

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Tatiane Bezerra de Oliveira

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E ATIVIDADES ANTI-INFLAMATÓRIA E
ANTINOCICEPTIVA DO EXTRATO AQUOSO DA ENTRECASCA DE *Chrysobalanus icaco* L

Recife, 2012

Tatiane Bezerra de Oliveira

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E ATIVIDADES ANTI-INFLAMATÓRIA E
ANTINOCICEPTIVA DO EXTRATO AQUOSO DA ENTRECASCA DE *Chrysobalanus icaco* L.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em
Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco,
como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em
Ciências Biológicas, Área de concentração – Biologia
Química para a Saúde

Orientadora: Prof^ª Dr^ª. Silene Carneiro do Nascimento

Co-orientadora: Prof^ª Dr^ª. Teresinha Gonçalves da Silva

Recife, 2012

Oliveira, Tatiane Bezerra de

Avaliação da toxicidade e atividades anti-inflamatória e antinociceptiva do extrato aquoso da entrecasca de *Chrysobalanus icaco* L / Tatiane Bezerra de Oliveira. – Recife: O Autor, 2012.

63 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Silene Carneiro do Nascimento

Coorientadora: Teresinha Gonçalves da Silva

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências Biológicas. Biologia Química para a Saúde, 2012.

Inclui bibliografia e anexos

1. Plantas medicinais- uso terapêutico 2. Agentes antiinflamatórios 3. Chrysobalanaceae I. Título.

615.321

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2012-058

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Tatiane Bezerra de Oliveira

Título: AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA DO EXTRATO AQUOSO DA ENTRECASCA DE *Chrysobalanus icaco* L.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Presidente:

Prof^a. Dr^a. Silene Carneiro do Nascimento – CCB/UFPE (Orientadora)

Titulares:

Prof^a. Dr^a. Jaciana Aguiar dos Santos
Faculdade de Integração do Sertão- PE (Membro externo)

Prof^a. Dr^a. Julianna Ferreira Cavalcanti de Albuquerque – CCB/UFPE
(Membro externo)

Suplentes:

Prof. Dr. Sebastião Melo – CCB/UFPE (Membro interno)

Prof^a. Dr^a Tereza Jansen de Almeida Catanho – CCB/UFPE (Membro externo)

Dedicatória

A minha família, pela sua fé, amor e paciência.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser o sustentáculo de todas as horas, e por proporcionar todos os meus dias, para que eu possa alcançar os meus objetivos.

A minha orientadora Prof^ª. Dr^ª. Silene Carneiro do Nascimento pela orientação e incentivo, além das oportunidades que me foram dadas para o desenvolvimento desse trabalho.

A minha co-orientadora Prof^ª. Dr^ª. Teresinha Gonçalves da Silva pela oportunidade, confiança e orientação.

A Prof^ª. Dr^ª. Teresa Correia, coordenadora da Pós-Graduação em Ciências Biológicas pelo apoio e oportunidade.

A Adenilda Eugênia de Lima, secretária da Pós-Graduação em Ciências Biológicas pelo apoio e dedicação.

A Suzete, pela sua paciência e apoio.

Aos meus amigos do Laboratório de Bioensaios para Pesquisa de Fármacos (LBPF), especialmente Fernanda Mota, Carlson Carvalho, Eduardo Ramos, Larissa Cardoso, Maria Rodrigues, Sandra Cabral, Sandrine Arruda, André Barros e Jaciana Aguiar, pelo apoio e amizade.

A toda minha família, pelo amor, carinho e compreensão, principalmente pelo apoio que me foi dado.

Ao CNPq e FACEPE pelo apoio financeiro.

RESUMO

Chrysobalanus icaco L. (Chrysobalanaceae) é uma planta nativa das áreas costeiras do continente americano, sendo utilizada na medicina popular para o controle de diversas patologias, tais como hiperglicemia, hemorragias, inflamações e diarreia crônica. O presente estudo teve por objetivo avaliar os efeitos toxicológicos e farmacológicos (Atividades anti-inflamatória e antinociceptiva) do extrato aquoso da entrecasca do caule de *Chrysobalanus icaco* (EACI). Foram usadas células tumorais para avaliação da citotoxicidade e camundongos albinos para avaliação das atividades farmacológicas. Para a avaliação da atividade anti-inflamatória foram usados os testes de edema de pata e bolsa de ar induzidos por carragenina e para a avaliação da atividade antinociceptiva foram usados os testes das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, placa quente e formalina. No ensaio da citotoxicidade pelo MTT, o EACI (50µg/mL) não apresentou citotoxicidade significativa frente às linhagens NCI-H292, HT-29, HEP-2 e K562. No teste de toxicidade aguda, os camundongos (5 fêmeas/ 5 machos) foram tratados com EACI (2000 mg/kg, v.o.) e observados parâmetros fisiológicos e comportamentais. Ambos os sexos não apresentaram sinais de toxicidade após a administração do EACI, bem como nenhum efeito tóxico foi observado durante os 14 dias seguintes. O EACI (400 mg/kg, v.o.) apresentou efeito anti-inflamatório evidenciado pela redução do edema de pata induzido por carragenina a 1% (0,1 mL/pata), apresentando atividade na primeira hora após a indução com o agente flogístico. No modelo da bolsa de ar, o EACI (100, 200 e 400 mg/kg) inibiu significativamente a migração de polimorfonucleares para o local da inflamação. O exsudato da bolsa foi coletado para avaliação dos níveis de mediadores pró-inflamatórios. Os níveis de TNF- α e IL-6 não foram alterados pelo EACI, porém uma redução significativa no nível de NO foi observada nas doses de 200 e 400 mg/kg (50,6% e 88,1 %, respectivamente). No teste de contorções induzidas por ácido acético, o EACI reduziu significativamente o número de contorções. O EACI aumentou o tempo de permanência dos animais na placa quente durante o tempo de 60 minutos, sugerindo que esse extrato possui efeito analgésico central. O teste da formalina revelou que o EACI possui atividade antinociceptiva na fase de dor neurogênica e na fase de dor inflamatória. Em conclusão, EACI não apresentou atividade citotóxica frente às linhagens testadas, nem efeitos tóxicos após a administração da dose de 2000 mg/kg. O EACI apresentou atividades anti-inflamatória e antinociceptiva. Estes resultados corroboram com o uso da entrecasca contra doenças anti-inflamatórias, porém mais estudos são necessários para a comprovação de seu uso etnofarmacológico como anti-inflamatório.

Palavras-chave: *Chrysobalanus icaco* L., Planta medicinal, Toxicidade, Anti-inflamatória, Antinociceptiva.

ABSTRACT

Chrysobalanus icaco L. (Chrysobalanaceae) is a plant native from the coastal areas of the America, and is used in folk medicine for the control of several diseases, such as hyperglycemia, bleeding, inflammation, and chronic diarrhea. The aim of this study was to evaluate the toxicological and pharmacological (anti-inflammatory and antinociceptive activity) of aqueous extract of the stem bark of *Chrysobalanus icaco* (EACI). Tumor cells were used to evaluate the cytotoxicity and albino mice for evaluation of pharmacological activities. The anti-inflammatory activity was investigated using the paw edema and air pouch models induced by carrageenan. To evaluate the antinociceptive activities were performed the writhing induced by acetic acid, hot plate and formalin tests. In the MTT cytotoxicity assay, the EACI (50µg/mL) showed no significant cytotoxicity to the cells lines NCI-H292, HT-29, HEp-2 and K562. In acute toxicity test, mice (5 females / 5 males) were treated with EACI (2000 mg / kg, po) and observed physiological and behavioral parameters. Both sexes showed no signs of toxicity following administration of the EACI, and no toxic effect was observed during the next 14 days. The EACI (400 mg / kg, po) showed anti-inflammatory effect evidenced by reduced paw edema induced by carrageenan 1% (0.1 mL / paw), with activity in the first hours after the induction agent phlogiston. In the model of the air pouch, the EACI (100, 200 e 400 mg/kg) significantly inhibited the migration of polymorphonuclear cells to the site of inflammation. The pouch exudate was collected to evaluate the levels of proinflammatory mediators. The levels of TNF- α and IL-6 were not affected by EACI, but a significant reduction in the level of NO was observed at 200 and 400 mg/kg doses (50.6% and 88.1%, respectively). In the writhing test induced by acetic acid, the EACI significantly reduced the number of contortions. The EACI increased the latency time of animals in the hot plate during the first 60 minutes, suggesting that this extract possesses central analgesic effect. The formalin test revealed that the EACI has antinociceptive activity in the phase of neurogenic pain and inflammatory pain phase. In conclusion, EACI showed no cytotoxic activity against the cells lines tested, no toxic effects after administration of 2000 mg / kg. The EACI presented anti-inflammatory and antinociceptive activities. These results corroborate the use of bark against anti-inflammatory diseases, but more studies are needed to confirm its ethnopharmacological use as anti-inflammatory.

Keywords: *Chrysobalanus icaco* L., herbal medicines, Toxicity, Anti-inflammatory, antinociceptive.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fotos de partes de <i>Chrysobalanus icaco</i> .	20
Figura 2 – Resultados da inflamação aguda: resolução, cicatrização por fibrose ou inflamação crônica.	22
Figura 3 – Metabolismo do ácido araquidônico na inflamação.	25

LISTA DE FIGURAS DO MANUSCRITO

Figura 1 – Efeito do EACI sobre os níveis de TNF- α e IL-6 no exudato inflamatório.	48
Figura 2 – Efeito do EACI sobre os níveis de óxido nítrico no exudato inflamatório.	49
Figura 3 – Efeito do EACI sobre as contorções abdominais induzidas por ácido acético.	49
Figura 4 – Efeito do EACI sobre nocicepção induzida por formalina 2.5%.	50

LISTA DE TABELAS DO MANUSCRITO

Tabela 1 – Efeito do EACI sobre parâmetros fisiológicos em camundongos.	46
Tabela 2 – Efeito do EACI sobre parâmetros hematológicos em camundongos após 14 dias.	47
Tabela 3 – Efeito do EACI no edema de pata induzido por carragenina em ratos.	47
Tabela 4 – Efeito do EACI sobre a migração celular em bolsão de ar subcutâneo.	48
Tabela 5 – Efeito do EACI sobre a resposta nociceptiva induzida por calor.	50

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

5-LOX	5-Lipoxigenase
12-LOX	12- Lipoxigenase
15-LOX	15- Lipoxigenase
AA	Ácido araquidônico
AAS	Ácido acetilsalicílico
AINES	Anti-inflamatórios Não Esteroidais
ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
COX	Ciclo-oxigenase
COXIBEs	AINEs seletivos para a COX-2
DL50	Dose letal 50%
DMSO	Dimetilsulfóxido
EACI	Extrato aquoso da entrecasca de <i>Chrysobalanus icaco</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
HEp-2	Carcinoma de laringe
HT-29	Carcinoma de colón humano
IASP	Associação Internacional do Estudo da Dor
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
IPA	Instituto de Pesquisa Agropecuária de Pernambuco
LBT4	Leucotrieno B4
LOX	Lipoxigenase
LTs	Leucotrienos
MTT	Brometo-3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difeniltetrazólio
NCI-H292	Carcinoma de pulmão humano
NF-κB	Fator de transcrição nuclear-κB
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NGF	Fator de crescimento nervoso
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintase
OMS	Organização Mundial de Saúde

PAF	Fator de ativação plaquetária
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
TXA2	Tromboxano A2

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO	13
OBJETIVOS	15
Objetivo Geral	15
Objetivos Específicos	15
1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
1.1. Uso de Plantas Medicinais	16
1.1.1. Toxicidade de plantas medicinais.....	17
1.1.2. Família Chrysobalanaceae	19
1.1.2.1. <i>Chrysobalanus icaco</i> L.	19
1.2. O processo inflamatório	21
1.2.1 Mediadores da inflamação	23
1.2.1.1. Aminas Vasoativas	23
1.2.1.2. Mediadores lipídicos (eicosanóides)	24
1.2.1.3. Óxido Nítrico	26
1.2.1.4. Citocinas	26
1.2.1.5. Fármacos Anti-inflamatórios	27
1.3. Dor e Nocicepção	29
1.3.1. Classificação da dor	29
1.3.2. Transmissão da dor	30
1.3.3. Mediadores químicos da dor	31
REFERÊNCIAS.....	32

CAPÍTULO II

MANUSCRITO.....	40
CONCLUSÃO.....	56
ANEXO A – Resultados complementares	58
ANEXO B – Normas do periódico Journal of Medicinal Food	61

Capítulo I

INTRODUÇÃO

As plantas fazem parte da vida do homem desde os primórdios, sendo o seu uso no tratamento de diversos transtornos da saúde umas das formas terapêuticas mais antigas. A Organização Mundial de Saúde (OMS), no início da década de 1990, divulgou que 65 – 80% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados de saúde. Tanto nos países em desenvolvimento quanto nos mais desenvolvidos aumentam, a cada dia, os apelos da mídia para o consumo de produtos à base de fontes naturais (VEIGA-JÚNIOR, PINTO, MACIEL, 2005).

No Brasil, o uso de plantas é um hábito bem difundido devido ao contexto histórico-cultural do país. Até a primeira metade do século XX, o Brasil era essencialmente rural e usava amplamente a flora medicinal. Hoje, a medicina popular do país é reflexo das uniões étnicas entre os diferentes imigrantes e os inúmeros povos autóctones que difundiram o conhecimento das ervas locais e de seus usos, transmitidos e aprimorados de geração a geração (LORENZI, MATOS, 2002).

Embora a utilização dessas plantas tenha uma tradição sustentada pela crença de uma terapia eficaz e livre de efeitos tóxicos, a validação científica dos fitoterápicos é uma etapa inicial obrigatória para a utilização correta das plantas medicinais e seus compostos ativos. Desta forma, os produtos derivados de plantas precisam ter a eficácia avaliada e confirmada, assim como deve ser garantida que sua administração a organismos vivos ocorra sem riscos para sua saúde (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2005).

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) estão entre os medicamentos mais prescritos no mundo. Apesar de sua ampla utilização, os AINEs apresentam limitações com relação à sua potência, eficácia e efeitos adversos. Os AINEs apresentam efeitos gastrintestinais adversos, e os AINEs seletivos para COX-2 foram associados a alterações cardiovasculares pequenas, porém proeminentes em alguns pacientes (BATLOUNI, 2010; BOERS, 2001; PARENTE, 2001). Os anti-inflamatórios esteroidais apresentam proeminentes efeitos adversos devido à ação comum aos esteróides. Devido a esses inconvenientes, torna-se necessária a busca por substâncias naturais com potencial anti-inflamatório que possam dar origem a novos fármacos de baixo custo e com efeitos adversos reduzidos (ANTI, GIORGI, CHAHADE, 2008).

Dados da literatura mostram que moléculas de origem vegetal apresentam importantes atividades anti-inflamatórias e que muitas de suas ações são relacionadas à habilidade de

inibir a síntese ou ação de citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão, vias do ácido araquidônico e NO, além da inibição do NF- κ B (CALIXTO et al., 2004; WERZ, 2007).

As preparações de plantas, por sua vez, frequentemente inibem mais de uma via de ação, maximizando os efeitos anti-inflamatórios e minimizando efeitos adversos, isso devido ao fato de haver uma mistura de substâncias que podem agir sinergicamente ou antagonicamente, através de diferentes mecanismos de ação (SCHMITZ, BACHER, 2005).

Chrysobalanus icaco L é uma planta amplamente empregada na medicina popular para tratar diversas doenças nas regiões norte, nordeste e sudeste do Brasil (PRANCE, 1972). O decocto da entrecasca é utilizado pela população de diversos estados do nordeste contra distúrbios inflamatórios, porém não foram encontrados na literatura estudos que avaliassem a toxicidade e atividade anti-inflamatória da entrecasca de *Chrysobalanus icaco*.

Neste contexto, este trabalho visa à comprovação científica das atividades farmacológicas (anti-inflamatória e antinociceptiva) e toxicológicas do extrato aquoso da entrecasca de *Chrysobalanus icaco* L., tendo como base o seu emprego na medicina tradicional.

OBJETIVOS

Geral

Realizar estudos toxicológicos (toxicidade aguda e citotoxicidade) e farmacológicos (atividade anti-inflamatória e antinociceptiva) do extrato aquoso da entrecasca de *Chrysobalanus icaco* L.

Objetivos específicos

- Preparar o extrato aquoso da entrecasca de *Chrysobalanus icaco* L. pelo método de decocção e calcular o rendimento;
- Avaliar a citotoxicidade do extrato frente quatro linhagens tumorais: NCI-H292 (Carcinoma de pulmão humano), HT-29 (Carcinoma de colón humano), HEP-2 (Carcinoma de laringe) e K562 (Leucemia mieloide crônica);
- Avaliar a toxicidade aguda do extrato em camundongos pela administração via oral;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória do extrato através dos modelos experimentais de inflamação aguda (edema de pata e bolsão de ar induzidos por carragenina);
- Determinar as concentrações do TNF- α , IL-6 e óxido nítrico no exsudato inflamatório de animais tratados com o extrato;
- Avaliar a atividade antinociceptiva do extrato, utilizando modelos experimentais de nocicepção (contorções induzidas por ácido acético, formalina e placa quente).

1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Uso de plantas medicinais

As plantas foram por muito tempo, e continuam sendo até os dias atuais, a base de muitos sistemas medicinais tradicionais no mundo todo, como homeopatia, fitoterapia e outros sistemas de medicina alternativa. Além disso, as plantas medicinais são uma das melhores e mais efetivas fontes de compostos candidatos a novas classes de medicamentos, já que representam fontes riquíssimas de diversidade natural ao considerarmos a amplitude dos compostos que sintetizam, muitos dos quais têm se mostrado útil na terapêutica para tratar uma variedade de doenças e males humanos. O conhecimento medicinal tradicional junto às técnicas modernas tem acelerado o processo de descoberta de fármacos derivados de plantas (ITOKAWA et al., 2008; KOLEWE, GAURAV, ROBERTS, 2008; SAKLANI, KUTTY, 2008).

O isolamento e utilização de substâncias derivadas de plantas como fármacos foram precedidos por séculos de uso etnobotânico. Para muitas dessas plantas utilizadas na medicina popular, já é possível comprovar o que a medicina tradicional reportou durante milênios. Além disso, atualmente novas moléculas biologicamente ativas derivadas de vegetais têm sido descobertas, como foi o caso da quinina, glicosídeos digitálicos e reserpina. A cada dia tornam-se mais comuns componentes que emergiram de extratos estudados com base na etnobotânica como importantes ferramentas farmacológicas para a elucidação de mecanismos de doenças e como peças centrais no incentivo do desenvolvimento da indústria farmacêutica moderna (LENTINI, 2000; RISHTON, 2008).

Além das informações etnobotânicas, outro grande incentivo à pesquisa com plantas é o fato de que, apesar do grande número de compostos industriais utilizados na clínica, a fitoterapia tradicional é ainda utilizada, principalmente em muitas áreas rurais de países em desenvolvimento aonde os tratamentos vão sendo passados de geração a geração. A OMS estima que cerca de 80% da população de países em desenvolvimento não têm acesso a qualquer atendimento primário à saúde seja pela distância dos centros de saúde ou por falta de recursos financeiros, sendo as plantas medicinais como única fonte de cuidados básicos à saúde (VEIGA-JÚNIOR, PINTO, MACIEL, 2005).

O uso de fitoterápicos com finalidade profilática, curativa, paliativa ou com fins de diagnóstico passou a ser oficialmente reconhecido pela OMS em 1978, quando recomendou a

difusão mundial dos conhecimentos necessários para o seu uso, considerando as plantas medicinais importantes instrumentos da Assistência Farmacêutica (BRASIL, 2001).

Na última década o uso de fitoterápicos expandiu-se globalmente, tornando-se tão popular, que a OMS elaborou uma série de guias e protocolos com o objetivo de definir as metodologias e avaliação da medicina tradicional. Segundo a OMS, um dos principais problemas no uso de fitoterápicos é a pouca documentação técnico-científica e comprovação de resultados por evidências clínicas mediante estudos padronizados, veiculados em publicações científicas reconhecidas (SANTOS, VIEIRA, KAMADA, 2009), além de que dados de segurança e eficácia disponíveis restringem-se a um reduzido número de plantas medicinais. Assim, cresce a cada dia a necessidade de estudar as propriedades curativas ocultas nas plantas.

Estudos têm demonstrado que drogas derivadas de plantas e muitas preparações vegetais são capazes de alterar funções do sistema imune, possuindo uma gama de efeitos imunomodulatórios, com a vantagem de não possuir efeitos imunossupressores, como ocorre com drogas utilizadas na clínica como os corticóides. Além disso, estudos *in vivo* e *in vitro* demonstram que plantas medicinais podem afetar a liberação de citocinas, liberação de histamina, proliferação de linfócitos e possuir atividade citotóxica (PLAEGER, 2003; SAKLANI, KUTTY, 2008).

Pesquisas como essas, têm demonstrado que para muitas doenças complexas, produtos naturais representam uma fonte extremamente valiosa para a produção de novas entidades químicas, já que representam estruturas privilegiadas, selecionadas pelo mecanismo evolucionário através de um período de milhões de anos (CALIXTO, 2005).

1.1.1. Toxicidade de plantas medicinais

A toxicidade de uma substância a um organismo vivo pode ser considerada como a capacidade de lhe causar dano grave ou morte. Organismos vivos apresentam a capacidade de responder a variações externas, de modo a manter sua função normal. Este processo conhecido como homeostasia permite que os organismos vivos, através de modificações bioquímicas, morfológicas e de seus mecanismos fisiológicos, se adaptem as condições adversas de exposição sem manifestação de toxicidade. Entretanto, quando o organismo não é capaz de se adaptar a estas variações externas, manifesta-se o efeito tóxico (BARROS, DAVINO, 2003).

A toxicidade de plantas medicinais é muitas vezes subestimada devido a crença de que por serem naturais não apresentam risco à saúde (FERREIRA-MACHADO et al., 2004). A ocorrência de efeitos indesejáveis das plantas medicinais muitas vezes é menor quando comparada a drogas sintéticas bem definidas. Entretanto experimentos clínicos têm revelado que efeitos adversos também ocorrem com a utilização de plantas medicinais (CALIXTO, 2000).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é um órgão governamental responsável por avaliar diversos critérios de qualidade, segurança e eficácia de medicamentos fitoterápicos produzidos industrialmente. Este controle tem o objetivo de desvincular os fitoterápicos da idéia de serem produtos de qualidade inferior ou sem potencial de risco tóxico (CARVALHO et al., 2007).

Em 2011, a ANVISA publicou um formulário nacional de fitoterápicos com o objetivo de padronizar a fabricação de medicamentos fitoterápicos pelas indústrias. No Formulário estão registradas informações sobre a forma correta de preparo e as indicações e restrições de uso de cada espécie. Os requisitos de qualidade estão definidos de forma específica para a farmácia de manipulação e farmácias vivas (BRASIL, 2011).

Exemplos da toxicidade de fitoterápicos podem ser encontrados na literatura, como é o caso do confrei (*Symphytum officinale* L.), que foi indicado para o tratamento de diversas doenças. Porém estudos posteriores demonstraram o risco do uso interno desta planta, altamente hepatotóxica devido a alcalóides pirrolizidínicos (BRASIL, 1992; STICKEL, SEITZ, 2000).

Outro exemplo é a kava-kava (*Piper methysticum*), utilizada para o tratamento da ansiedade, insônia e depressão. O uso oral desta planta medicinal por um curto período de tempo é considerado seguro, porém esta planta apresenta toxicidade quando administrada em altas doses ou em longo prazo. A kava-kava pode exacerbar quadros de insuficiência hepática, bem como hepatite em pacientes com história de hepatite recorrente, sendo este efeito reversível após a suspensão do fitoterápico. Na Alemanha e Suíça, vários casos de toxicidade hepática grave (hepatite, cirrose e falência hepática) foram relacionados com produtos contendo extratos de kava-kava (CORDEIRO, CHUNG, SACRAMENTO, 2005).

O consumo de suplementos dietéticos comerciais, chás e fitoterápicos utilizados como adjuvantes em dietas de emagrecimento, constituídos de plantas do gênero *Aristolochia* apresentaram casos de intoxicações. Estas estão associadas aos metabólitos nefrotóxicos e carcinogênicos, chamados ácidos aristolóquicos (IOSET, RAOELISON, HOSTETTMANN, 2002).

As pesquisas realizadas para avaliação do uso seguro das plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil ainda são insipientes, sendo que a maioria das plantas nativas ainda não foram avaliadas quanto à sua segurança e eficácia (CARVALHO et al., 2008; RATES, 2001), assim como é insipiente o controle da comercialização pelos órgãos oficiais em feiras livres, mercados públicos ou lojas de produtos naturais (VEIGA-JUNIOR, PINTO, 2005).

1.1.2. Família Chrysobalanaceae

A família Chrysobalanaceae se distribui pelas regiões tropicais e subtropicais, constituída de 17 gêneros e 450 espécies, sendo caracterizada pela presença de flavonóides, triterpenóides, diterpenóides, esteróides e taninos (CASTILHO, OLIVEIRA, KAPLAN, 2005).

Na medicina popular, espécies da família Chrysobalanaceae são empregadas para tratar diversas doenças como malária, diabetes, diarreia, disenteria e infecções. Os diterpenos, triterpenos e flavonóides encontrados nesta família se mostram de ampla diversidade farmacológica: citotóxicos, antifúngicos e antioxidantes (CASTILHO, KAPLAN, 2008; CARVALHO, COSTA, 2009; ZUQUE et al., 2004).

1.1.2.1. *Chrysobalanus icaco* L.

Chrysobalanus icaco Linnaeus (*C. icaco*) pertencente à família Chrysobalanaceae, é popularmente conhecida por diversos nomes como guajerú, guajuru, abajeru, bajuru, bajirú, ajuru, entre outros. É uma espécie arbustiva de tamanho médio, caule tortuoso, folhas simples e coriáceas. As flores são brancas e formam uma inflorescência do tipo cimosa. O fruto é uma drupa, esférica ou elipsóide (Figura 1) (KRUEL, PEIXOTO, 2004).

C. icaco é originário tanto da América como do continente Africano, se naturalizando na Ásia (Índia e Vietnã) e nas Ilhas do Pacífico. Na América se distribuiu desde a Flórida até o sul do Brasil, principalmente nas zonas costeiras e no litoral da Colômbia ao Equador. Na África sua presença é reportada desde a Guiné até Angola, Tanzânia, Camarões, Senegal e Trinidad e Tobago (SIMÓN et al., 2000; SMITH et al., 2004).

No Brasil, se encontra distribuída por todo país, ocorrendo nos estados do Rio de Janeiro, São Paulo, Minas Gerais, Espírito Santo, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pará, Ceará, Pernambuco, Maranhão, Bahia, Sergipe, Piauí e Amazonas (LORENZI, MATOS, 2002; SANTANA, REGO, SILVA, 2000; SILVA, PEIXOTO, 2009).

Figura 1 – Fotos de partes *Chrysobalanus icaco*.



Representação da inflorescência (A), planta inteira (B) e Fruto imaturos (C).

Fonte: [http://www.bioversityinternational.org/databases/new_world_fruits_database/detail.html?tx_wfqbe_pil\[species_id\]=449](http://www.bioversityinternational.org/databases/new_world_fruits_database/detail.html?tx_wfqbe_pil[species_id]=449)

C. icaco possui diversos usos, dentre eles, como alimento humano, medicinal, artesanato, corante e ornamental. No Brasil, o consumo dos frutos de *C. icaco* como alimento é muito apreciado pelas populações ribeirinhas, sendo consumido *in natura*. Em outros países da América seus frutos são utilizados e comercializados na forma de geléias e conservas (PIO CORRÊA, 1926). Segundo Fonseca-Kruel et al. (2006), pescadores da América e África cozinham sua casca e utilizam para tingir, endurecer e tornar mais duradouras as suas redes.

As raízes, cascas, folhas e flores de *C. icaco* são adstringentes, provavelmente devido à presença de taninos (LOPÉZ, 2004), sendo utilizados pela população contra doenças infecciosas como diarreia crônica, blenorragia, leucorréia e infecções uretrais e vesicais (CORDERO, 1978; FONSECA-KRUEL et al., 2006; LORENZI; MATOS, 2002). As folhas

são indicadas na medicina popular como anestésica, anti-inflamatória e hipoglicemiante (BARBOSA-FILHO et al., 2005; TORRES et al., 2009). As cascas e raízes também são usadas como antidiabética e anti-inflamatória (AGRA, FREITAS, BARBOSA-FILHO, 2007; LORENZI; MATOS, 2002).

No Brasil e em El Salvador, a diarreia crônica é tratada, fervendo-se 5 g de fruto, raiz, córtex e folha em 250 mL de água, devendo ser dado de dois a três copos, por dia, ao paciente (LÓPEZ, 2004). O óleo extraído das sementes era outrora utilizado no preparo de uma emulsão antidisentérica e para unguentos (PIO CORRÊA, 1926). Na Colômbia e na Venezuela os frutos do guajiru são comercializados na forma de xarope utilizados contra a disenteria e a diarreia infantil (LORENZI; MATOS, 2002).

Ferreira-Machado et al. (2004) analisaram os efeitos toxicológicos do extrato aquoso das folhas de *C. icaco*, sugerindo um potencial genotóxico pela indução de alteração da topologia plasmodial, apresentando também ação antioxidante. Presta e Pereira (1987) comprovaram o potencial hipoglicemiante do chá das folhas de *C. icaco* em camundongos normoglicêmicos e diabéticos induzidos por aloxana.

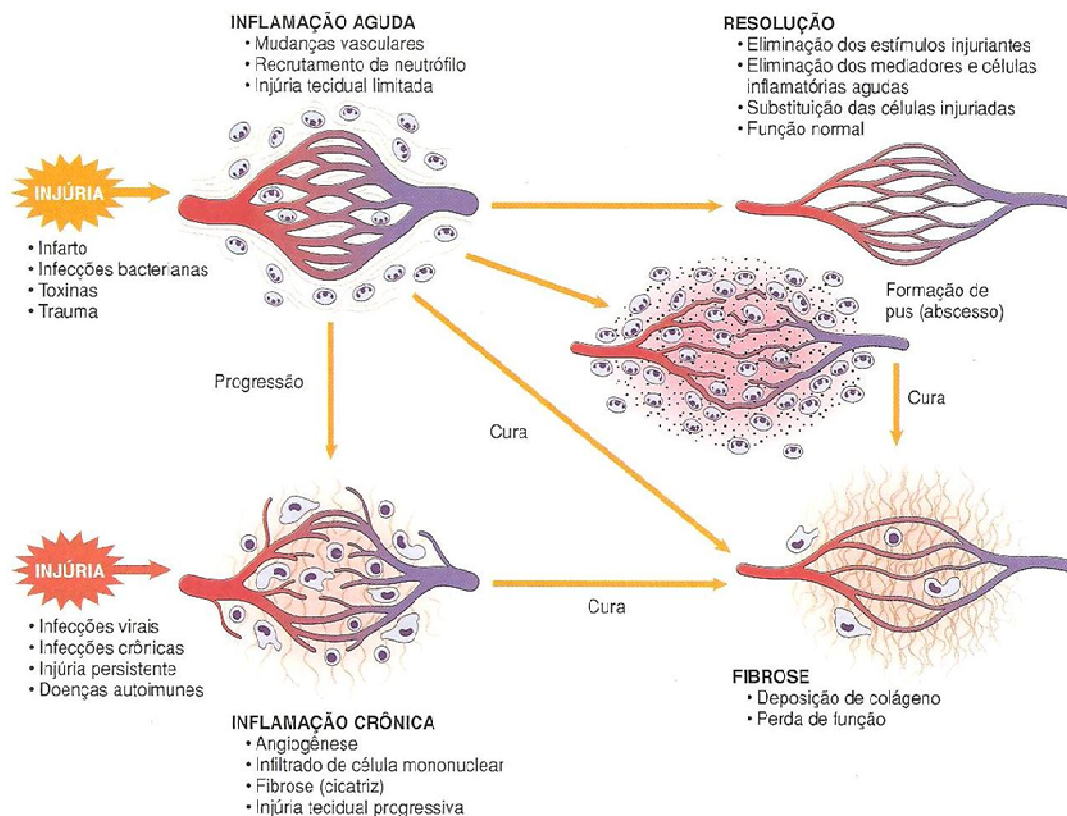
Diterpenóides isolados das folhas de *C. icaco* demonstraram atuar como inibidores *in vitro* do Vírus da Imunodeficiência Adquirida (HIV) (GUSTAFSON et al., 1991). O ácido pomólico, triterpeno isolado das folhas de *C. icaco* por solventes orgânicos induziu apoptose em uma linhagem de leucemia resistente a múltiplas drogas (FERNANDES et al., 2003). Segundo estudos realizados por Alves et al. (2000), o extrato metanólico obtido das folhas tem um potencial anti-angiogênico, reduzindo aproximadamente 44% na formação de novos vasos. Estudos fitoquímicos revelaram a presença de quercitrina, miricetina-3-o-glucuronídeo e rutina nas folhas de *C. icaco* (BARBOSA et al., 2006).

1.2. O processo inflamatório

Inflamação é um termo geral para as mudanças que podem ocorrer nos tecidos vascularizados como resposta a danos teciduais, infecções ou reações imunológicas. Vários são os mediadores químicos envolvidos no desenvolvimento do processo inflamatório, podendo ser de origem tissular, como as aminas vasoativas, fator de ativação plaquetária (PAF), eicosanóides, citocinas, radicais livres superóxidos, óxido nítrico e neuropeptídeos; ou de origem plasmática, como os sistemas de coagulação, do complemento e das cininas (IWALEWA et al., 2007).

O processo inflamatório agudo consiste de uma liberação sequencial de mediadores e do recrutamento de leucócitos circulantes, os quais se tornam ativos no sítio da injúria e liberam mais mediadores pró-inflamatórios. A inflamação aguda pode ser dividida em três fases, cada qual mediada por diferentes mecanismos: uma fase inicial, caracterizada principalmente por vasodilatação local e aumento da permeabilidade vascular; uma fase tardia, com a infiltração de leucócitos e células fagocitárias e a fase proliferativa, na qual ocorre degeneração tecidual e fibrose (Figura 2) (MURI, SPOSITO, METSAVAHT, 2009).

Figura 2 - Resultados da inflamação aguda: resolução, cicatrização por fibrose ou inflamação crônica



Fonte: Robbins et al., 2006.

Em lesões de pouca gravidade e curta duração a resolução envolve a neutralização ou degradação espontânea de mediadores químicos, com subsequente retorno da permeabilidade ao normal, o término da infiltração leucocitária, a morte dos neutrófilos e a remoção de líquidos e proteínas do edema, e de fragmentos necróticos (Figura 2) (ROBBIN et al., 2006).

Deste modo, o objetivo da inflamação aguda é servir como aporte de defesa para o organismo, localizando a região agredida, para assim eliminar o agente agressor e remover os tecidos degenerados, preparando a área lesada para reparação, além de envolver uma série de

eventos celulares e vasculares dinâmicos, bem coordenados que dependem da chegada de leucócitos inflamatórios para o local da lesão (KIRVESKARI et al., 2003).

Entretanto, o processo inflamatório pode seguir outro curso que não a resolução, progredindo para um processo inflamatório crônico como resultado da persistência do agente agressor (infecções persistentes por certos microorganismos; exposição prolongada a agentes potencialmente tóxicos ou reações auto-imunes) ou falhas nos processos de resolução (Figura 2) (BILATE, 2007). A inflamação crônica apresenta duração mais longa e está associada à presença de linfócitos e macrófagos, necrose tecidual e proliferação de fibroblastos e formação de granulomas. A inflamação crônica origina-se de infecções persistentes por certos microorganismos, por exposição prolongada a agentes potencialmente tóxicos e de distúrbios de auto-imunidade (GEPDIREMEN et al., 2004).

1.2.1. Mediadores da inflamação

Os fenômenos da inflamação são mediados por substâncias químicas, cuja interação é complexa. Estas substâncias são oriundas do plasma, dos leucócitos, das plaquetas, do endotélio e do tecido conjuntivo.

1.2.1.1. Aminas Vasoativas

As aminas vasoativas, histamina e serotonina, são as primeiras substâncias a serem liberadas no desencadeamento da cascata da inflamação. Estas substâncias são estocadas em vesículas no interior de macrófagos, mastócitos e plaquetas, promovem alterações vasculares que incluem: vasodilatação, aumento do fluxo sanguíneo, aumento da permeabilidade vascular e exsudação plasmática. Essas alterações iniciam-se imediatamente e desenvolvem-se durante as primeiras horas após o estímulo inflamatório (PARADA et al., 2001). Essas aminas atuam sinergicamente com a bradicinina induzindo a hiperalgesia térmica, e participam dos processos de nocicepção em diversas condições inflamatórias, bem como na formação do edema (LAVICH et al., 2003; KAY, 2001).

A bradicinina é um peptídeo vasoativo gerado a partir da clivagem proteolítica do cininogênio (precursor inativo) por ação da enzima caliceína, com envolvimento do fator de XII da via intrínseca da coagulação. A bradicinina afeta a musculatura, promovendo dilatação de vasos sanguíneos e aumento da permeabilidade vascular. A bradicinina tem um papel

importante também na dor, pois possui um potente efeito álgico (SIQUEIRA-JUNIOR, DANTAS, 2000).

Os eventos vasculares produzidos por essas aminas promovem uma elevação da perfusão local e um extravasamento de líquido para o espaço intercelular, causando o edema, a hiperemia e a elevação da temperatura, observados no sítio da inflamação. Tais eventos associados à liberação de substâncias quimiotáticas induzem a migração de leucócitos para o tecido inflamado. A saída das células circulantes da luz do vaso e a migração de leucócitos para o sítio inflamatório seguem algumas fases sequenciais: captura, rolamento dos leucócitos pelo endotélio, adesão firme e transmigração, sendo que todas essas etapas são dependentes da expressão, pelos leucócitos e pelas células endoteliais, de moléculas de adesão e de quimiocinas (BILATE, 2007).

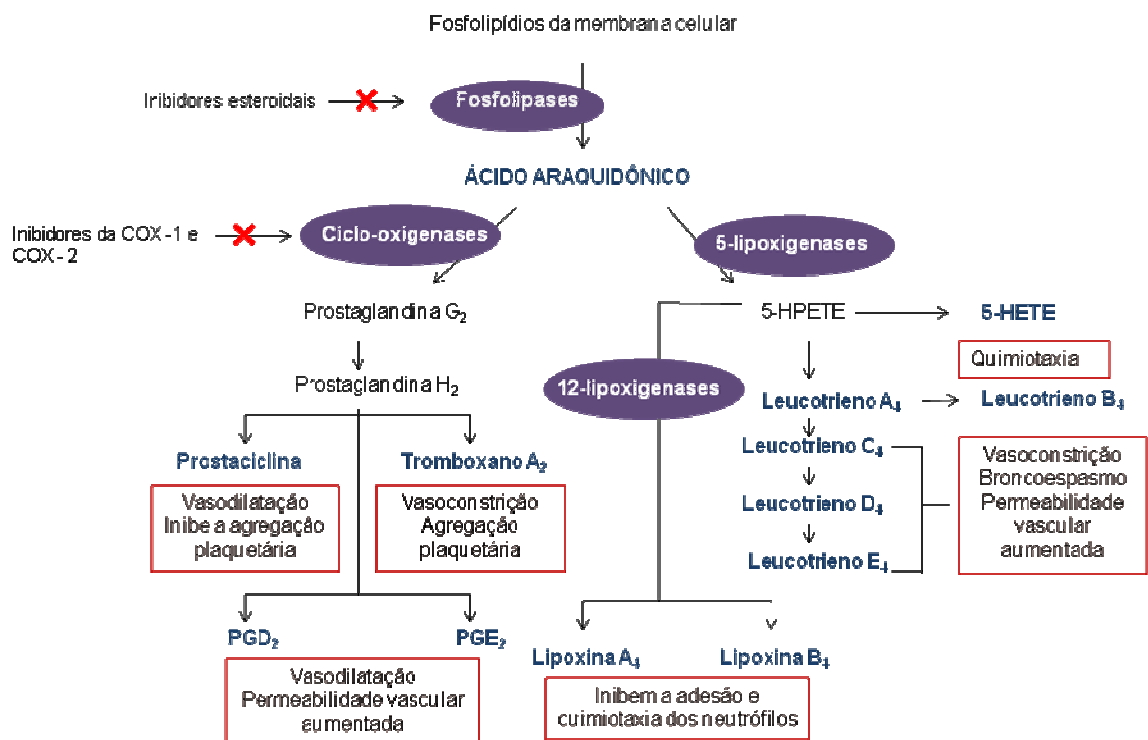
1.2.1.2. Mediadores lipídicos (eicosanóides)

Outra classe de mediadores envolvidos no processo inflamatório são os mediadores lipídicos, conhecidos genericamente como eicosanóides, que compreendem os prostanóides, leucotrienos (LTs) e lipoxinas derivados do metabolismo do ácido araquidônico. O ácido araquidônico é um ácido graxo poli-insaturado contendo 20 carbonos, estando presente nos fosfolipídios que compõe a membrana celular. O ácido araquidônico é liberado dos fosfolipídeos da membrana celular por ação principalmente da enzima fosfolipase A₂ (PLA₂) que é ativada por diversos estímulos químicos, físicos e mecânicos. Uma vez liberado, o ácido araquidônico é metabolizado por duas vias enzimáticas, a via da ciclo-oxigenase (COX-1 e COX-2) e a via da lipoxigenase (5-LOX, 12-LOX e 15-LOX). Pela via da COX é gerada a prostaglandina PGH₂, que estimula a formação de vários prostanóides, incluindo diversas prostaglandinas (PGI₂, PGD₂ e PGE₂) e tromboxano A₂ (TXA₂). Pela via da lipoxigenase formam-se leucotrienos, lipoxinas e outros produtos (MURI, SPOSITO, METSAVAHT, 2009; BATLOUNI, 2010) (Figura 3).

Em mamíferos, as ciclo-oxigenases (COXs) existem em três isoformas designadas COX-1, COX-2 e COX-3, codificadas por diferentes genes, com estruturas químicas similares. A isoforma COX-1 é expressa de forma constitutiva (constante) na maioria dos tecidos. É essencial para a manutenção do estado fisiológico normal de muitos tecidos, incluindo a proteção da mucosa gastrointestinal; controle do fluxo sanguíneo renal; homeostasia; respostas autoimunes; funções pulmonares e do sistema nervoso central; cardiovasculares e reprodutivas. Enquanto a COX-2 é induzida nas inflamações por vários

estímulos como citocinas, endotoxinas e fatores de crescimento, originando prostaglandinas (BATLOUNI, 2010). A COX-3 (variante do gene da COX-1) parece ser expressa em altos níveis no sistema nervoso central e pode ser encontrada também na aorta. Essa enzima é seletivamente inibida por drogas analgésicas e antipiréticas, como paracetamol e dipirona, e é potencialmente inibida por alguns AINEs (CHANDRASEKHARAN et al., 2002).

Figura 3 - Metabolismo do ácido araquidônico na inflamação.



Fonte: Adaptado de Robbins et al., 2006.

As prostaglandinas (PG) em geral são vasodilatadoras, promovendo o edema, rubor, febre, infiltração de leucócitos e ainda sensibilizam as terminações nervosas periféricas, tornando-as mais responsivas a estímulos álgicos. A PGE_2 e PGI_2 são potentes vasodilatadores, que também potencializam o aumento da permeabilidade vascular. Ambas causam dor indiretamente devido a formação do edema que comprime as fibras nervosas. Além disso, amplificam os efeitos da bradicinina e histamina através da diminuição do limiar de excitabilidade de nociceptores vinculados às fibras nervosas (GOMES et al., 2009). PGI_2 inibe a agregação plaquetária e a PGE_2 é a principal prostaglandina produzida durante o processo inflamatório e esta relacionada ao desenvolvimento da febre. PGD_2 participa das respostas alérgicas, causa vasodilatação e potencializa a formação de edema. O tromboxano

A₂ (TXA₂) é um ativador da agregação plaquetária e potente vasoconstritor (BATLOUNI, 2010).

Os leucotrienos (LTs), em especial o LTB₄, são os mais potentes fatores quimiotáticos e ativadores de leucócitos. Estes compostos são sintetizados principalmente nos leucócitos, entretanto, após um estímulo inflamatório, podem ser produzidos por qualquer célula que possua um sistema enzimático adequado a sua síntese (YOKOMIZO, IZUMI, SHIMIZU, 2001). Além das ações quimiotáticas, os LTs também são potentes agentes vasoativos e espasmogênicos, participam da formação do edema, induzem a liberação de TXA₂ e prostaglandinas, além de representarem um componente especialmente importante em diversas fisiopatologias, como, asma, artrite reumatóide e respostas alérgicas (STEAVENS, LOWE, 2002).

1.2.1.3. Óxido Nítrico

Outro mediador importante é o óxido nítrico (NO). Este mediador é um gás solúvel e está relacionado a várias funções fisiológicas, incluindo transmissão neuronal, relaxamento vascular, imunomodulação e citotoxicidade (TSUCHIYA et al., 2007). O NO é liberado a partir da reação de conversão da L-arginina em L-citrulina, catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS). Pelo menos três isoformas desta enzima são conhecidas: duas são constitutivas, presentes em condições fisiológicas, NOS endotelial (eNOS) e NOS neuronal (nNOS); a terceira é a NOS induzida (iNOS), liberada por meio de um estímulo como a resposta inflamatória (TAKEUCHI et al., 2004; MARIOTTO et al., 2007).

A iNOS catalisa a formação de espécies reativas de nitrogênio no local do estímulo inflamatório, além de promover a ativação do fator de transcrição nuclear-κB (NF-κB), um dos principais fatores responsáveis por regular a expressão de vários mediadores pró-inflamatórios (OKAMOTO et al., 2004; KELLEHER et al., 2007).

1.2.1.4. Citocinas

As citocinas são importantes mediadores do processo inflamatório produzidos por vários tipos celulares, principalmente por macrófagos e linfócitos ativados. As citocinas são pleiotrópicas e modulam a função de muitos tipos celulares e são determinantes para a infiltração celular e para os efeitos sistêmicos durante o processo inflamatório agudo. O conjunto inicial de reações que caracteriza a fase aguda do processo inflamatório é mediado

primariamente pela liberação de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, IL-8, IL-12 e TNF- α) no tecido lesado. Dentre estas citocinas, particularmente o TNF- α e a IL-1 β iniciam a cascata inflamatória (SIQUEIRA-JUNIOR, DANTAS, 2000).

A secreção das citocinas é estimulada por endotoxinas, complexos imunes, toxinas, lesões físicas e uma variedade de processos inflamatórios. Essas citocinas, uma vez liberadas, exercem efeitos autócrinos (atuam na mesma célula que secretou a citocina), parácrinos (afetando células vizinhas) e endócrinos (promovendo efeitos sistêmicos, assim como os hormônios) (BILATE, 2007).

As principais ações do TNF- α e IL-1- β são ativação das células endoteliais, dos leucócitos e indução de reações sistêmicas de fase aguda. No endotélio vascular ocorre um aumento na expressão e síntese de moléculas de adesão endotelial, aumentando a aderência dos leucócitos circulantes às células endoteliais, e também a síntese e liberação de outras citocinas, fatores de crescimento, eicosanóides e óxido nítrico (POBER, SESSA, 2007; DINARELLO, 2009; SIMS, SMITH, 2010).

Várias citocinas diferentes desempenham papéis importantes no estabelecimento e no desenvolvimento do processo inflamatório atuando como substâncias pro-inflamatórias que induzem a síntese e a liberação de mediadores inflamatórios típicos como as prostaglandinas, os leucotrienos e o óxido nítrico (FRANKE et al, 2002). Enquanto outras citocinas como IL-4, IL-10 e IL-13 atuam como agentes anti-inflamatórios, diminuem as funções celulares e a síntese de citocinas pró-inflamatórias, reduzindo a dor e a quimiotaxia de leucócitos (VALE et al., 2003).

1.2.1.5. Fármacos Anti-inflamatórios

Os anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) encontram-se entre os medicamentos mais prescritos em todo o mundo. São utilizados principalmente no tratamento da inflamação, dor e edema, como também nas osteoartrites, artrite reumatóide e distúrbios músculo-esqueléticos. Essa classe heterogênea de fármacos inclui a aspirina e vários outros agentes inibidores da ciclo-oxigenase (COX), seletivos ou não (BATLOUNI, 2010).

Os AINES apresentam propriedades anti-inflamatórias, analgésicas e antipiréticas. É o principal tratamento para a dor leve e moderada devido as suas propriedades analgésicas prolongadas e diminuem a temperatura corporal elevada sem provocar dependência química. Os efeitos terapêuticos e colaterais dos AINES resultam principalmente da inibição da enzima COX, reduzindo assim, a síntese das prostaglandinas e diminuindo a intensidade do processo

inflamatório. Os efeitos colaterais associados aos AINEs incluem os efeitos gastrintestinais, pois as prostaglandinas exercem uma função protetora sobre a mucosa gástrica; alteração na função renal quando do uso em longo prazo em pessoas com predisposição, asma induzida por AINEs, alteração no tempo de coagulação, hipersensibilidade dentre outros (MURI, SPOSITO, METSAVAHT, 2009; SOSTRES et al, 2010).

Os AINEs seletivos para a COX-2 são designados COXIBs e foram desenvolvidos na tentativa de inibir a síntese de prostaglandinas pela enzima COX-2 em locais de inflamação sem, contudo, afetar a ação da isoenzima COX-1 constitutivamente ativa, encontrada no trato gastrointestinal, nos rins e plaquetas. No entanto, hoje se sabe que a COX-2 também é expressa constitutivamente e exerce papéis fisiológicos através da síntese de PGI₂. Embora os fármacos que inibem seletivamente a COX-2 demonstrem uma melhor segurança gastrintestinal, alguns membros dessa classe foram retirados do mercado devido a um risco aumentado de eventos cardiovasculares (BATLOUNI, 2010).

Assim como os AINEs tradicionais, os coxibs também exercem efeitos tóxicos renais e não são recomendados para pacientes com insuficiência renal grave (KUMMER, COELHO, 2002).

Os glicocorticóides (anti-inflamatórios esteroidais) são amplamente utilizados no tratamento de distúrbios inflamatórios, hematológicos, alérgicos entre outros. Os glicocorticóides são substâncias imunossupressoras e anti-inflamatórias potentes, eficazes e amplamente utilizadas em processos inflamatórios agudos e crônicos (PERRETTI, AHLUWALIA, 2000).

Os glicocorticóides sintéticos (dexametasona, cortisona, etc) mimetizam ações do cortisol endógeno, atuando através da ligação a um receptor citoplasmático específico para glicocorticóides. Exercem sua ação analgésica e anti-inflamatória 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 alterações em grau de fibrose (ANTI, GIORGI, CHAHADE, 2008; CASTRO, 2005).

A eficácia dos glicocorticóides em aliviar desordens inflamatórias resulta dos efeitos pleiotrópicos do receptor de glicocorticóide. No entanto, esses efeitos pleiotrópicos promovem diversos efeitos adversos como retardo do crescimento em crianças, imunossupressão, hipertensão, inibição da cicatrização, osteoporose e distúrbios metabólicos. Esses efeitos adversos limitam a terapia prolongada com glicocorticóides (RHEN, CIDLOWSKI, 2005).

1.3. Dor e Nocicepção

Segundo a IASP - Associação Internacional para Estudo da Dor, a dor pode ser definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a dano tecidual real ou potencial. Além envolver um estímulo potencialmente nocivo, a dor tem uma conotação individual e é representada por uma experiência subjetiva, incluindo componentes afetivos e emocionais, que amplificam ou diminuem a sensação dolorosa (KLAUMANN, WOUK, SILLAS, 2008).

A dor é importante, pois é através dela que se pode perceber um sinal de alerta para um perigo iminente, estando assim relacionada com a proteção do organismo, exibindo os limites que não podem ser transgredidos. Apesar das sensações dolorosas serem um aviso do qual o organismo se utiliza para sinalizar um processo de agressão, a problemática da dor acompanha a humanidade na medida em que interfere na homeostasia do indivíduo e da sua relação com os outros (KLAUMANN, WOUK, SILLAS, 2008).

Existe uma diferença entre os termos nocicepção e dor. O termo nocicepção refere-se a manifestações neurofisiológicas, gerada por estímulos nocivos. A dor envolve a percepção de um estímulo aversivo e requer a capacidade de abstração e elaboração do impulso sensorial (ALMEIDA, ROIZENBLATT, TUFIK, 2004).

1.3.1. Classificação da dor

Em termos de duração, a dor pode ser classificada como aguda ou crônica. A dor aguda é caracterizada por ter início repentino relacionado a traumas, infecções inflamações ou dano potencial. Este tipo de dor tem um importante papel, pois informa ao indivíduo um perigo potencial eminente. Espera-se que desapareça após intervenção da causa, por exemplo, cura da lesão ou em resposta a medicamento (KLAUMANN, WOUK, SILLAS, 2008). A dor crônica ocorre em resposta à lesão 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 apresentam etiologia incerta e não desaparece com o emprego dos procedimentos terapêuticos convencionais. 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) (MCQUAY, 2002).

A dor também pode ser classificada de acordo com sua origem. A dor persistente pode ser subdividida segundo sua origem em nociceptiva e neuropática. A dor nociceptiva resulta da ativação direta de nociceptores da pele e outros tecidos em resposta a uma lesão tecidual, acompanhada de inflamação. A dor neuropática ou neurogênica origina-se devido a lesões de nervos periféricos ou do sistema nervoso central (ALMEIDA et al., 2006).

1.3.2. Transmissão da dor

A transmissão do estímulo doloroso, assim como sua inibição, envolve múltiplos mecanismos. A percepção da dor se inicia na periferia pela estimulação dos nociceptores, que são receptores encontrados nos tecidos superficiais, profundos e vísceras que se apresentam como terminações nervosas livres com alto limiar de excitabilidade.

O estímulo doloroso é propagado através das fibras aferentes primárias C ou A δ onde encontram-se os nociceptores. As fibras A δ são responsáveis pela primeira fase da dor, rápida e forte, e são sensíveis a estímulos mecânicos intensos (mecanorreceptores de alto limiar). As fibras C produzem uma segunda fase de dor mais difusa e persistente e formam, na periferia, receptores de alto limiar para estímulos térmicos e/ou mecânicos. Existem também fibras do tipo C polimodais que respondem a estímulos mecânicos, térmicos e químicos (BESSON, 1997; KLAUMANN, WOUK, SILLAS, 2008).

As fibras aferentes nociceptivas terminam no corno dorsal da medula. Os neurônios nociceptivos do corno dorsal estão localizados nas lâminas mais superficiais: a lâmina marginal (lâmina I) e a substância gelatinosa (lâmina II). As fibras (neurônios) sensoriais primários fazem sinapse no corno dorsal da medula espinhal com neurônios de segunda ordem, predominantes na lâmina II (substância gelatinosa) da medula espinhal. Os neurônios de segunda ordem cruzam a medula espinhal para ascender ao trato espinotalâmico, projetando seus corpos celulares ao tálamo. No tálamo, neurônios de terceira ordem emitem axônios através da cápsula interna do córtex somatosensor, onde a somatização do estímulo nocivo ocorre, ou emite axônios ao giro cingulado anterior, onde existe o componente emocional da dor (RUSSO, BROSE, 1998). O tálamo é um dos responsáveis por informar que existe sensação nociceptiva, e o córtex é responsável pela discriminação do tipo de sensação nociceptiva e por identificar de onde provém (GUYTON, HALL, 2006).

1.3.3. Mediadores químicos da dor

Os receptores nociceptivos são ativados por diversos neuromediadores inflamatórios quando liberados por macrófagos, mastócitos, células endoteliais ou nervos traumatizados, facilitando a transmissão dolorosa e as alterações inflamatórias periféricas e, conseqüentemente, o quadro de hiperalgesia, sendo chamados de algio gênicos. Dentre estes, se destacam a acetilcolina, a histamina, bradicinina, o leucotrieno, a substância P, o PAF, os radicais ácidos, os íons potássio, as prostaglandinas, os tromboxanos, as interleucinas e o fator de crescimento nervoso (NGF) (KRAYCHETE, CALASANS, VALENTE, 2006; MA; QUIRION, 2008).

Quando um estímulo intenso provoca lesão tecidual, há desencadeamento de um processo inflamatório seguido de reparação. As células lesadas liberam enzimas que agem sobre os cininogênios, formando cininas. A partir da membrana celular, pela ação da fosfolipase A2, libera-se ácido araquidônico que, por ação da ciclo-oxigenase e da lipoxigenase, origina prostaciclina, prostaglandinas, tromboxano, leucotrienos e lipoxinas (BATLOUNI, 2010).

Além dessa resposta inflamatória tecidual, há uma resposta neurogênica, com produção de vasodilatação, extravasamento de proteínas plasmáticas e ação sobre as células inflamatórias com a liberação de mediadores químicos. Os mediadores inflamatórios agem aumentando a sensibilidade dos nociceptores, reduzindo assim seu limiar de excitabilidade (ROCHA et al, 2007).

REFERÊNCIAS

- AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.1, p.114-140, 2007.
- ALMEIDA, T.F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Research**, v.1000, n.1-2, p.40-56, 2004.
- ALMEIDA, T. P.; MAIA, J. Z.; FISCHER, C. D. B.; PINTO, V. M.; PULZ, R. S.; RODRIGUES, P. R. C. Classificação dos processos dolorosos em medicina veterinária. **Veterinária em Foco**, v. 3, n. 2, p. 107-118, 2006.
- ALVES, S. P.; TERUSZKIN, B. I.; HENRIQUES, N. S.; CASTILHO, R.O.; KAPLAN, M.A.C.; CURRIE CABRAL, M.; da COSTA CARVALHO, M. G. *Chrysobalanus icaco* L. extract for antiangiogenic Potential observation. **International Journal of Molecular Medicine**, v. 5, p. 667-669, 2000.
- ANTI, S. M. A.; GIORGI, R. D. N.; CHAHADE, W. H. Antiinflamatórios hormonais: Glicocorticóides. **Einstein**, v. 6, n. 1, p. S159-S65, 2008.
- BARBOSA, W. L. R.; PERES, A.; GALLORI, S.; VINCIERI, F. F. Determination of myricetin derivatives in *Chrysobalanus icaco* L. (Chrysobalanaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p. 333-337, 2006.
- BARBOSA-FILHO, J.M.; VASCONCELOS, T.H.C.; ALENCAR, A.A.; BATISTA, L.M.; OLIVEIRA, R.A.G.; GUEDES, D.N.; FALCÃO, H.S.; MOURA, M.D.; DINIZ, M.F.F.M.; MODESTO-FILHO, J. Plants and their active constituents from South, Central, and North America with hypoglycemic activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, V.15, n.4, p. 392-413, 2005.
- BARROS, S. B. M.; DAVINO, S. C. Avaliação da Toxicidade. In: S. Oga. **Fundamentos de Toxicologia**. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2003. p. 57-67.
- BATLOUNI, M. Anti-Inflamatórios Não Esteroides: Efeitos Cardiovasculares, Cérebro-Vasculares e Renais. **Arquivos Brasileiros Cardiologia**, v. 94, n. 4, p. 556-563, 2010.
- BESSON, J.M. The complexity of physiopharmacologic aspects of pain. **Drugs**, v. 53, Suppl. 2, p.1-9, 1997.
- BILATE, A. M. B. Inflamação, citocinas, proteínas de fase aguda e implicações terapêuticas. **Temas de reumatologia clínica**, v. 8, n. 2, p. 47-50, 2007.
- BOERS, M. NSAIDS and selective COX-2 inhibitors: competition between gastroprotection and cardioprotection. **The Lancet**, v. 357, p. 1222-1223, 2001.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Proposta de Política Nacional de Plantas Medicinais e Medicamentos Fitoterápicos. Brasília, 1ª edição, 2001.

BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria Nacional de Vigilância sanitária. Portaria SNVS n 19 de 30.01.92. Proíbe o uso de confrei (*Symphytum officinale* L.) em preparações para uso interno, 1992.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira. Brasília: Anvisa, 126p., 2011.

CALIXTO, J.B.; CAMPOS, M. M.; OTUKI, M. F.; SANTOS, A. R. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. Modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. **Planta medica**, v.70, p. 93-103, 2004.

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

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytoterapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, n. 2, p. 179 – 189, 2000.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F.; MORAIS, S. M.; SANTOS, L. F. L.; ROCHA, M. F. G.; BEVILAQUA, C. M. L. Validação de plantas medicinais com atividade anti-helmíntica. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.7, n.3, p.97-106, 2005.

CASTILHO, R. O.; KAPLAN, M. A. C. Constituintes químicos de *Licania tomentosa* BENTH. (CHRYSOBALANACEAE). **Química Nova**, v. 31, n. 1, p.66-69, 2008.

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

CARVALHO, M. G.; COSTA, P. M. Outros constituintes isolados de *Licania arianeae* (Chrysobalanaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n.1b, p. 290-293, 2009.

CARVALHO, A. C. B.; NUNES, D. S. G.; BARATELLI, T. G.; SHUQAIR, N. S. M. S. A. Q.; NETTO, E. M. Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos, **T&C Amazônia**, ano V, n.11, p. 26-32, 2007.

CASTILHO, R. O.; OLIVEIRA, R. R.; KAPLAN, M.A. C. Licanolide, a new triterpene lactone from *Licania tomentosa*. **Fitoterapia**, v.76, p.562–566, 2005.

CASTRO, M. Efeitos antiinflamatórios e antiproliferativos dos glicocorticóides: concordância ou discordância? **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.49, n.3, p. 334-336, 2005.

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. **Proceeding of National Academy of Science of the United States of America**, v.99, n.21, p.13926-13931, 2002.

CORDERO, A.B. **Manual de medicina doméstica**. República Dominicana: Taller, 1978. 490p.

CORDEIRO, C.H.G.; CHUNG, M.C.; SACRAMENTO, L.V.S. Interações medicamentosas de fitoterápicos e fármacos: *Hypericum perforatum* e *Piper methysticum*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n.3, p. 272-278, 2005.

DINARELLO, C. A. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. **Annual review of immunology**, v. 27, p. 519-50, 2009.

FERNANDES, J.; CASTILHO, R.O.; COSTA, M.R.; SOUZA, K.W.; KAPLAN, M.A.C.; GATTASS, C.R. Pentacyclic triterpenes from Chrysobalanaceae species: cytotoxicity on multidrug resistant and sensitive leukemia cell lines. **Cancer Letters**, v.190, p.165-169, 2003.

FERREIRA-MACHADO, S.C.F.; RODRIGUES, M.P.; NUNES, A.P.M.; DANTAS, F.J.S.; MATTOS, J.C.P.; SILVA, C.R.; MOURA, E.G.; BEZERRA, R.J.A.C.; ARAÚJO, A.C. Genotoxic potentiality of aqueous extract prepared from *Chrysobalanus icaco* L. leaves. **Toxicology Letters**, v.151, n.3, p.481-487, 2004.

FONSECA-KRUEL, V. S.; PEIXOTO, A.L.; SÁ, C. F.C.; ARAÚJO, D. S.D.; SILVA, W.L.; FERREIRA, A. J. **Plantas úteis da restinga: o saber dos pescadores artesanais de Arraial do Cabo**, Rio de Janeiro. Rio de Janeiro: Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 35p., 2006.

FRANKE, A.; LANTE, W.; FACKELDEY, V.; BECKER, H. P.; THODE, C.; KUHLMANN, W. D.; MARKEWITZ, A. Proinflammatory and antiinflammatory cytokines after cardiac operation: different cellular sources at different times. **The Annals of Thoracic Surgery**, v. 74, n. 2, p. 363-371, 2002.

GEPIREMEN, A.; MSHVILDADZE, V.; SULEYMAN, H.; ELIAS, R. Acute and chronic anti-inflammatory effects of *Hedera colchica* in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, n. 1, p. 191–195, 2004.

GOMES, A.; FERNANDES, E.; SILVA, A. M. S.; PINTO, D. C. G. A.; SANTOS, C. M. M.; CAVALEIRO, J. A. S.; LIMA, J. L. F. C. Anti-inflammatory potential of 2-styrylchromones regarding their interference with arachidonic acid metabolic pathways. **Biochemical Pharmacology**, v.78, n. 2, p. 171-177, 2009.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Tratado de fisiologia médica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. 1115 p.

GUSTAFSON, K.R.; MUNRO, M.H.G.; BLUNT, J.W.; CARDELLINA, J.H.; MCMAHON, J.B.; GULAKOWSKI, R.J.; CRAGG, G.M.; COX, P.A.; BRINEN, L.S.; CLARDY, J.; BOYD, M.R. HIV inhibitory natural products. 3. Diterpenes from *Homalanthus acuminatus* and *Chrysobalanus icaco*. **Tetrahedron**, v.47, n.26, p.4547- 4554, 1991.

IOSET, J. R.; RAOELISON, G. E; HOSTETTMANN, K.; Detection of aristolochic acid in Chinese phytochemicals and dietary supplements used as slimming regimens. **Food and chemical toxicology**, v. 41, p. 29-36, 2002.

ITOKAWA, H.; MORRIS-NATSCHKE, S.L.; AKIYAMA, T.; LEE, K.H. Plant derived natural product research aimed at new drug discovery. **Nature Medicine**, v. 62, p. 263-280, 2008.

IWALEWA, E. O.; MCGAW, L. J.; NAIDOO, V.; ELOFF, J. N. Inflammation: the foundation of diseases and disorders. A review of phytomedicines of South African origin used to treat pain and inflammatory conditions. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, n.25, p. 2868-2885, 2007.

KAY, A. B. Allergy and allergic diseases. First of two parts. **The New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 1, p.30-7, 2001.

KELLEHER, Z.T.; MATSUMOTO, A.; STAMLER, J.S.; MARSHALL, H.E.. NOS2 regulation of NF-kappa B by S-nitrosylation of p65*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 42, p. 30667-30672, 2007.

KIRVESKARI, J.; HELINTO, M.; SAAREN-SEPPALA, H.; RENKONEN, R.; TERVO, T. Leukocyte rolling and extravasation in surgical inflammation after mechanical and laser-induced trauma in human patients. **Experimental Eye Research**, v. 77, n. 3, p. 387-390, 2003.

KLAUMANN, P. R.; WOUK, A. F. P. F.; SILLAS, T. Patofisiologia da dor. **Archives of Veterinary Science**, v. 13, n.1, p.1-12, 2008.

KOLEWE, M. E.; GAURAV, V.; ROBERTS, S. C. Pharmaceutically active natural product synthesis and supply via plant cell culture technology. **Molecular Pharmacology**, v. 5, p. 243-256, 2008.

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

KRUEL, V. S. F.; PEIXOTO, A. L. Etnobotânica na reserva extrativista marinha de Arraial do Cabo, RJ, Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, v. 18, n. 1, p. 177-190, 2004.

KUMMER, C. L.; COELHO, T. C. R. B. Antiinflamatórios Não Esteróides Inibidores da Ciclooxigenase-2 (COX-2): Aspectos Atuais. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 52, n. 4, p. 498 – 512, 2002.

LAVICH, T. R.; CORDEIRO, R. S.; CALIXTO, J. B.; SILVA, P. M.; MARTINS, M. A. Combined action of vasoactive amines and bradykinin mediates allergen-evoked thermal hyperalgesia in rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 462, n. 1-3, p.185-92, 2003.

LENTINI, F. The role of ethnobotanics in scientific research. State of ethnobotanical knowledge in Sicily. **Fitoterapia**, v. 71 (suppl 1), p. 83-88, 2000.

LÓPEZ, L.A.C. El caco (*Chrysobalanus icaco*) como cultivo potencial en zonas de trópico seco (2004). Disponível em: <http://www1.monografias.com/trabajos15/caco-cultivo/cacocultivo.shtml> Acesso em: 24/09/2011.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa: Plantarum, 2002. 544p.

MCQUAY, H. J. Neuropathic pain: evidence matters. **European Journal of Pain**, v. 6, p. 11-18, 2002.

MARIOTTO, S.; SUZUKI, Y.; PERSICHINI, T.; COLASANTI, M.; SUZUKI, H.; CANTONI, O. Cross-talk between NO and arachidonic acid in inflammation. **Current Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 18, p. 1940-1944, 2007.

MA, W.; QUIRION, R. Does COX2-dependent PGE2 play a role in neuropathic pain? **Neuroscience Letters**, v. 437, n. 3, p. 165-169, 2008.

MURI, E. M. F.; SPOSITO, M. M. M.; METSAVAHT, L. Antiinflamatórios não-esteroidais e sua farmacologia local. **Acta fisiatrica**, v.16, n.4, p.186-190, 2009.

OKAMOTO, T.; GOHIL, K.; FINKELSTEIN, E.I.; BOVE, P.; AKAIKE, T.; VAN DER VLIET, A. Multiple contributing roles for NOS2 in LPS-induced acute airway inflammation in mice. **American Journal of Physiology. Lung Cellular and Molecular Physiology**, v. 286, n.1, p. 198-209, 2004.

PARADA, C. A.; TAMBELI, C. H.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced nociception. **Neuroscience**, v. 102, n. 4, p.937-944, 2001.

PARENTE, L. Pros and cons of selective inhibition of cyclooxygenase-2 versus dual lipooxygenase/cyclooxygenase inhibition: is two better than one? **The Journal of Rheumatology**, v. 28, p. 2375-2382, 2001.

PERRETTI, M.; AHLUWALIA, A. The microcirculation and inflammation: site of action for glucocorticoids. **Microcirculation**, v. 7, n. 3, p. 147-61, 2000.

PIO CORRÊA, M. **Dicionário de Plantas Úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Vol.3. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, p.747, 1926.

PLAEGER, S.F. Clinical immunology and traditional herbal medicines. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 10, p. 337-338, 2003.

POBER, J. S.; SESSA, W. C. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. **Nature reviews Immunology**, v. 7, n. 10, p. 803-15, 2007.

PRANCE, G.T. Chrysobalanaceae. Flora Neotropica. Monograph nº10. New York: Hafner Publishing Company, 1972. 411p.

PRESTA, G. A.; PEREIRA, N. A. Activity of abejeru (*Chrysobalanus icaco* linn, chrysobalanacea) in experimental study of hypogycemiant plants. **Revista Brasileira de Farmácia**, n. 68 p.91-101, 1987.

RATES, S. M. K. Promoção do uso racional de fitoterápicos:uma abordagem no ensino de farmacognosia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 11: 57-69, 2001.

RHEN, T.; CIDLOWSKI, J. A. Antiinflammatory action of glucocorticoids - new mechanisms for old drugs. **New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 16, p. 1711-23, 2005.

RISHTON, G.M. Natural products as a robust source of new drugs and drug leads: past successes and present day issues. **American Journal of Cardiology**, v. 101, p. 43D-49D, 2008.

ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S.; MITCHELL, R. N.; KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Fundamentos de patologia: bases patológicas das doenças** . 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2006. 829 p.

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

RUSSO, C. M.; BROSE, W. G. Chroninc pain. **Annual Review of Medicine**, 49: 123-133, 1998.

SAKLANI, A.; KUTTY, S. K. Plant-derived compounds in clinical trials. **Drug Discovery Today**, v. 13, p. 161-171, 2008.

SANTANA, M.L.; RÊGO, F.A.O; SILVA, A.F. Características de frutos e morfologias de plantas de guajuru (*Chrysobalanus icaco* L.) desenvolvidas no litoral paraibano. **Ceres**, v. 47, n.270, p. 181-187, 2000.

SANTOS, J. S.; VIEIRA, A. B. D.; KAMADA, I. A Rosa Mosqueta no tratamento de feridas abertas: uma revisão. **Revista brasileira de enfermagem**, v.62, n.3, p.457-462, 2009.

SCHMITZ, L. M.; BACHER, S. Novel molecular targets in search for anti-inflammatory agents. **Phytochemistry Reviews**, v. 4, p. 19-25, 2005.

SILVA, I. M.; PEIXOTO, A. L. O abajurú (*Chrysobalanus icaco* L. e *Eugenia rotundifolia* Casar.) comercializado na cidade do Rio de Janeiro, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n.1B, p. 325-332, 2009.

SIMÓN, G.V.; MARES, F. M.; MARTÍNEZ, R. F. M.; SÁNCHEZ, A. S. **Frutales tropicales de Tabasco**. 2. ed. Villahermosa: Centro de Investigación de Ciencias Biológicas, 2000. 137p.

SIQUEIRA - JUNIOR, J. F.; DANTAS, C. J. S. **Mecanismos celulares e moleculares da inflamação**. 1 ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2000. 238 p.

SMITH, N.; MORI, S. A.; HENDERSON, A.; STEVENSON, D. W.; HEALD, S. V. **Flowering plants of the neotropics**. Princeton and Oxford published in association with The New York Botanical Garden, 1ª ed. 2004.

SIMS, J. E.; SMITH, D. E. The IL-1 family: regulators of immunity. **Nature reviews Immunology**, v. 10, n. 2, p. 89-102, 2010.

SOSTRES, C.; GARGALLO, C. J.; ARROYO, M. T.; LANAS, A. Adverse effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs, aspirin and coxibs) on upper gastrointestinal tract. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 24, p. 121-132, 2010.

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

STICKEL, F.; SEITZ, H. K. The efficacy and safety of comfrey. **Nutrition Society: Public Health Nutrition**, v. 3, n.4A, p. 501-508, 2000

TAKEUCHI, K.; WATANABE, H.; TRAN, Q. K.; OZEKI, M.; SUMI, D.; HAYASHI, T.; IGUCHI, A.; IGNARRO, L. J.; OHASHI, K.; HAYASHI, H. Nitric oxide: inhibitory effects on endothelial cell calcium signaling, prostaglandin I₂ production and nitric oxide synthase expression. *Cardiovascular Research*, v. 62, p. 194-201, 2004.

TORRES, D. F.; OLIVEIRA, E. S.; ALVES, R. R. N.; VASCONCELLOS, A. Etnobotânica y etnozoológia en unidades de conservación: Uso de la biodiversidad en la apa de genipabu, Rio Grande del Norte, Brasil. **INCI**, v.34, n. 9, p.623-629, 2009.

TSUCHIYA, K.; SAKAI, H.; SUZUKI, N.; IWASHIMA, F.; YOSHIMOTO, T.; SHICHIRI, M.; HIRATA, Y. Chronic blockade of nitric oxide synthesis reduces adiposity and improves insulin resistance in high-fat-induced obese mice. **Endocrinology**, v. 148, n. 10, p. 4548-4556, 2007.

VALE, M.L.; MARQUES, J.B.; MOREIRA, C.A.; ROCHA, F.A.C.; FERREIRA, S.H.; POOLE, S.; CUNHA, F.Q.; RIBEIRO, R.A. Antinociceptive Effects of Interleukin-4, -10, and -13 on the Writhing Response in Mice and Zymosan-Induced Knee Joint Incapacitation in Rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 304, p. 102-108, 2003.

VEIGA-JÚNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v.28, n.3, p. 519-528, 2005.

WERZ, O. Inhibition of 5-lipoxygenase product synthesis by natural compounds of plant origin. **Planta Medica**, v. 73, p. 1331-1357, 2007.

YOKOMIZO, T.; IZUMI, T.; SHIMIZU, T. Leukotriene B₄: metabolism and signal transduction. **Archives of Biochemistry Biophysics**, v. 385, n. 2, p.321-241, 2001.

ZUQUE, A. L. F.; WATANABE, E. S.; FERREIRA, A. M. T.; ARRUDA, A. L. A.; RESENDE, U. M.; BUENO, N. R.; CASTILHO, R. O. Avaliação das atividades antioxidantes, antimicrobiana e citotóxica de *Couepia grandiflora* Benth. (Chrysobalanaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.14, n.2, p. 129-136, 2004.

Capítulo II

MANUSCRITO I

Atividades anti-inflamatória e antinociceptiva do extrato aquoso da entrecasca de *Chrysobalanus icaco* Linnaeus.

Tatiane Bezerra de Oliveira¹, Carlson Helder Reis de Carvalho Júnior¹, Fernanda Virgínia Barreto Mota¹, Maria Bernadete Souza Maia², Silene Carneiro do Nascimento¹, Teresinha Gonçalves da Silva^{1*}

¹Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE

²Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE.

*Correspondence to: Dra. Teresinha Gonçalves da Silva. Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Antibióticos. Av. Prof. Moraes Rego, 1235. Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brasil. CEP: 50670-901. Phone: +55 31 81 2126 8347; Fax: +55 31 81 2126 8346. E-mail: teresinha.goncalves@pq.cnpq.br

Artigo a ser submetido ao periódico **Journal of Medicinal Food**

MANUSCRITO I

Atividade anti-inflamatória e antinociceptiva do extrato aquoso da entrecasca de *Chrysobalanus icaco* Linnaeus.

Tatiane Bezerra de Oliveira¹, Carlson Helder Reis de Carvalho Júnior¹, Fernanda Virgínia Barreto Mota¹, Maria Bernadete Souza Maia², Silene Carneiro do Nascimento¹, Teresinha Gonçalves da Silva^{1*}

¹Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE

²Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, PE.

*Correspondence to: Dra. Teresinha Gonçalves da Silva. Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Antibióticos. Av. Prof. Moraes Rego, 1235. Cidade Universitária, Recife, Pernambuco, Brasil. CEP: 50670-901. Phone: +55 31 81 2126 8347; Fax: +55 31 81 2126 8346. E-mail: teresinha.goncalves@pq.cnpq.br

ABSTRACT *Chrysobalanus icaco* Linnaeus is a plant used in traditional medicine in Brazil in control of various diseases such as diabetes, diarrhea and inflammation. In this work, we describe the anti-inflammatory and antinociceptive effects of aqueous extract of bark of *C. icaco* (EACI). EACI in 2000 mg/kg did not induce toxic effects. There was no occurrence of death throughout the experiment, and there were no changes in physiological and hematological parameters. The anti-inflammatory activities of EACI (100, 200 and 400 mg/kg, p.o.) were evaluated by in acute inflammation models. The EACI (400 mg/kg) reduced carrageenan-induced rat paw oedema, and also inhibited inflammation induced by subcutaneous carrageenan injection, reducing cell migration, nitric oxide, however did not reduce the levels of TNF- α and IL-6 produced in the pouch. EACI significantly inhibited the number of writhings and the doses of 200 and 400 mg/kg showed antinociceptive effect similar to those obtained by acetylsalicylic acid (200 mg/kg, p.o.). There was reduction of the time that the animal spent licking the formalin-injected paw (both phase). The EACI (200 mg/kg) was able to prolonged the reaction time in hot plate only in the first hour after administration of the extract, being this activity similar to morphine (2,5 mg/kg, s.c.). Our results indicate that the EACI demonstrates significant anti-inflammatory activity through the inhibition of cellular migration and nitric oxide, thus confirming the popular use of this plant as an anti-inflammatory agent.

KEY WORD: *Chrysobalanus icaco* L., herbal medicines, Toxicity, Anti-inflammatory, antinociceptive.

INTRODUÇÃO

Produtos naturais derivados de plantas contribuíram imensamente para o desenvolvimento dos fármacos terapêuticos modernos. É conhecido que diversos metabólitos secundários derivados de plantas interferem sobre diversas moléculas pró-inflamatórias.¹ O uso tradicional de plantas como agentes anti-inflamatórios tem sido avaliado por diversos estudos, que indicam que extratos ou frações de plantas possuem atividade anti-inflamatória em modelos animais e de cultura de celular. Em consequência disso, existe um considerável interesse na identificação de novos tipos de agentes anti-inflamatórios a partir de produtos de plantas usadas na medicina popular.^{2,3}

Chrysobalanus icaco Linnaeus é uma espécie arbustiva pertencente a família Chrysobalanaceae com distribuição por áreas costeiras no caribe, America do sul e na áfrica ocidental.⁴ As folhas, casca e raízes desta planta são utilizadas na medicina tradicional na região norte, nordeste e sudeste do Brasil no controle de diversas patologias como diabetes, diarreia e inflamação.⁵⁻⁷ O extrato aquoso das folhas de *C. icaco* foi capaz de induzir alteração na topologia plasmodial, sugerindo um potencial genotóxico.⁸ Segundo Alves et al. (2000)⁹, o extrato metanólico obtido das folhas tem um potencial anti-angiogênico, reduzindo aproximadamente 44% na formação de novos vasos. Diterpenóides isolados das folhas de *C. icaco* atuaram como inibidores do Vírus da Imunodeficiência Adquirida (HIV).¹⁰ O ácido pomólico, triterpeno isolado das folhas de *C. icaco* induziu apoptose em uma linhagem de leucemia resistente a múltiplas drogas.¹¹

As investigações fitoquímica relatam a presença de miricetina nas folhas de *C. icaco*.¹² A miricetina é considerado um importante flavonóide primitivo, e sua presença tem sido usada como um marcador quimiotaxonômico na família Chrysobalanaceae.^{13,14} Estudos na literatura relataram a presença de ácidos trienoicos, tetraenoicos e seus derivados oxo¹⁵ e taninos no óleo da semente de *C. icaco*.¹⁶

Apesar de sua indicação de uso popular para doenças infecciosas e inflamatórias, não foram encontrados na literatura nenhum estudo que avaliasse as atividades anti-inflamatória da entrecasca de *Chrysobalanus icaco*, parte da planta muito usada com esta finalidade pela população. Portanto, este estudo teve como objetivo investigar as atividades anti-inflamatória e antinociceptiva do extrato aquoso da entrecasca de *Chrysobalanus icaco*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Material botânico

A entrecasca de *C. icaco* foi coletada no município de Japaratinga, Alagoas (Brasil) no período de abril de 2009. Uma exsicata encontra-se depositada no herbário do Instituto de Pesquisa Agropecuária de Pernambuco (Pernambuco, Brasil), sob o nº 83131.

Animais

Camundongos albinos swiss de ambos os sexos (30-35g) e ratos wistar machos (190-200g) foram obtidos do Biotério do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), que está registrado com o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) sob o nº 18. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno à temperatura de 22 ± 2 °C, com ciclo claro-escuro de 12 horas, recebendo ração balanceada e água à vontade. Os animais foram submetidos a jejum de 4 horas antes de cada experimento. Os protocolos de experimentação foram aprovados pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE (nº 23076.050728/2010-84)

Reagentes e drogas

Indometacina, carragenina e ácido acetilsalicílico (AAS) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA), e ácido acético foi adquirido da Merck (Rio de Janeiro, Brasil). EDTA foi obtido do Labtest, São Paulo, Brasil. TNF- α do mouse e kits de IL-1 β ELISA foram adquiridos da eBioscience, São Paulo, Brasil. Sulfato de Morfina foi adquirido da União Química, São Paulo, Brasil. Todos os medicamentos (exceto sulfato de morfina) foram dissolvidas em solução salina 0,9% imediatamente antes da utilização. O grupo controle negativo foi composto por animais tratados com veículo.

Obtenção do extrato aquoso da entrecasca de C. icaco

A entrecasca foi seca em estufa a 37 °C e trituradas para a preparação do extrato aquoso de *C. icaco* (EACI). A decocção foi preparada na proporção de 10g de pó para 50 mL de água, aquecido à temperatura de 100 °C durante 30 minutos. O decocto foi filtrado, rotaevaporado, liofilizado e posteriormente armazenado a -20 °C até o momento do uso. No momento do uso, o extrato seco obtido foi suspenso em salina (0,9% de NaCl).

Avaliação da toxicidade aguda

Os parâmetros adotados foram determinados segundo Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA).¹⁷ Grupos compostos por 10 camundongos (cinco machos e cinco fêmeas) receberam via oral o veículo (Salina 0,9% NaCl) e EACI (2000 mg/kg). Esta dose foi escolhida seguindo recomendações da ANVISA, visando o bem estar animal. Sinais de toxicidade foram observados e registrados durante os primeiros 60 minutos. Os animais foram observados por 14 dias para registro dos sinais tóxicos, evolução ponderal, consumo de água e alimentos e mortalidade. No ultimo dia de observação, os animais foram anestesiados com xilazina (0,10 mL/kg) e ketamina (0,35 mL/kg) para coleta de sangue por punção cardíaca para exame hematológico e para observação de alterações macroscópica das vísceras.

Edema de pata induzido por carragenina

O modelo de edema em pata de rato foi realizado de acordo com Winter et al. (1962).¹⁸ Cinco grupos de 6 ratos cada foram tratados por via oral com EACI (100, 200 e 400 mg/kg), indometacina (fármaco padrão, 10 mg/kg) ou salina. Após uma hora, os animais receberam uma injeção subcutânea de 0,1 mL de carragenina a1% na região subplantar da pata direita posterior. O edema foi registrado imediatamente após a injeção de carragenina e nos tempos de 1, 2, 3, 4 e 5h. O volume do edema foi determinado em milímetros através de pletismômetro (Ugo Basile). Os resultados foram expressos como a diferença entre o volume final e o volume inicial.

Bolsão de ar subcutâneo

A atividade anti-inflamatória do EACI foi avaliada pela formação de uma bolsa de ar na região dorsal de camundongos pela injeção subcutânea de 2,5mL de ar estéril no dia 0, seguida pela segunda injeção de 2,5 mL de ar estéril três dias depois. No sexto dia, os animais receberam via oral o EACI (100, 200 e 400 mg/kg), indometacina (10 mg/kg) ou veículo. As doses foram escolhidas de acordo com os resultados obtidos no teste de toxicidade aguda. Uma hora após a administração oral, a inflamação foi induzida pela injeção de 1 mL de um solução de carragenina (1% em solução salina) dentro do bolsão de ar. Após 6 h, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂, as bolsas foram lavadas com 3 mL de solução salina contendo 3 µMol de EDTA. A contagem de leucócitos polimorfunucleares foi realizada em contador hematológico ABX Micros 60. O exsudato restante foi centrifugado e os sobrenadantes armazenados a -20°C para determinação das citocinas pró-inflamatórias.¹⁹

Quantificação dos níveis de TNF- α e IL-6

Os exudatos coletados do bolsão de ar foram armazenados a -20° C para a determinação dos níveis de citocinas. A quantificação dos níveis de TNF- α e IL-6 nestes exudatos foi realizado pela técnica de ELISA *sandwich* usando kits específicos para camundongos de acordo com as instruções do fabricante (eBioscience, San Diego, California, USA). O limite de menor detecção deste ensaio foi de 10 pg/mL.

Determinação dos níveis de óxido nítrico

Para avaliação a produção de óxido nítrico (NO), as concentrações de nitrato (metabólito estável do NO) foram medidos no sobrenadante do exudato do bolsão de ar.²⁰ Uma alíquota de 50 μ l de amostra foi transferido para uma microplaca e incubadas com 50 μ l de reagente de Griess (sulfanilamida 1%, 0,1% naphthylethylene diamina dicloridrato, 5% H₃PO₄) por 10 min em temperatura ambiente protegido da luz.²¹ A absorbância foi medida em 540nm em leitor de microplacas e a concentração de nitrato foi calculada usando uma curva padrão de nitrato de sódio.

Contorções abdominais induzidas por ácido acético

O modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético foi realizado de acordo com Koster et al. (1959).²² Camundongos receberam oralmente EACI (100, 200 e 400 mg/kg), ácido acetil salicílico (AAS) (200mg/kg) e veículo. Após uma hora, uma solução de ácido acético a 1% foi injetada (0,1mL/10 g de peso animal) na cavidade peritoneal dos animais. Dez minutos depois, os camundongos foram observados, e o número de contorções durante o período de 20 minutos foi registrado.

Teste da formalina

Os camundongos receberam uma injeção de 20 μ L de formalina (2,5%, v/v) na região subplantar direita. Imediatamente após a injeção, o tempo em que o animal passou lambendo ou mordendo a pata injetada foi registrado. A resposta nociceptiva foi registrada nos intervalos de 0-5 minutos (primeira fase, dor neurogênica) e de 15-30 minutos (segunda fase, dor inflamatória) após injeção de formalina. Os animais foram pré-tratados com EACI (200 mg/kg), AAS (200mg/kg) ou veículo 60 minutos antes da injeção de formalina. O sulfato de morfina (2,5 mg/kg, s.c.) foi administrado 45 minutos antes da indução da nocicepção. A dose de 200 mg/kg de EACI foi escolhida por apresentar a melhor atividade antinociceptiva no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético.²³

Placa quente

Este teste seguiu o modelo descrito por Adzu et al (2003) com modificações.²⁴ Os animais foram colocados sobre uma placa de alumínio (Insight equipments, Brasil) aquecida a temperatura fixa ($55 \pm 1^\circ\text{C}$). O tempo de latência em termos de desconforto (lamber as patas ou pular) foi registrado antes e depois do tratamento. Os camundongos foram pré-tratados com EACI (200 mg/kg, p.o.), sulfato de morfina (2,5 mg/kg, s.c.) e veículo (p.o.). As medidas de latência foram realizadas nos tempos de 30, 60, 120, 180 e 240 minutos após o tratamento. Para impedir a lesão tecidual foi estabelecido *cut off* de 30 segundos.

Análise estatística

Todos os grupos experimentais foram constituídos de 6 animais, exceto a toxicidade aguda que foram 10 animais por grupo. Os resultados foram expressos como média $\pm$ D.P. As diferenças entre os grupos foram determinadas através da Análise de Variância (ANOVA – one way), seguida pelo teste de Bonferroni. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $*p < 0.05$, $**p < 0.01$, $***p < 0.001$ e $****p < 0.0001$. As análises foram feitas com auxílio do programa GraphPad Prism 5.0.

RESULTADOS

Avaliação da toxicidade aguda

A administração oral do EACI na dose de 2000 mg/kg não induziu efeitos tóxicos. Não houve a ocorrência de morte durante o experimento, nem mudanças nos parâmetros fisiológicos observados (ganho de peso, consumo de ração e água, parâmetros hematológicos e aspecto macroscópico dos órgãos) como mostrados na tabela 1 e 2.

Tabela 1 – Efeito do EACI sobre parâmetros fisiológicos em camundongos.

Grupos	Consumo de ração (g)	Consumo de água (mL)	Peso corporal (g)	
			Inicial	Final
Controle (machos)	32.9 ± 4.8	50.0 ± 4.8	29.0 ± 1.3	35.3 ± 0.8
EACI (machos)	33.8 ± 2.2	46.9 ± 3.3	29.3 ± 0.7	34.7 ± 1.3
Controle (fêmeas)	27.9 ± 4.2	32.5 ± 3.2	28.8 ± 0.7	35.1 ± 0.9
EACI (fêmeas)	31.9 ± 2.6	39.6 ± 2.3	28.4 ± 0.4	35.7 ± 0.9

Valores expressos em média $\pm$ D.P. (n=5). Não houve diferença significativa entre os grupos tratados e os controles.

Tabela 2 – Efeito do EACI sobre parâmetros hematológicos em camundongos após 14 dias.

Parameters	Controle (machos)	EACI (machos)	Controle (fêmeas)	EACI (fêmeas)
Hemácias ($10^6/\text{mm}^3$)	8.8 ± 0.5	8.7 ± 0.4	8.9 ± 0.5	9.4 ± 0.6
Hemoglobina (g/dL)	14.5 ± 0.9	13.0 ± 0.8	13.9 ± 0.4	14.6 ± 1.0
Hematócrito (%)	42.9 ± 3.9	40.6 ± 1.1	43.9 ± 0.9	43.8 ± 0.4
VCM (μg)	48.8 ± 0.8	47.4 ± 0.9	49.7 ± 0.6	46.0 ± 0.9
HCM (pg)	15.2 ± 0.6	14.8 ± 0.4	15.2 ± 0.4	14.7 ± 0.4
CHCM (%)	31.6 ± 0.9	31.8 ± 1.1	31.5 ± 0.3	31.7 ± 0.3
Leucócitos ($10^3/\text{mm}^3$)	9.7 ± 0.7	8.5 ± 0.9	8.0 ± 0.5	9.0 ± 0.7
Plaquetas ($10^3/\text{mm}^3$)	324.0 ± 59.4	293.5 ± 20.5	292.0 ± 50.1	302.0 ± 57.7

Valores expressos em média $\pm$ D.P. (n=5). HCM - Hemoglobina corpuscular média; CHCM - Concentração da hemoglobina corpuscular; VCM - Volume corpuscular médio. Não houve diferença significativa entre os grupos tratados e os controles.

Edema de pata induzido por carragenina

O pré-tratamento com EACI na dose de 100 e 200 mg/kg não reduziu o volume do edema induzido por carragenina 1% (Tabela 3). Contudo, a dose de 400 mg/kg (64,7%) foi capaz de reduzir o edema de pata significativamente no tempo de 1 hora, esta atividade foi similar a indometacina (72,2%).

Tabela 3 – Efeito do EACI no edema de pata induzido por carragenina em ratos.

Grupo	Dose (mg/kg)	Volume do edema de pata (mL)				
		1h	2h	3h	4h	5h
Controle	-	0.36 ± 0.08	0.55 ± 0.12	0.97 ± 0.18	1.07 ± 0.21	0.90 ± 0.27
EACI	100	0.26 ± 0.02	0.50 ± 0.06	0.89 ± 0.11	1.02 ± 0.12	0.87 ± 0.10
	200	0.21 ± 0.07	0.47 ± 0.08	0.83 ± 0.08	0.96 ± 0.09	0.84 ± 0.12
	400	$0.13 \pm 0.03^{**\#}$	0.38 ± 0.05	0.79 ± 0.14	0.95 ± 0.13	0.81 ± 0.11
Indometacina	10	$0.1 \pm 0.01^{***}$	$0.24 \pm 0.02^{***}$	$0.47 \pm 0.05^{***}$	$0.54 \pm 0.07^{***}$	$0.49 \pm 0.05^{***}$

Dados representam média $\pm$ DP volume do edema (mL) nos tempos de 1, 2, 3, 4 e 5 horas após a injeção de carragenina a 1% (N=6); $**p < 0,01$ $***p < 0,001$ Vs. Controle. #- não significativo vs. indometacina. ANOVA, teste de Bonferroni.

Bolsão de ar subcutâneo

O pré-tratamento com o EACI demonstrou atividade anti-inflamatória nas doses testadas (Tabela 4). A dose de 400 mg/kg apresentou atividade anti-inflamatória semelhante à indometacina (10mg/kg).

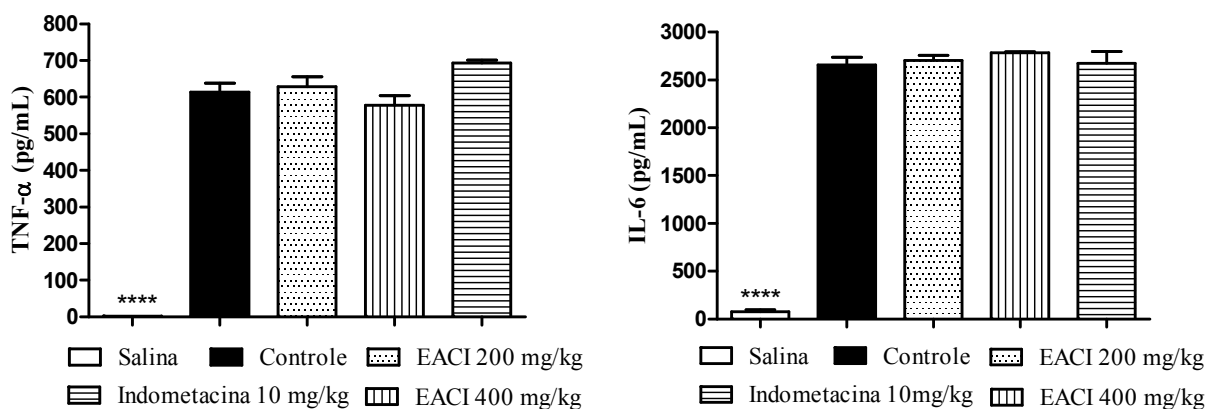
Tabela 4 – Efeito do EACI sobre a migração celular em bolsão de ar subcutâneo.

Grupo	Dose (mg/kg)	Migração Celular ($10^3 / \text{mm}^3$)	Inibição (%)
Controle	-	11.3±1.62	-
salina	-	0.26±0.05***	-
EACI	100	6.93±0.80***	36.1
	200	5.60±0.41***	50.4
	400	4.72±0.94***#	58.3
Indometacina	10	3.88±0.69***	65.6

Valores expressos em média ± DP. (N = 6). *** $p < 0.001$ V.s Controle. # - não significativo v.s indometacina. ANOVA, teste de Bonferroni.

Quantificação dos níveis de TNF- α e IL-6

A quantificação de TNF- α e IL-6 foram realizadas com as doses que mostraram melhor inibição da migração de células polimorfonucleares no experimento de bolsão de ar. Os grupos tratados com EACI (200 e 400 mg/kg) não reduziram os níveis destas citocinas em comparação ao grupo controle (Figura 1).



Determinação dos níveis de óxido nítrico

Os grupos tratados com EACI nas doses de 200 e 400 mg/kg reduziram significativamente os níveis de NO comparado com o grupo controle (Figura 2).

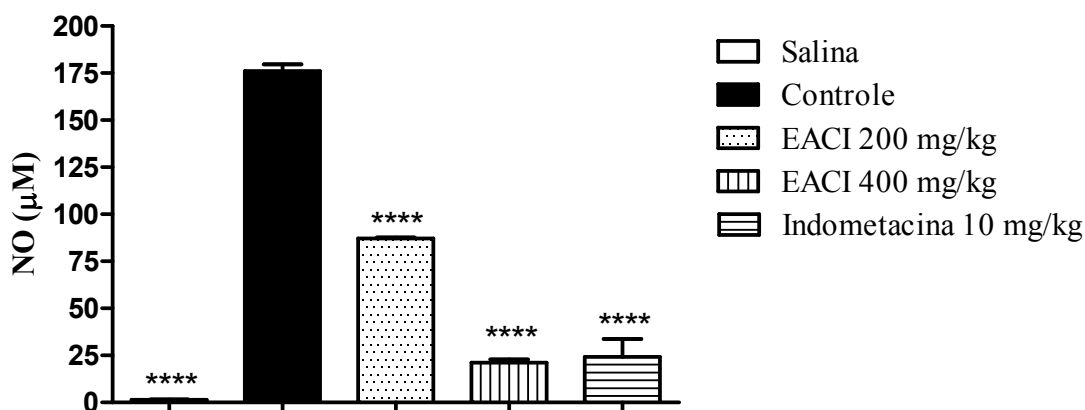


Figura 2 – Efeito do EACI sobre os níveis de óxido nítrico no exudato inflamatório. Valores expressos em média $\pm$ DP (n = 6), **** p < 0.0001 v.s controle. ANOVA, teste de Bonferroni.

Contorções induzidas por ácido acético

O tratamento com EACI reduziu o número de contorções induzidas por ácido acético (Figura 3). As doses de 200 e 400 mg /kg mostraram efeito antinociceptivo semelhante ao obtido pelo AAS (200 mg/kg). Os demais testes antinociceptivos foram realizados com a dose de 200 mg/kg, visto que esta dose apresentou atividade antinociceptiva semelhante a dose de 400 mg/ kg.

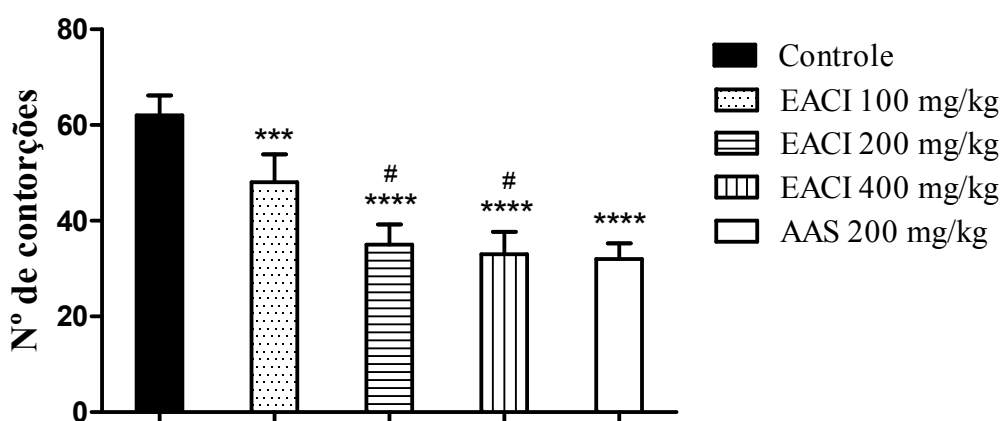


Figura 3 – Efeito do EACI sobre as contorções abdominais induzidas por ácido acético. Valores expressos em média $\pm$ DP representa o número de contorções induzidas por ácido acético 1% (n = 6), *** p < 0.001, **** p < 0.0001 v.s controle. # - não significativo v.s AAS. ANOVA, teste de Bonferroni.

Teste da formalina

O EACI (200 mg/kg) reduziu significativamente o tempo de lambidas induzidas por formalina 2.5% em ambas fases (Figura 4). Na primeira fase, o EACI teve atividade antinociceptiva semelhante à morfina.

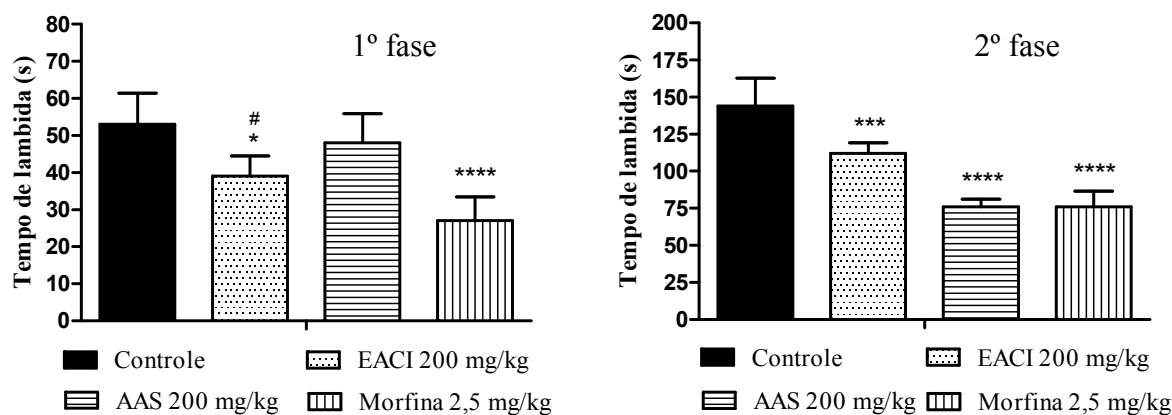


Figura 4 – Efeito do EACI sobre nocicepção induzida por formalina 2.5%. Valores expressados em média $\pm$ DP (n = 6), * p < 0.001 *** p < 0.001 **** p < 0.0001 v.s controle. # - não significativo v.s. morfina. ANOVA, teste de Bonferroni.

Placa quente

O EACI na dose de 200 mg/kg prolongou significativamente o tempo de reação a placa quente apenas na primeira hora após a administração do extrato (Tabela 5), sendo esta atividade semelhante à morfina.

Tabela 5 – Efeito do EACI sobre a resposta nociceptiva induzida por calor.

Grupos	Dose (mg/kg)	Tempo de latência (s)					
		0	30	60	120	180	240
Controle	-	9.0 $\pm$ 0.3	9.4 $\pm$ 0.3	10.2 $\pm$ 1.3	9.0 $\pm$ 0.5	9.5 $\pm$ 1.3	10.7 $\pm$ 1.2
EACI	200	9.3 $\pm$ 1.3	10.6 $\pm$ 0.9	13.6 $\pm$ 1.2 ^{**#}	9.6 $\pm$ 0.5	10.2 $\pm$ 0.9	8.8 $\pm$ 0.3
Morfina	2.5	9.4 $\pm$ 0.5	11.7 $\pm$ 1.5 [*]	12.5 $\pm$ 1.8 [*]	15.4 $\pm$ 1.1 ^{***}	16.7 $\pm$ 1.7 ^{***}	16.3 $\pm$ 1.4 ^{***}

Dados representam a media $\pm$ DP do tempo de latência (s) para o animal lambear a pata ou saltar a temperatura constante de 55 $\pm$ 1 °C nos intervalos de 0, 30, 60, 120, 180 e 240 minutos após o tratamento (n = 6). *p < 0.05, **p < 0.001, ***p < 0.0001 vs. Controle. # não significativo vs. morfina-ANOVA, teste de Bonferroni.

DISCUSSÃO

Este trabalho investigou as bases farmacológicas para o uso na medicina popular da entrecasca de *C. icaco* em inflamação inflamação aguda. Também foi investigada a atividade antinociceptiva do EACI.

O modelo de edema de pata em ratos tem sido amplamente utilizado na pesquisa de novas drogas. A inflamação induzida pela carragenina é um processo agudo, altamente reproduzível e bem estudado. O desenvolvimento do edema induzido por carragenina é um modelo bifásico, com vários mediadores atuando em sequência para produzir a resposta inflamatória.²⁵ Na fase inicial (1-2 h) ocorre liberação de histamina, serotonina, bradicinina e citocinas que promovendo vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular. Além de desencadearem a formação do edema, estes mediadores contribuem fortemente com a migração celular, principalmente de neutrófilos para o sítio inflamatório. A fase posterior (3-5 h) está correlacionada com elevada produção de prostaglandinas, ativação da COX-2 e liberação de NO.^{26,27}

O EACI na dose de 400 mg/kg causou inibição do edema na fase inicial da resposta inflamatória induzida por carragenina. Com base nesta observação, pode-se sugerir que o efeito anti-inflamatório apresentado pelo EACI pode ser, em parte, atribuído à inibição da liberação de mediadores pró-inflamatórios da inflamação aguda, especificamente os mediadores liberados na primeira fase deste teste, como histamina, serotonina e bradicinina.

O modelo de bolsão de ar é comumente usado nos testes de triagem de drogas para o tratamento da artrite, pois mimetiza a membrana sinovial inflamada de pacientes com artrite reumatóide, com infiltração de polimorfonucleares e liberação de mediadores pró-inflamatórios.²⁸ O pré-tratamento dos animais com o EACI na dose de 400 mg/kg inibiu a migração de leucócitos polimorfonucleares para o sítio inflamatório assemelhando a inibição produzida pela indometacina, demonstrando que o EACI possui um potencial efeito anti-inflamatório em reduzir a migração celular.

A carragenina aumentou drasticamente a concentração de TNF- α no exsudato do bolsão, não sendo significativamente reduzida pelo pré-tratamento com EACI. As concentrações de IL-6 também não foram alteradas pelo EACI. Em contrapartida, o nível de NO foi reduzido pelo EACI. O NO é um importante mediador na inflamação aguda e crônica. Este mediador é um potente vasodilatador, o seu envolvimento durante a resposta inflamatória pode estar relacionada com sua capacidade de aumentar a permeabilidade vascular e conseqüente formação de edema através de mudanças na circulação sanguínea local. Ele também estimula a atividade da COX, resultando na produção exacerbada de

prostaglandinas.^{29,30} Estes resultados corroboram com a redução do processo inflamatório, porém mais estudos se fazem necessários para a compreensão dos mecanismos pelo quais o EACI reduz os níveis de NO.

Doenças inflamatórias e dor são uns dos mais importantes problemas de saúde no mundo. Atualmente, poucas drogas são eficientes no tratamento destas desordens, e muitas delas causam efeitos colaterais severos. Portanto, a procura por novas terapias é extremamente importante.³¹ Vários modelos de nocicepção em animais de laboratório foram desenvolvidos para verificar a atividade analgésica de extratos e compostos. Entre os modelos de nocicepção utilizados neste trabalho, o teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético é descrito como um típico modelo para avaliar a dor de origem inflamatória, pouco específico, mas com boa sensibilidade, sendo uma ferramenta de triagem para avaliação da atividade analgésica e anti-inflamatória de novos agentes.³² O ácido acético age liberando mediadores endógenos que estimulam os neurônios nociceptivos.²⁵ Neste estudo, o EACI foi capaz de reduzir as contorções nas doses de 100, 200 e 400 mg / kg. Embora as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético representem um modelo de nocicepção periférica, este não é um modelo específico, uma vez que diferentes classes de substâncias também inibem as contorções como: hipotensores, depressores e estimulantes do sistema nervoso e anti-histamínicos.³² Portanto, a interpretação da redução da dor através do estímulo pelo ácido acético, deve ser conduzida de forma cautelosa e levando-se em consideração os resultados de outros testes.

O teste da formalina é um modelo válido e confiável de nocicepção, sensível para várias classes de drogas analgésicas, sendo utilizado no esclarecimento dos possíveis mecanismos do efeito antinociceptivo.³³ Este teste produz duas fases distintas de nocicepção, a primeira (durante os 5 primeiros minutos) correspondem a dor neurogênica, e a segunda fase (durante 15 a 30 minutos após injeção de formalina) corresponde a dor inflamatória.³⁴ Medicamentos de ação central, como os opióides inibem ambas fases, enquanto que medicamentos de ação periférica, como a aspirina, indometacina e dexametasona inibem apenas a segunda fase.³³ O EACI foi capaz de diminuir o tempo que os animais passaram lambendo a pata injetada durante a duas fases. O efeito produzido na primeira fase foi semelhante a morfina. Estes resultados sugerem que o efeito antinociceptivo apresentado pelo EACI envolve mecanismos centrais. Entretanto, para confirmar esta hipótese, foi realizado o teste da placa quente, onde EACI demonstrou efeito antinociceptivo durante os primeiros 60 minutos, indicando que esse extrato possui efeito analgésico central de curta duração, visto

que o bloqueio das respostas na placa quente indica um mecanismo de ação no sistema nervoso central.³²

Embora a definição dos mecanismos de ação requeira mais estudos, o EACI atenuou os efeitos inflamatórios pela redução dos níveis de NO e da migração de polimorfonucleares no exsudato do bolsão de ar, não apresentando efeito sobre o TNF- α e IL-6. O EACI apresentou efeito antinociceptivo sobre a dor inflamatória e dor neurogênica.

AGRADECIMENTOS

Ao CNPq e FACEPE pelo suporte financeiro.

REFERENCIAS

1. Calixto JB, Otuki MF, Santos ARS: Anti-inflammatory compounds of plants origin. Part I. action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor κ B (NF – κ B). *Planta medica* 2003; 69: 973-983.
2. Chiu Y, Huang T, Chiu C, Lu T, Chen Y, Peng W, Chen C: Analgesic and Anti-inflammatory Activities of the Aqueous Extract from *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. both *in Vitro* and *in Vivo*. *Evid Based Complement Alternat Med* 2012; 2012: 1-11.
3. Mothana RAA. Anti-inflammatory, antinociceptive and antioxidant activities of the endemic Soqotraen *Boswellia elongata* Balf. f. *Jatropha unicostata* Balf. f. in different experimental models. *Food chem toxicol* 2011; 49: 2594-2599.
4. Smith N, Mori SA, Henderson A, Stevenson DW, Heald SV: Chrysobalanaceae. In: Flowering plants of the neotropics, Princeton University Press, Princeton, New Jersey, 2004, pp100-102.
5. Costa OA: Brazilian Plants With Hypoglycaemic Effects. *Leandra* 1977; 7: 63-75.
6. Agra MF, Freitas PF, Barbosa-Filho JM: Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Brazil J Pharmacog* 2007; 17 (1): 114-140.
7. Barbosa-Filho JM, Vasconcelos THC, Alencar AA, Batista LM, Oliveira RAG, Guedes DN, Falcão HS, Moura MD, Diniz MFFM, Modesto-Filho J: Plants and their active constituents from South, Central, and North America with hypoglycemic activity. *Brazil J Pharmacog* 2005; 15 (4): 392-413.
8. Ferreira-Machado SCF., Rodrigues MP, Nunes APM, Dantas FJS, Mattos JCP, Silva CR, Moura EG, Bezerra RJAC, Araújo AC: Genotoxic potentiality of aqueous extract prepared from *Chrysobalanus icaco* L. leaves. *Toxicol Lett* 2004; 151 (3): 481-487.
9. Alves SP, Teruszkin BI, Henriques NS, Castilho RO, Kaplan MAC, Currie CM, Costa MGC: *Chrysobalanus icaco* L. extract for antiangiogenic Potential observation. *Int J Mol Med* 2000; 5: 667-669.
10. Gustafson KR, Munro MHG, Blunt JW, Cardellina JH, McMahon JB, Gulakowski RJ, Cragg GM, Cox PA, Brinen LS, Clardy J, Boyd MR: HIV inhibitory natural products. 3. Diterpenes from *Homalanthus acuminatus* and *Chrysobalanus icaco*. *Tetrahedron* 1991; 47 (26): 4547- 4554.
11. Fernandes J, Castilho RO, da Costa MR, Wagner-Souza K, Coelho Kaplan MA, Gattass CR: Pentacyclic triterpenes from Chrysobalanaceae species: cytotoxicity on multidrug resistant and sensitive leukemia cell lines. *Cancer Lett* 2003; 190: 165-169.
12. Chaffaud M, Emberger L: Chrysobalanacées. In: Traite' de Botanique Systematique, Vol. 2, Masson, Paris, 1960, pp 1390-1391.

13. Mendez J, Bilia AR, Morelli I: Phytochemical investigations of *Licania* genus. Flavonoids and triterpenoids from *Licania pittieri*. *Pharma Acta Helv* 1995; 70 (3): 223-226.
14. Coradin L, Giannasi DE, Prance AT: Chemosystematic studies in the *Chrysobalanaceae*. Flavonoids in *Parinari*. *Brittonia* 1985; 37 (2): 169-178.
15. Gunstone FD, Subbarao R: New tropical seed oils. Part I. conjugated trienoic and tetraenoic acids and their oxoderivatives in the seed oils of *Chrysobalanus icaco* and *Parinari laurinum*. *Chem Phys Lipids* 1967; 1: 349-359.
16. Verma VS, Raychaudhuri SP: Effect of catechol tannins isolated from a medicinal plant *Chrysobalanus icaco* on the infectivity of potato virus X. *Zentralbl Bakteriol Parasitenkd Infektionskr Hyg* 1972; 127(2): 178- 179.
17. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Guia para a condução de Estudos não clínicos de Segurança necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos. <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/30dd7a0047457fa68b53df3fbc4c6735/GUIA+PARA+A+CONDU%C3%87%C3%83O+DE+ESTUDOS+N%C3%83O+CL%C3%8DNICOS+DE+SEGURAN%C3%87A+NECESS%C3%81RIOS+AO+DESENVOLVIMENTO+DE+MEDICAMENTOS.pdf?MOD=AJPERES> (acessado Janeiro 2011)
18. Winter CA, Risley EQ, Nuss GW: Carrageenan-induced edema in hind paw of rat as an assay for anti-inflammatory drugs. *Proc Soc Biol Med* 1962; 11: 544-547.
19. Guerra ASHS, Malta DJN, Laranjeira LPM, Maia MBS, Colaço NC, Lima MCA, Galdino ISL, Pitta IR, Gonçalves-Silva T: Anti-inflammatory and antinociceptive activities of indole-imidazolidine derivatives. *Int Immunopharmacol* 2011; 11 (11): 1816-1822.
20. Xu J, Xu X, Verstraete W: Adaptation of *E. coli* cell method for microscale nitrate measurement with the Griess reaction in culture media. *J Microbiol Methods* 2000; 41: 23-33.
21. Green LC, Wagner DA, Glogowski J, Skipper PL, Wisnok JS, Tannenbaum SR: Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. *Anal Biochem* 1982; 126: 131-138.
22. Koster R, Anderson M, De Debeer EJ: Acetic acid for analgesic screening. *Federation Proceeding* 1959; 18: 412-418.
23. Gomes NM, Rezende CM, Fontes SP, Matheus ME, Fernandes PD: Antinociceptive activity of Amazonian Copaíba oils. *J Ethnopharmacol* 2007; 109: 486-492.
24. Adzu B, Amos S, Kapu SD, Gamaniel KS: Anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of *Sphaeranthus senegalensis*. *J Ethnopharmacol* 2003; 84: 169-173.
25. Guzzo LS, Saúde-Guimarães DAS, Silva ACA, Lombardi JA, Guimarães HN, Grabe-Guimarães A: Antinociceptive and anti-inflammatory activities of ethanolic extracts of *Lychnophora* species. *J Ethnopharmacol* 2008; 116: 120-124.
26. Posadas I, Bucci M, Roviezzo F, Rossi A, Parente L, Sautebin L, Cirino G: Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. *Br J Pharmacol* 2004; 142: 331-338.
27. Morris CJ: Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. In: *Methods in Molecular Biology*, Humana Press Inc., Totowa, 2003, 115-121.
28. Sedgwick AD, Lees P: A comparison of air pouch, sponge and pleurisy models of acute carrageenan inflammation in the rat. *Agents Actions* 1986; 18 (3-4): 439-446.
29. Salvemini D, Misko TP, Seibert K, Masferrer JL, Currie MG, Needleman P: Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proc Natl Acad of Sci USA* 1993; 90: 7240- 7244.
30. Salvemini D, Zhi-qiang W, Wyatt PS, Bourdon DM, Marino MH, Manning PT, Currie MG: Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. *Br J Pharmacol* 1996; 118: 829- 838.
31. Marinho DG, Alviano DS, Matheus ME, Alviano CS, Fernandes PD: The latex obtained from *Hancornia speciosa* Gomes possesses anti-inflammatory activity, *J Ethnopharmacol* 2011; 135: 530-537.

32. Le Bars D, Gozariu M, Cadden SW: Animals models of nociception. *Pharmacol Rev* 2001; 53 (4): 597-652.
33. Hunskaar S, Hole K: The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain* 1987; 30 (1): 103-114.
34. Tjolsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K: The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 1992; 51 (1): 5-17.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse estudo permitem concluir que:

- O EACI não foi significativamente citotóxico frente às linhagens tumorais de NCI-H292, HT-29, HEP-2 e K562;
- A administração oral do EACI na dose de 2000 mg/kg não mostrou ser tóxica, pois não alterou os parâmetros fisiológicos, comportamentais e hematológicos;
- O EACI apresentou atividade antiedematogênica na dose de 400mg/kg, inibindo o aumento do edema de pata de forma significativa na primeira hora após a injeção de carragenina;
- O EACI apresentou atividade anti-inflamatória significativa nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg, reduzindo a migração de polimorfonucleares para o sítio da inflamação;
- O EACI não reduziu os níveis de TNF- e IL-6 no exsudato do bolsão de ar, porém reduziu drasticamente os níveis de óxido nítrico;
- A administração oral do EACI promoveu antinocicepção no modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético;
- No modelo de formalina, o extrato atenuou a resposta na fase de dor neurogênica e na fase de dor inflamatória;
- No modelo de placa foram observados aumento no tempo de permanência na placa quente, sugerindo que o EACI possua efeito analgésico central.

ANEXO A

Resultados complementares

1 Materiais e métodos

1.1 Material botânico

A entrecasca de *C. icaco* foi coletada no município de Japaratinga, Alagoas (Brasil) no período de abril de 2009. Uma exsicata encontra-se depositada no herbário do Instituto de Pesquisa Agropecuária de Pernambuco (Pernambuco, Brasil), sob o nº 83131.

1.2 Obtenção do extrato aquoso da entrecasca de *C. icaco*

A entrecasca foi seca em estufa a 37 °C e trituradas para a preparação do extrato aquoso de *C. icaco* (EACI). A decocção foi preparada na proporção de 10g de pó para 50 mL de água, aquecido à temperatura de 100 °C durante 30 minutos. O decocto foi filtrado, rotaevaporado, liofilizado e posteriormente armazenado a -20 °C até o momento do uso. No momento do uso, o extrato seco obtido foi suspenso em salina (0,9% de NaCl).

1.3 Cultura de células

As células provenientes de tumores humanos foram obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro. As linhagens de tumores humanos NCI-H292 (Carcinoma de pulmão humano), HT-29 (Carcinoma de colón humano) e HEp-2 (Carcinoma de laringe) foram mantidas em DMEM (Sigma) e a linhagem celular K562 (Leucemia mielóide crônica) foi mantida em RPMI 1640 (Sigma). Ambos meios foram suplementado com 10% de soro bovino fetal, 1% de solução de antibiótico (penicilina 1000 UI/mL contendo estreptomicina 250 mg/mL e 1% de L-glutamina 200 mM) As culturas foram incubada a 37 °C em estufa com atmosfera úmida enriquecida com 5% de CO₂.

1.4 Avaliação de atividade citotóxica

Para determinação da citotoxicidade, uma suspensão de 10⁵ células/mL foi preparada em meio adaptado para cada linhagem celular. A suspensão foi distribuída em placas de 96 poços e incubada a 37 °C em estufa com atmosfera úmida enriquecida com 5% de CO₂. Após 24 h, 22µL do extrato foi adicionado aos as placas obtendo a concentração final de 50 µg/mL. Após 72 h foi adicionado em cada poço 25 µL de Brometo-3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-5-difeniltetrazólio (MTT). As placas foram incubadas por 2 horas em estufa (37 °C). Ao final desse período, o meio de cultura foi aspirado juntamente com o excesso de MTT. Em seguida

foram adicionados 100µL de dimetilsulfóxido (DMSO) a cada poço para a dissolução dos cristais de formazan (ALLEY et al., 1998). Este ensaio é baseado na capacidade de células vivas em reduzir o sal tetrazólio (cor amarela), em formazan (violeta). A leitura óptica a 450 nm foi feita em leitor automático de placas. A inibição do crescimento celular foi calculada em relação ao grupo controle não tratado, considerado como 100% de células viáveis. O experimento foi realizado em quadruplicata.

2. Resultados

2.1. Obtenção do extrato aquoso da entrecasca de *C. icaco*

O extrato após ser liofilizado apresentou rendimento de 3,9% (15,433g).

2.2. Avaliação da atividade citotóxica

A citotoxicidade de EACI (50 µg/mL) foi avaliada em quatro linhagens tumorais. O ensaio revelou que EACI inibiu o crescimento celular das linhagens tumorais NCI-H292, HT-29, HEp-2 e K562 em 21,7%, 2,2%, 12,2% e 34,9%, respectivamente. O EACI não mostrou atividade citotóxica significativa para todas as linhagens testadas.

Referencias

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

ANEXO B

REGRAS DO PERIÓDICO JOURNAL OF MEDICINAL FOOD

Full Communications should be presented in the standard format described below, and should not exceed 3,000 words (excluding references, tables, figures, legends, acknowledgements, and disclosures).

Short Communications are intended for the presentation of brief observations that do not warrant a full-length text, but also are not preliminary results. Word limit is 1,500. Include an abstract; do not use section headings in the body of the text; report methods, results, and discussion in a single section. Citations are identical in style to those of full-length articles, but appropriately abbreviated in number.

Technical Notes are brief scientific observations and methods (preparative, analytical, etc.). Letters to the Editor can be on any issue relevant to the field. They must be brief (one or two journal pages) and appropriately documented by data. Letters may be addressed to the Editor-in Chief or Associate Editors, and may be subject to review.

Reviews and Perspectives may be solicited by the Editors or submitted independently. Reviews are summaries of developments in medicinal food and nutrition. Perspectives are more representative of an opinion about an area of the field or a direction of research. Both may be subject to peer-review. Reviews and Perspectives should not exceed 4,000 words (excluding references, tables, figures, legends, acknowledgments, and disclosures.).

Conference Proceedings: Authors wishing to submit conference/workshop summaries should contact the editorial office well in advance of the event to discuss publication potential and obtain guidance on preparation.

Manuscript Submission and Copyright Agreement Form

The Copyright Agreement form (available at www.liebertpub.com/media/content/transfer_of_copyright.pdf) should be submitted once your article has been accepted for publication. Manuscripts cannot be published without this form. The corresponding author is responsible for obtaining signatures of coauthors. Authors not permitted to release copyright must still return the form signed under the statement of the reason for not releasing the copyright. Upon acceptance of your article, please fax the Copyright Agreement form to 914-740-2108.

IMPORTANT: Please do NOT upload a single PDF file containing all text, image, and table files. Upload individual files of all manuscript material. Once all individual files are uploaded on to Manuscript Central, the system will automatically create a single PDF proof for you and for the peer-review process.

PREPARATION OF MANUSCRIPT

Prepare the entire manuscript, including figure legends, in Microsoft Word. The manuscript should be double spaced (6mm minimum), with ample margins (minimum 1”) on all sides.

The title page should include the authors' names and affiliations, a running title of about 45 characters (including spaces), and the full contact information for the corresponding author (i.e., mailing and/or street address, telephone and fax numbers, and E-mail address.) The second page must consist of an abstract of not more than 250 words, which should be self-explanatory without reference to the text. The SI system should be used for all scientific and laboratory data. Full communications are structured using the following headings: abstract, introduction, materials and methods, results, discussion, acknowledgments, and references. Number pages consecutively. At the end of the manuscript, give the name, mailing address, and E-mail of the individual to whom correspondence should be directed.

The authors may suggest suitable referees during the submission process, but must provide accurate E-mail addresses for all such individuals.

Key Words. Three to 10 key words or phrases must be provided after the abstract to facilitate computer searches. Key words should not repeat words or phrases used in the title. They should be listed alphabetically.

Acknowledgments. Collaborations, sources of research funds, and other acknowledgments should be listed in a separate section at the end of the text ahead of the REFERENCES section.

Disclosure Statement. Immediately following the Acknowledgments section, include a section entitled "Author Disclosure Statement." In this portion of the manuscript, authors must disclose any commercial associations that might create a conflict of interest in connection with submitted manuscripts. This statement should include appropriate information for EACH author, thereby representing that competing financial interests of all authors have been appropriately disclosed according to the policy of the Journal. It is important that all conflicts of interest, whether they are actual or potential, be disclosed. This information will remain confidential while the manuscript is being reviewed and will not influence the editorial decision. Please see the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals at www.icmje.org/index.html#conflicts for further guidance. If no conflicts exist, the authors must state "No competing financial interests exist."

Ethical Considerations in the Conduct and Reporting of Research: Protection of Human Subjects and Animals in Research*

When reporting experiments on human subjects, authors should indicate whether the procedures followed were in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human experimentation (institutional and national) and with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 2008. If doubt exists whether the research was conducted in accordance with the Helsinki Declaration, the authors must explain the rationale for their approach and demonstrate that the institutional review body explicitly approved the doubtful aspects of the study. When reporting experiments on animals, authors should indicate whether the institutional and national guide for the care and use of laboratory animals was followed.

*This portion of *Journal of Medicinal Food's* Instructions for Authors has been quoted directly from the Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals website. For more information, visit www.icmje.org/ethical_6protection.html

References. Cite all references within the text by a superscript Arabic number. Number references in the order that they appear in the text. Double-space the references and triple-space between each listing. When there are more than six authors, it is acceptable to list the first three followed by “et al.”, but this must be applied consistently throughout the reference section. Use the following styles as appropriate:

Journals: (1) surname of author(s), initials, (2) article title, (3) journal, (4) year of publication, (5) volume number, and (6) first and last page of citation.

Journal Example:

Lappé MA, Bailey EB, Childress C, Setchell KDR: Alterations in clinically important phytoestrogens in genetically modified, herbicide-tolerant soybeans. *J Med Food* 1999;1:241–245.

Books: (1) surname of author(s), initials, (2) chapter title, (3) title of book, (4) editors of book (if applicable), (5) edition of book (if applicable), (6) publisher, (7) city of publication, (8) year of publication, and (9) first and last page reference.

Book example:

Karp A: On the current understanding of somaclonal variation. In: *Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology*, Vol. 2. (Mifflin BJ, ed.) Oxford University Press, Oxford, 1990, pp. 199–234.

Patents: (1) surname(s) of author(s), initials, (2) patent title, (3) country where patent issued, (4) patent number, (5) month, day, and year of issuance.

Patent Example:

Hendler SS, Sanchez R: Tocopherol-based antiviral agents and method of using same. U.S. Patent 5,114,957. May 19, 1992.

Online Journals: Online journals are cited using the same format as print journals. Add “(Online)” after the journal name. Include inclusive pagination or other identifying information such as DOI (Digital Object Identifier) number.

Online Journal Example:

Faller P, Goussias C, Rutherford AW, Un S: Resolving intermediates in biological proton-coupled electron transfer: A tyrosyl radical prior to proton movement. *Proc Natl Acad Sci USA* (Online) published July 10, 2003, 10.1073/pnas 1530926100.

URL (Web Page): (1) Author, if available. (2) Title of page as listed on the site. (3) Address of page. (4) Date accessed.

URL (Web Page) Example:

Hsu, D: Chemicool Periodic Table. www.chemicool.com (accessed Jan 1999).

Unpublished References: When data from an unpublished source are presented, supply complete information, e.g., researcher's name and location. If work is in press, give the journal in which it is to be published or the publisher. Include "In press" in place of publication date.

Tables. Type each table with its title in a separate file. Use Arabic numerals to number tables. Each table must stand alone (i.e., contain all necessary information in the caption) and the table itself must be understood independently of the text. Details of experimental conditions should be included in the table footnotes. Table legends and footnotes should be double-spaced. Information that appears in the text should not be repeated in tables, and tables should not contain data that can be given in the text in one or two sentences.

Illustrations. Prepare a separate list of figure legends, double-spaced, at the end of the manuscript. Magnifications should be included when appropriate.

Color publication of figures is encouraged, but the cost for color printing must be subsidized by the author(s). Authors will be charged at the rate of \$800.00 USD for **each printed page** that includes color. Please consider these costs when preparing your manuscript for submission.

Alternatively, figures may be published in color in the online version of the journal, and black and white in the print version, with no additional publication charges.

Please follow these guidelines for submitting figures:

- Do **NOT** embed art files into a Word or PDF document.
- Line illustrations should be submitted at 900 dpi.
- Halftones and color should be submitted at a minimum of 300 dpi.
- Save as either TIFF or EPS files.
- Color art must be saved as CYMK—**not RGB**.
- Black and White art must be submitted as grayscale—**not RGB**.
- Do **NOT** submit PowerPoint, PDF, Bitmap, or Excel files.

Please name your artwork files with the submitting authors name i.e. SmithFig1.tif, SmithTable2.tif etc. **Authors who do not follow these guidelines may have their submission returned to them without being reviewed.**

Converting Word or Excel files: Perhaps the best and easiest way to **convert Word or Excel files** into a format which is suitable for print is to scan them using the below guidelines:

- All files should be scanned at 100% size.
- 300 dpi
- Final color mode: cmyk
- save file as: .tif or .eps

If you need directions on how to **convert a PowerPoint slide** to acceptable format go to www.liebertpub.com/MEDIA/pdf/ppconvert.pdf

Permissions

The author must obtain permission to reproduce figures, tables, and text from previously published material. Written permission must be obtained from the original copyright holder (generally the publisher, not the author or editor) of the journal or book concerned. An appropriate credit line should be included in the figure legend or table footnote, and full publication information should be included in the reference list. Written permission must be obtained from the author of any unpublished material cited from other laboratories, and should accompany the manuscript. All permissions listings must be shown in manuscript—they cannot be entered on proofs.

FEES AND REPRINTS

To help defray the cost of printing, the publisher requests that charges of \$80 per printed page be paid by all authors who have funds available from research grants or from their institutions. (Editorial Board members will be charged a special price of \$55 per printed page.) However, the ability to pay page charges is not a prerequisite for publication.

Reprints may be ordered by following the special instructions that will accompany page proofs, and should be ordered at the time the corresponding author returns the corrected page proofs to the Publisher. Reprints ordered after an issue is printed will be charged at a substantially higher rate.