and F80, respectively.

2.3 Animals

Swiss albino female and male mice (*Mus musculus*) weighting approximately 30 g (\pm 50-day-old), were obtained from the Bioterium of the Antibiotics Department of the Federal University of Pernambuco (UFPE) and maintained under constant conditions (temperature: 20 \pm 2 °C, humidity: 40-60%, 12-h light/ 12-h dark cycle). The mice were allowed to access standard rodent chow diet (Purina®) and water *ad libitum*. These experiments were approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of the Biological Sciences Center of the Federal

University of Pernambuco, Brazil (CEEA – UFPE).

2.4 Antiinflammatory assay – carrageenan-induced peritonitis

0.9% NaCl (control), dexamethasone, piroxicam and indomethacin (standard drugs, 2 mg/kg, 3 mg/kg and 10 mg/kg, respectively), CE and F80 (test drugs, 100 mg/kg both) were administered by oral route to the correspondent groups (6 animals per group). After one hour, 0.25 mL carrageenan (1% in 0.9% NaCl) injected intraperitoneally were used as phlogistic agent. Four hours later, animals were sacrificed by cervical dislocation and immediately submitted to surgery for abdominal opening (Gupta et al., 2005). Peritoneal cavity was washed with 2 mL of 0.9% NaCl with EDTA. Exsudates were collected and the polymorphonuclear leukocytes (PMNL) count was determined in a Neubauer chamber after sample dilution in Turk solution (1:200).

2.5 Nitrite analysis

Accumulated nitrite (NO_2^-) in the peritoneal exsudates was measured as an indicator of NO production according to a colorimetric assay based on the Griess reaction (Sherman et al., 1993). The exsudates (100 μL) were reacted with 100 μL Griess reagent (6 mg/mL) at room temperature for 10 min, and then NO_2^- concentration was determined by measuring absorbance at 540 nm. A standard curve was constructed using known concentrations of sodium nitrite (NaNO_2).

2.6 Analgesic activity – acetic acid-induced writhing response

The response to an i.p. injection of acetic acid solution, which manifests as a contraction of the abdominal muscles and stretching of the hind limbs, was evaluated using a method adapted from Young et al. (2005). Animals (6 per group) were pretreated i.p. with CE or F80 (100 mg/kg), vehicle (0.9% NaCl) or piroxicam (10 mg/kg) and dipyrone (150 mg/kg) as standard drugs. One hour later, a dose of 0.1 mL/10 g body weight of 1% acetic acid was injected i.p. After 10 min, the number of writhes during the following 20-min period was counted. Inhibition percentage was calculated through the decrease of total writhes number in the treated groups against control group.

2.7 Statistical analysis

Data were expressed as mean \pm S.E.M. (n=6) and statistically assessed using one-way ANOVA (Origin[®] 5.0). *P* values less than 0.05 were considered significant.

3 Results and discussion

Natural products, known as secondary metabolites of plants or animals, continue to be an important segment on the research of new drugs. The use of medicinal plants for the treatment of human diseases has increased considerably worldwide, including inflammatory processes of diverse origins (Cirigliano and Sun, 1998; Priya et al., 2004; Castelucci et al., 2007).

The search for new drugs that effectively interfere with the inflammatory

process and pain is currently of great relevance. Plants traditionally used and their derivative compounds have been valued historically as a source of antiinflammatory agents and pain killers (Elisabetsky et al., 1995; Calixto et al., 2003, 2004).

3.1 Antiinflammatory assay

Despite the fact that they have weaker antiinflammatory effects than indomethacin and dexamethasone, both CE and F80 were found to have antiinflammatory effects. CE and F80 showed significant reduction (40.9% and 38.2%, respectively) in the number of PMNL in the inflammatory exsudate, similar to piroxicam (46.7%) (Figure 1 and Table 1).

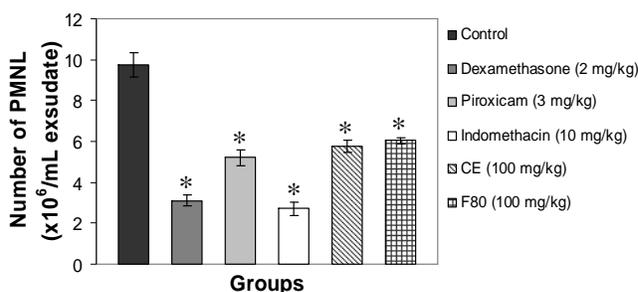


Figure 1 – Effect of pre-treatment with dexamethasone, piroxicam, indomethacin (standard drugs), CE and F80 on migration of polymorphonuclear leukocytes (PMNL) (number of PMNL/mL exsudate) in carrageenan-induced peritonitis in mice. Each column represents the mean of six animals and vertical lines show the S.E.M. Asterisk denotes the significance level in comparison to control value: * $P < 0.05$.

Table 1 – Evaluation of antiinflammatory activity of standard drugs (dexamethasone, piroxicam and indomethacin), CE and F80 on carrageenan-induced peritonitis in pre-treated mice.

| Compound | PMNL/mL exsudate ± S.E.M. (x 10 ⁶) | Antiinflammatory Activity (%) |
|-------------------------|--|-------------------------------|
| Control | 9.7 ± 0.8 | – |
| Dexamethasone (2 mg/kg) | 3.1 ± 0.3 * | 68.1 |
| Piroxicam (3 mg/kg) | 5.2 ± 0.5 * | 46.7 |
| Indomethacin (10 mg/kg) | 2.7 ± 0.4 * | 72.2 |
| CE (100 mg/kg) | 5.8 ± 0.3 * | 40.9 |
| F80 (100mg/kg) | 6.0 ± 0.1 * | 38.2 |

n=6. * $P < 0.05$ vs. control group.

Among the phlogistics agents available (as dextran, bradykinin, β -glucan, etc), carrageenan is perhaps the most commonly used and well studied (Leme et al., 1973). It produces a maximal edema in 3 h. While the carrageenan model is typically associated with activation of the cyclooxygenase pathway and is sensitive to glucocorticoids and prostaglandin synthesis antagonists, the early phase of the carrageenan response is due to the release of serotonin and histamine (DiRosa et al., 1971). Thus, the significant ameliorative activity of CE and F80 observed in the present study may be due to inhibition of these inflammatory mediators such as histamine, serotonin and prostaglandin and also decrease of NO production.

According to Kelly et al. (2007), there is growing optimism that inhibition of leukocyte recruitment might prevent inappropriate inflammation. So, the search for drugs that act upon cell migration may be of great interest.

In a previous study, Carvalho et al. (1996) determined the antiinflammatory activity of a crude aqueous extract of *C. ferrea* pods at 60 °C, using the carrageenan-induced paw edema method in mice. Assays revealed that the extract reduced the edema formation significantly since the first moments.

Many other plant extracts present expressive antiinflammatory activity by reducing leukocyte migration. Matos et al. (2003), using the same experimental model used in the present study, also observed a decrease in cell migration in the mice treated with aqueous fraction obtained from *Spiranthera odoratissima* leaf ethanolic extract. Gokhale et al. (2002), working with ethanolic extracts obtained from *Saussurea lappa*, *Argyrea speciosa* and *Achyranthes aspera*, discovered that all of them show antiinflammatory activity using the carrageenan-induced paw edema and carrageenan-induced peritonitis models in rats and mice. Chloroform extract of *Bryonia laciniosa* produced a higher inhibition in leukocyte migration than indomethacin in an *in vivo* experiment performed by Gupta et al. (2003). An ethanolic extract of *Petiveria alliacea* roots also presented a reduction in the number of migrating neutrophils,

mononuclear cells and eosinophils in a rat pleurisy model (Lopes-Martins et al., 2002). The methanol extract of *Vernonia cinerea* exhibited significant activity against all phlogistic agents used in an experiment realized by Mazumder et al. (2003).

3.2 Nitrite analysis

Since nitric oxide (NO) synthesis by inducible nitric oxide synthase (iNOS) is increased in inflammation and leads to cellular injury, the nitrite content in the exsudates was quantified using Griess reagent. This assay is an indirect method to quantify NO, because NO rapidly reduces to nitrate and nitrite.

iNOS-derived NO is involved in various pathological conditions such inflammation and autoimmune diseases and leads to tissue damage (Singh et al., 2000). Thus, suppression of iNOS is closely linked with antiinflammatory action (Ahn et al., 2007).

As shown in Figure 2, CE and F80 promoted a high reduction on the content of nitrite, specially CE, which decreased it to a level smaller than those presented by the standard drugs. The strong reduction of nitrite level in the exsudate by CE might be attributed to the presence of antioxidant compounds in this aqueous extract. It is likely that CE and F80 show their antiinflammatory activity through the down-regulation of NO production and reduction on leukocyte migration.

Plant extracts showing immunomodulatory activities have been extensively described, specially for their

inhibitory effect upon the NO production by macrophages (Rimbach et al., 2000; Ferreira et al., 2003; Ryu et al., 2003a, 2003b).

Ahn et al. (2007), investigating the ethanol extract and fractions of *Gastrodia elata* rhizomes, discovered that the extract and its *n*-butanol fraction decreased in the content of nitrite in the exsudates obtained from the carrageenan-induced air-pouch model in mice. Koo et al. (2006) also verified this reduction by testing two constituents (geniposide and genipin) obtained from the ethanol extract of *Gardenia jasminoides* fruit in rats.

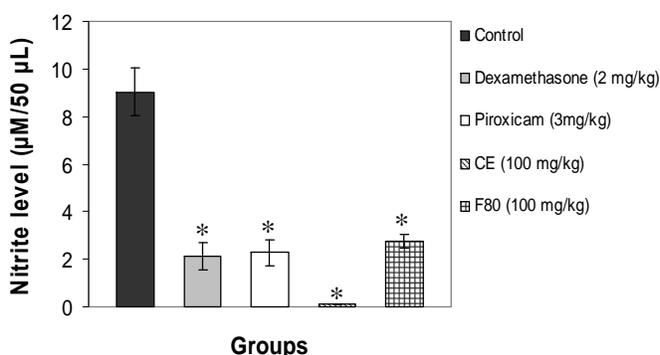


Figure 2 – Inhibitory effects of standard drugs dexamethasone and piroxicam, CE and F80 in relation to control group on NO production. Each column represents the mean of six animals and vertical lines show the S.E.M. Asterisk denotes the significance level in comparison to control value: * $P < 0.05$.

3.3 Analgesic activity – acetic acid-induced writhing response

It is well known that the intraperitoneal administration of agents that irritate serous membranes, such as acetic acid, causes a

stereotypical behavior in mice characterized by abdominal contractions, movements of the body as a whole, twisting of dorsoabdominal muscles, and a decrease in motor activity and coordination (Le Bars et al., 2001). In acetic acid-induced writhing response, which is the visceral pain model, the analgesic mechanism of abdominal writhing involves different nociceptive mechanisms, such as the process or release of arachidonic acid metabolites via cyclo-oxygenase and prostaglandin biosynthesis, opioid mechanisms, local peritoneal receptors and mediators related to acetylcholine and histamine, besides sympathetic system mediators (Collier et al., 1968; Takahashi and Paz, 1987; Duarte et al., 1988; Franzotti et al., 2000; Park et al., 2005; Koo et al., 2006).

Acetic acid causes algia by releasing of endogenous substances, which then excite the pain nerve endings; the abdominal constriction is related to sensitization of nociceptive receptors to prostaglandins (Chen, 1993). Although this test is non-specific (*e.g.*, anti-cholinergic, anti-histaminic and other agents also show activity), it is a very sensitive procedure that enables the detection of peripheral antinociceptive activity of compounds using animal protocols and is widely used for analgesic screening. This method is simple and reliable, and affords rapid evaluation of peripheral analgesic action (Shinde et al., 1999).

Dipyrone (metamizol) is a widely used nonsteroidal antiinflammatory drug (NSAID). In addition to the well-known peripheral

effects of NSAIDs – specially prostaglandin synthesis inhibition – and the fact that dipyrone is able to induce a significant antinociceptive effect in the absence of an antiinflammatory response, it has been proposed that it produces antinociception at least partially by acting upon central nervous system structures (Tortorici and Vanegas, 2000, Hernández and Vanegas, 2001; Hernández-Delgado and Cruz, 2004).

Since CE and F80 were confirmed to have antiinflammatory activity in carrageenan-induced peritonitis (Figure 1 and Table 1), their analgesic activity was examined. As shown in Table 2 and Figure 3, both preparations protected mice against chemical induced noxious stimulus, causing an inhibition at the rate of 56.60% (for CE; higher than that one promoted by piroxicam) and 72.72% (for F80; comparable to dipyrone, suggesting probably the same mechanism of action), on the writhing response induced by acetic acid. These results indicate that CE and F80 contain analgesic action in addition to antiinflammatory activity, subsequently suggesting that prostaglandin biosynthesis might be commonly involved in both activities of CE and F80 or that the mode of action of both preparations is related to sensitization of nociceptive receptors to prostaglandins.

Carvalho et al. (1996) also evaluated the analgesic activity of a *C. ferrea* pod extract, using a variation of the method described here and the hot-plate test in mice. Our results corroborate theirs, both showing

significant reduction in the nociception in the treated groups.

Table 2 – Anti-nociceptive effect of standard drugs (piroxicam and dipyrone), CE and F80 by acetic acid-induced writhing response test in mice.

| Compound | Dose | Medium \pm S.E.M. | Protection (%) |
|-----------|-----------|---------------------|----------------|
| Control | – | 69.1 \pm 7.8 | – |
| Piroxicam | 10 mg/kg | 46.5 \pm 1.6 * | 32.73 |
| Dipyrone | 150 mg/kg | 18.2 \pm 1.9 * | 73.60 |
| CE | 100 mg/kg | 30.0 \pm 4.0 * | 56.60 |
| F80 | 100 mg/kg | 18.9 \pm 1.9 * | 72.72 |

n=6. * P <0.05 vs. control group.

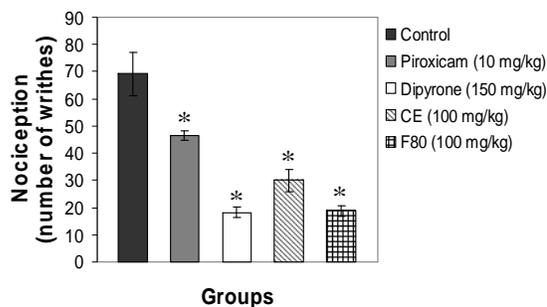


Figure 3 – Effects of standard drugs piroxicam and dipyrone, CE and F80 in relation to control group in writhing induced in mice by intraperitoneal injection of acetic acid. Each column represents the mean of six animals and vertical lines show the S.E.M. Asterisk denotes the significance level in comparison to control value: * P <0.05.

Many other researchers lead their efforts to elucidate different pharmacological effects of plant extracts. Amendoeira et al. (2005) evaluated the analgesic effect of some

Nidularium procerum extracts and concluded that the leaf extract concentrates the analgesic compounds. Analyzing their results, Bastos et al. (2006) showed, for the first time, that the aqueous extract of *Physalis angulata* roots present antinociceptive activity against the acetic acid-induced visceral pain and inflammatory pain responses induced by formalin in mice. Oral administration of the ethanolic extract and its fractions of the aerial parts of *Cleome rutidosperma* produced significant analgesic activity in acetic acid-induced writhing and tail immersion tests in mice, in a work performed by Bose et al. (2007).

Furthermore, the antinociceptive and antiinflammatory effects demonstrated in the present study contributed to the ethnomedical uses of *C. ferrea*. However, further investigations are necessary to elucidate the precise mechanisms of action and the compounds responsible for them.

Acknowledgements

This work was financially supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

References

Ahn, E.K., Jeon, H.J., Lim, E.J., Jung, H.J., Park, E.H., 2007. Anti-inflammatory and anti-angiogenic activities of *Gastrodia elata* Blume. *J. Ethnopharmacol.* 110, 476-482.

Amendoeira, F.C., Frutuoso, V.S., Chedier, L.M., Pearman, A.T., Figueiredo, M.R., Kaplan, M.A.C., Prescott, S.M., Bozza, P.T., Castro-Faria-Neto, H.C., 2005. Antinociceptive effect of *Nidularium*

procerum: a Bromeliaceae from the Brazilian coastal rain forest. *Phytomedicine* 12, 78-87.

Andrade, S.F., Cardoso, L.G.V., Carvalho, J.C.T., Bastos, J.K., 2007. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of extract, fractions and populnoic acid from bark wood of *Austroplenckia populnea*. *J. Ethnopharmacol.* 109, 464-471.

Balbach, A., 1972. *As plantas que curam*. Três, São Paulo, pp. 302-303.

Bastos, G.N.T., Santos, A.R.S., Ferreira, V.M.M., Costa, A.M.R., Bispo, C.I., Silveira, A.J.A., do Nascimento, J.L.M., 2006. Antinociceptive effect of the aqueous extract obtained from roots of *Physalis angulata* L. on mice. *J Ethnopharmacol.* 103, 241-245.

Bose, A., Mondal, S., Gupta, J.K., Ghosh, T., Dash, G.K., Si, S., 2007. Analgesic, anti-inflammatory and antipyretic activities of the ethanolic extract and its fractions of *Cleome rutidosperma*. *Fitoterapia* 78, 515-520.

Braga, R., 1976. *Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará*. 2. ed. Três, São Paulo, pp. 45-56.

Bragança, L.A.R., 1996. *Plantas medicinais antidiabéticas*. EDUFF Press, Niterói, p. 172.

Calixto, J.B.; Otuk, M.F.; Santos, A.R., 2003. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part I. Action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor kappa B (NF-kappa B). *Planta Med* 69, 973-983.

Calixto, J.B.; Campos, M.M.; Otuk, M.F.; Santos, A.R., 2004. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. Modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. *Planta Med* 70, 93-103.

Carvalho, J. C. T.; Teixeira, J. R. M.; Souza, P. J. C.; Bastos, J. K.; Santos Filho, D.; Sarti, S. J., 1996. Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract. *J. Ethnopharmacol.* 53, 175-178.

Castelucci, S., Rogerio, A.P., Ambrosio, S.R., Arakawa, N. S., Lira, S. P., Faccioli, L.H.,

- Costa, F.B., 2007. Anti-inflammatory activity of *Dasyphyllum brasiliensis* (Asteraceae) on acute peritonitis induced by β -glucan from *Histoplasma capsulatum*. J. Ethnopharmacol. 112, 192-198.
- Chen, Q., 1993. Methodology in pharmacological study on Chinese materia medica. 7 People's Medical Publishing House, Beijing, p. 360.
- Cirigliano, M.; Sun, A., 1998. Advising patients about herbal therapies. JAMA 280, 1565-1566.
- Collier, H.O.J., Dinneen, J.C., Johnson, C.A., Schneider, C., 1968. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. Br. J Pharmacol. Chemother. 32, 295-310.
- DiRosa, M., Giroud, J.P., Willoughby, D.A., 1971. Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. J. Pathol. 104, 15-29.
- Duarte, J.D.G., Nakamura, M., Ferreira, S.H., 1988. Participation of the sympathetic system in acetic acid-induced writhing in mice. Braz. J. Med. Biol. Res. 21, 341-343.
- Elisabetsky, E., Amodor, T.A., Albuquerque, R.R., Nunes, D.S., Carvalho, A.C.T., 1995. Analgesic activity of *Psychotria colorata* (Wild. ex R. & S.) Muell. Arg. alkaloids. J. Ethnopharmacol. 48, 77-83.
- Ferreira, A.P.; Soares, G.L.; Salgado, C.A.; Gonçalves, L.S.; Teixeira, F.M.; Teixeira, H.C.; Kaplan, M.A., 2003. Immunomodulatory activity of *Mollugo verticillata* L. Phytomedicine 10, 154-158.
- Franzotti, E.M., Santos, C.V.F., Rodrigues, H.M.S.L., Mourão, R.H.V., Andrade, M.R., Antonioli, A.R., 2000. Anti-inflammatory, analgesic and acute toxicity of *Sida cardiaefolia* L. (Malva branca). J. Ethnopharmacol. 72, 273-278.
- Gokhale, A.B., Damre, A.S., Kulkarni, K.R., Saraf, M.N., 2002. Preliminary evaluation of anti-inflammatory and anti-arthritic activity of *S. lappa*, *A. speciosa* and *A. aspera*. Phytomedicine 9, 433-437.
- Gomes, M., 2003. As plantas da saúde – guia de tratamentos naturais. 3. ed. Paulinas, São Paulo, p. 232.
- Gupta, M., Mazumdar, U.K., Sivakumar, T., Vamsi, M.L.M., Karki, S.S., Sambathkumar, R., Manikandan, L., 2003. Evaluation of anti-inflammatory activity of chloroform extract of *Bryonia laciniosa* in experimental animal models. Biol. Pharm. Bull. 26 (9), 1342-1344.
- Gupta, M.; Mazumder, U.K.; Sambathkumar, R.; Gomathi, P.; Rajeshwa, Y; Kakoti, B.B.; Tamil Selven, V., 2005. Anti-inflammatory, analgesic and antipyretic effects of methanol extract from *Bauhinia racemosa* stem bark in animal models. J. Ethnopharmacol. 98, 267-273.
- Hashimoto, G. (ed.), 1996. Illustrated Cyclopedia of Brazilian Medicinal Plants. Aboc-Sha, Kamakura, p. 646.
- Hernández, N., Vanegas, H., 2001. Antinociception induced by PAG-microinjected dipyrone (metamizol) in rats: involvement of spinal endogenous opioids. Brain Res. 896, 175-178.
- Hernández-Delgado, J.P., Cruz, S.L., 2004. Dipyrone potentiates morphine-induced antinociception in dipyrone-treated and morphine-tolerant rats. Eur. J. Pharmacol. 502, 67-73.
- Kelly, M.; Hwang, J.M.; Kubes, P., 2007. Modulating leukocyte recruitment in inflammation. J. Allergy Clin. Immunol. 120, n. 1, 3-10.
- Koo, H.J.; Lim, K.H.; Jung, H.J.; Park, E.H., 2006. Anti-inflammatory evaluation of gardenia extract, geniposide and genipin. J. Ethnopharmacol. 103, 496-500.
- Le Bars, D., Gozariu, M., Cadden, S.W., 2001. Animal models of nociception. Pharmacol. Rev. 53, 597-652.
- Leme, J.G., Hamamura, L., Leite, M.P., Silva, M.R., 1973. Pharmacological analysis of the acute inflammatory process induced in the rats

paw by local injection of carrageenan and by heating. *Br. J. Pharmacol.* 48, 88-96.

Lopes-Martins, R.A.B., Pegoraro, D.H., Woisky, R., Penna, S.C., Sertié, J.A.A. 2002. The anti-inflammatory and analgesic effects of a crude extract of *Petiveria alliacea* L. (Phytolaccaceae). *Phytomedicine* 9, 245-248.

Matos, L.G., Santos, L.D.A.R.; Vilela, C.F., Pontes, I.S., Tresvenzol, L.M.F., Paula, J.R., Costa, E. A., 2003. Atividades analgésica e/ou antiinflamatória da fração aquosa do extrato etanólico das folhas da *Spiranthera odoratissima* A. St. Hillaire (manacá). *Rev. Bras. Farmacogn.* 13, suppl., 15-16.

Mazumder, U.K., Gupta, M., Manikandan, L., Bhattacharya, S., Haldar, P. K., Roy, S., 2003. Evaluation of anti-inflammatory activity of *Vernonia cinerea* Less. extract in rats. *Phytomedicine* 10, 185-188.

Nakamura, E.L.S., Kurosaki, F., Arisawa, M., Mukainaka, T., Okuda, M., Tokuda, H., Nishino, H., Pastore Jr, F., 2002. Cancer chemopreventive effects of constituents of *Caesalpinia ferrea* and related compounds. *Cancer Lett.* 177, 119-124.

Park, Y.M., Won, J.H., Kim, Y.H., Choi, J.W., Park, H.J., Lee, K.T., 2005. In vivo and in vitro anti-inflammatory and antinociceptive effects of the methanol extract of *Inonotus obliquus*. *J. Ethnopharmacol.* 101, 120-128.

Priya, K.S., Arumugam, G., Rathinam, B., Wells, A., Babu, M., 2004. *Celosia argentea* Linn. leaf extract improves wound healing in a rat burn wound model. *Wound Rep. Reg.* 12, 618-625.

Rimbach, G., Park, Y.C., Guo, Q., Moini, H., Qureshi, N., Saliou, C., Takayama, K., Virgili, F., Packer, L., 2000. Nitric oxide synthesis and TNF- α secretion in Raw 264.7 macrophages: mode of action of a fermented papaya preparation. *Life Sci.* 67, 679-694.

Ryu, J.H., Ahn, H., Kim, J.Y., Kim, Y.K., 2003a. Inhibitory activity of plant extracts on nitric oxide synthesis in LPS-activated macrophages. *Phytotherapy Res.* 17, 485-489.

Ryu, J. H., Ahn, H., Jin Lee, H., 2003b. Inhibition of nitric oxide production on LPS-activated macrophages by kazinol B from *Broussonetia kazinoki*. *Fitoterapia* 74, 350-354.

Sherman, M.P., Aeberhard, E.E., Wong, V.Z., Griscavage, J.M., Ignarro, L.J., 1993. Pyrrolidine dithiocarbamate inhibits induction of nitric oxide synthase activity in rat alveolar macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 191, 1301-1308.

Shinde, U.A., Phadke, A.S., Nair, A.M., Mungantiwar, A.A., Dikshit, V.J., Saraf, M.N., 1999. Studies on the anti-inflammatory and analgesic activity of *Cedrus deodara* (Roxb.) Loud. wood oil. *J. Ethnopharmacol.* 65, 21-27.

Simmons, D.L., 2006. What makes a good anti-inflammatory drug target? *DDT v.* 11, n. 5/6, 210-219.

Singh, V.K., Mehrotra, S., Narayan, P., Pandey, C.M., Agarwal, S.S., 2000. Modulation of autoimmune diseases by nitric oxide. *Immunol. Res.* 22, 1-19.

Takahashi, R.N., Paz, M.M., 1987. Influence of naloxone on analgesic effects of antidepressants in mice. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 20 (5), 607-610.

Tortorici, V., Vanegas, H., 2000. Opioid tolerance induced by metamizol (dipyrone) microinjections into the periaqueductal grey of rats. *Eur. J. Neurosci.* 12, 4074-4080.

Young, H.Y., Luo, Y.L., Cheng, H.Y., Hsieh, W.C., Liao, J.C., Peng, W.H., 2005. Analgesic and anti-inflammatory activities of [6]-gingerol. *J. Ethnopharmacol.* 96, 207-210.

4 CONCLUSÕES

Os protocolos experimentais utilizados neste trabalho permitem concluir que:

1. CE e F80 não possuem atividade citotóxica e antitumoral significativa frente às linhagens NCI-H292 e HEp-2 e o tumor Sarcoma-180;
2. CE e F80 possuem baixa toxicidade oral;
3. CE e F80 reduzem a migração leucocitária e o conteúdo de nitrito no exsudato inflamatório, indicando atividade antiinflamatória significativa;
4. CE reduz drasticamente o conteúdo de nitrito, indicando possível atividade antioxidante;
5. CE e F80 apresentam atividade analgésica significativa.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABAD, M. J.; BERMEJO, P.; CARRETERO, E.; MARTÍNEZ-ACITORES, C.; NOGUERA, B.; VILLAR, A. Antiinflammatory activity of some medicinal plant extracts from Venezuela. **Journal of Ethnopharmacology**, 55, p. 63-68, 1996.

ABBAS, A. K.; MURPHY, K. M.; SHER, A. Functional diversity of helper lymphocytes. **Nature**, 383, p. 787-793, 1996.

ALBERTS, B.; BRAY, D.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Fundamentos da Biologia Celular: Uma introdução à biologia molecular da célula**. Porto Alegre: ARTMED, 1999. 757 p.

ALZUGARAY, D. **Plantas que curam**. São Paulo: Hemus Press, 1984.

BACCHI, E. M.; SERTIE, J. A. A. Anti-ulcer action of *Styrax camporum* and *Caesalpinia ferrea* in rats. **Planta Medica**, 60, p. 118-120, 1994.

BACCHI, E. M.; SERTIE, J. A. A.; VILLA, N.; KATZ, H. Anti-ulceration and toxicity of *Styrax camporum* and *Caesalpinia ferrea*. **Planta Medica**, 61, p. 204-207, 1995.

BALBACH, A. **As plantas que curam**. São Paulo: Três, 1972, p. 302-303.

BARROWS, L. R. Agentes antineoplásicos e imunoativos. In: GENNARO, A. R. (editor). **Remington: a ciência e a prática da farmácia**. 20. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 1535-1566.

BASSANEZI, B. S. B.; OLIVEIRA FILHO, A. G. Analgesia pós-operatória. **Revista do Colégio Brasileiro de Cirurgiões**, v. 33, n. 2, p. 116-122, 2006.

BATISTETTI, P. G. Bloqueios analgésicos: riscos e medidas de segurança. In: ANDRADE FILHO, A. C. C. (editor). **Dor: diagnóstico e tratamento**. 1. ed. São Paulo: Roca, 2001. p. 183-199.

BAYNES, J.; DOMINICZACK, M. H. **Bioquímica médica**. 1. ed. São Paulo: Manole, 2000. 566 p.

BEATTIE, C. History and principles of anesthesiology. In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; GILMAN, A. G. (editores). **Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics**. 10. ed. New York: McGraw- Hill, 2001. p. 321-325.

BERTINO, J. R. Antineoplastic drugs. In: SMITH, C. M.; REYNARD, A. M. **Textbook of pharmacology**. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1992. p. 941-963.

BITTENCOURT, H. N. S.; BRUNSTEIN, C. G. Fármacos antineoplásicos. In: FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. B. **Farmacologia Clínica: fundamentos da terapêutica racional**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 502-531.

BLOEMEN, K.; VERSTRAELEN, S.; VAN DEN HEUVEL, R.; WITTERS, H.; NELISSEN, I.; SCHOETERS, G. The allergic cascade: Review of the most important molecules in the asthmatic lung. **Immunology Letters**, 113, p. 6-18, 2007.

BOENTE, P. C.; SAMPAIO FILHO, C. A.; DEL GIGLIO, A. Agentes antineoplásicos. In: SILVA, P. **Farmacologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 1111-1117.

BOGDAN, C. Nitric oxide and the immune response, **Nature Immunology**, 2, p. 2907-2916, 2001.

BORNE, R. F. Nonsteroidal anti-inflammatory agents. In: WILLIAMS, D. A.; LEMKE, T. L. **Foye's principles of medicinal chemistry**. 5. ed. Baltimore, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002. p. 751-793.

BORRIS, R. P. Natural product research: perspectives from a major pharmaceutical company. **Journal of Ethnopharmacology**, 51, p. 29-38, 1996.

BOSSOLANI, M. P. **Mecanismo molecular da ação anti-secretora ácida gástrica de extratos e frações isoladas de *Maytenus ilicifolia* Mart e *Maytenus aquifolium* Mart**. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo, 2000. (Dissertação para obtenção do título de Mestre). p. 108.

BOTTING, J. H. Nonsteroidal anti-inflammatory agents. **Drugs Today**, 35, p. 225-235, 1999.

BOYD, M. R. The position of intellectual property rights in drug discovery and development from natural products. **Journal of Ethnopharmacology**, 51, p. 17-27, 1996.

BRAGA, R. **Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará**. 2. ed. São Paulo: Três, 1976. p. 45-56.

BRAGANÇA, L. A. R. **Plantas Medicinais Antidiabéticas**. Niterói: EDUFF Press, 1996. p. 172.

BRODY, T. Controle da dor e da inflamação com medicamentos antiinflamatórios não-esteróides. In: BRODY, T. M.; LARNER, J.; MINNEMAN, K. P.; NEU, H. C. **Farmacologia humana: da molecular à clínica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. p. 344-354.

BROOKS, S. A. The involvement of *Helix pomatia* lectin (HPA) binding *N*-acetylgalactosamine glycans in cancer progression. **Histology and Histopathology**, 15, p.143-158, 2000.

BROOKS, S. A.; CARTER, T. M. *N*-acetylgalactosamine, *N*-acetylglucosamine and sialic acid expression in primary breast cancers. **Acta Histochemica**, 103, p. 37-51, 2001.

BROWN, R. S.; BOTTOMLEY, W. K. The utilization and mechanism of action of tricyclic antidepressants in the treatment of chronic facial pain: a review of the literature. **Anesthesia Progress**, 37, p. 223-229, 1990.

CALL, D. R.; NEMZEK, J. A.; EBONG, S. J.; BOLGOS, G. L.; NEWCOMB, D. E.; REMICK, D. G. Ratio of local to systemic chemokine concentrations regulates neutrophil recruitment. **American Journal of Pathology**, 158(2), p. 715-721, 2001.

CALLERY, P.; GANNETT, P. Cancer and cancer chemotherapy. In: WILLIAMS, D. A.; LEMKE, T. L. **Foye's principles of medicinal chemistry**. 5. ed. Baltimore, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002. p. 924-951.

CAMPBELL, M. K. **Bioquímica**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000. 752 p.

CAMPBELL, J. N.; RAJA, S. N.; COHEN, R. H.; MANNING, D. C.; KHAN, A. A.; MEYER, R. A. Peripheral neural mechanisms of nociception. In: WALL, P. D.; MELZACK, R. (editors). **Textbook of Pain**. Edinburgh: Churchill Livingstone, 1989. p. 22-45.

CAMPOS, C.; DE GREGÓRIO, R.; GARCIA-NIETO, R.; GAGO, F.; ORTIZ, P.; ALEMANY, S. Regulation of cyclooxygenase activity by metamizol. **European Journal of Pharmacology**, 378(3), p. 339-347, 1999.

CARVALHO, J. C. T.; TEIXEIRA, J. R. M.; SOUZA, P. J. C.; BASTOS, J. K.; SANTOS FILHO, D.; SARTI, S. J. Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract, **Journal of Ethnopharmacology**, 53, p. 175-178, 1996.

CARVALHO, W. A. Analgésicos, antipiréticos e antiinflamatórios. In: SILVA, P. **Farmacologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 431-455.

CERQUEIRA, E. M. M. Câncer e Genética. In: BARACAT, F. F.; FERNANDES JR., H. J.; SILVA, M. J. **Cancerologia Atual: Um Enfoque Multidisciplinar**. São Paulo: Roca, 2000. p. 507-515.

CHANDRASEKHARAN, N. V.; DAI, H.; ROOS, K. L.; EVANSON, N. K.; TOMSIK, J.; ELTON, T. S.; SIMMONS, D. L. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, 99(21), p. 13926-13931, 2002.

CHANG, Y. H.; LEE, S. T.; LIN, W. W. Effects of cannabinoids on LPSstimulated inflammatory mediator release from macrophages: involvement of eicosanoids. **Journal of Cellular Biochemistry**, 81, p. 715-723, 2001.

CHEER, S. M.; GOA, K. L. Parecoxib (parecoxib sodium). **Drugs**, 61, p. 1133-1141, 2001.

CHI, D. S.; QUI, M.; KRISHNASWAMY, G.; LI, C.; STONE, W. Regulation of nitric oxide production from macrophages by lipopolysaccharide and catecholamines. **Nitric Oxide: Biology and Chemistry**, 8, p. 127-132, 2003.

CHOI, E. M.; HWANG, J. K. Investigations of anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Piper cubeba*, *Physalis angulata* and *Rosa hybrida*. **Journal of Ethnopharmacology**, 89, p. 171-175, 2003.

CHROUSOS, G. P. The hypothalamic-pituitary-adrenal axis and immunomediated inflammation. **The New England Journal of Medicine**, 332, p. 1351-1362, 1995.

CHU, G. Cellular responses to cisplatin. The roles of DNA-binding proteins and DNA repair. **Journal of Biological Chemistry**, 269, p. 787-790, 1994.

CLARK, A. Natural products. In: WILLIAMS, D. A.; LEMKE, T. L. **Foye's principles of medicinal chemistry**. 5. ed. Baltimore, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002. p. 24-36.

COCHRANE, C. G. Cellular injury by oxidants. **The American Journal of Medicine**, 91, p. 23S-30S, 1991.

COCICOV, A. F.; COCICOV, H. L. F.; SILVA, M. B. G.; SKARE, T. L. Uso de corticosteróides por via peridural nas síndromes dolorosas lombares. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, 54: 1, p. 129-141, 2004.

CORDEIRO, S. M.; COELI, M. Câncer e dor. In: BARACAT, F. F.; FERNANDES JR., H. J.; SILVA, M. J. **Cancerologia Atual: Um Enfoque Multidisciplinar**. São Paulo: Roca, 2000. p. 366-376.

COSSERMELLI, W.; PASTOR, E. H. Antiinflamatórios não-esteróides e doenças reumatológicas. **Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de São Paulo**, 50, p. 115-124, 1995.

COSTA-LOTUFO, L. V.; KHAN, M. T. H.; ATHER, A.; WILKE, D. V.; JIMENEZ, P. C.; PESSOA, C.; MORAES, M. E. A.; MORAES, M. O. Studies of the anticancer potential of plants used in Bangladeshi folk medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, 99, p. 21-30, 2005.

COUTURE, R.; HARRISSON, M.; VIANNA, R. M.; CLOUTIER, F. Kinin receptors in pain and inflammation. **European Journal of Pharmacology**, 429, p. 161-176, 2001.

CUZZOCREA, S. Shock, inflammation and PARP. **Pharmacological Research**, 52, p. 72-82, 2005.

DAVID, J. P. L.; DAVID, J. M. Plantas medicinais. Fármacos derivados de plantas. In: SILVA, P. **Farmacologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 135-145.

DE DOOY, J. J.; MAHIEU, L. M.; VAN BEVER, H. P. The role of inflammation in the development of chronic lung disease in neonates. **European Journal of Pediatrics**, 160, p. 457-463, 2001.

DESCH, C. E. Etiologia do câncer: oncogenes e fatores ambientais/tóxicos. In: ANDREOLI, T. E.; CARPENTER, C. C. J.; GRIGGS, R. C.; LOSCALZO, J. **Cecil Medicina Interna Básica**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. p. 436-438.

DEWEY, W. L.; BRASE, D.; WELCH, S. P. Controle da dor com analgésicos opióides. In: BRODY, T. M.; LARNER, J.; MINNEMAN, K. P.; NEU, H. C. **Farmacologia humana: da molecular à clínica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. p. 329-343.

DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A. A.; CAPASSAO, F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Sciences**, 65, p. 337-353, 1999.

ELISABETSKY, E.; COSTA-CAMPOS, L. Medicinal plant genetic resources and international cooperation: the Brazilian Perspective. **Journal of Ethnopharmacology**, 51, p. 111-120, 1996.

FANTONE, J. C.; WARD, P. A. Inflammation. In: RUBIN, E.; FARBER, J. L. (editors). **Pathology**. 3. ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1999. p. 36-75.

FARNSWORTH, N. R.; SOEJARTO, D. D. Global importance of medicinal plants. In: AKERELE, O.; HEYWOOD, V., SYNGE, H. (editors). **Conservation of Medicinal Plants**. Cambridge: Cambridge University Press, 1991. p. 25-51.

FERNANDES JÚNIOR, H. J. Introdução ao estudo das neoplasias. In: BARACAT, F. F.; FERNANDES JR., H. J.; SILVA, M. J. **Cancerologia Atual: Um Enfoque Multidisciplinar**. São Paulo: Roca, 2000. p. 3-10.

FERREIRA, M. B. C.; HIDALGO, M. P. L.; CAUMO, W. Analgésicos opióides. In: FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. B. C. (editores). **Farmacologia clínica: Fundamentos da terapêutica racional**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 236-258.

FERREIRA, M. B. C.; TORRES, I. L. S. Dor crônica. In: KAPCZINSKY, F.; QUEVEDO, J.; IZQUIERDO, I. **Bases biológicas dos transtornos psiquiátricos**. 2. ed. Porto Alegre: ArtMed, 2004. p. 347-365.

FERREIRA, M. B. C.; WANNMACHER, L. Analgésicos não-opióides. In: FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. B. C. (editores). **Farmacologia clínica: Fundamentos da terapêutica racional**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 229-235.

FERREIRA, P. E. M. S. Dor crônica: avaliação e tratamento psicológico. In: ANDRADE FILHO, A. C. C. (editor). **Dor: diagnóstico e tratamento**. 1. ed. São Paulo: Roca, 2001. p. 43-52.

FERRER-BRECHNER, T.; GANZ, P. Combination therapy with ibuprofen and methadone for chronic cancer pain. **American Journal of Medicine**, 77, p. 78-83, 1984.

FEUERSTEIN, M.; HICKEY, P. F. Ergonomic approaches in the clinical assessment of occupational musculoskeletal disorders. In: TURK, D. C.; MELZACK, R. (editors). **Handbook of pain assessment**. New York: The Guilford Press, 1992, p. 71-99.

FOLEY, K. M.; MACALUSO, C. Adjuvante analgesics in cancer pain management. In: ARONOFF, G. M. (editor). **Evaluation and treatment of chronic pain**. 2. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1992, p. 340-348.

FRANK, M. M.; FRIES, L. F. The role of complement in inflammation and phagocytosis. **Immunology Today**, 12, p. 322-326, 1991.

FRIES, D. S. Opioid analgesics. In: WILLIAMS, D. A.; LEMKE, T. L. **Foye's principles of medicinal chemistry**. 5. ed. Baltimore, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002. p. 453-479.

GANONG, W. F. **Fisiologia médica**. 17. ed. Rio de Janeiro: Prentice-Hall do Brasil, 1998. p. 96-103.

GARRISON, J. C. Histamine, bradykinin, 5-hydroxytryptamine, and their antagonists. In: GILMAN, A. F.; RALL, T. W.; NIES, A. S. TAYLOR, P. (editors). **The pharmacological basis of therapeutics**. 8. ed. New York: Pergamon Press, 1990. p. 575-599.

GEBHART, G. F.; MCCORMACK, K. J. Neuronal plasticity. Implication for pain therapy. **Drugs**, 47, p. 1-47, 1994.

GLENNON, R. A.; DUKAT, M. Serotonin receptors and drugs affecting serotonergic neurotransmission. In: WILLIAMS, D. A.; LEMKE, T. L. **Foye's principles of medicinal chemistry**. 5. ed. Baltimore, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002. p. 315-337.

GOMES, M. **As plantas da saúde – guia de tratamentos naturais**. 3. ed. São Paulo: Paulinas, 2003. p. 232.

GONZALEZ, F. G.; BARROS, S. B. M.; BACCHI, E. M. Atividade antioxidante e perfil fitoquímico de *Caesalpinia ferrea* Mart. In: IX Semana Farmacêutica de Ciência e Tecnologia da FCF-USP, 2004, São Paulo. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. São Paulo: Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 2004. v. 40., p. 79.

GUPTA, M., MAZUMDER, U. K.; KUMAR, R. S.; SIVAKUMAR, T.; VAMSI, M. L. M. Antitumor activity and antioxidant status of *Caesalpinia bonducella* against Ehrlich ascites carcinoma in Swiss albino mice. **Journal of Pharmacological Sciences**, 94, p. 177-184, 2004.

GUTSTEIN, H. B.; AKIL, H. P. Opioid analgesics. In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; GILMAN, A. G. (editores). **Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics**. 10. ed. New York: McGraw-Hill, 2001. p. 569-619.

HAMILTON, P. M. **Michigan: pain and symptom management**. Disponível em: <<http://www.criticalcareceu.com>>. Acesso em: 24 set. 2007, 14h52min.

HANADA, T.; YOSHIMURA, A. Regulation of cytokine signaling and inflammation. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, 13, p. 413-421, 2002.

HANSEL, D. E.; DINTZIS, R. Z. **Fundamentos de Patologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007. 937 p.

HANSON, G. R. Analgésicos, antipiréticos e antiinflamatórios. In: GENNARO, A. R. (editor). **Remington: a ciência e a prática da farmácia**. 20. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 1502-1521.

HASHIMOTO, G. (ed.). **Illustrated Cyclopedia of Brazilian Medicinal Plants**. Aboc-Sha: Kamakura, 1996. p. 646.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A.; NAKAMURA, C. V.; FILHO, B. P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 97, p. 1027-1031, 2002.

HOUDE, R. W. Systemic analgesics and related drugs: narcotic analgesics. In: BONICA, J. J.; VENTAFRIDDA, V. (editors). **Advances in pain research and therapy**. New York: Raven Press, 1979. v. 2, p. 263-273.

HOWLAND, R. D.; MYCEK, M. J. **Lippincott's illustrated reviews: pharmacology**. 3. ed. Baltimore, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006. 552 p.

INDAP, M. A.; RADHIKA, S.; MOTIWALE, L.; RAO, K. V. K. Quercetin: antitumour activity and pharmacological manipulations for increased therapeutic gains. **Indian Journal of Pharmacological Sciences**, 68, p. 465-469, 2006.

JAVAN, M.; AHMADIANI, A.; SEMNANIAN, S.; KAMALINEJAD, M. Antinociceptive effects of *Trigonella foenum-graecum* leaves extract. **Journal of Ethnopharmacology**, 58, p. 125-129, 1997.

JOHNSON, J. O. Anestésicos gerais. In: GENNARO, A. R. (editor). **Remington: a ciência e a prática da farmácia**. 20. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 1452-1456.

JOHNSTON, B.; BUTCHER, E. C. Chemokines in rapid leukocyte adhesion triggering and migration. **Seminars in Immunology**, 14, p. 83-92, 2002.

KEITH, M. W.; SALLY, A. L.; MICHAEL, W. S.; THOMAS, J. G.; GARRY, M. M. *Taxus* spp. needles contain amounts of taxol comparable to the stem bark of *Taxus brevifolia*: analysis and isolation. **Journal of Natural Products**, 53, p. 1249-1255, 1990.

KELLY, M.; HWANG, J. M.; KUBES, P. Modulating leukocyte recruitment in inflammation. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 120, n. 1, p. 3-10, 2007.

KINOSHITA, T. Biology of complement: the overture. **Immunology Today**, 12, p. 291-295, 1991.

KINTZIOS, S. E. Terrestrial plant derived anticancer agents and plants used in anticancer research. **Critical Reviews in Plant Sciences**, 25, p. 79-113, 2006.

KIRSCHFINK, M. Controlling the complement system in inflammation. **Immunopharmacology**, 38, p. 51-62, 1997.

KLUG, W. S.; CUMMINGS, M. R. **Essentials of Genetics**. 4. ed. New Jersey: Prentice-Hall, 2002. p. 431-449.

KORHONEN, R.; LAHTI, A.; KANKAANRANTA, H.; MOILANEN, E. Nitric oxide production and signaling in inflammation. **Current Drug Targets. Inflammation and Allergy**, 4, p. 471-479, 2005.

KORSMEYER, S. J. Genes e Neoplasia. In: ISSELBACHER, K. J.; BRAUNWALD, E.; WILSON, J. D.; MARTIN, J. B.; FAUCI, A. S.; KASPER, D. L. **Harrison – Medicina Interna**. 13. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 1995. v. 1, p. 391-398.

KRAYCHETE, D. Antiinflamatórios não-hormonais. In: SILVA, P. **Farmacologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002a. p. 556-565.

KRAYCHETE, D. Opióides. In: SILVA, P. **Farmacologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002b. p. 456-473.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Robbins e Cotran / Patologia – Bases patológicas das doenças**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. 1592 p.

LASKIN, D. L.; PENDINO, K. J. Macrophages and inflammatory mediators in tissue injury. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, 35, p. 655-677, 1995.

LAZO, J. S.; LARNER, J. M. Drogas antineoplásicas individuais. In: BRODY, T. M.; LARNER, J.; MINNEMAN, K. P.; NEU, H. C. **Farmacologia humana: da molecular à clínica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. p. 513-526.

LEE, J. B.; KATAYAMA, S. Inflammation and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. In: SMITH, C. M.; REYNARD, A. M. **Textbook of pharmacology**. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1992. p. 401-435.

LEVY, M.; BRUNE, K.; ZYLBER-KATZ, E.; COHEN, O.; CARACO, Y.; GEISLINGER, G. Cerebrospinal fluid prostaglandins after systemic dipyron intake. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, 64(1), p.117-122, 1998.

LEWIS, G. P. **Legumes of Bahia**. Royal Botanic Garden, Kew, Inglaterra, 1987. p. 369.

LIMA, E. C.; CURY, A. E.; FISCHMAN, O. G.; GIESBRECHT, A. M.; PAULO, M. Q. Atividade antifúngica de extratos de plantas medicinais sobre *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton* isolados de pacientes com dermatofitoses. **13th Brazilian Symposium in Medicinal Plants**. Ceará, Brasil, 1994.

LINDLEY, I.; WESTWICK, J.; KUNKEL, S. Nomenclature announcement: the chemokines. **Immunology Today**, 14, p. 24, 1993.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 4. ed., v. 1. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2002. p. 162.

LYNCH, E. L.; LITTLE, F. F.; WILSON, K. C.; CENTER, D. M.; CRUIKSHANK, W. W. Immunomodulatory cytokines in asthmatic inflammation. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, 14, p. 489-502, 2003.

MACFARLANE, B. V.; WRIGHT, A.; CALLAGHAN, J.; BENSON, H. A. E. Chronic neuropathic pain and its control by drugs. **Pharmacology & Therapeutics**, 75, p. 1-19, 1997.

- MACHADO, A. **Neuroanatomia funcional**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2006. p. 287-308.
- MACKAY, C. R. Chemokines: immunology's high impact factors. **Nature Immunology**, 2, p. 95-101, 2001.
- MCQUAY, H. J. Neuropathic pain: evidence matters. **European Journal of Pain**, 6 (suppl.), p. 11-18, 2002.
- MANTOVANI, A.; BONECCHI, R.; LOCATI, M. Tuning inflammation and immunity by chemokine sequestration: decoys and more. **Nature Reviews Immunology**, 6, p. 907-918, 2006.
- MARGIORIS, A. N.; GRAVANIS, A.; CHROUSOS, G. P. Glicocorticóides e mineralocorticóides. In: BRODY, T. M.; LARNER, J.; MINNEMAN, K. P.; NEU, H. C. **Farmacologia humana: da molecular à clínica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. p. 421-429.
- MENDELSON, J. Princípios de Neoplasia. In: ISSELBACHER, K. J.; BRAUNWALD, E.; WILSON, J. D.; MARTIN, J. B.; FAUCI, A. S.; KASPER, D. L. **Harrison – Medicina Interna**. 13. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 1995. p. 1902-1915.
- MENEZES, I. A. C.; MOREIRA, I. J. A.; CARVALHO, A. A.; ANTONIOLLI, A. R.; SANTOS, M. R. V. Cardiovascular effects of the aqueous extract from *Caesalpinia ferrea*: Involvement of ATP-sensitive potassium channels. **Vascular Pharmacology**, 47, p. 41-47, 2007.
- NAKAMURA E. L. S.; KUROSAKI, F.; ARISAWA, M.; MUKAINAKA, T.; OKUDA, M.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; PASTORE JR, F. Cancer chemopreventive effects of constituents of *Caesalpinia ferrea* and related compounds. **Cancer Letters**, 177, p. 119-124, 2002a.
- NAKAMURA, E. L. S.; KUROSAKI, F.; ARISAWA, M.; MUKAINAKA, T.; TAKAYASU, J.; OKUDA M.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; PASTORE JR, F. Cancer chemopreventive effects of a Brazilian folk medicine, juca, on *in vivo* two-stage skin carcinogenesis. **Journal of Ethnopharmacology**, 81, p. 135-137, 2002b.
- NAPOLITANO, D. R.; MINEO, J. R.; DE SOUZA, M. A.; DE PAULA, J. E.; ESPINDOLA, L. S.; ESPINDOLA, F. S. Down-modulation of nitric oxide production in murine macrophages treated with crude plant extracts from the Brazilian Cerrado. **Journal of Ethnopharmacology**, 99, p. 37-41, 2005.
- NASCIMENTO, M. P. S. C. B.; OLIVEIRA, M. E.; MIURA, C. L. Q.; REIS, J. C. B.; NASCIMENTO, H. T. S.; LEITE, J. M. B.; LOPES, J. B.; RIBEIRO, V. Q. Potencial forrageiro do pau-ferro. In: **Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento**, 41. Teresina: Embrapa, Outubro, 2002. 16 p.
- NATESAN, S.; BADAMI, S.; DONGRE, S. H.; GODAVARTHI, A. Antitumor activity and antioxidant status of the methanol extract of *Careya arborea* bark against Dalton's lymphoma ascites-induced ascitic and solid tumor in mice. **Journal of Pharmacological Sciences**, 103, p. 12-23, 2007.
- NATHAN, C. F. Points of control in inflammation. **Nature**, 420, p. 846-852, 2002.
- NELSON, W. L. Antihistamines and related antiallergic and antiulcer agents. In: WILLIAMS, D. A.; LEMKE, T. L. **Foye's principles of medicinal chemistry**. 5. ed. Baltimore, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002. p. 794-818.

OSAWA, T.; KAWAKISHI, S.; NAMIKI, M. In: KURODA, Y.; SHANKEL, D.M.; WATERS, M. D. (editors). **Antimutagenesis and anticarcinogenesis mechanism II**. New York: Plenum, 1990. p. 139-153.

PARK, J. H.; OH, S.; LIM, S. S.; LEE, Y. S.; SHIN, H. K.; OH, Y. S.; CHOE, N. H.; PARK, J. H. Y.; KIM, J. K. Induction of heme oxygenase-1 mediates the anti-inflammatory effects of the ethanol extract of *Rubus coreanus* in murine macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 351, p. 146-152, 2006.

PATT, R. B. Control of pain associated with advanced malignancy. In: ARONOFF, G. M. (editor). **Evaluation and treatment of chronic pain**. 2. ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1992, p. 313-339.

PENNA, J. F. M. **Dicionário brasileiro de plantas medicinais**. 3. ed. Rio de Janeiro: Komos, 1964.

PEREIRA, F. E. L. Inflamações. In: BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo: Patologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 130-174.

PERISSINOTTI, D. M. N. Dor psicogênica. In: TEIXEIRA, M. J.; FIGUEIRÓ, J. A. B. **Dor: epidemiologia, fisiopatologia, avaliação, síndromes dolorosas e tratamento**. São Paulo: Grupo Editorial Moreira Jr., 2001. p. 82-85.

PETHO, G.; DEROW, A.; REEH, P. W. Bradykinin-induced nociceptor sensitization to heat is mediated by cyclooxygenase products in isolated rat skin. **European Journal of Neuroscience**, 14, p. 210-218, 2001.

PIO CORRÊA, M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, 1984. p. 687.

PLEUVRY, B. J.; LAURETTI, G. R. Biochemical aspects of chronic pain and its relationship to treatment. **Pharmacology & Therapeutics**, 71, p. 313-324, 1996.

PRADO, W. A. Neurofisiologia e neuroquímica da dor aguda e crônica. In: ANDRADE FILHO, A. C. C. (editor). **Dor: diagnóstico e tratamento**. 1. ed. São Paulo: Roca, 2001. p. 1-5.

PREMALATHA, B.; RAJGOPAL, G. Cancer – an ayurvedic perspective. **Pharmacological Research**, 51, p. 19-30, 2005.

PRESCOTT, L. F. Therapeutic misadventure with paracetamol: fact or fiction? **American Journal of Therapeutics**, 7, p. 99-114, 2000a.

PRESCOTT, L. F. Paracetamol: past, present, and future. **American Journal of Therapeutics**, 7, p. 99-114, 2000b.

QUEIROZ, M. L.; JUSTO, G. Z.; VALADARES, M. C.; PEREIRA-DA-SILVA, F. R. Evaluation of *Caesalpinia ferrea* extract on bone marrow hematopoiesis in the murine models of listeriosis and Ehrlich ascites tumor. **Immunopharmacology & Immunotoxicology**, 23(3), p. 367-382, 2001.

RAISON, L. C.; CAPURON, L.; MILLER, A. H. Cytokines sing the blues: inflammation and the pathogenesis of depression. **Trends in Immunology**, 27, p. 24-31, 2006.

RAJEWSKY, M. F.; ENGELBERGS, J.; THOMALE, J.; SCHWEER, T. DNA repair: counteragent in mutagenesis and carcinogenesis – accomplice in cancer therapy resistance. **Mutation Research**, 462, p. 101-105, 2000.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia**. 5. ed. trad. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004. 904 p.

RANSOHOFF, R. M.; GLABINSKI, T. A.; TANI, M. Chemokines in immune-mediated inflammation of the central nervous system. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, 7, n. 1, p. 35-46, 1996.

REDBURN, D. A.; DAHL, N. Sensory receptors of the somatosensory system. In: JOHNSON, L. R. (editor) **Essential medical physiology**. 2. ed. Philadelphia: Lippincot-Raven Publishers, 1998. p. 685-692.

REIS, D. S.; SOUZA, M. A.; MINEO, J. R.; ESPINDOLA, F. S. Myosin V and iNOS expression is enhanced in J774 murine macrophages treated with IFN- γ . **Brazilian Journal of Medical Biological Research**, 34, p. 221-226, 2001.

RICHARDSON, D. S.; JOHNSON, S. A. Anthracyclines in haematology: preclinical studies, toxicity and delivery systems. **Blood Reviews**, 11, p. 201-223, 1997.

ROBERTS II, L. J.; MORROW J. D. Analgesic-antipyretic and antiinflammatory agents and drugs employed in the treatment of gout. In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E.; GILMAN, A. G. (editors). **Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics**. 10. ed. New York: McGraw- Hill, 2001. p. 817-731.

ROITT, I.; RABSON. **Imunologia básica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 183 p.

ROJA, G.; HEBLE, M. R. The quinoline alkaloid camptothecin and 9-methoxy camptothecin from tissue cultures and mature trees of *Nathapodytes foetida*. **Phytochemistry**, 36, p. 65-66, 1994.

ROMERO, R.; ESPINOZA, J.; GONÇALVES, L. F.; KUSANOVIC, J. P.; FRIEL, L. A.; NIEN, J. K. Inflammation in preterm and term labour and delivery. **Seminars in Fetal & Neonatal Medicine**, 11, p. 317-326, 2006.

ROT, A.; VON ANDRIAN, U. H. Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokines grammar for immune cells. **Annual Reviews of Immunology**, 22, p. 891-928, 2004.

SAKATA, R. K. Tratamento da dor no doente com câncer. In: TEIXEIRA, M. J.; FIGUEIRÓ, J. A. B. **Dor: epidemiologia, fisiopatologia, avaliação, síndromes dolorosas e tratamento**. São Paulo: Grupo Editorial Moreira Jr., 2001. p. 201-207.

SANTOS PIMENTA, L. P.; PINTO, G. B.; TAKAHASHI, J. A.; SILVA, L. G.; BOAVENTURA, M. A. Biological screening of annonaceous Brazilian medicinal plants using *Artemia salina* (brine shrimp) test. **Phytomedicine**, 10, p. 209-212, 2003.

SCHREIBER, H. Tumour immunology. In: PAUL, W. (editor). **Fundamental immunology**. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1999. p. 1237-1270.

SCHULTZBERG, M.; LINDBERG, C.; ARONSSON, A. F.; HJORTH, E.; SPULBER, S. D.; OPRICA, M. Inflammation in the nervous system - Physiological and pathophysiological aspects. **Physiology & Behavior**, 92, p. 121-128, 2007.

SILVA, M. J.; ALMEIDA, L. A. Quimioterapia. In: BARACAT, F. F.; FERNANDES JR., H. J.; SILVA, M. J. **Cancerologia Atual: Um Enfoque Multidisciplinar**. São Paulo: Roca, 2000. p. 120-133.

SILVA, E. D.; MORAES, T. M. Controle da dor. In: BARACAT, F. F.; FERNANDES JR., H. J.; SILVA, M. J. **Cancerologia Atual: Um Enfoque Multidisciplinar**. São Paulo: Roca, 2000. p. 145-149.

SILVERTHORN, D. U. **Fisiologia humana: uma abordagem integrada**. 2. ed. Barueri: Manole, 2003. 816 p.

SIMONS, F. E. R.; SIMONS, K. J. Histamine and H₁-receptor antagonists. In: SMITH, C. M.; REYNARD, A. M. **Textbook of pharmacology**. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1992. p. 1104-1118.

SLICHENMYER, W. J.; ROWINSKY, E. K.; DONEHOWER, R. C.; KAUFMANN, S. H. The current status of camptothecin analogues as antitumor agents. **Journal of the National Cancer Institute**, 85, p. 271-291, 1993.

SMITH, C. M. Opioid analgesics – agonists and antagonists. In: SMITH, C. M.; REYNARD, A. M. **Textbook of pharmacology**. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1992a. p. 226-250.

SMITH, C. M. General anesthesia and general anesthetics. In: SMITH, C. M.; REYNARD, A. M. **Textbook of pharmacology**. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1992b. 183-212.

SOARES, C. R. O tratamento radioterápico do câncer. In: BARACAT, F. F.; FERNANDES JR., H. J.; SILVA, M. J. **Cancerologia Atual: Um Enfoque Multidisciplinar**. São Paulo: Roca, 2000. p. 99-103.

SOEJARTO, D. D. Biodiversity prospecting and benefit-sharing: perspectives from the field. **Journal of Ethnopharmacology**, 51, p. 1-15, 1996.

SOSA, S.; BALICK, M. J.; ARVIGO, R.; ESPOSITO, R. G.; PIZZA, C.; ALTINIER, G.; TUBARO, A. Screening of the topical anti-inflammatory activity of some Central American plants. **Journal of Ethnopharmacology**, 81, p. 211-215, 2002.

SPIEGEL, P. Farmacoterapia com analgésicos opiáceos. In: ANDRADE FILHO, A. C. C. (editor). **Dor: diagnóstico e tratamento**. 1. ed. São Paulo: Roca, 2001. p. 247-254.

STAKER, B. L.; HJERRILD, K.; FEESE, M. D.; BEHNKE, C. A.; BURGIN JR., A. B.; STEWART, L. The mechanism of topoisomerase I poisoning by a camptothecin analog. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, 99, p. 15387-15392, 2002.

STEVENS, A.; LOWE, J. **Patologia**. 2 ed. Barueri: Manole, 2002, 655 p.

SUNG, Y-F.; HOLTZMAN, S. G. Anestésicos gerais. In: BRODY, T. M.; LARNER, J.; MINNEMAN, K. P.; NEU, H. C. **Farmacologia humana: da molecular à clínica**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1997. p. 355-368.

SUYENAGA, E. S.; RECHE, E., FARIAS, F. M.; SCHAPOVAL, E. E.; CHAVES, C. G.; HENRIQUES, A. T. Antiinflammatory investigation of some species of *Mikania*. **Phytotherapy Research**, 16, p. 519-523, 2002.

TEIXEIRA, M. J. Fisiopatologia da dor neuropática. In: ANDRADE FILHO, A. C. C. (editor). **Dor: diagnóstico e tratamento**. 1. ed. São Paulo: Roca, 2001a. p. 7-42.

TEIXEIRA, M. J. Anatomia e fisiologia das vias nociceptivas e supressoras da dor. In: TEIXEIRA, M. J.; FIGUEIRÓ, J. A. B. **Dor: epidemiologia, fisiopatologia, avaliação, síndromes dolorosas e tratamento**. São Paulo: Grupo Editorial Moreira Jr., 2001b. p. 14-40.

TEIXEIRA, M. J. Fisiopatologia da dor neuropática. In: TEIXEIRA, M. J.; FIGUEIRÓ, J. A. B. **Dor: epidemiologia, fisiopatologia, avaliação, síndromes dolorosas e tratamento**. São Paulo: Grupo Editorial Moreira Jr., 2001c. p. 41-57.

TEIXEIRA, M. J. Princípios de tratamento da dor. In: TEIXEIRA, M. J.; FIGUEIRÓ, J. A. B. **Dor: epidemiologia, fisiopatologia, avaliação, síndromes dolorosas e tratamento**. São Paulo: Grupo Editorial Moreira Jr., 2001d. p. 86-92.

TEIXEIRA, M. J.; SOUZA, A. C. F. Dor – evolução histórica dos conhecimentos. In: TEIXEIRA, M. J.; FIGUEIRÓ, J. A. B. **Dor: epidemiologia, fisiopatologia, avaliação, síndromes dolorosas e tratamento**. São Paulo: Grupo Editorial Moreira Jr., 2001. p. 8-13.

TEIXEIRA, M. J.; VALLE, L. B. S. Tratamento farmacológico da dor. In: TEIXEIRA, M. J.; FIGUEIRÓ, J. A. B. **Dor: epidemiologia, fisiopatologia, avaliação, síndromes dolorosas e tratamento**. São Paulo: Grupo Editorial Moreira Jr., 2001. p. 93-130.

THIES, A.; MOLL, I.; BERGER, J.; SCHUMACHER, U. Lectin binding to cutaneous malignant melanoma, HPA is associated with metastasis formation. **British Journal of Cancer**, 84, p. 819-823, 2001.

THOMAS, G. **Química medicinal: uma introdução**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 413 p.

THOMAS, G.; ARAÚJO, C. C.; SOUZA, P. S. Avaliação das atividades antiinflamatória, analgésica e antipirética dos extratos aquosos de *Caesalpinia ferrea*, *Plantago major*, *Polygonum acre* e *Pterodon polygaeflorus*. **10th Brazilian Symposium in Medicinal Plants**. São Paulo, Brasil, 1988.

TRACEY, K. J. The inflammatory reflex. **Nature**, 420, p. 853-859, 2002.

TRENAM, C. W.; BLAKE, D. R.; MORRIS, C. J. Skin inflammation: reactive oxygen species and the role of iron. **The Journal of Investigative Dermatology**, 99, p. 675-682, 1992.

TURK, D. C.; MELZACK, R. **The measurement of pain and the assessment of people experiencing pain**. **Handbook of pain assesment**. New York London: The Guilford Press, 1992, p. 3-12.

TURK, D. C.; OKIFUJI, A. Pain terms and taxonomies of pain. In: LOESER, J. D.; BUTLER, S. H.; CHAPMAN, C. R.; TURK, D. C. (editors). **Bonica's management of pain**. 3. ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. p. 17-25.

TURNER, D. M. Natural product source material use in the pharmaceutical industry: the Glaxo experience. **Journal of Ethnopharmacology**, 51, p. 39-44, 1996.

VANE, J. R.; BOTTING, R. M. New insights in the mode of action of antiinflammatory drugs. **Inflammation Research**, 44, p. 1-10, 1995.

VERPOORTE, R. Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development. **Drug Discovery Today**, 3, p. 232-238, 1999.

VOET, D.; VOET, J. G. **Biochemistry**. New York: John Wiley & Sons, 1999. p. 773-806.

WALL, P. D.; MELZACK, R. The measurement of pain and the assessment of the people experiencing pain. In: WALL, P. D.; MELZACK, R. (editors). **Textbook of Pain**. Edimburgh: Churchill Livingstone, 1994, p. 3.

WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. B. C. Princípios gerais no tratamento da inflamação. In: FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. B. C. (editores). **Farmacologia clínica: Fundamentos da terapêutica racional**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004a. p. 294-295.

WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. B. C. Antiinflamatórios esteróides. In: FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. B. C. (editores). **Farmacologia clínica: Fundamentos da terapêutica racional**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004b. p. 307-322.

WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. B. C. Princípios gerais no tratamento da dor. In: FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. B. C. (editores). **Farmacologia clínica: Fundamentos da terapêutica racional**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004c. p. 152-156.

WHITE, H. S. Histamina e anti-histamínicos. In: GENNARO, A. R. (editor). **Remington: a ciência e a prática da farmácia**. 20. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. p. 1522-1528.

WINKELSTEIN, A. Immunopharmacology. In: SMITH, C. M.; REYNARD, A. M. **Textbook of pharmacology**. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1992. p. 964-983.

WOOLF, C. J.; MARNION, R. J. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms, and management. **Lancet**, 353, p. 1959-1964, 1999.

XIMENES, N. C. A. **Purificação e Caracterização da Lectina da Vagem de *Caesalpinia ferrea* (CfePL): Aplicação Biológica**. Recife: UFPE, 2004. (Dissertação para obtenção do título de Mestre em Bioquímica – Departamento de Bioquímica – Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco). 53 p.

6 ANEXOS

- Parecer da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE
- Resumo do trabalho apresentado na II Reunião Regional da FeSBE (Federação de Sociedades de Biologia Experimental) – UFPE – 2007
- Instruções de autores do periódico Journal of Ethnopharmacology
- Instruções de autores do periódico Phytomedicine

Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Ciências Biológicas

Av. Prof. Nelson Chaves, s/n
50670-420 / Recife - PE - Brasil
Fones: (55 81) 2126 8840 | 2126 8351
Fax: (55 81) 2126 8350
www.ccb.ufpe.br



Ofício nº 40/06

Recife, 26 de julho de 2006

Da Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE
Para: **Profa. Teresinha Gonçalves da Silva**
Departamento de Antibióticos - UFPE

Os membros da Comissão de Ética em Experimentação Animal do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco (CEEA-UFPE) avaliaram a resposta de V. Sa. referente ao primeiro parecer da CEEA sobre o projeto de pesquisa intitulado "**Avaliação das Atividades antiinflamatória e antitumoral de derivados indólicos- tiazolidinônicos e lectina isolada de vagem de *Caesalpinia ferrea***".

Concluímos que os procedimentos descritos para a utilização experimental dos animais encontram-se de acordo com as normas sugeridas pelo Colégio Brasileiro para Experimentação Animal e com as normas internacionais estabelecidas pelo National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals as quais são adotadas como critérios de avaliação e julgamento pela CEEA-UFPE.

Encontra-se de acordo com as normas vigentes no Brasil, especialmente a Lei 9.605 – art. 32 e Decreto 3.179-art 17, de 21/09/1999, que trata da questão do uso de animais para fins científicos.

Diante do exposto, emitimos **parecer favorável** aos protocolos experimentais realizados.

Atenciosamente,


Prof. Silene Carneiro do Nascimento
 Presidente CEEA

04.013 - Produtos Naturais

AVALIAÇÃO DE ATIVIDADE CITOTÓXICA DE AMOSTRAS LECTÍNICAS DA VAGEM DE CAESALPINIA FERREA MART. EX TUL. VAR. FERREA. ¹Silva, A. C. C.; ²Ximenes, N. C. A.; ³Coelho, L. C. B. B.; ⁴Carneiro-da-Cunha, M. G.; ⁵Silva, T. G.; ⁶Correia, M. T. S.; ^{1, 2, 3, 4, 6}Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco; ⁵Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco;

Objetivo: Devido ao fato de algumas lectinas apresentarem atividades citotóxica e antitumoral, objetivou-se avaliar a citotoxicidade de uma fração (F), com atividade lectínica, parcialmente purificada (F80) e de uma lectina pura, CfePL (do inglês *Caesalpinia ferrea Pod Lectin*), obtidas da vagem de *Caesalpinia ferrea*, árvore vulgarmente conhecida como pau-ferro ou jucá, que cresce em todo o Brasil, principalmente em Pernambuco e no Ceará e bastante utilizada na medicina popular, inclusive na prevenção do câncer.

Métodos e Resultados: F80 e CfePL foram purificadas a partir de um extrato (a 10%, p/v) feito com a farinha da vagem de *C. ferrea* em NaCl 0,15 M e submetido a fracionamento salino com sulfato de amônio à uma saturação de 80% (F80), seguido de cromatografia em coluna de quitina (CfePL). Diferentes concentrações de F80 e de CfePL (10; 5; 2,5; 1,25 µg/mL) foram incubadas separadamente em placas de microtitulação com suspensões em meio de cultura (*Minimum Essential Medium Eagle Modified Dulbecco's*, DMEM) contendo 10⁵ células/mL (220 µL em cada poço) das linhagens NCI-H292 (células mucoepitelióides obtidas a partir de um carcinoma de pulmão humano) e HEP-2 (derivadas de tumor primário da laringe humana), por 72 h em estufa a 37 °C. Após este período de contato entre as células e as amostras, foi adicionado em cada poço 25 µL de brometo-3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difeniltetrazólio (MTT) a uma concentração de 5 mg/mL em PBS (p/v) e as placas foram deixadas por 2 h em estufa (37 °C). Posteriormente o meio de cultura juntamente com o excesso de MTT foi aspirado, seguido de adição de 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO) a cada poço para a dissolução dos cristais de "formazan". O ensaio foi realizado em quadruplicata e o controle recebeu apenas NaCl 0,15 M. A leitura óptica foi feita em leitor automático de placas a 595 nm. A densidade óptica (DO) média dos poços testes foi comparada com a DO média dos poços controle a fim de se determinar a CI₅₀ (concentração que inibe 50% da proliferação celular). Os testes revelaram que não houve diferenças entre o controle e as amostras estudadas, não sendo possível determinar a CI₅₀, mesmo na maior concentração utilizada (10 µg/mL).

Conclusões: As amostras lectínicas (F80 e CfePL) avaliadas não apresentam atividade citotóxica frente às linhagens celulares estudadas.

Apoio Financeiro: Capes, CNPq

Data de Apresentação: 01/06/2007



<http://www.elsevier.com>

JOURNAL OF ETHNOPHARMACOLOGY

An Interdisciplinary Journal Devoted to Indigenous Drugs
The Official Journal of the International Society of
Ethnopharmacology

Guide for Authors

I. Scope of the Journal

The *Journal of Ethnopharmacology* is dedicated to the exchange of information and understandings about people's use of plants, fungi, animals, microorganisms and minerals and their biological and pharmacological effects based on the principles established through international conventions. Early people, confronted with illness and disease, discovered a wealth of useful therapeutic agents in the plant and animal kingdoms. The empirical knowledge of these medicinal substances and their toxic potential was passed on by oral tradition and sometimes recorded in herbals and other texts on *materia medica*. Many valuable drugs of today (e.g., atropine, ephedrine, tubocurarine, digoxin, reserpine) came into use through the study of indigenous remedies. Chemists continue to use plant-derived drugs (e.g., morphine, taxol, physostigmine, quinine, emetine) as prototypes in their attempts to develop more effective and less toxic medicinals.

In recent years the preservation of local knowledge, the promotion of indigenous medical systems in primary health care, and the conservation of biodiversity have become even more of a concern to all scientists working at the interface of social and natural sciences but especially to ethnopharmacologists. Recognizing the sovereign rights of States over their natural resources, ethnopharmacologists are particularly concerned with local people's rights to further use and develop their autochthonous resources. Accordingly, today's Ethnopharmacological research embraces the multidisciplinary effort in the documentation of indigenous medical knowledge, scientific study of indigenous medicines in order to contribute in the long-run to improved health care in the regions of study, as well as search for pharmacologically unique principles from existing indigenous remedies.

The *Journal of Ethnopharmacology* publishes original articles concerned with the observation and experimental investigation of the biological activities of plant and animal substances used in the traditional medicine of past and present cultures. The journal will particularly welcome interdisciplinary papers with an **ethnopharmacological**, an **ethnobotanical** or an **ethnochemical** approach to the study of indigenous drugs. Reports of **anthropological** and **ethnobotanical** field studies fall within the journal's scope. Studies involving **pharmacological** and **toxicological** mechanisms of action are especially welcome. **Clinical studies** on efficacy will be considered if contributing to the understanding of specific ethnopharmacological problems.

The journal welcomes review articles in the above mentioned fields especially those highlighting the multi-disciplinary nature of ethnopharmacology. Commentaries are by invitation only. All reviews and commentaries are fully peer-reviewed. Potential authors are strongly encouraged to contact the Reviews Editor (ethnopharmacol@pharmacity.ac.uk) prior to writing a review. A one-page outline and a short C.V. of the (senior) author should also be included.

THE "RULES OF 5"

The Editors and Editorial Board have developed the "Rules of 5" for publishing in JEP. We have produced five clear criteria that each author needs to think about before submitting a manuscript and setting the whole process of editing and reviewing at work. [Click here.](#)

II. Preparation of manuscripts

Authors who want to submit a manuscript should consult and peruse carefully recent issues of the journal for format and style. Authors must include the following contact details on the title page of their submitted manuscript: full postal address; fax; e-mail. All manuscripts submitted are subject to peer review. The minimum requirements for a manuscript to qualify for peer review are that it has been prepared by strictly following the format and style of the journal as mentioned, that it is written in good English, and that it is complete. Manuscripts that have not fulfilled these requirements will be returned to the author(s).

Contributions are accepted on the understanding that the authors have obtained the necessary authority for publication. Submission of multi-authored manuscripts implies the consent of each of the authors. The publisher will assume that the senior or corresponding author has specifically obtained the approval of all other co-authors to submit the article to this journal. Submission of an article is understood to imply that it is not being considered for publication elsewhere and that the author(s) permission to publish his/her article in this journal implies the exclusive authorization to the publisher to deal with all issues concerning copyright therein. Further information on copyright can be found on the Elsevier website.

In the covering letter, the author must also declare that the study was performed according to the international, national and institutional rules considering animal experiments, clinical studies and biodiversity rights. See below for further information. The ethnopharmacological importance of the study must also be explained in the cover letter.

Animal and clinical studies - Investigations using experimental animals must state in the Methods section that the research was conducted in accordance with the internationally accepted principles for laboratory animal use and care as found in for example the European Community guidelines (EEC Directive of 1986; 86/609/EEC) or the US guidelines (NIH publication #85-23, revised in 1985). Investigations with human subjects must state in the Methods section that the research followed guidelines of the Declaration of Helsinki and Tokyo for humans, and was approved by the institutional human experimentation committee or equivalent, and that informed consent was obtained. The Editors will reject papers if there is any doubt about the suitability of the animal or human procedures used.

Biodiversity rights - Each country has its own rights on its

biodiversity. Consequently for studying plants one needs to follow the international, national and institutional rules concerning the biodiversity rights.

1. Manuscript types

The *Journal of Ethnopharmacology* will accept the following contributions:

1. Original research articles - whose length is not limited and should include Title, Abstract, Methods and Materials, Results, Discussion, Conclusions, Acknowledgements and References. As a guideline, a full length paper normally occupies no more than 10 printed pages of the journal, including tables and illustrations.
2. Ethnopharmacological communications (formerly Short Communications) - whose average length is not more than 4 pages in print (approx. 2000-2300 words, including abstract and references). A maximum of 2 illustrations (figures or tables) is allowed. See paragraph below for description and format.
3. Letters to the Editors.
4. Reviews - Authors intending to write review articles should consult and send an outline to the Reviews Editor (see inside front cover for contact information) before preparing their manuscripts. The organization and subdivision of review articles can be arranged at the author's discretion. Authors should keep in mind that a good review sets the trend and direction of future research on the subject matter being reviewed. Tables, figures and references are to be arranged in the same way as research articles in the journal. Reviews on topics that address cutting-edge problems are particularly welcome.
5. Book reviews - Books for review should be sent to the Reviews Editor.
6. Commentaries - invited, peer-reviewed, critical discussion about crucial aspects of the field but most importantly methodological and conceptual-theoretical developments in the field and should also provide a standard, for example, for pharmacological methods to be used in papers in the *Journal of Ethnopharmacology*. The scientific dialogue differs greatly in the social / cultural and natural sciences, the discussions about the common foundations of the field are ongoing and the papers published should contribute to a transdisciplinary and multidisciplinary discussion. The length should be a maximum of 2-3 printed pages or 2500 words. Please contact the Reviews Editor (ethnopharmacology@pharmacy.ac.uk) with an outline.
7. Conference announcements and news.

2. General procedures

The language of the Journal is English. Manuscripts should be neatly typed, double-spaced throughout, including tables, on pages of uniform size with at least 2.5 cm margins on all sides. Use one font type and size throughout the manuscript. Author(s) should not break or hyphenate words. When using an electronic printer, the right-hand margin should not be justified. Footnotes in text are not permitted. The text of the manuscript must be paginated, the first page being the title page. The manuscript, typed with double spacing and ample margins, should be submitted with a cover letter (containing the declaration that the study was performed according to the international, national and institutional rules considering animal experiments, clinical studies and biodiversity rights and a

clear explanation of the ethnopharmacological importance of the study) and a completed Author Checklist ([click here](#)).

The following format and order of presentation is suggested.

2.1. Title, author(s), address(es)

The title should be no longer than 100 letters, including spaces. Initials or first and middle names followed by last name of the author or authors must be given (not last name followed by initials). If there are two or more authors with different addresses, use a superscripted letter (a, b, c etc.), not a number, at the end of the last name of each author to indicate his/her corresponding address. The full address of the corresponding author (the way the author wishes to be contacted) should be provided. The corresponding (usually, the senior) author, to whom correspondence and proofs will be sent, must be indicated by an asterisk and footnoted, and in the footnote, his/her telephone and fax numbers, and e-mail address must be indicated. Address(es) should be underlined or italicised.

2.2. Abstract

The abstract should be structured with five sub-headings: Ethnopharmacological relevance; Aim of the Study; Materials and Methods; Results; Conclusions. The text should not exceed 200 words and has to be presented at the beginning of the paper. Unsubstantiated speculation should not be included. Footnotes may not be used. References, if cited, must provide complete publication data.

2.3. Text layout

The text of a research paper should be divided into the following headings: Introduction, Methodology (or Materials and Methods), Results, and Discussion and conclusions. Each heading (and subheading) must be numbered using the convention established in the journal. Acknowledgements should come after Discussion and conclusions and before References; Acknowledgements and References are not to be numbered. Headings must be bold-faced and written in an upper-and-lower case style [not in caps], while subheadings should be underlined or italicised. Tables and figures are to be placed at the end of the text, after References. Authors are required to include: (i) the chemical structure, formula and proprietary name of novel or ill-defined compounds; (ii) the w/w yield of prepared extracts in terms of starting crude material; (iii) complete formulation details of all crude drug mixtures; (iv) the voucher herbarium specimen number of the plant(s) studied in case of less well known plants, cited using the collector and collection number (e.g., Doe 123), and indicating the name of the herbarium institution where it has been deposited. All plant materials must be fully identified as in the following illustration: *Catharanthus roseus* (L.) G. Don f. *albus* Pich. (Apocynaceae) as authenticated by Dr. John Doe, Department of Botany, University of Connecticut.

2.4. Guidelines for Plant and Animal Names

All scientific names (Latin binomials) must be underlined or italicised throughout the text and in the tables and figures. For plant and animal species, full or complete scientific names, genus-species and the correct authority citation, must be used, when that name appears for the first time in text. The authority citation may be dropped in subsequent mention of that name throughout the text. The family name must follow the scientific name in parentheses when the name appears for the first time in the text. Full scientific names and the family name of the subject plants/animals must be

used in the Abstract. Synonyms must be indicated in parentheses and preceded by the word "syn." followed by a colon. Authors are advised to consult the International Plant Name Index (IPNI) (<http://www.ipni.org>) and W3Tropicos (<http://www.mobot.org>) web-based databases to determine the correct spelling of full plant scientific names. Generic names may be abbreviated (e.g., *C. roseus* for *Catharanthus roseus*), provided such practice does not lead to confusion; generic names, however, must not be abbreviated when the name appears for the first time in the text. Specific epithets must never be abbreviated; thus, the use of *Catharanthus r.* is not allowed.

2.5. Keywords

Authors are requested to assign 3-6 keywords to the manuscript, preferably taken from Index Medicus or Excerpta Medica Index, for abstracting and indexing purposes. These keywords should be typed at the end of the Abstract. Each keyword should start with a capital letter and be separated from each other by a semi-colon.

2.6. Tables, illustrations and graphs

Tables should be on separate sheets, one table per sheet, and should bear a short descriptive title. Footnotes in tables should be indicated by consecutive superscript letters, not numbers.

Figures should be original ink drawings, photographs or computer drawn figures in the original, and of high quality, ready for direct reproduction. Xerox copies are unacceptable as they give unsatisfactory results after final printing. Figures should be drawn in such a way that they can be reduced to 8 cm in width (i.e., the column width); in exceptional cases a reduction to a width of 17.5 cm will be allowed. All lettering should be such that height of 1.2-1.5mm (minimum) of numbers and capital letters results after reduction. Numerical scales, scale and curve legends, and all other lettering within the figure itself should be drawn with a lettering guide (stencil) or should be done using striplitters (Letraset, etc.). All figures should have captions. Each figure should be identified in the margin or at the back in a corner with the name of the author and the figure number. The figure captions should be on a separate sheet. One set of original drawings is required.

Colour illustrations should be submitted as original photographs, high-quality computer prints or transparencies, close to the size expected in publication, or as 35 mm slides. Polaroid colour prints are not suitable. If, together with your accepted article, you submit usable colour figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in colour on the web (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. For colour reproduction in print, you will receive information regarding the total cost from Elsevier after receipt of your accepted article. The 2006 price for color figures is EUR 285 for the first page and EUR 191 for subsequent pages.

For further information on the preparation of electronic artwork, please see <http://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Please note: Because of technical complications which can arise by converting colour figures to 'grey scale' (for the printed version should you not opt for colour in print) please submit in addition usable black and white prints corresponding to all the colour illustrations.

2.7. References

References should be referred to by name and year (Harvard system) chronologically in the text (e.g.: Brown and Penny, 1973; Stuart, 1979; Ageel et al., 1987) and listed alphabetically at the end of the paper. No ampersand should be used and the words "et al." should not be underlined or italicized. Only papers and books that have been published or in press may be cited.

For papers in press, please cite the DOI article identifier. The Digital Object Identifier (DOI) is a persistent identifier which may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The DOI will never change. Therefore, it is an ideal medium for citing Articles in Press, which have not yet received their full bibliographic information. *Unpublished manuscripts or manuscripts submitted to a journal but which have not been accepted may not be cited.* Journal and book titles should not be underlined or italicised and should be given in full in the reference list, with no underline or italics.

Examples:

Journals:

Britton, E. B., 1984. A pointer to a new hallucinogen of insect origin. *Journal of Ethnopharmacology* 12, 331-333.

Books:

Emboden, W., 1972. *Narcotic Plants*. Studio Vista, London, p. 24.

Multiauthor Books:

Farnsworth, N.R., 1988. Screening plants for new medicines. In: E.O. Wilson and F.M. Peter (Eds.), *Biodiversity*, National Academy Press, Washington, D.C., pp. 83-97.

Ethnopharmacological Communications (formerly short

- communications) are brief contributions on:
 - isolation of biological active compound(s) from a traditional medicine,
 - screening of a series traditional medicines for biological activity,
 - study on a pharmacological activity of a traditional medicine,
 - study on the toxicology of a traditional medicine.

(Click here) for examples of various formats.
Articles in Special Issues: Please ensure that the words 'this issue' are added (in the list and text) to any references to other articles in this Special Issue.

III. Submission

All manuscripts (except reviews, commentaries and book reviews) must be submitted to (<http://www.elsevier.com/journals>)

Each Submission must include a cover letter (containing the declaration that the study was performed according to the international, national and institutional rules considering animal experiments, clinical studies and biodiversity rights and a clear explanation of the ethnopharmacological importance of the study) and a completed Author Checklist ([click here](#)).

If an author cannot submit their manuscript electronically, then please send to:

Professor Dr R. Verpoorte
Editor-in-Chief, *Journal of Ethnopharmacology*
Division of Pharmacognosy
Institute of Biology
Leiden University

P.O. Box 9502
2300 RA Leiden
The Netherlands

IV. Copyright regulations for authors

Upon acceptance of an article, authors will be asked to sign a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright see <http://www.elsevier.com/copyright>). Acceptance of the agreement will ensure the widest possible dissemination of information. An e-mail (or letter) will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <http://www.elsevier.com/permissions>).

If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <http://www.elsevier.com/permissions>.

V. Authors' rights

As an author you (or your employer or institution) retain certain rights; for details you are referred to <http://www.elsevier.com/authorsrights>.

VI. Correcting proofs and reprints

Proofs will be sent to the corresponding author. Elsevier is now sending PDF proofs by e-mail for correction. If an author is unable to handle this process, regular print proofs will be sent. Elsevier will do everything possible to get the article corrected and published as quickly and accurately as possible. Therefore, it is important to ensure that all corrections are sent back in ONE communication. Subsequent corrections will not be possible. Only typesetting errors may be corrected; no changes in, or additions to, the accepted manuscript will be allowed. Proofs should be returned to Elsevier within 48 hours. Twenty-five offprints of each paper will be supplied free of charge to the corresponding author. Additional offprints can be ordered at prices shown on the offprint order form that accompanies the copyright form.

VII. Language Services

Authors who require information about language editing and copyediting services pre- and post-submission please visit <http://www.elsevier.com/locate/languagepolishing> or contact authorsupport@elsevier.com for more information. Please note Elsevier neither endorses nor takes responsibility for any products, goods or services offered by outside vendors through our services or in any advertising. For more information please refer to our Terms & Conditions <http://www.elsevier.com/termsandconditions>.

VIII. Funding body agreements and policies

Elsevier has established agreements and developed policies to allow authors who publish in Elsevier journals to comply with potential manuscript archiving requirements as specified as conditions of their grant awards. To learn more about existing agreements and policies please visit <http://www.elsevier.com/fundingbodies>.

IX. Author enquiries

For enquiries relating to the submission of articles (including electronic submission where available) please visit this journal's homepage at <http://www.elsevier.com/locate/jethpharm>. You can track accepted articles at <http://www.elsevier.com/trackarticle> and set up e-mail alerts to inform you of when an article's status has changed. Also accessible from here is information on copyright, frequently asked questions and more.

© Copyright 2007 Elsevier | <http://www.elsevier.com>

Phytomedicine

International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology

Instructions to Authors

Aims and Scopes

PHYTOMEDICINE An international Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology is devoted to the advancement and promotion of research on medicinal plants.

The following areas are covered:

- Clinical studies of standardized preparations
- Pharmacological and molecular biological studies of standardized plant extracts
- New pharmacological and molecular biological results on isolated plant constituents having significant bioactivity
- Pharmacokinetic and bioavailability studies of prominent bioactive compounds from standardized plant extracts
- New standardization methods for prominent plant extracts and their constituents
- Results presented have to be innovative and should be discussed with respect to possible therapeutic relevance
- Outstanding and novel clinical and pharmacological studies
- papers on the isolation and structure elucidation of bioactive compounds do not fall into the scope of *Phytomedicine*
- Screening results of plants will not be considered.

Clinical studies

- Clinical studies must be designed, implemented and analyzed in a manner to meet current standards for clinical trials (GCP - Good Clinical Practice), which are equivalent to those required for synthetic drugs.
- For guidelines and necessary information see the following reviews: "Improving the quality of reporting of randomized controlled trials. The CONSORT statement", C. Begg et al. (1996) *JAMA* 276:637-639 and "Better reporting of randomized controlled trials: the CONSORT statement", D.G. Altman (1996) *BMJ* 313:570-571. All subjective as well as objective parameters must be measured, reported and analyzed.
- The plant extract(s) studied must be defined and standardized in the same way as described under "Pharmacological and molecular biological studies".
- Clinical studies must be approved by an Institutional Ethics Committee or its equivalent.

Pharmacological and molecular biological studies (in vitro, ex vivo or in vivo)

- Results have to be based on adequate statistics. Positive controls (reference/standard compounds) and at least three dose responses have to be included.
- Correlation of pharmacological results with the known bioactive constituents of the extract tested, should be discussed, if possible.
- Manuscripts in which new pharmacological results of plant extracts are reported, must contain a discussion on the suggested or identified active principles which might be responsible for the pharmacological activities of the extract.
- If the phytochemical facilities are not available or the expertise is lacking, the authors are asked to seek cooperation with a phytochemical laboratory.
- It is required that the extract being reported with pharmacological activity must have some type of standardization.

Fritillaria und Bupleurum. PhD thesis, Faculty of Chemistry and Pharmacy, University of Munich, Germany.
Liu, C.D., Kwan, D., Saxton, R.L., McFadden, D.W., 2000. Hypericin and photodynamic therapy decreases human pancreatic cancer in vitro and in vivo. *J. Surgical Res.* 93, 137-143.

Documentation of Materials being studied: All biological materials used in the investigation should be stated as derived from cultivated plants or from their natural habitat. Voucher specimens representing the material being studied must be deposited in a specific location with a voucher number. The site (GPS coordinates) and date of collection, with the part(s) used in the study, should be documented. If fresh plant material is not used, the method of drying should be stated. The most recent botanically accepted Latin binomial(s), with authorities, of the plant(s) used must be given, together with accepted synonymy, if appropriate. Vernacular names should also be given for plants used in the study. Data on plants not identified to the species level will not be accepted.

The concentration(s) of known biologically active secondary metabolites in the plant(s) or extract(s) being studied must be presented, together with the methodology (a reference may be sufficient) used to determine these levels, in the event that the activity being studied is related to the activity of the constituent(s).

When pharmacological activity of defined chemical constituents are being studied, the degree of purity must be indicated and the means by which the analysis was conducted.

Abbreviations: See "Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals" (1991) *New England Journal of Medicine* 324:424-428.

Typewriting, Figures and Tables: The manuscript has to be written in the English language. Typewritten manuscripts should be double-spaced.

Text, including italics and bold characters, should be saved as Word or WordPerfect .doc or .doc documents for Windows.

Figures and Tables: The maximum type area is 17 cm (6.7 inch) width and 22.5 cm (8.9 inch) height. Figures must be clearly lettered and suitable for reproduction to fit either one column width (8.2 cm or 3.2 inch) or two-column width (17 cm or 6.7 inch). In addition to the printed version figures and tables can be supplied in digital format (EPS, TIFF, JPG or PPT and XLS format, final resolution 300 dpi for halftones, 1270 dpi for black/white line drawings). Colour: If, together with your accepted article, you submit usable colour figures then Elsevier will ensure, at no additional charge that these figures will appear in colour on the web (e.g., Science Direct and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the print version. Colour figures can be printed only if the costs are covered by the author (EURO 450.00 for one colour plate, EUR 350.00 for every following colour plate/for more than one plate ask for a cost estimate). Authors who agree to pay the production costs for figures to be published in colour will automatically receive 50 additional free offprints. For further information on the preparation of electronic artwork, please see www.elsevier.com/artworkinstructions. Label each figure with figure number. Figures should be cited in the text as Fig. 1 or Figs. 1 and 2. Figures should be placed after the References (and Appendices, if any) in the manuscript. They should be preceded by the figure legends on a separate page. Indicate in the margins of the manuscript where figures should

be placed. Tables should be prepared so that they can be printed in one column or full page width (see above). Tables should be submitted at the end of the manuscript, placed on separate pages, double spaced and numbered sequentially. Indicate in the margins of the manuscript where tables should be placed. Tables should be cited in the text as Table 1 or Table 1 and 2. Tables containing a great amount of pharmacological should be better presented as instructive graphs.

Forms of Manuscripts

Original Papers

The papers should contain not more than 12-15 typewritten pages or up to 5000 words, including references, tables and figures. Previously reported methods should be referenced only. The number of references should not exceed 30 (except for review articles).

Short Communications

They should be condensed to 4-8 typewritten pages or not more than 2500 words including references and a maximum of two illustrations.

Review Articles

Review articles will only be by invitation. Review articles can provide concise and critical updates on a subject of current interest. Herbal drug-monographs are only acceptable if they contain the newest pharmacological and toxicological issues and an outlook on future directions.

Submission of Manuscripts

The latest version of the manuscript should be sent electronically by e-mail as a complete version including text and pictures or by post with an original printed version and a floppy disc or CD copy of the complete manuscript to one of the Editors in Chief.

From Europe and Africa, as far as including Nepal and the states formerly included in the U.S.S.R. manuscripts should be sent to:

Prof. Dr. H. Wagner
University of Munich, Department of Pharmacy
Butandstrasse 5-13, Haus B, D-81377 Munich, Germany
Fax: 0049/89 2180-7705-1;
E-mail: H.Wagner@cup.uni-muenchen.de

From North, Central and South America, Caribbean Islands and West to Myanmar, including the Peoples Republic of China, but excluding Japan, manuscripts should be sent to:

Prof. Dr. N.R. Farnsworth
College of Pharmacy (M/C 877), P.C.R.P.S., University of Illinois at Chicago
833 South Wood Street, Chicago, Illinois 60612, USA
Fax: 001/312 996-7107-; E-mail: norman@uic.edu

From Japan manuscripts should be sent to:

Prof. Dr. Y. Ashawa
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokushima Bunri University
Yamashiro-cho, Tokushima 770, Japan
Fax: 0081/88 655-3051; E-mail: asakawa@ph.bunri-u.ac.jp

Offprints: 25 offprints will be sent free of charge. Authors who pay for printed colour figures will be sent 50 free offprints. Additional offprints may be ordered at a cost. There is no page charge for published papers. Until publication of the print edition, corrected proofs will be available at online first.