

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS  
UNIFAL-MG

**Lidiane Orlandi**

Efeito antinociceptivo, anti-inflamatório e antidiarreico do  
extrato liofilizado da casca do caule de *Byrsonima intermedia*  
A. Juss (murici-pequeno)

Alfenas/MG

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS  
UNIFAL-MG

**Lidiane Orlandi**

Efeito antinociceptivo, anti-inflamatório e antidiarreico do  
extrato liofilizado da casca do caule de *Byrsonima intermedia*  
A. Juss (murici-pequeno)

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do programa em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Obtenção de insumos farmacêuticos e avaliação da atividade biológica.

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Alves da Silva

Alfenas/MG

2010

Orlandi, Lidiane.

Efeito antinociceptivo, anti-inflamatório e antidiarreico do extrato liofilizado da casca do caule de *Byrsonima intermedia* A. Juss (murici- pequeno) / Lidiane Orlandi. - Alfenas, 2011.

77 f. -

Orientador: Geraldo Alves da Silva.

Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas) -  
Universidade Federal de Alfenas.

Bibliografia.

1. Malpighiaceae - fisiologia. 2. Analgésicos. 3. Antiinflamatórios.  
4. Antidiarréicos. I. Silva, Geraldo Alves da. II. Título.

CDD: 615.5

**Lidiane Orlandi**

Efeito antinociceptivo, anti-inflamatório e antidiarreico do extrato liofilizado da casca do caule de *Byrsonima intermedia*

A. Juss (murici-pequeno)

A Banca examinadora, abaixo-assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Obtenção de insumos farmacêuticos e avaliação da atividade biológica.

Aprovada em: 03/02/2011

**Profa.:** Edna Tomiko Myiake Kato

**Instituição:** Universidade de São Paulo **Assinatura:** \_\_\_\_\_

**Profa.:** Tati Ishikawa

**Instituição:** Universidade Federal de Alfenas **Assinatura:** \_\_\_\_\_

**Prof.:** Geraldo Alves da Silva

**Instituição:** Universidade Federal de Alfenas **Assinatura:** \_\_\_\_\_

Ao meu pai César Augusto Orlandi (*in memoriam*),  
minha mãe Rita, e minha mãzinha Marina  
pela dedicação incondicional.

Ao Professor Alexandre Giusti-Paiva  
e Fabiana C. Vilela  
por todos os ensinamentos e pelo exemplo.

## AGRADECIMENTOS

A Deus por iluminar meu caminho e me abençoar por todas as conquistas e obstáculos vencidos.

Ao meu pai César Augusto Orlandi (*in memoriam*) por me guiar e não me desamparar quando estou sozinha.

A minha mãe, Rita P. Orlandi e minha mãezinha, Marina Orlandi, por acreditarem em mim, me darem seu amor e dedicação incondicional nestes últimos anos em que vivemos somente por nós.

A Fabiana Cardoso Vilela, minha melhor amiga, companheira, irmã, mãe, filha, parceira, a melhor irmã do mundo que eu escolhi pra mim e que faço todo esforço para merecer seu reconhecimento e respeito, muito obrigada por tudo!

Ao Professor Alexandre Giusti-Paiva, pelo exemplo a ser seguido, pelos ensinamentos e pela amizade.

Ao Professor Geraldo Alves da Silva pela oportunidade que me foi dada e pela confiança.

Ao Professor Renato Paiva pelo projeto aprovado e pelo apoio nas coletas.

Ao Professor Sandro Barbosa e toda sua equipe pela oportunidade, pela confiança e pelas portas abertas do seu laboratório para que eu pudesse executar uma grande parte do meu projeto.

Aos alunos de mestrado Laiane Corsini Rocha e Luiz Carlos Almeida Rodrigues, pelas noites divertidas, pela parceria muito feliz que tivemos no nosso trabalho.

Aos alunos Michael Brian Santiago, Gabriel de O. I. Moraes e Danielle Ferreira Dias por toda ajuda na execução de grande parte dessa dissertação.

Aos meus familiares por me apoiarem e por darem toda força nestes últimos anos.

A todos os meus amigos de Lavras e Alfenas que fizeram parte da minha formação pessoal e profissional.

A melhor turma do mundo por tudo que vivemos e que ainda viveremos nessa jornada acadêmica.

## RESUMO

O chá das cascas do caule de *Byrsonima intermedia* A. Juss. é utilizado popularmente no tratamento de diarreias e disenterias. Suas cascas contêm polifenóis a que podem ser atribuídas atividades antimicrobiana, anti-hemorrágica, antidiarreica e anti-inflamatória. Neste estudo, o extrato liofilizado de cascas de *Byrsonima intermedia* foi caracterizado através de ensaios químicos para avaliação da presença de metabólitos secundários, quantificação de seu conteúdo fenólico e flavonoídico e da determinação do perfil cromatográfico por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foram avaliados os efeitos antinociceptivo, anti-inflamatório e antidiarreico do extrato liofilizado de cascas de *Byrsonima intermedia* (ELBi), para tornar mais segura sua utilização como planta medicinal. Os testes de formalina, placa quente e filamentos de von Frey foram utilizados para avaliar a atividade antinociceptiva em camundongos. Para avaliar o efeito anti-inflamatório, foram realizados os testes de granuloma, peritonite induzida por lipopolissacarídeo (LPS) e edema de pata, induzido por carragenina, em ratos. Para a avaliação do efeito antidiarreico, o extrato foi testado “in vivo”, pelo teste de trânsito intestinal e “in vitro”, pelo teste de banho isolado de órgãos. O extrato liofilizado de cascas de *Byrsonima intermedia* revelou a presença de 37,3 mg de ácido gálico/g de amostra e 6,3 mg de quercetina/g de amostra. No teste da formalina, o extrato mostrou efeito antinociceptivo significativo, quando comparado com o controle, nas doses de 100 e 300 mg/kg, na primeira fase e nas três doses de 30-300 mg/kg, na segunda fase. No teste da placa quente, o ELBi, em doses de 30-300 mg/kg, aumentou o tempo de latência em comparação ao grupo controle, assim como a morfina, de forma significativa. No teste com filamentos de Von Frey, observou-se diminuição significativa no limiar da retirada da pata nas três doses de 30-300 mg/kg de ELBi, assim como no tratamento com indometacina 10 mg/kg. Na avaliação do efeito anti-inflamatório, o extrato, nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg, diminuiu o peso do granuloma em 37,9%; 36,9% e 45,4%, respectivamente, no teste de granuloma. No teste de peritonite, os valores de inibição no recrutamento de leucócitos foram de 21,4; 32,3 e 40,12%, para extrato nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg, respectivamente. Já para o edema de pata induzido por carragenina, os valores de inibição foram de 11,8; 31,06 e 25,2%, para doses de 30, 100 e 300 mg/kg de extrato, respectivamente. Para a avaliação do efeito antidiarreico no teste de trânsito intestinal, foi observado que o comprimento médio percorrido pelo carvão, quando os animais foram pré-tratados com ELBi na dose de 300 mg/kg, diminuiu significativamente quando comparado ao controle. Nos estudos “in vitro”, a contratilidade do tecido foi diminuída significativamente diante de

mediadores como acetilcolina,  $\text{Ca}^{+2}$  e  $\text{K}^+$ . Diante dos resultados, podemos inferir que o extrato aquoso de cascas de *Byrsonima intermedia* exerce efeito antinociceptivo, anti-inflamatório e antidiarreico.

Palavras-chave: *Byrsonima intermedia*. Antinociceptivo. Anti-inflamatório. Antidiarreico.



## ABSTRACT

Tea made from the stem bark of *Byrsonima intermedia* A. Juss. is popularly used to treat diarrhea and dysentery. Their shells contain polyphenols which can be attributed to antimicrobial, anti-hemorrhagic, anti-diarrheal and anti-inflammatory. In this study the extract lyophilized bark of *Byrsonima intermedia* was characterized by chemical tests to assess the presence of secondary metabolites, quantification of phenolic and flavonoid content and chromatographic profiles by high performance liquid chromatography (HPLC) were evaluated antinociceptive, anti-inflammatory and antidiarrheal effects lyophilized extract of bark of *Byrsonima intermedia* (ELBi) to make their use safer as a medicinal plant. The formalin test, hot plate and von Frey filaments were used to evaluate the antinociceptive activity in mice. To evaluate the anti-inflammatory tests were conducted granuloma, peritonitis induced by LPS (lipopolysaccharide) and paw edema induced by carrageenin in rats. To evaluate the antidiarrheal effect of the extract was tested in vivo, the test of intestinal transit and in vitro, the isolated organ bath. The aqueous extract of bark of *Byrsonima intermedia* revealed the presence of 37.3 mg gallic acid/g sample and 6.3 mg quercetin/g of sample. In the formalin test the extract showed a significant antinociceptive effect when compared with the control at doses of 100 and 300 mg/kg in the first phase, and three doses 30-300 mg/kg in the second phase. In the hot plate test ELBi at doses of 30-300 mg/kg increased the latency time compared to the control group, as well as morphine significantly. In testing with von Frey filaments was observed a significant decrease in paw withdrawal threshold of the three doses 30-300 mg/kg ELBi, as well as treatment with indomethacin 10 mg/kg. In the evaluation of anti-inflammatory extract at doses of 30, 100 and 300 mg/kg reduced the weight of granuloma in 37.9%, 36.9% and 45.4% respectively in the granuloma test. In the test of peritonitis inhibition values in the recruitment of leukocytes were 21.4, 32.3 and 40.12% for the extract at doses of 30, 100 and 300 mg/kg, respectively. As for the paw edema induced by carrageenin inhibition values were 11.8, 31.6 and 25.2% for doses of 30, 100 and 300 mg/kg of extract, respectively. To evaluate the antidiarrheal effect in the test of intestinal transit was observed that the average length traveled by the charcoal when the animals were pretreated with ELBi at a dose of 300 mg/kg significantly decreased when compared with control. In studies in vitro contractility of the tissue was decreased significantly in front of mediators such as acetylcholine,  $Ca^{+2}$  and  $K^{+}$ . With the results we can infer that the aqueous extract of bark of *Byrsonima intermedia* exerts antinociceptive, anti-inflammatory and antidiarrheal.

Keywords: *Byrsonima intermedia*. Antinociceptive. Antinflammatory. Antidiarrhoeal.

## LISTAS DE FIGURAS

FIGURA 1-Ramo florido de murici-pequeno - <i>Byrsonima intermedia</i> A. Juss.....	23
FIGURA 2- Compostos isolados do extrato metanólico de folhas de <i>Byrsonima intermedia</i> .	24
FIGURA 3- Triagem fitoquímica de antraquinonas no extrato liofilizado de <i>Byrsonima intermedia</i> A. Juss .....	41
FIGURA 4- Triagem fitoquímica de taninos no extrato liofilizado de <i>Byrsonima intermedia</i> A. Juss.....	42
FIGURA 5- Triagem fitoquímica de alcaloides no extrato liofilizado de <i>Byrsonima intermedia</i> A. Juss.....	42
FIGURA 6- Triagem fitoquímica de saponinas no extrato liofilizado de <i>Byrsonima intermedia</i> A. Juss.....	43
FIGURA 7- Triagem fitoquímica de esteroides e triterpenos pentacíclicos no extrato liofilizado de <i>Byrsonima intermedia</i> A. Juss.....	43
FIGURA 8- Triagem fitoquímica de flavonoides no extrato liofilizado de <i>Byrsonima intermedia</i> A. Juss.. ..	44
FIGURA 9- Perfil cromatográfico do extrato liofilizado de cascas de <i>Byrsonima intermedia</i> realizado através de cromatografia líquida de alta eficiência, monitorado em 272nm .....	45
FIGURA 10- Efeito do extrato liofilizado de cascas de <i>Byrsonima intermedia</i> administrado por via oral sobre a lambida da pata induzida pela formalina em camundongos.....	47
FIGURA 11- ELBi administrado por via oral no teste da placa quente em camundongos.....	48
FIGURA 12- Efeito da administração ELBi ou Indometacina em hipernocicepção induzida pela injeção intraplantar de carragenina em camudongos detectada pelo Von Frey eletrônico... ..	49
FIGURA 13- Efeito da administração ELBi ou dexametasona administrado por via oral sobre a formação do tecido granulomatoso.....	50
FIGURA 14- Efeito da administração de ELBi ou indometacina administrado por via oral em recrutamento de leucócitos induzido por lipopolissacarídeo em cavidade intraperitoneal de ratos .....	50
FIGURA 15- Efeito da administração do ELBi ou indometacina em edema de pata em ratos induzido pela injeção intraplantar de carragenina... ..	51
FIGURA 16- Efeito da administração do ELBi ou cloridrato de loperamida (2 mg/kg) no índice peristáltico em ratos .....	52

FIGURA 17- Efeito do ELBi e Atropina $10^{-8}$ M sobre a resposta contrátil induzida por acetilcolina em íleo de ratos .....	53
FIGURA 18- Efeito do ELBi e Nifedipina $10^{-6}$ M sobre a resposta contrátil induzida por $\text{CaCl}_2$ em íleo de ratos.....	54
FIGURA 19- Efeito da Glibenclamida sobre a resposta contrátil induzida por KCl em íleo de ratos.....	55
FIGURA 20- Efeito do ELBi sobre a resposta contrátil induzida por KCl em íleo de ratos ..	55

## LISTAS DE TABELAS

TABELA 1- Tempo de retenção e máximo de absorção no UV do extrato liofilizado de cascas de <i>Byrsonima intermedia</i> monitorado por cromatografia líquida de alta eficiência .....	46
TABELA 2- Efeito do extrato liofilizado de cascas de <i>Byrsonima intermedia</i> e Atropina $10^{-8}$ M sobre a resposta contrátil induzida por acetilcolina em íleo de ratos.....	53
TABELA 3- Efeito do extrato liofilizado de cascas de <i>Byrsonima intermedia</i> e Nifedipina $10^{-6}$ M sobre a resposta contrátil induzida por $\text{CaCl}_2$ em íleo de ratos.....	54

## LISTAS DE ABREVIATURAS

- AAS-** Ácido acetil salicílico
- Ach-** acetilcolina
- AINES-** anti-inflamatórios não esteroidais
- AlCl<sub>3</sub>-** cloreto de alumínio
- ANVISA-** agência nacional de vigilância sanitária
- Ca<sup>2+</sup>-** cálcio
- CaCl<sub>2</sub>-** cloreto de cálcio
- CH<sub>3</sub>COOK-** acetato de potássio
- CHCl<sub>3</sub>-** clorofórmio
- CLAE-** cromatografia líquida de alta eficiência
- COX-** ciclo-oxigenase
- ELBi-** extrato liofilizado de *Byrsonima intermedia*
- FeCl<sub>3</sub>-** cloreto férrico
- HCl-** ácido clorídrico
- IASP-** *International Association for the Study of Pain*
- K<sup>+</sup>-** potássio
- KCl-** cloreto de potássio
- LPS-** lipopolissacarídeo
- Mg<sup>0</sup>-**magnésio
- Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-** carbonato de sódio
- OMS-** Organização Mundial de Saúde
- PBS-** tampão fosfato
- SNC-** sistema nervoso central
- SNP-** sistema nervoso periférico
- TNF  $\alpha$ -** fator de necrose anti-tumoral  $\alpha$
- TRO-** terapia de reidratação oral
- UV-** ultravioleta

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	17
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	19
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	20
3.1	OBJETIVOS GERAIS .....	20
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	20
<b>4</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b> .....	21
4.1	PLANTAS MEDICINAIS .....	21
4.2	FAMÍLIA MALPHIGIACEAE E GÊNERO BYRSONIMA .....	22
4.3	<i>Byrsonima intermedia</i> A. Juss. ....	24
4.4	DOR E NOCICEPÇÃO .....	25
4.5	INFLAMAÇÃO .....	28
4.6	DIARREIA .....	30
<b>5</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	33
5.1	COLETA E IDENTIFICAÇÃO .....	33
5.2	OBTENÇÃO DO EXTRATO LIOFILIZADO DA CASCA .....	33
5.3	CARACTERIZAÇÃO QUALITATIVA DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS .....	33
5.3.1	<i>ANTRAQUINONAS</i> .....	34
5.3.2	<i>TANINOS</i> .....	34
5.3.2.1	Reações com proteínas (gelatina): .....	34
5.3.2.2	Reações com sais de ferro: .....	34
5.3.3	<i>ALCALOIDES</i> .....	34
5.3.4	<i>SAPONINAS</i> .....	34
5.3.5	<i>ESTEROIDES E TRITERPENOS PENTACÍCLICOS</i> .....	34
5.3.6	<i>FLAVONOIDES</i> .....	35
5.3.6.1	Teste Shinoda: .....	35

5.4	DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE COMPOSTOS FENÓLICOS.....	35
5.5	DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE FLAVONOIDES .....	35
5.6	CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO LIOFILIZADO DE CASCA DO CAULE DE <i>B. intermedia</i> POR CLAE (CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUÇÃO) .....	36
5.7	ESTUDO FARMACOLÓGICO .....	36
5.7.1	<i>AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA</i> .....	37
5.7.1.1	Teste da formalina .....	37
5.7.1.2	Teste da placa quente.....	37
5.7.1.3	Teste de von Frey eletrônico .....	37
5.7.1.4	Grupos experimentais .....	38
5.7.2	<i>AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA</i> .....	38
5.7.2.1	Teste do granuloma – indução do tecido granulomatoso .....	38
5.7.2.2	Teste de peritonite .....	38
5.7.2.3	Teste de edema de pata induzido por carragenina.....	39
5.7.2.4	Grupos experimentais .....	39
5.7.3	<i>ATIVIDADE ANTIDIARREICA IN VIVO E IN VITRO</i> .....	39
5.7.3.1	Avaliação <i>in vivo</i> .....	39
5.7.3.1.1	<i>Teste do trânsito intestinal</i> .....	39
5.7.3.2	Avaliação <i>in vitro</i> .....	40
5.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	41
<b>6</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	42
6.1	CARACTERIZAÇÃO QUALITATIVA DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS.....	42
6.1.1	<i>ANTRAQUINONAS</i> .....	42
6.1.2	<i>TANINOS</i> .....	42
6.1.2.1	Reações com proteínas (gelatina):.....	42
6.1.2.2	Reações com sais de ferro: .....	42
6.1.3	<i>ALCALOIDES</i> .....	43



6.1.4	<i>SAPONINAS</i> .....	44
6.1.5	<i>ESTEROIDES E TRITERPENOS PENTACÍCLICOS</i> .....	44
6.1.6	<i>FLAVONOIDES</i> .....	45
6.1.6.1	Teste Shinoda: .....	45
6.2	DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE COMPOSTOS FENÓLICOS E FLAVONOIDES .....	45
6.3	CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO LIOFILIZADO DE CASCA DO CAULE DE <i>B. intermedia</i> POR CLAE (CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUÇÃO) .....	45
6.4	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA.....	47
6.4.1	<i>TESTE DA FORMALINA</i> .....	47
6.4.2	<i>TESTE DA PLACA QUENTE</i> .....	49
6.4.3	<i>TESTE DE VON FREY ELETRÔNICO</i> .....	50
6.5	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA.....	50
6.5.1	<i>TESTE DO GRANULOMA – INDUÇÃO DO TECIDO GRANULOMATOSO</i> .....	50
6.5.2	<i>TESTE DE PERITONITE</i> .....	51
6.5.3	<i>TESTE DE EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA</i> .....	52
6.6	ATIVIDADE ANTIDIARREICA <i>IN VIVO</i> E <i>IN VITRO</i> .....	52
6.6.1	<i>AVALIAÇÃO IN VIVO</i> .....	52
6.6.1.1	Teste do trânsito intestinal.....	52
6.6.2	<i>AVALIAÇÃO IN VITRO</i> .....	53
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>57</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>63</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>64</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Diversas espécies de plantas medicinais estão em uso em todo o mundo, para auxiliar ou substituir terapias convencionais no tratamento de várias enfermidades e sua composição química e atividade farmacológica diferem de espécie para espécie (KIM et al., 2010). Devido ao uso de plantas medicinais sem o conhecimento dos compostos ativos ou seus potenciais efeitos farmacológicos, estudos para fornecer precisa avaliação de sua qualidade eficácia e segurança têm sido necessários (CALIXTO et al., 2000).

Muitos compostos químicos presentes em diversas plantas possuem propriedades analgésicas. Como exemplos podem ser citados os alcaloides de *Papaver somniferum* L. (Papaveraceae), os canabinoides da *Cannabis sativa* L. (Cannabaceae), a salicina e o ácido salicílico presentes em *Salix* spp L. (Salicaceae) e inúmeros alcaloides, terpenoides, esteroides, flavonoides, xantonas, taninos, lactonas e glicosídeos (CALIXTO et al., 2000). Diante da simplicidade da sensação da dor e da complexidade em seu mecanismo, muitas pesquisas etnofarmacológicas de plantas medicinais para o alívio da dor são vistas como estratégia produtiva e lógica na procura por novos fármacos analgésicos (ELISABETSKY et al., 1995).

Nossa compreensão dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos no processo de várias doenças tem aumentado drasticamente e vem permitindo a descoberta de muitos alvos promissores para o desenvolvimento de novos fármacos utilizados nos tratamentos dessas doenças, inclusive no tratamento de doenças inflamatórias (GALLIN et al., 1999; PATWARDHAN; GAUTAM, 2005). Dentre vários exemplos de plantas com efeito anti-inflamatório, citam-se *Astronium urundeuva* (Allemão) Engl. (Anacardiaceae) (aroeira-do-sertão), *Hybanthus ipecacuanha* (L.) Baill. (Violaceae) (ipecacuanha), *Tabebuia serratifolia* (Vahl) G. Nicholson (Bignoniaceae) (Pau-d'arcobranco), que possuem compostos ativos naturais que lhes conferem esse efeito, como taninos, flavonoides e cumarinas (LEAL et al., 2000; VIANA et al., 2003).

Nos países em desenvolvimento, o acesso da população à medicina moderna é muito baixo, por isso ela depende, basicamente, de plantas medicinais no cuidado primário à saúde. Isso inclui doenças inflamatórias e também diarreia (PETROVICK et al., 1999).

A diarreia pode ser considerada como uma ameaça global que pode culminar na mortalidade e morbidade, devido à perda de líquidos e eletrólitos do corpo. Os fatores plausíveis que implicam induzir diarreia podem variar de infectantes para os fatores imunológicos e nutritivos (OMS, 1990). Nos países em desenvolvimento, estimativas

apontam que cerca de dois milhões de crianças, menores de cinco anos, vão a óbito devido à diarreia, representando, ainda, a segunda maior causa de morte (NIEHAUS et al., 2002). Embora os suplementos nutritivos tenham provado ser benéficos em casos de diarreia aguda, o tratamento para diarreia crônica ainda permanece incerto e, muitas vezes, pode culminar em sérias repercussões, quando não tratada. Estudos a fim de se procurar tratamentos baseados em produtos naturais são importantes, considerando que efeitos adversos com uso de fármacos para essa disfunção são bem conhecidos (BANJI et al., 2010).

O murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.), um arbusto do Cerrado pertencente à família Malpighiaceae, tem sido utilizado na medicina popular como adstringente, antidiarreico, antimicrobiano, antifúngico e em infecções de pele (RODRIGUES; CARVALHO, 2001). O estudo desta espécie, a partir de seu emprego pelas comunidades, pode fornecer informações úteis para a elaboração de estudos farmacológicos, fitoquímicos e agrônômicos sobre a mesma, com grande economia de tempo e dinheiro.

Muitas pesquisas têm direcionado seus esforços para descobrir e avaliar a segurança e eficácia do uso de extratos de plantas que possuem atividades farmacológicas. Neste sentido, este trabalho foi realizado com o objetivo de caracterizar os constituintes químicos e avaliar o efeito antinociceptivo, anti-inflamatório e antidiarreico do extrato liofilizado da casca do caule de *Byrsonima intermedia*, para que assim ela possa ser utilizada com mais segurança.

## 2 JUSTIFICATIVA

As plantas medicinais são frequentemente utilizadas no intuito de substituir ou auxiliar as terapias convencionais no tratamento de várias doenças. Entre outros fatores, a preferência na utilização das plantas medicinais decorre da facilidade de obtenção e do baixo custo. Porém, sabe-se que elas apresentam ampla diversidade de metabólitos secundários com diferentes atividades biológicas (FARNSWORTH et al., 1985; SIMÕES et al., 2003), justificando a necessidade de um aprofundamento no conhecimento das propriedades medicinais das espécies vegetais.

Neste sentido, o trabalho fornecerá parâmetros de qualidade que comprovem a segurança dos extratos preparados a partir de *Byrsonima intermedia* A. Juss., de acordo com os testes farmacológicos realizados em animais, a fim de verificar um possível efeito antidiarreico, anti-inflamatório e analgésico, assim como a caracterização química que forneça informações sobre esse extrato, para que ele possa ser empregado de maneira racional.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVOS GERAIS

Caracterizar quimicamente o extrato liofilizado da casca de *Byrsonima intermedia* A. Juss. e avaliar seu potencial quanto às atividades antinociceptiva, anti-inflamatória e antidiarreica.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Triagem fitoquímica do extrato liofilizado de *Byrsonima intermedia*.
- Quantificar o conteúdo de compostos fenólicos e flavonoides do extrato liofilizado de *Byrsonima intermedia*.
- Caracterizar o extrato liofilizado de *Byrsonima intermedia* por cromatografia líquida de alta eficiência.
- Avaliar o efeito antinociceptivo do extrato em camundongos, através dos testes de formalina, placa quente e filamentos de von Frey.
- Avaliar o efeito anti-inflamatório do extrato em ratos, através dos testes de granuloma, peritonite induzida por lipopolissacarídeo (LPS) e edema de pata, induzido por carragenina.
- Avaliar o efeito antidiarreico do extrato em ratos “in vivo”, pelo teste de trânsito intestinal e “in vitro”, pelo teste de banho isolado de órgãos.

## 4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Este item está subdividido em 6 subitens, importantes para o desenvolvimento da dissertação. A revisão bibliográfica abrange o período de 1970 a 2010 e apresenta o panorama em relação aos itens seguintes: importância das plantas medicinais, família Malpighiaceae e gênero *Byrsonima*, espécie tema da dissertação - *Byrsonima intermedia* A. Juss., dor e nocicepção, inflamação e diarreia.

### 4.1 PLANTAS MEDICINAIS

As plantas medicinais têm sido utilizadas, desde a antiguidade, como medicamento para o tratamento de uma série de doenças; elas exercem papel importante na saúde mundial. Apesar dos grandes avanços observados na medicina moderna nas últimas décadas, as plantas ainda têm uma contribuição importante na saúde. Medicamentos à base de plantas são amplamente distribuídos por todo mundo, porém, são mais abundantes nos países tropicais (CALIXTO, 2000).

Conforme McCurdy e Scully (2005), uma análise histórica permite observar que a descoberta e o desenvolvimento de vários medicamentos estão intimamente ligados às plantas. Com o desenvolvimento tecnológico, algumas plantas passaram a ser empregadas como fonte para a extração direta dos compostos ativos. O exemplo mais clássico do emprego de plantas medicinais na terapia moderna é o ácido acetilsalicílico (AAS), um derivado semissintético do ácido salicílico, cujos precursores, salicilina e saligenina, são extraídos das cascas de *Salix alba* L. (Salicaceae) e *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim. (Rosaceae).

Outros exemplos relevantes podem ser citados, como a morfina, extraída de *Papaver somniferum*; a digoxina, oriunda da *Digitalis* sp (Plantaginaceae); o taxol, da *Taxus brevifolia* Nutt. (Taxaceae); o quinino, extraído da casca da *Cinchona* sp (Rubiaceae); a vincristina e a vinblastina, alcaloides extraídos da *Catharanthus roseus* (L.) G. Don (Apocynaceae) (RATES, 2001).

São considerados medicamentos fitoterápicos os obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais, cuja eficácia e segurança são validadas por meio de levantamentos etnofarmacológicos, de utilização, documentações tecnocientíficas ou evidências clínicas. Droga vegetal é a planta medicinal, ou suas partes, que contenha as substâncias, ou classes de substâncias, responsáveis pela ação terapêutica, após processos de

coleta, estabilização, quando aplicável, e secagem, podendo estar nas formas íntegra, rasurada, triturada ou pulverizada (ANVISA, 2010).

Uma característica básica do fitoterápico é o fato de que, normalmente, ele não possui uma ação farmacológica imediata ou intensa, como os medicamentos sintéticos, por isso ele não é utilizado nos tratamentos emergenciais e sim no tratamento de doenças crônicas. Ainda assim, o fitoterápico tem ampla utilização terapêutica e grande aceitação pela população (CALIXTO, 2000).

Como alguns exemplos de extratos vegetais padronizados prescritos atualmente, podem-se citar o ginko (*Ginkgo biloba* L.) (Ginkgoaceae), que contém diterpenos (gincolídeos) com propriedades que melhoram a circulação central e periférica, e uma lactona terpênic (bilobalídeo), com propriedades neuroprotetoras e também flavonoides antioxidantes (ZHOU et al., 2004) e a erva-de-são-joão (*Hipericum perforatum*), muito utilizada no tratamento de depressão (KASPER, 2001).

Ainda que os medicamentos derivados de plantas tenham boa aceitação pela população e estejam presentes no mercado farmacêutico, apenas uma pequena parcela das plantas medicinais possui dados científicos que comprovem sua eficácia e seu espectro toxicológico, assim como garantia de qualidade do produto (RATES, 2001). Sendo assim, o estudo destas plantas, seja do ponto de vista botânico, químico, biológico, tecnológico ou farmacológico, não é tarefa simples, pois todas as etapas envolvidas na transformação de um vegetal em medicamento estão relacionadas com diferentes áreas de conhecimento. Por isso, torna-se necessário longo tempo para se chegar a um fitoderivado padronizado, sob os pontos de vista de controle de qualidade, ação biológica e riscos toxicológicos.

#### 4.2 FAMÍLIA Malpighiaceae E GÊNERO *Byrsonima*

Malpighiaceae é uma família comum em regiões tropicais e subtropicais, apresentando sua maior diversidade na América do Sul (JUDD et al., 1999). Tem cerca de 1.200 espécies, organizadas em 66 gêneros (ANDERSON, 1990b), sendo considerada como uma das dez mais bem representadas no bioma cerrado, por Mendonça et al. (1998). Nos diferentes biomas brasileiros, a família apresenta 32 gêneros, com cerca de 300 espécies (BARROSO, 1991). A família é composta por árvores, arbustos, lianas e ervas perenes, com folhas usualmente opostas, simples, inteiras, de venação pinada (JUDD et al., 1999).

Embora as flores desta família sejam bastante homogêneas, seus frutos destacam-se pela diversidade estrutural, ocorrendo frutos secos e carnosos, deiscentes e indeiscentes, que

podem ser alados ou sem alas, glabros ou pilosos. A semente apresenta embrião reto a curvo, com endosperma ausente na maturidade (ANDERSON, 1979a).

Malpighiaceae encontra-se entre as Malpighiales e seus maiores gêneros são *Byrsonima* Rich. ex Kunth, *Heteropterys* Kunth, *Banisteriopsis* C.B. Rob., *Tetrapteryx* Cav., *Stigmaphyllon* A. Juss. e *Bunchosia* Rich. ex Juss. (JUDD et al., 1999). Dentre os gêneros pertencentes à Malpighiaceae, *Byrsonima* é composto por cerca de 150 espécies (MAMEDE, 1981), sendo um gênero essencialmente americano e encontrado nas regiões tropicais e subtropicais da América do Sul (FELÍCIO et al., 1995). No Brasil, são encontradas cerca de 60 espécies de *Byrsonima* distribuídas em vários estados, desde a Amazônia até o Paraná. No cerrado brasileiro, este gênero é formado por 38 espécies popularmente conhecidas como murici, morici, moreci ou mureci (MENDONÇA, 1998).

As espécies de *Byrsonima*, assim como todas as demais espécies de Malpighiaceae, possuem folhas simples, de filotaxia oposta, não apresentando estípulas (JOLY, 1977). As inflorescências são do tipo racemo terminal, com flores hermafroditas, pentâmeras, apresentando sépalas e pétalas de formato e coloração variáveis entre as espécies (GIULIETTI, 1971). Conforme Ferreira (1973), a frutificação pode ocorrer ao longo do ano, mostrando drupas de coloração amarela, com exocarpo fino, mesocarpo carnoso, endocarpo pétreo, contendo um único pirênio, com três lóculos e uma semente em cada lóculo.

Investigações químicas de espécies de *Byrsonima* resultam no isolamento químico de esteroides, triterpenos, flavonoides, proantocianidinas, ácidos galoilquínicos e sulfonoglicolípídeos (BEJAR et al., 1995; RASTRELLI et al., 1997; MENDES et al., 1999; SANNOMIYA et al., 2004; SANNOMIYA et al., 2005a,b).

As plantas do gênero *Byrsonima* desfrutam de uma série de usos etnomedicinais. Suas folhas são empregadas contra febre e úlceras, assim como diuréticos, antiasmáticos e contra infecções na pele (SILVA et al., 2001; AGUIAR et al., 2005).

Algumas atividades biológicas de espécies de *Byrsonima* foram previamente investigadas. Os extratos hidrometanólico e metanólico de folhas de *B. Basiloba* A. Juss. (anteriormente documentado como *B. cinera*) apresentaram atividade antidiarreica (FIGUEIREDO et al., 2005). Conforme Sannomiya et al. (2005a), o extrato polar de folhas de *B. crassa* Nied. mostrou efeito antiulcerogênico em camundongos. O extrato metanólico de folhas de *B. crassifolia* (L.) Kunth demonstrou forte atividade giardicida (AMARAL et al., 2006). Silva e seus colaboradores (2001) descrevem que, na medicina popular, folhas de *B. fagifolia* Nied., popularmente conhecida como murici-cascudo ou murici-vermelho, são utilizadas como antieméticas, diuréticas, febrífugas e no tratamento de úlcera péptica.



#### 4.3 *Byrsonima intermedia* A. Juss.

*Byrsonima intermedia* A. Juss., arbusto de cerca de 1,5 m de altura, frequente no cerrado brasileiro, apresenta vários ramos que partem de base subterrânea, com folhas opostas, lanceoladas, flores em cachos terminais, amarelas, mas, quando velhas, alaranjadas (SOUTO; OLIVEIRA, 2005).



Figura 1: Ramo florido de murici-pequeno, *Byrsonima intermedia* A. Juss.  
Fonte: João de Deus Medeiros

Conforme estudos realizados por Bonzani da Silva (1970a, b), o isolamento químico de raízes de *B. intermedia* demonstra presença de ácido gálico, pirogalol, pirocatequinas e  $\beta$ -amirina. A análise fitoquímica do extrato metanólico de folhas de *B. intermedia* indicou presença de 3-*O*- $\beta$ -D-galactopiranosil-quercetina **1**, (+)-catequina **2**, (-)-epicatequina **3**, ácido gálico **4**, galato de metila **5**, 3-*O*- $\alpha$ -L-arabinosil-quercetina **6**, amentoflavona **7**, 3-*O*- $\beta$ -(2''-gabil-galactosil)-quercetina **8**, 3-*O*- $\alpha$ -(2''-gabil-arabinosil)-quercetina **9** e quercetina **10** (SANNOMIYA et al., 2007).

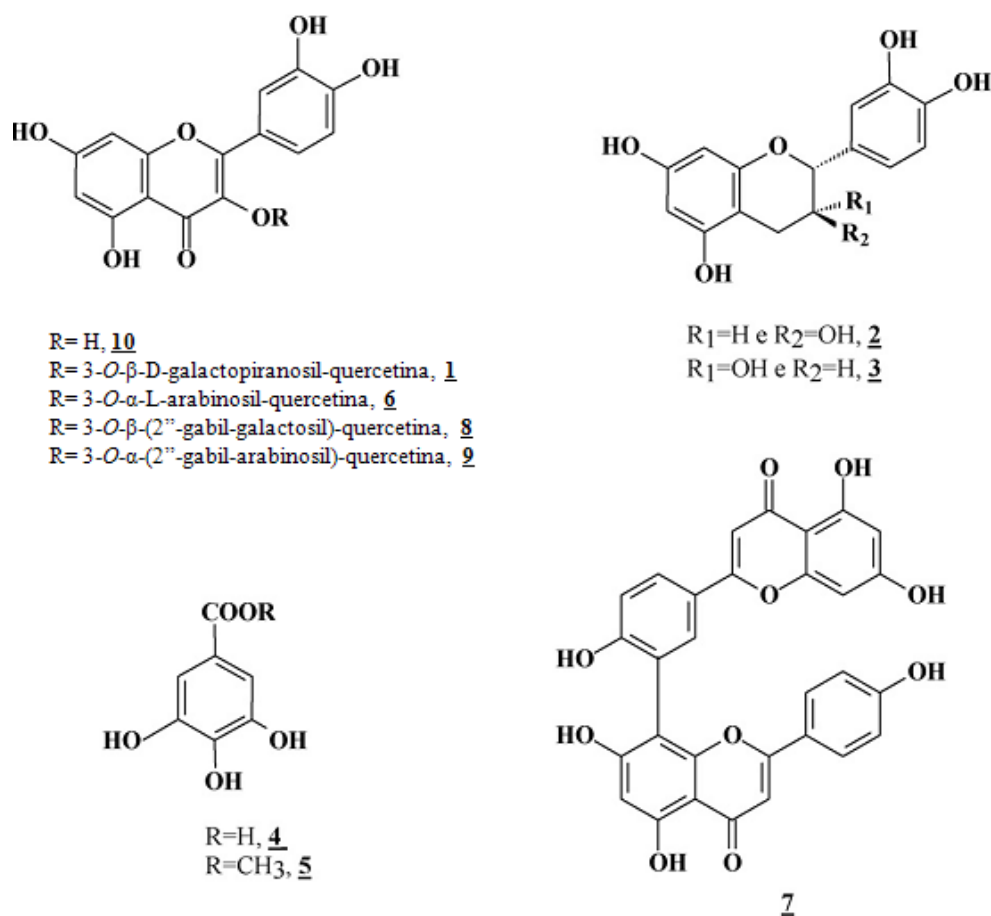


Figura 2: Compostos isolados do extrato metanólico de folhas de *Byrsonima intermedia*

O chá das cascas de caule de murici-pequeno (*Byrsonima intermedia* A. Juss.) tem sido utilizado em diarreias e disenterias (RODRIGUES; CARVALHO, 2001). De acordo com Corrêa (1984), esta espécie apresenta casca rica em taninos, que são metabólitos secundários fenólicos em geral, polifenóis de alta massa molecular e estrutura química variável. Estes compostos têm atividade antimicrobiana, anti-hemorragica, antidiarreica e anti-inflamatória (PINTO; BERTOLUCCI, 2002).

#### 4.4 DOR E NOCICEPÇÃO

De acordo com a definição proposta pela *International Association for the Study of Pain* (IASP), dor é uma experiência emocional, com sensação desagradável, associada à lesão tecidual presente, potencial ou descrita como tal (CAVALCANTI; MADDALENA, 2003). A dor pode ser classificada como aguda ou crônica.

Dor aguda é um sintoma biológico de estímulo nocivo, como dano tecidual devido à doença ou trauma. Pode ser altamente localizada ou pode se irradiar. É descrita em caráter de

pontadas e persiste enquanto houver patologia tecidual (BERNARD et al., 1996; LOESER; MELZACK, 1999). A dor torna-se crônica quando o controle da patologia não é satisfatório, persistindo além do tempo necessário para a cura da lesão (ASHBURN; STAATS, 1999). Esse tipo de dor é resultante de processos patológicos, que agredem as estruturas somáticas ou viscerais, e de disfunções do sistema nervoso central (SNC), ou do sistema nervoso periférico (SNP). Contudo, a dor crônica gera estresse, reduz a imunidade, diminui a produção de endorfinas e causa alterações do sono, causando depressão (CARVALHO, 1999).

A dor, além de uma sensação, é uma experiência influenciada por ansiedade, depressão, expectativa e outras variáveis psicológicas. Isto é importante porque as sensações têm vias neuroanatômicas, com receptores específicos que permitem a detecção e a medida de um estímulo. Já as experiências incorporam componentes sensoriais com influências pessoais e ambientais importantes (MILLAN, 1999).

É uma mistura das características físicas dos estímulos com as funções motivacionais, afetivas e cognitivas do indivíduo, pois desempenha o papel de alerta, comunicando ao indivíduo que algo está errado, podendo gerar estresse acentuado e incapacidade física (SOUZA, 2005). Em indivíduos sadios, a dor serve para propósitos altamente adaptativos relacionados com a sobrevivência. As sensações dolorosas induzem respostas urgentes de seu alívio, provocando comportamentos como massagear (ou lambear) a área lesada, além de raiva, grito e choro (GANONG, 1988; AGNATI et al., 1991).

Uma vez que os animais não são capazes de verbalizar os componentes subjetivos da dor, neles não se avalia dor, mas nocicepção. Sendo assim, termos como dor e analgesia são mais adotados para humanos e nocicepção e antinocicepção para animais (JONES, 1996).

Nocicepção é um termo derivado do latim *nocere*, que significa "ferir/mal"; é o nome dado ao processo pelo qual os organismos detectam estímulos potencialmente prejudiciais. Em humanos, a base desse sistema é uma classe de sensores aferentes chamados de nociceptores, definidos pela IASP como "um receptor, preferencialmente, sensível a um estímulo nocivo ou a um estímulo que viria a ser nocivo se prolongado" (SMITH; LEWIN, 2009).

As fibras nervosas responsáveis pela nocicepção são caracterizadas como fibras aferentes primárias, denominadas fibras C e A $\delta$ . As fibras C são fibras mielinizadas e respondem a estímulos nocivos de origem térmica, mecânica ou química. As fibras A $\delta$  são fibras mielinizadas que respondem a estímulos térmicos e mecânicos (JULIUS; BASBAUM, 2001).

Os neurônios responsáveis pela transmissão da informação nociceptiva possuem, na periferia, terminações não mielinizadas (nociceptores), responsáveis pela detecção dos estímulos nociceptivos. As fibras nervosas nociceptivas estão envolvidas na transdução do estímulo nocivo periférico, na condução do potencial de ação para a medula espinhal e na transmissão da informação nociceptiva para os neurônios centrais. Mecanismos distintos de transdução, receptores, canais iônicos e transmissores sensoriais mediam estes processos (GRIGG et al., 1986; WOOLF; COSTIGAN, 1999).

No sistema nervoso central, o corno dorsal da medula espinhal é um sítio importante no processo de transmissão e modulação desta transmissão sináptica. Além disso, mecanismos endógenos, representados por sistemas modulatórios descendentes, inibem a transmissão da informação nociceptiva para as estruturas supraespinhais (WOOLF; COSTIGAN, 1999; KIDD; URBAN, 2001; RIEDEL; NEECK, 2001).

Vários neurotransmissores estão envolvidos na modulação da transmissão nociceptiva no corno dorsal da medula espinhal. As taquicininas (substância P, neurocinina A e B) e os aminoácidos excitatórios liberados na medula são importantes mediadores da informação nociceptiva (PICARD et al., 1993; ZHENG; CHEN, 2001), sendo o principal neurotransmissor excitatório o glutamato. Óxido nítrico é outro exemplo importante de mediador do processo nociceptivo na medula espinhal (ALDERTON et al., 2001).

Na terapia da dor existem duas classes principais de fármacos analgésicos. Os opioides, como a morfina e a codeína, que são indicados no tratamento de dores agudas, moderadas ou intensas, são utilizados quando a resposta nociceptiva não responde a analgésicos menos potentes. Embora os opioides sejam muito efetivos, principalmente no tratamento da dor aguda, sua utilização é limitada pelo fato de esses fármacos apresentarem muitos efeitos indesejados, como constipação, náuseas, vômitos, broncoconstrição, hipotensão, bradicardia e depressão respiratória (McQUEEN, 1983; HOSKIN; HANKS, 1991).

Outra classe de fármacos bastante utilizada no tratamento da dor é a dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINES), que possuem vantagens sobre os analgésicos opioides por não provocarem tolerância e dependência com o uso crônico (NUKI, 1983; RAINSFORD; VELO, 1992).

## 4.5 INFLAMAÇÃO

A inflamação é uma resposta biológica complexa de tecidos vasculares a estímulos nocivos, tais como patógenos, danos celulares ou irritantes (físicos ou químicos). É um mecanismo de defesa destinado a remover os estímulos lesivos e iniciar o processo de cicatrização do tecido (MALDINI et al., 2009). Este processo envolve uma complexa sucessão de ativações enzimáticas, liberação de mediadores químicos, extravasamento de líquidos, migração celular, lesão tecidual e reparação (VANE; BOTTING, 2004).

Apesar de os efeitos da inflamação serem, muitas vezes, observados como indesejáveis, pois são desagradáveis e causam desconforto, mostram-se benéficos, permitindo ao indivíduo sobreviver com os efeitos do estresse de cada dia (PORTH; KUNERT, 2004).

De acordo com Brune e Hinz (2004), a resposta inflamatória aguda é caracterizada principalmente por vasodilatação local e aumento da permeabilidade capilar; a resposta subaguda ou retardada caracteriza-se pela infiltração de leucócitos e fagócitos e a resposta crônica ou proliferativa caracteriza-se por degeneração tecidual e fibrose.

As inflamações agudas geralmente são autolimitantes e rapidamente controladas pelas defesas do hospedeiro. Por outro lado, a inflamação crônica é autoperpetuante e pode durar semanas, meses ou anos. Podem desenvolver-se durante o processo inflamatório agudo recorrente ou progressivo, ou, ainda, de respostas insidiosas, de baixo grau, geralmente assintomáticas, incapazes de evocar uma resposta aguda. A inflamação crônica é considerada uma inflamação prolongada, na qual a inflamação ativa, a destruição tissular e a tentativa de reparar os danos ocorrem simultaneamente. A inflamação aguda manifesta alterações, como edema e infiltrado predominantemente neutrofílico. A inflamação crônica, por sua vez, é caracterizada por infiltrado de células mononucleares, incluindo macrófagos, linfócitos e plasmócitos, por destruição tecidual induzida pela persistência do agente nocivo ou pelas células inflamatórias, e pelas tentativas de cicatrização pela substituição do tecido danificado por tecido conjuntivo, efetuado por meio da proliferação de pequenos vasos sanguíneos e, em particular, fibrose (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

Várias doenças, como câncer, diabetes, aterosclerose e artrite são associadas frequentemente com inflamação e em muitas pesquisas tem sido demonstrado que inflamação crônica pode ser fator comum de muitas doenças (MEDZHITOV, 2008).

O objetivo de conhecer melhor a inflamação iniciou tentativas de reproduzir o fenômeno experimentalmente. Observações microscópicas permitiram entender a participação da circulação e das células sanguíneas nesse processo, logo, modelos experimentais

permitiram caracterizar melhor o processo inflamatório e as substâncias químicas que dele participam (SOUZA et al., 2003).

Os modelos experimentais utilizados em estudos com fármacos anti-inflamatórios são: estudo da quimiotaxia de leucócitos “in vitro”; teste do edema inflamatório na pata do animal induzido por substâncias químicas; angiogênese; modelos de inflamação por mecanismos autoimunes; modelos que utilizam agentes infecciosos, teste da permeabilidade capilar induzida pelos marcadores da inflamação; pleurisia ou peritonite e edema inflamatório de orelha induzido por agentes irritantes, dentre outros (LAPA et al., 2002).

Anti-inflamatórios são direcionados a inibir enzimas específicas e/ou antagonizar receptores específicos e a resposta de translação de proteínas envolvidas na inflamação. Os inibidores de ciclooxigenase (COX), o fator de necrose antitumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) (CHAN; CARTER, 2010) e os corticosteroides são exemplos dessa abordagem utilizada com o objetivo de bloquear a produção e/ou ação de mediadores químicos pró-inflamatórios (SERHAN, 2008).

Embora corticosteroides sejam fármacos anti-inflamatórios amplamente empregados na terapêutica de doenças crônicas, o uso em longo prazo pode requerer o aumento da dose e causar efeitos colaterais indesejados, como hipertensão, edema, ganho de peso e resistência à insulina. Inibidores de COX não-seletivos podem causar sangramento gastrointestinal e danos nos rins; já inibidores seletivos de COX-2 aumentam o risco de doenças cardiovasculares (MUKHERJEE et al., 2001; SOMMER; BIRKLEIN, 2010).

Nas últimas décadas, tem-se verificado o crescimento dos conhecimentos tanto do processo inflamatório em si como de potenciais substâncias que possam, de alguma forma, interferir com o mesmo, muitas delas de origem vegetal (CALIXTO; OTUKI; SANTOS, 2003).

Compostos naturais com diferentes mecanismos de ação podem ser utilizados no tratamento de doenças inflamatórias (RIOS et al., 2009), sobretudo a partir de plantas que estão sendo utilizadas com esse propósito. Um número de plantas tradicionalmente utilizadas apresenta propriedades farmacológicas com grande potencial em aplicações terapêuticas. Um exemplo importante é o salgueiro, de onde se extrai a salicina que tem sido associada com ácido salicílico, a molécula precursora chave que contribuiu para a descoberta do ácido acetilsalicílico, comercializado como aspirina (MAHDI et al., 2006).

Dentre os metabólitos secundários com potencial atividade anti-inflamatória podem-se citar a curcumina, extraída da *Curcuma longa* L. (Zingiberaceae); a rutina, a quercetina, a apigenina, a morina e a narigenina, obtidas do *Ginkgo biloba*; a silimarina, extraída do

*Silybum marianum* (L.) Gaertn. (Asteraceae); alguns flavonoides, como a baicaleína, obtida da *Scutellaria baicalensis* Georgi (Lamiaceae) e o cirsiolol, derivado da *Achillea fragrantissima* Forssk, entre muitos outros (CALIXTO; OTUKI; SANTOS, 2003).

Sendo assim, anti-inflamatórios novos, eficazes e seguros são necessários. Considerando o potencial efeito adverso destes fármacos produtos da medicina alternativa, como as plantas medicinais, são continuamente procurados para proporcionar a diminuição ou, até mesmo, o desaparecimento da doença (ARAWWAWALA et al., 2010).

#### 4.6 DIARREIA

Diarreia é um distúrbio gastrointestinal comum caracterizado por um aumento na frequência de evacuações e alteração na consistência das fezes. Ela continua sendo uma das grandes ameaças à saúde para as populações dos países tropicais e subtropicais pobres. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que de 3 a 5 bilhões de casos ocorram a cada ano (1 bilhão em crianças menores de 5 anos de idade) e que aproximadamente 5 milhões de mortes por ano sejam devido à diarreia (2,5 milhões em crianças menores de 5 anos de idade) (ADEYEMI et al., 2009).

A diarreia é responsável por mortes em adultos e, especialmente, em crianças em todo o mundo, particularmente nos países em desenvolvimento (MURRAY; LOPEZ, 1997; TEIXEIRA; HELLER, 2006). Ela pode ser classificada como aguda ou crônica. A forma aguda, a mais comum, é de início inesperado e é controlada em, aproximadamente, 14 dias. Normalmente, sua origem é relacionada a agentes infecciosos (micro-organismos, toxinas) ou reações inflamatórias (THAPAR; SANDERSON, 2004).

A diarreia crônica pode se desenvolver por problemas congênitos, síndrome neoplásica, vírus da imunodeficiência humana (HIV), pelos efeitos adversos de medicamentos e, mais comumente, por infecções gastrointestinais, incluindo gastroenterite viral/bacteriana (FIELD, 2003; ANASTASI et al., 1997).

Em geral, pacientes com diarreia descontrolada estão em maior risco de desidratação, desequilíbrio eletrolítico, ruptura da pele e fadiga. Em muitos casos, os tratamentos utilizados são terapia de reidratação oral (TRO) e intervenção farmacológica, incluindo antibióticos e medicamentos antidiarreicos (THEODOROU et al., 2002; BRIJESH et al., 2006). Outras opções de tratamento incluem agentes supressores da motilidade intestinal, que visam reverter a desidratação, reduzir a duração da doença e o período de tempo que o indivíduo é infectado (ALLEN et al., 2003). As buscas por terapias contra a diarreia incluem alopáticos,

homeopáticos e medicinas alternativas que demonstram capacidade de reduzir a duração e a gravidade da diarreia em crianças nos países em desenvolvimento (JACOBS et al., 2006).

Em virtude de um grande número de doenças, incluindo propriedades epidemiológicas, agentes etiológicos e manifestações clínicas variáveis, estratégias diferentes têm sido aplicadas no controle da diarreia (KAPIKIAN et al., 1996). A fim de reduzir infecções causadas por patógenos bacterianos, o programa de Controle de Doenças Diarreicas, criado em 1978, pela OMS, direcionou a utilização especial de produtos medicinais populares no controle e na gestão da diarreia (GALVÃO et al., 1993).

Para a avaliação do efeito antidiarreico em extratos de plantas, a diarreia é induzida por alguma substância, como óleo de rícino, ácido araquidônico, prostaglandina E<sub>2</sub> ou sulfato de magnésio. A capacidade do extrato em questão é determinada pela medição da produção fecal. Como essas substâncias têm diferentes mecanismos de ação, o extrato pode ser avaliado de acordo com seu local de atuação (GALVEZ et al., 1993; ABGOR et al., 2004). O efeito sobre a motilidade intestinal é determinado pela capacidade do extrato de bloquear as contrações produzidas por agonistas, como acetilcolina, histamina e nicotina (AKAH et al., 1999; MURUGESAN et al., 2000; ABDULLAHI et al., 2001).

Atualmente, triagens de produtos biológicos e extratos de plantas, principalmente as da família Liliaceae, Rubiaceae, Meliaceae, Fabaceae e Myrtaceae, dentre várias outras, têm sido realizadas para a obtenção de biomoléculas isoladas, com o objetivo de diminuir a diarreia (NWAFOR et al., 2000; AFROZ et al., 2006; ROUF et al., 2007; MUJUMDAR et al., 2005; GARCIA et al., 2003).

Pimentas longas (*Piper longum* L.) e pretas (*Piper nigrum* L.) (Piperaceae) são utilizadas como componentes de formulações naturais com efeito antidiarreico; elas possuem um alcaloide, piperina, que tem várias atividades farmacológicas. Isso tem mostrado uma atividade inibitória dose-dependente contra diarreia induzida por óleo de rícino, sulfato de magnésio e ácido araquidônico (BAJAD et al., 2001).

Análises dos constituintes de *Egletes viscosa* (L.) Less. (Compositae), uma planta popular brasileira, e de *Euphorbia hirta* L. (Euphorbiaceae), utilizada na medicina popular africana e asiática, mostrou a presença de flavonoides como ternatina e quercitrina, que possibilitam o efeito antidiarreico dessas plantas (GALVEZ et al., 1993; RAO et al., 1997).

Yavada e Jain (2005) identificaram uma nova glicosil flavona, 7-O- $\alpha$ -L-arabinopiranosil-(1 $\rightarrow$ 6)-O- $\beta$ -D-galactopiranosil-5,7,4'-trihidroxi-6,3'-dimetoxiflavona de *Melilotus indica* (L.) All. (Leguminosae), uma planta medicinal utilizada em vários tratamentos, incluindo a diarreia infantil, encontrada na Índia, no Oriente Médio e na Europa.



Muitos estudos em animais têm investigado a bioatividade e efeitos de plantas tradicionalmente utilizadas no tratamento da diarreia. Seus extratos podem exercer efeitos antiespasmódico, retardamento do trânsito intestinal, suprimir a motilidade intestinal, estimular a absorção de água e reduzir a secreção de eletrólitos. Estas atividades podem explicar os benefícios do uso particular de plantas no tratamento da diarreia (PALOMBO, 2006).

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO

O caule de *B. intermedia* foi coletado de populações naturais localizadas no município de Ijaci, região sul do estado de Minas Gerais, localizado a 918,0 m de altitude, nas coordenadas 21°14'S de latitude e longitude 44,9° W GRW, nos meses de junho e novembro de 2009 e março de 2010. A planta tem tamanho médio de 1,10 m de altura e caules laterais de aproximadamente 1,0 cm de diâmetro, as cascas foram retiradas dos ramos laterais para que, assim, houvesse preservação da vegetação. Foram coletadas cascas de cerca de 10 indivíduos.

A identificação taxonômica foi realizada no Laboratório de Cultura de Tecidos de Plantas, sob a responsabilidade do professor Renato Paiva, no Setor de Fisiologia Vegetal do Departamento de Biologia (DBI) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, MG. A exsicata está depositada no herbário ESAL do DBI/UFLA, sob registro número 17.601.

### 5.2 OBTENÇÃO DO EXTRATO LIOFILIZADO DA CASCA

As cascas do caule foram retiradas com o auxílio de uma faca e secas, por 48 horas, em estufa, a 40°C. Em seguida, foram trituradas em moinho mecânico e pulverizadas através de tamis abertura 0,84 mm, tyler 20. Em seguida, foram armazenadas em recipiente fechado.

O extrato aquoso de cascas de *Byrsonima intermedia* a 5% (g/mL) foi obtido por meio de decocção, de acordo com a Farmacopeia Brasileira 5ª Edição (2010), utilizando-se 25 g de cascas em 500 mL de água destilada. A secagem do extrato foi realizada por liofilização, obtendo-se, assim, o extrato liofilizado. A obtenção deste extrato foi realizada no Laboratório de Plantas Medicinais e Fitoterápicos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Unifal-MG. Este extrato liofilizado foi designado ELBi. Assim, a partir deste item até o final da dissertação, exceto nas legendas de figuras e tabelas substitui-se “extrato liofilizado de *Byrsonima intermedia*” por “ELBi”.

### 5.3 CARACTERIZAÇÃO QUALITATIVA DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS

Para a caracterização do extrato ELBi, foram realizados ensaios para a avaliação da presença de possíveis metabólitos secundários.

### 5.3.1 ANTRAQUINONAS

Colocou-se 1 g do extrato em um béquer e adicionaram-se 10 mL de diclorometano. Em seguida, filtrou-se o extrato e transferiu-se para um tubo de ensaio, onde foi adicionado 1 mL de amônia diluída.

### 5.3.2 TANINOS

Colocou-se 1 g do extrato em um béquer e adicionaram-se 100 mL de água destilada. Ferveu-se esta solução por, aproximadamente, 5 minutos em uma chapa de aquecimento para a obtenção da solução teste, filtrou-se o extrato e esperou-se esfriar.

#### 5.3.2.1 Reações com proteínas (gelatina)

Adicionaram-se 2 mL de solução teste em um tubo de ensaio, acrescentaram-se duas gotas de HCl diluído e gotejou-se uma solução de gelatina a 2% sobre a solução.

#### 5.3.2.2 Reações com sais de ferro

Colocaram-se 2 mL da solução teste em um tubo de ensaio, juntamente com 2 mL de água destilada e 4 gotas de uma solução de  $\text{FeCl}_3$  1% em metanol.

### 5.3.3 ALCALOIDES

Adicionaram-se 3 g do extrato em um béquer, juntamente com 10 mL de uma solução de etanol e água destilada (7:3), filtrou-se o extrato com funil e algodão, obtendo-se a solução teste.

Esta solução foi vertida em um tubo de ensaio onde foi adicionado gotas do reagente de Dragendorff.

### 5.3.4 SAPONINAS

Colocaram-se 2 g do extrato e 10 mL de água em um béquer, ferveu-se durante 3 minutos e, em seguida, esta solução foi filtrada e aguardou-se o resfriamento.

Esta solução foi transferida para um tubo de ensaio, que foi agitado vigorosamente por 20 segundos, deixando-se em repouso por 20 minutos.

### 5.3.5 ESTEROIDES E TRITERPENOS PENTACÍCLICOS

Adicionaram-se 3 g do extrato e 10 mL de  $\text{CHCl}_3$  em um béquer, agitou-se e deixou-se evaporar a secura. Uma solução de clorofórmio com anidrido acético (1:1) foi adicionada, a

fim de ressuspender a substância obtida após a evaporação. Três gotas de HCl concentrado foram adicionadas a esta solução.

### 5.3.6 FLAVONOIDES

Colocaram-se 3 g do extrato em um béquer e a ele foram adicionados 20 mL de hexano. Agitou-se para retirar os graxos. Esta solução foi filtrada e à torta obtida adicionaram-se 20 mL de metanol, com a finalidade de extraírem-se os flavonoides presentes na amostra. Deixou-se a solução evaporar até reduzir o volume e, então, esta foi ressuspensa em etanol, obtendo-se a solução teste.

#### 5.3.6.1 Teste Shinoda

Foi adicionado um fragmento de  $Mg^0$  e três gotas de HCl concentrado em 1 ml da solução teste. Adicionaram-se também 2,0 mL de etanol a esta solução.

### 5.4 DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE COMPOSTOS FENÓLICOS

O conteúdo de compostos fenólicos nos extratos foi determinado baseado no método colorimétrico de Folin-Ciocalteu, com algumas modificações. As alíquotas do extrato foram diluídas com água destilada, para se obter concentração de 23,88 mg/mL. Dessa forma, 0,5 mL de cada alíquota foram transferidos para um tubo de ensaio sob abrigo da luz. Em seguida, foram adicionados 2,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu 2 N. Após um período de 2 a 5 minutos, foram acrescentados aos tubos 2,0 mL de carbonato de sódio ( $Na_2CO_3$ ) 4% (p/v).

Após 2 horas de incubação à temperatura ambiente, a absorbância foi mensurada em espectrofotômetro a 750 nm, utilizando água destilada como branco. Ácido gálico (2,5 a 12,5  $\mu g/mL$ ), dissolvido em água destilada, foi utilizado para a elaboração da curva padrão. Os valores de fenólicos totais foram expressos como equivalentes de ácido gálico (mg de ácido gálico/g de amostra), o teste foi realizado em triplicata (CIOCALTEU, 1927).

### 5.5 DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE FLAVONOIDES

A determinação de flavonoides foi realizada a partir do extrato diluído em água destilada, na concentração de 11,6 mg/mL. Em seguida, 1,5 mL de etanol absoluto foi adicionado em 0,5 mL do extrato condicionado no tubo. Posteriormente, 0,1 mL da solução de cloreto de alumínio ( $AlCl_3$ ) 10% (p/v) e 0,1 mL de acetato de potássio ( $CH_3COOK$ ) 1M foram adicionados à solução. O volume da solução foi completado para 5 mL, com 2,8 mL de

água destilada. Os tubos foram agitados para homogeneização e mantidos em repouso por 30 minutos.

Em seguida, foram realizadas as leituras em espectrofotômetro no comprimento de onda de 425nm, correspondente ao pico de absorção do quelato, quercetina-alumínio, ajustando o zero de absorvância com a solução do branco, o teste foi realizado em triplicata (KALIA et al., 2008).

#### 5.6 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO LIOFILIZADO DE CASCA DO CAULE DE *B. intermedia* POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUÇÃO (CLAE)

A análise por cromatografia líquida de alta eficiência do extrato aquoso de casca de *Byrsonima intermedia* foi realizada em equipamento Shimadzu LC-100, usando coluna C18 CLC-ODS (250–4,6mm), com tamanho de partículas de 5- $\mu$ m. A fase móvel consistiu do eluente A (solução de ácido acético 0,5 mmol/L) e eluente B (solução metanólica de ácido acético 0,1% m/v). O gradiente (A:B) foi o seguinte: 0,01-30min (10:100); 30-45min (0:100), com fluxo de solvente na proporção de 1,0mL/min, a 272nm, e volume de injeção de 20 $\mu$ L, na concentração de 1mg/mL. LC solution foi utilizado para o tratamento dos dados.

#### 5.7 ESTUDO FARMACOLÓGICO

No estudo farmacológico, foram realizados testes para a avaliação da atividade antinociceptiva, anti-inflamatória e antidiarreica, a fim de confirmar o uso popular de murici-pequeno como planta medicinal. O trabalho foi apreciado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Alfenas, sob o protocolo número 232/2009, por estar em conformidade com os princípios éticos exigidos em experimentação animal.

Foram utilizados ratos Wistar machos (180 $\pm$ 50g) e camundongos Swiss machos (25 $\pm$ 5g) provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL-MG. Os animais foram tratados com ração comercial e água *ad libitum*, durante todo experimento, garantida sua adaptação por sete dias em sala climatizada a 23 $\pm$ 2 °C, em caixas de polipropileno adequadas à sua manutenção e foram mantidos sob regime de luz com ciclo claro-escuro de 12 horas. Ao término de cada experimento, os animais foram sacrificados com halotano.

## 5.7.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA

### 5.7.1.1 TESTE DA FORMALINA

O método utilizado para este ensaio foi baseado naquele descrito por Santos e Calixto (1997).

Neste modelo experimental, aplicaram-se, por via subcutânea, 20  $\mu$ L de solução de formaldeído a 10% na região plantar da pata traseira direita dos animais. Após 1 hora do tratamento dos grupos teste e controle, e 30 minutos do tratamento do grupo morfina, o fármaco padrão utilizado. Imediatamente, observou-se, então, o tempo que os animais levaram lambendo a pata que recebeu a solução de formalina, durante 5 minutos após a aplicação e por mais 10 minutos, após 20 minutos da aplicação do estímulo nociceptivo.

### 5.7.1.2 TESTE DA PLACA QUENTE

O teste da placa quente foi utilizado para medir o tempo de latência de resposta ao estímulo termocéptico, de acordo com o método descrito por Eddy e Leimback (1953).

Neste teste, cada animal foi colocado individualmente sobre uma placa quente ( $50\pm 1^\circ\text{C}$ ). A medição do tempo foi interrompida quando o animal apresentou comportamento instintivo de saltar sobre a placa ou lambendo as patas com, no máximo, 20 segundos, para evitar a injúria tecidual. Foram realizadas uma observação basal e observações após 30, 60 e 120 minutos dos tratamentos.

### 5.7.1.3 TESTE DE VON FREY ELETRÔNICO

Neste modelo experimental, a hipernocicepção é induzida pela injeção intraplantar de carragenina e os efeitos antinociceptivos do fármaco e do extrato utilizados nos tratamentos são medidos pelos filamentos de von Frey, que registram quando o animal retira a pata.

O estímulo da pata foi repetido até que se conseguissem duas medidas similares. Colocou-se cada camundongo em uma caixa de acrílico (12x10x17 cm de altura), por 30 minutos antes do teste. Durante esse período de adaptação, as patas dos animais foram tocadas 2-3 vezes com a ponta do transdutor e, após esse período, a leitura basal foi realizada.

Após uma hora do tratamento, os animais receberam uma injeção intraplantar de carragenina 100  $\mu$ g/pata e registrou-se a sensibilidade nociceptiva de cada animal, depois de uma e três horas da aplicação da carragenina (CUNHA et al., 2004).

#### 5.7.1.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Para os três testes da avaliação antinociceptiva do extrato de *Byrsonima intermédia*, foram utilizados oito animais por grupo, sendo o tratamento semelhante nos três testes para grupo controle e os três grupos de extratos, conforme especificado a seguir:

Grupo 1: Veículo, carboximetilcelulose, 1% , v.o.;

Grupo 2: ELBi, 30 mg/kg, v.o.;

Grupo 3: ELBi, 100 mg/kg, v.o.;

Grupo 4: ELBi, 300 mg/kg, v.o.

O fármaco padrão difere para cada teste, sendo morfina (10 mg/kg, i.p.) e indometacina (10 mg/kg, v.o.), no teste de formalina; morfina (1 mg/kg, i.p.), Naloxano (0,4 mg/kg, i.p.) + ELBi (100 mg/kg, v.o.) e morfina (1 mg/kg i.p.) + Naloxano (0,4 mg/kg, i.p.), para o teste de placa quente e indometacina (10 mg/kg, v.o.) para von Frey eletrônico.

#### 5.7.2 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

##### 5.7.2.1 TESTE DO GRANULOMA – INDUÇÃO DO TECIDO GRANULOMATOSO

Em condições assépticas e sob anestesia com tribromoetano (250 mg/kg; i.p.), efetuou-se a incisão longitudinal ventral em cada animal e implantaram-se, por meio de divulsão do tecido subcutâneo, quatro cilindros de algodão hidrófilo branco de 5 mm de comprimento, pesando 40 mg cada, em quatro pontos equidistantes da incisão. Os cilindros de algodão foram previamente esterilizados por autoclavagem em lotes de quatro unidades, pesando 160 mg e, imediatamente antes do implante, foram tratados com 0,4 mL de solução aquosa de penicilina injetável 5%, segundo o método de Meier et al. (1950) e Niemegeers et al. (1975).

Iniciou-se o tratamento duas horas depois da implantação dos “pellets”, prolongando até o 7º dia. No oitavo dia, os animais foram sacrificados, os granulomas removidos por dissecação e submetidos à secagem em estufa, por 24 horas, em temperatura de 40°C. Em seguida, seus pesos foram determinados em balança analítica e o peso do granuloma foi calculado pela diferença entre os pesos secos, inicial e final.

##### 5.7.2.2 TESTE DE PERITONITE

Uma hora após os tratamentos, aplicou-se o agente inflamatório (lipopolissacarídeo proveniente de *E. coli* sorotipo 026:B6-Sigma, 500 µg/kg, i.p). Quatro horas após a indução da inflamação, os animais foram sacrificados. Uma incisão foi feita entre a terceira e a quinta

costela do lado direito do mediastino. Em seguida, o peritônio de cada animal foi lavado com 10 mL de PBS (Tampão fosfato) 0,1 M. Posteriormente, o exsudato peritonial foi coletado, transferido para um tubo cônico de centrífuga e o volume foi determinado. Uma alíquota de 10 µL do exsudato foi utilizada para determinar a contagem total de leucócitos em câmara de Neubauer (FERRÁNDIZ; ALCARAZ, 1991).

#### 5.7.2.3 TESTE DE EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA

A técnica de medida do edema foi baseada no método descrito por Carvalho (1998). Transcorridos 60 minutos dos tratamentos, o edema de pata foi induzido pela injeção de carragenina (1.000 µg/pata) como agente inflamatório no volume de 0,1 mL, que foi aplicada na região plantar da pata posterior direita dos animais. Após uma, duas, três e quatro horas da administração da carragenina, a pata na qual a inflamação foi induzida foi imersa até a região tíbio-társica na cuba do pletismógrafo e o edema foi medido de acordo com a alteração do volume na cuba.

#### 5.7.2.4 GRUPOS EXPERIMENTAIS

Para os três testes da avaliação do efeito anti-inflamatório do extrato de *Byrsonima intermédia*, foram utilizados seis animais por grupo, sendo o tratamento semelhante nos três testes para grupo controle e os três grupos de extratos, conforme especificado a seguir:

Grupo 1: Veículo, carboximetilcelulose, 1% , v.o.;

Grupo 2: ELBi, 30 mg/kg, v.o.;

Grupo 3: ELBi, 100 mg/kg, v.o.;

Grupo 4: ELBi, 300 mg/kg, v.o..

O fármaco padrão difere apenas para o teste de granuloma, sendo a dexametasona (0,1 mg/kg, v.o) utilizada; para edema de pata induzido por carragenina e peritonite induzida por LPS, utilizou-se a indometacina (10 mg/kg, v.o.).

### 5.7.3 ATIVIDADE ANTIDIARREICA *IN VIVO* E *IN VITRO*

#### 5.7.3.1 AVALIAÇÃO *IN VIVO*

##### 5.7.3.1.1 TESTE DO TRÂNSITO INTESTINAL

Após 30 minutos de cada tratamento, os animais receberam 2 mL de óleo de rícino v.o. e, 30 minutos após o tratamento com óleo de rícino, os animais foram tratados com suspensão



de carvão ativo 10% em solução de goma arábica 5%, 2 mL/animal v.o. Após 30 minutos, os animais foram sacrificados com halotano e foi realizada a extirpação imediata do intestino, desde o piloro até o início do ceco. Assim, foi feita a medida do comprimento total do intestino delgado e da distância percorrida pela suspensão de carvão ativo. O resultado foi expresso em porcentagem do comprimento total do intestino delgado. Os grupos experimentais foram constituídos por veículo, carboximetilcelulose (1%, v.o.), ELBi nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg (v.o.) e cloridrato de loperamida (2 mg/kg, v.o.) como fármaco padrão.

#### 5.7.3.2 AVALIAÇÃO *IN VITRO*

Para avaliar o efeito do extrato aquoso de cascas de *Byrsonima intermedia* sobre a motilidade intestinal “in vitro”, os animais (ratos Wistar) foram mantidos em jejum por 12 horas e, posteriormente, decapitados. Em seguida, foi removido um fragmento de 2 cm do íleo (porção distal a 10 cm da junção ileocecal). O fragmento foi amarrado a dois ganchos de aço (um cada extremidade do fragmento), tendo um destes ganchos sido fixado à base da cuba e o outro conectado a um transdutor de força isométrica acoplado a um sistema de aquisição de dados (Biopac).

O fragmento do intestino permaneceu em uma cuba para órgão isolado contendo solução nutriente de Krebs (em mM: NaCl: 118; KCl: 4,7; CaCl<sub>2</sub>+H<sub>2</sub>O: 2,5; MgSO<sub>4</sub>+7H<sub>2</sub>O: 1,64; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 1,18; NaHCO<sub>3</sub>: 24,9; glicose: 11,1), com pH 7,4, mantida a 37°C e sob aeração constante com mistura carbogênica (95% O<sub>2</sub> e 5% CO<sub>2</sub>). Nos 30 minutos iniciais, o tecido permaneceu em repouso, antes da aplicação de qualquer substância.

Antes do início de cada experimento, os fragmentos de íleo, após o equilíbrio de tensão passiva de 1 g, foram desafiados com uma concentração fixa de acetilcolina (Ach) (10<sup>-6</sup> M), até apresentarem respostas constritoras semelhantes.

Para a elucidação do mecanismo de ação do extrato, o tecido foi submetido à presença de diferentes fármacos que permitem contrações sustentadas que determinam diferentes mecanismos inibitórios.

A partir de então, foram construídas curvas de concentração-efeito para acetilcolina (10<sup>-9</sup> a 10<sup>-4</sup> M) na presença de extrato de *Byrsonima intermedia*, nas concentrações de 0,1 mg/mL, 0,3 mg/mL, 1 mg/mL, 3 mg/mL e 10 mg/mL ou atropina, na concentração de 10<sup>-8</sup> M, em solução nutriente de Krebs normal.

Para confirmar o bloqueio de canais de Ca<sup>+2</sup>, o tecido foi mantido em solução livre de Ca<sup>+2</sup> e saturado com concentração fixa de acetilcolina (Ach) (10<sup>-6</sup> M), até não apresentar

resposta constritora. Posteriormente, foram aplicadas doses de extrato de *Byrsonima intermédia*, nas concentrações de 0,1 mg/mL, 0,3 mg/mL, 1 mg/mL, 3 mg/mL e 10 mg/mL ou nifedipina na concentração de  $10^{-6}$  M. Em seguida,  $K^+$  (80 mM) foi aderido ao tecido para que, assim, fosse possível construir curvas de concentração-efeito para  $CaCl_2$  ( $10^{-4}$  a  $10^{-1}$  M).

Para sustentar a hipótese do mecanismo mediado por canais de potássio, o tecido foi mantido em solução nutriente de Krebs normal. Posteriormente,  $K^+$  (80mM) foi aderido ao tecido e as curvas foram realizadas com doses crescentes de extrato de *Byrsonima intermedia* (0,1; 0,3; 1; 3; 10 mg/mL) e glibenclamida, nas concentrações de  $10^{-9}$  a  $10^{-4}$  M.

## 5.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro desvio padrão da média. Para a comparação de duas médias, foi aplicado o teste “t” de Student. Para comparação de três ou mais médias, utilizou-se a análise de variância (One-way), seguida do pós-teste de Newman-Keuls, quando foi apropriado. O nível estatístico para rejeição da hipótese de nulidade foi fixado em 5% ( $p < 0,05$ ).

## 6 RESULTADOS

O extrato aquoso de cascas de *Byrsonima intermedia* foi liofilizado e apresentou um rendimento de 16%.

### 6.1 CARACTERIZAÇÃO QUALITATIVA DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS

#### 6.1.1 ANTRAQUINONAS

Após a adição de amônia diluída, não se observou coloração rósea na camada aquosa da solução, considerando, então, que não há presença de antraquinonas neste extrato, como pode ser observado na Figura 3.

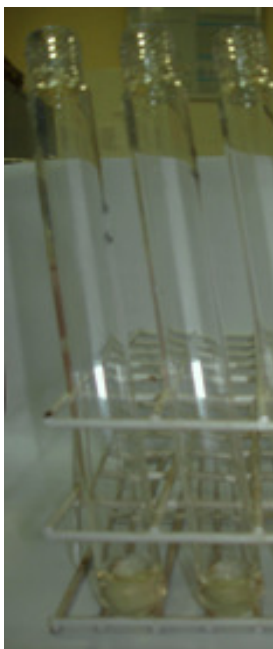


Figura 3: Triagem fitoquímica de antraquinonas no extrato liofilizado de *Byrsonima intermedia* A. Juss.

#### 6.1.2 TANINOS

##### 6.1.2.1 Reações com proteínas (gelatina)

Para este teste, observou-se formação de precipitado com a adição de gelatina, indicando a presença de taninos no extrato, conforme visto na Figura 4.

##### 6.1.2.2 Reações com sais de ferro

Neste teste, observou-se a formação de coloração verde-escura após adição de cloreto férrico, indicando a presença de taninos no extrato, como pode ser observado na Figura 4.

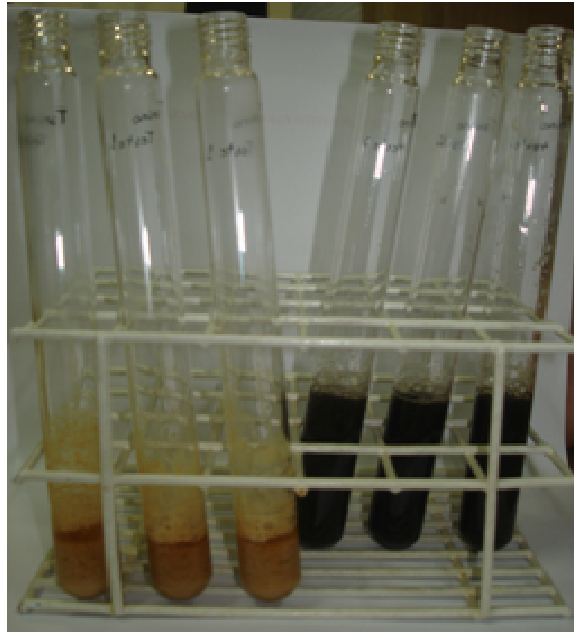


Figura 4: Triagem fitoquímica de taninos no extrato liofilizado de *Byrsonima intermedia* A. Juss.

### 6.1.3 ALCALOIDES

Após a adição de reagente de Dragendorff, não houve formação de precipitado, como se observa na Figura 5, podendo-se inferir que não há presença de alcaloides no ELBi.

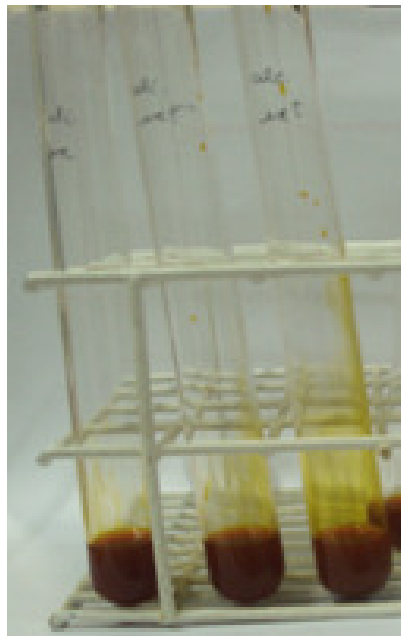


Figura 5: Triagem fitoquímica de alcaloides no extrato liofilizado de *Byrsonima intermedia* A. Juss.

#### 6.1.4 SAPONINAS

Conforme se observado na Figura 6, a presença de espuma com 20 minutos de repouso após agitação vigorosa do tubo de ensaio contendo extrato indicou a presença de saponinas no mesmo.

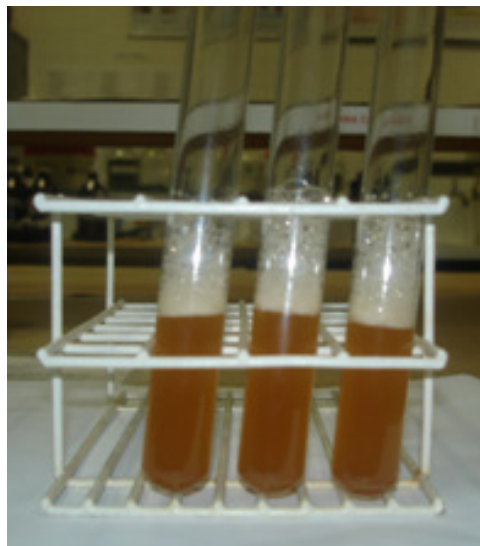


Figura 6: Triagem fitoquímica de saponinas no extrato liofilizado de *Byrsonima intermedia* A. Juss.

#### 6.1.5 ESTEROIDES E TRITERPENOS PENTACÍCLICOS

Uma coloração esverdeada foi observada após a adição de ácido clorídrico concentrado, conforme visto na Figura 7, indicando uma possível presença de esteroides e triterpenos pentacíclicos.

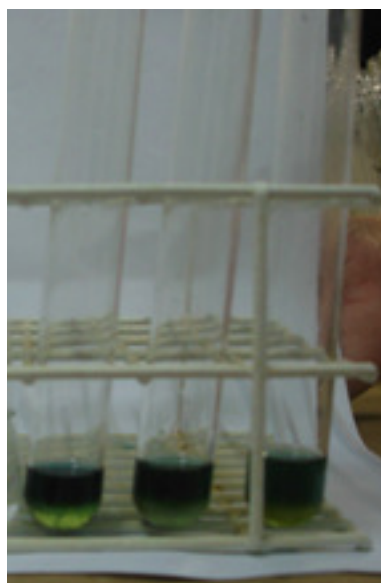


Figura 7: Triagem fitoquímica de esteroides e triterpenos pentacíclicos no extrato liofilizado de *Byrsonima intermedia* A. Juss.

## 6.1.6 FLAVONOIDES

### 6.1.6.1 Teste Shinoda

Após a adição de  $Mg^0$  e ácido clorídrico, observou-se uma mudança na coloração do extrato de bege para vermelho, revelando a presença de flavonoides, que foi confirmada com o teste de quantificação na presença de cloreto de alumínio.



Figura 8: Triagem fitoquímica de flavonoides no extrato liofilizado de *Byrsonima intermedia* A. Juss.

## 6.2 DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE COMPOSTOS FENÓLICOS E FLAVONOIDES

O conteúdo de compostos fenólicos foi determinado pelo método de Folin-Ciocalteu expresso em mg de ácido gálico/g de amostra e sua concentração foi de 37,3 mg/g. Já a quantificação dos flavonoides foi avaliada pelo método colorimétrico com alumínio expresso em mg de quercetina/g de amostra, e sua concentração foi de 6,3 mg/g.

## 6.3 CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO LIOFILIZADO DE CASCA DO CAULE DE *B. intermedia* POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUÇÃO (CLAE)

O perfil cromatográfico do extrato liofilizado de cascas de *B. intermedia* foi determinado por CLAE e o cromatograma foi monitorado em 272 nm (Figura 9). Na Figura 9 pode-se observar os compostos fenólicos presentes no extrato e seus tempos de retenção e seus máximos de absorção no espectro UV estão resumidos na Tabela 1. Observa-se que, conforme demonstrado no doseamento do conteúdo de fenóis e flavonoides, o extrato ELBi

possui compostos dessas classes, uma vez que o cromatograma obtido apresentou picos correspondentes a substâncias polares (cerca de 17 mAU).

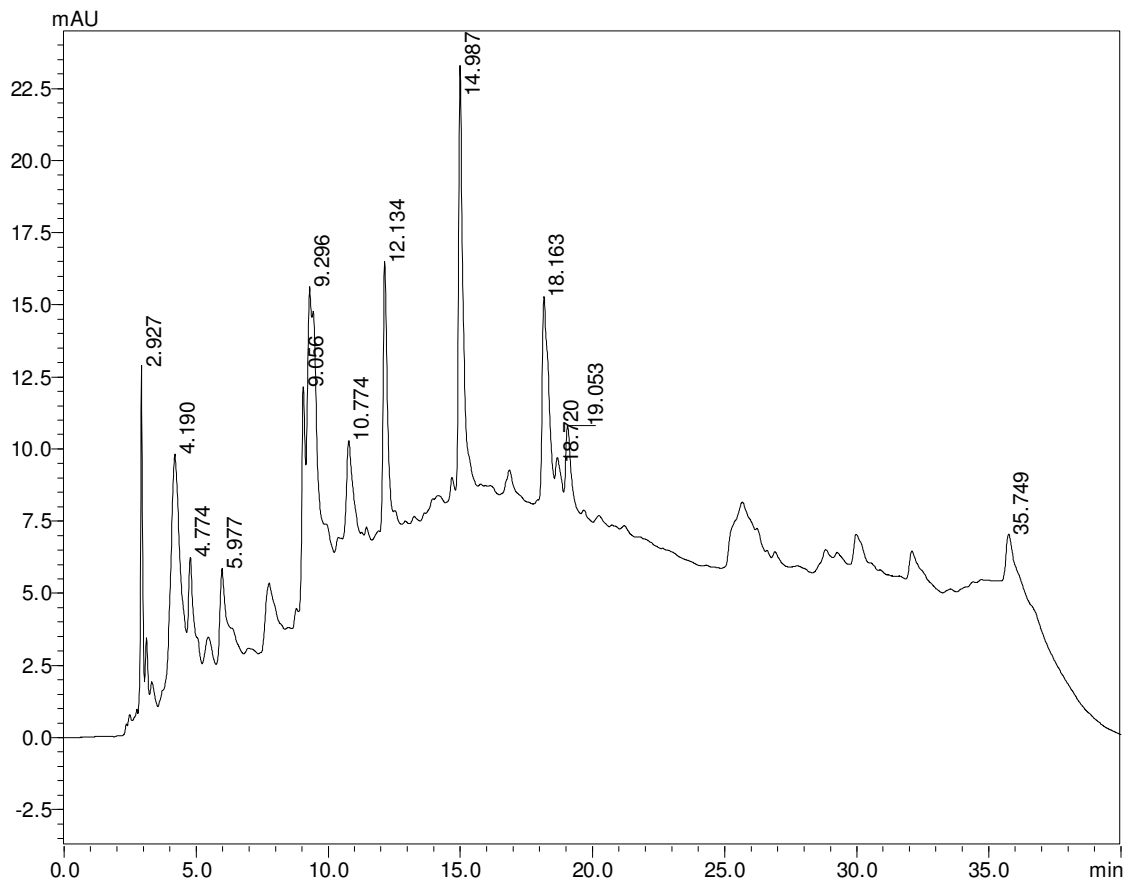


Figura 9: Perfil cromatográfico do extrato liofilizado de cascas de *Byrsonima intermedia* realizado por meio de cromatografia líquida de alta eficiência, monitorado em 272 nm.

Tabela 1: Tempo de retenção e máximo de absorção no ultravioleta do extrato liofilizado de cascas de *Byrsonima intermedia* monitorado por cromatografia líquida de alta eficiência

Tempo de retenção (min)	Máximo de absorção (nm)
2.927	261
4.190	275
4.774	275
5.977	279
9.056	279
9.296	278
10.774	279
12.134	279
14.987	306
18.163	354
18.720	282
19.053	268
35.749	278

#### 6.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA

##### 6.4.1 TESTE DA FORMALINA

O extrato liofilizado de cascas de *Byrsonima intermedia* mostrou um efeito antinociceptivo significativo, quando comparado com o controle nas doses de 100 e 300 mg/kg na primeira fase, e nas três doses de 30-300 mg/kg, na segunda fase. O fármaco de referência, indometacina, suprimiu somente a segunda fase no teste da formalina, enquanto a morfina inibiu ambas as fases, frente o estímulo da dor.



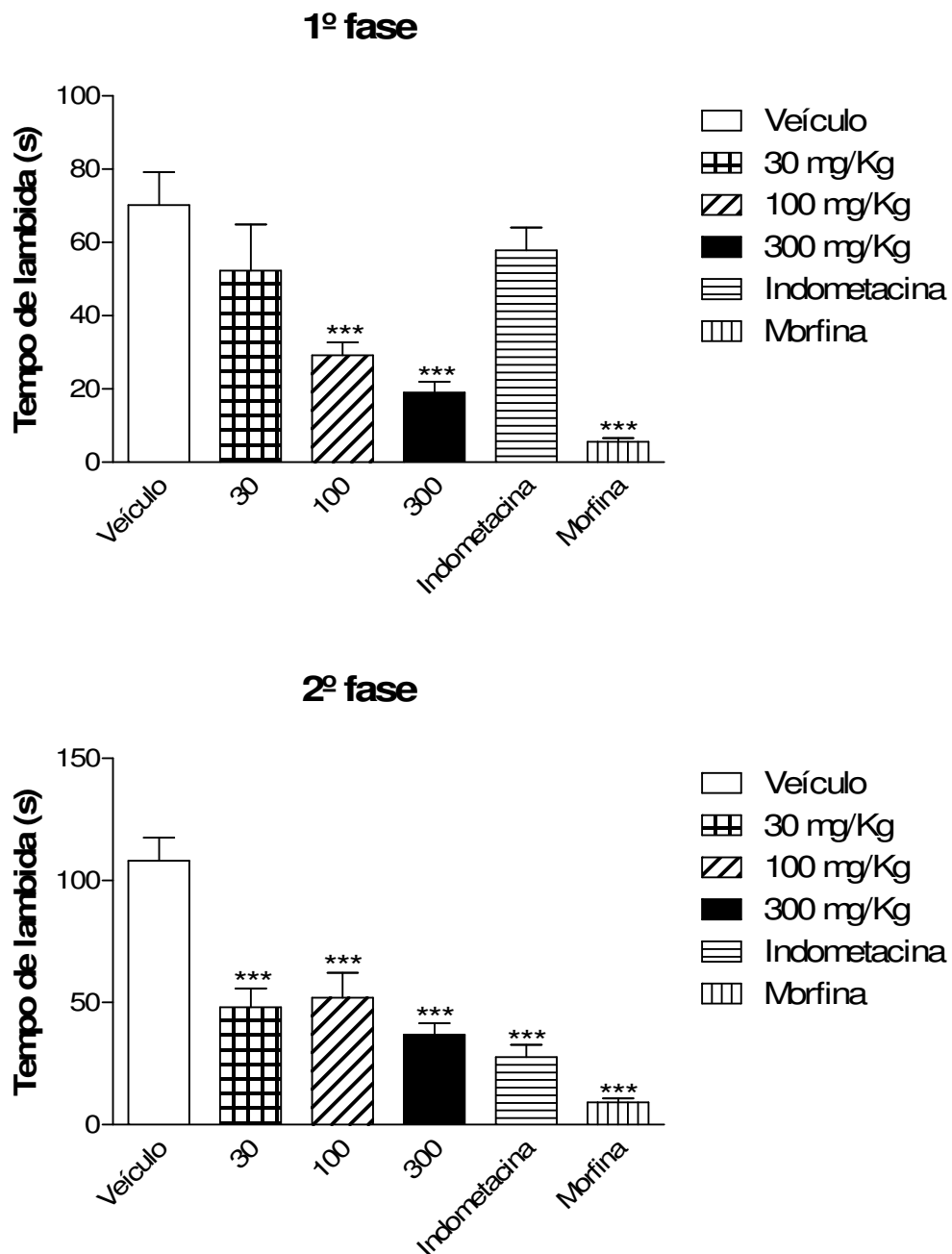


Figura 10: Efeito do extrato liofilizado de cascas de *Byrsonima intermedia* administrado por via oral sobre a lambida da pata induzida pela formalina em camundongos. Os animais foram pré-tratados oralmente com veículo, extrato liofilizado de cascas de *Byrsonima intermedia* (doses 30, 100, e 300 mg/kg), indometacina (5 mg/kg) ou morfina (10 mg/kg), antes da formalina. O tempo total de lambida da pata foi medido na primeira e na segunda fase após injeção intraplantar de formalina. Cada coluna representa a média com  $\pm$ S.E.M, para oito camundongos em cada grupo. Os asteriscos denotam o nível de significância, quando comparado com o controle Grupo: \*\*\* P <0,001.

#### 6.4.2 TESTE DA PLACA QUENTE

De acordo com a Figura 11, pode-se observar que o tratamento oral com extrato liofilizado de cascas de *Byrsonima intermedia*, em doses de 30-300 mg/kg, aumentou o tempo de latência em comparação ao grupo controle, assim como a morfina de forma significativa.

Para elucidar o mecanismo do efeito antinociceptivo de ELBi, os animais foram pré-tratados com naloxano. Na Figura 11 observa-se que o naloxano impediu a ação da morfina de maneira significativa apenas no tempo de 60 minutos, quando administrado com ELBi na dose de 100 mg/kg; o impedimento ocorreu no tempo de 30 minutos.

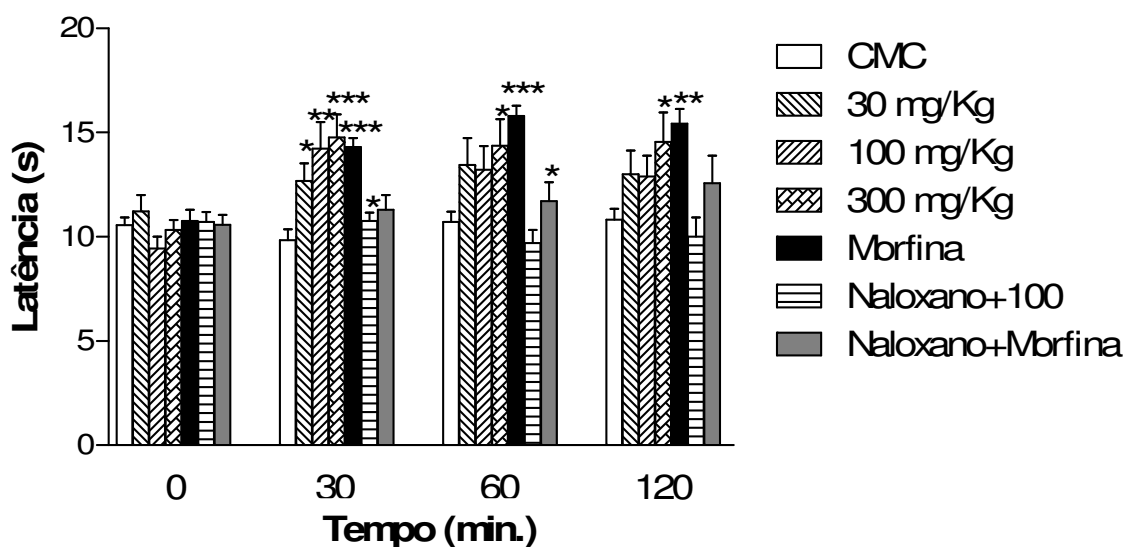


Figura 11: Efeito do extrato liofilizado de cascas de *Byrsonima intermedia* administrado por via oral, no teste da placa quente em camundongos. Os animais foram pré-tratados oralmente com veículo, extrato liofilizado de cascas de *Byrsonima intermedia* (doses 30, 100, e 300 mg/kg), morfina 1 mg/kg i.p., naloxano 0,4 mg/kg, i.p + extrato liofilizado de cascas de *Byrsonima intermedia* (dose 100 mg/kg) e naloxano + morfina (0,4 e 1 mg/kg, respectivamente) antes do teste da placa quente a 50°C. Cada coluna representa a média com  $\pm$ S.E.M. de oito camundongos por grupo. Os asteriscos denotam o nível de significância, quando comparado ao grupo controle (ANOVA de uma via seguido pelo teste de Newman-Keuls): \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ .

#### 6.4.3 TESTE DE VON FREY ELETRÔNICO

Na Figura 12 observa-se diminuição significativa no limiar da retirada da pata quando em contato com o filamento após três horas da injeção da carragenina nas três doses de 30-300 mg/kg de ELBi, assim como no tratamento com indometacina 10 mg/kg.

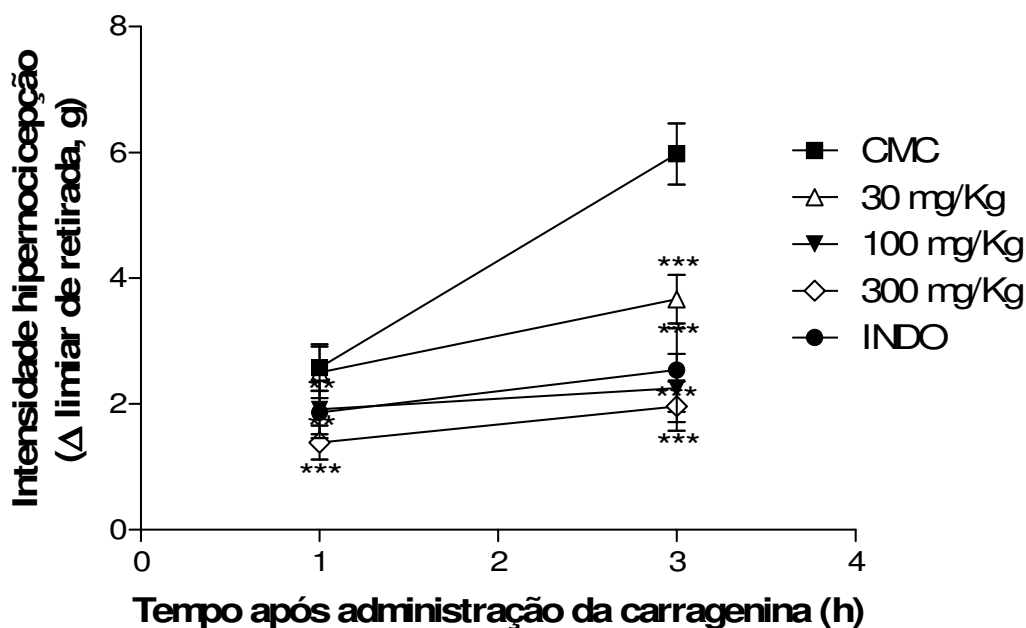


Figura 12: Efeito da administração de extrato liofilizado de cascas de *Byrsonima intermedia* ou indometacina (INDO-10 mg/kg) em hipernociceção induzida pela injeção intraplantar de carragenina (100 µg/pata) em camudongos, detectada pelo Von Frey eletrônico. Cada ponto representa a média  $\pm$ S.E.M. de sete animais por grupo. Os asteriscos denotam níveis de importância, quando comparados com o grupo veículo: \*\* P <0,01; \*\*\* P <0,001.

#### 6.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

##### 6.5.1 TESTE DO GRANULOMA – INDUÇÃO DO TECIDO GRANULOMATOSO

Neste modelo de inflamação crônica induzida por “pellets” de algodão, que leva ao crescimento de tecido fibrovascular em ratos, o extrato liofilizado de cascas de *Byrsonima intermedia* inibiu significativamente a formação do tecido granulomatoso, nas três doses de 30-300 mg/kg. O extrato, nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg, diminuiu o peso do granuloma em 37,9%; 36,9% e 45,4%, respectivamente, quando comparado com o controle dexametasona (10 mg/kg), que inibiu em 69,1% a formação do tecido granulomatoso.

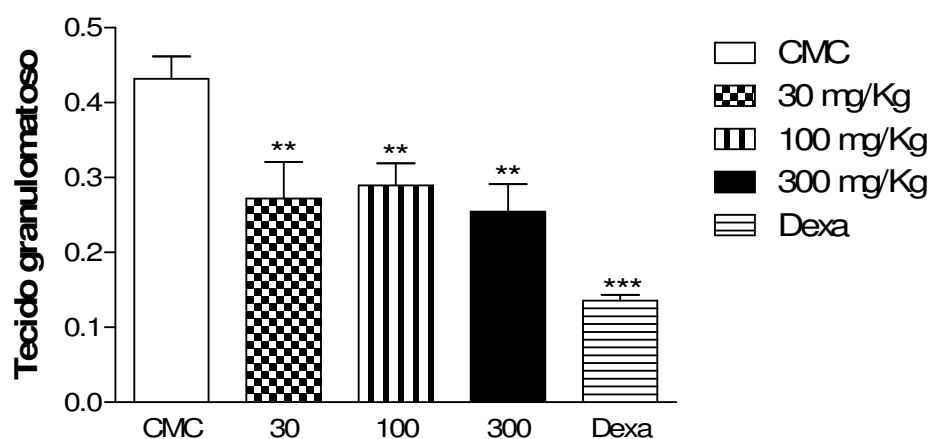


Figura 13: Efeito da administração de extrato liofilizado de cascas de *Byrsonima intermedia* ou dexametasona (DEXA-10 mg/kg) administrado por via oral sobre a formação do tecido granulomatoso. Cada barra representa a média  $\pm$ S.E.M. de oito animais. Os asteriscos denotam os níveis de significância quando comparado com o grupo controle: \*\* P <0,01; \*\*\* p <0,001.

#### 6.5.2 TESTE DE PERITONITE

Na Figura 14 observa-se que houve inibição significativa no recrutamento de leucócitos para a cavidade peritoneal em ratos. Os valores de inibição do recrutamento de leucócitos, após 4 horas de aplicação de LPS, foram de 21,4%, 32,3% e 40,12%, para extrato nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg, respectivamente. Indometacina (5mg/kg) inibiu da mesma forma que a dose de 300 mg/kg do extrato, 40,1%.

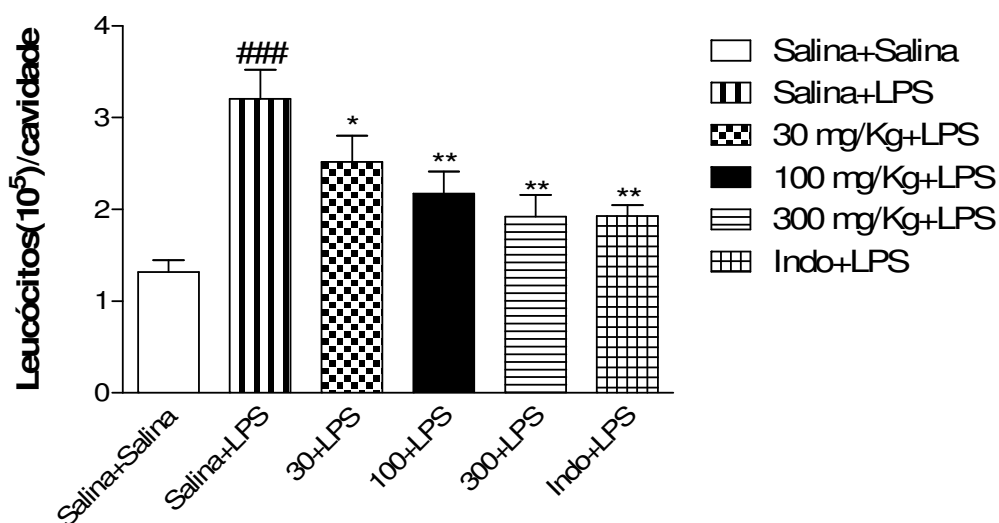


Figura 14: Efeito da administração de extrato liofilizado de cascas de *Byrsonima intermedia* ou indometacina (5 mg/kg) administrado por via oral, em recrutamento de leucócitos induzido por lipopolissacarídeo em cavidade intraperitoneal de ratos. Cada coluna representa a média

$\pm$ S.E.M. de oito animais por grupo. ## P <0,01 comparado com salina + grupo veículo. \* P <0,05; \*\* P <0,01 comparado com LPS + grupo veículo.

### 6.5.3 TESTE DE EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA

De acordo com a Figura 15, pode-se observar uma inibição significativa do edema de pata induzido por carragenina. Os valores de inibição do edema, após 3 horas da injeção de carragenina, foram de 11,8%, 31,06% e 25,2%, para as doses de 30, 100 e 300 mg/kg de extrato, respectivamente. Indometacina (5 mg/kg) inibiu 51,2% da formação do edema.

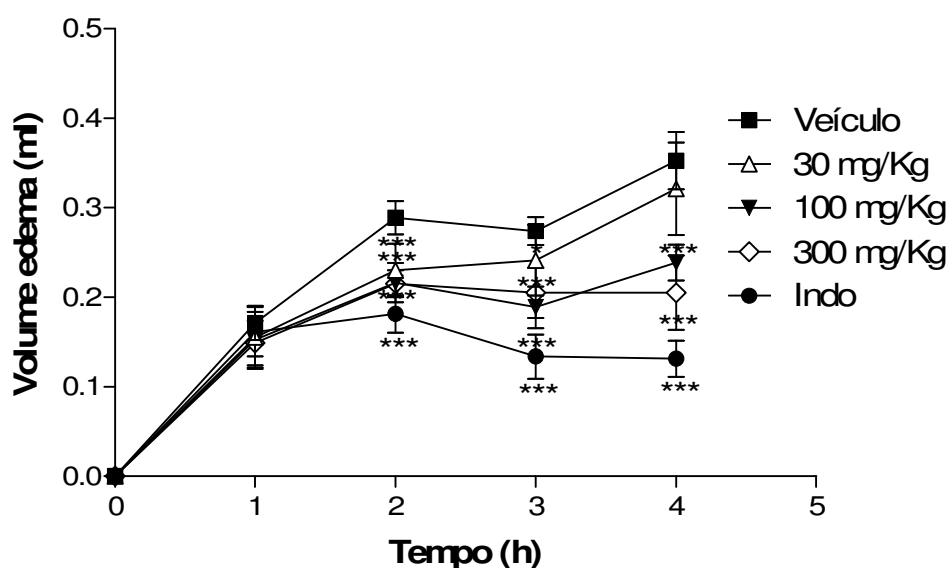


Figura 15: Efeito da administração do extrato liofilizado de cascas de *Byrsonima intermedia* ou indometacina (INDO-5mg/kg) em edema de pata em ratos induzido pela injeção intraplantar de carragenina (1 mg/pata). Cada ponto representa a média  $\pm$ S.E.M. de oito animais por grupo. Os asteriscos denotam níveis de importância, quando comparados com o grupo veículo: \*\*\* P <0,001.

## 6.6 ATIVIDADE ANTIDIARREICA *IN VIVO* E *IN VITRO*

### 6.6.1 AVALIAÇÃO *IN VIVO*

#### 6.6.1.1 TESTE DO TRÂNSITO INTESTINAL

Na avaliação do trânsito gastrointestinal foi observado que o comprimento médio percorrido pelo carvão, quando os animais foram pré-tratados com extrato liofilizado de *Byrsonima intermedia* nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg, foi diminuído. A dose de 300 mg/kg

diminui significativamente o trajeto percorrido pelo carvão, quando comparado com o controle.

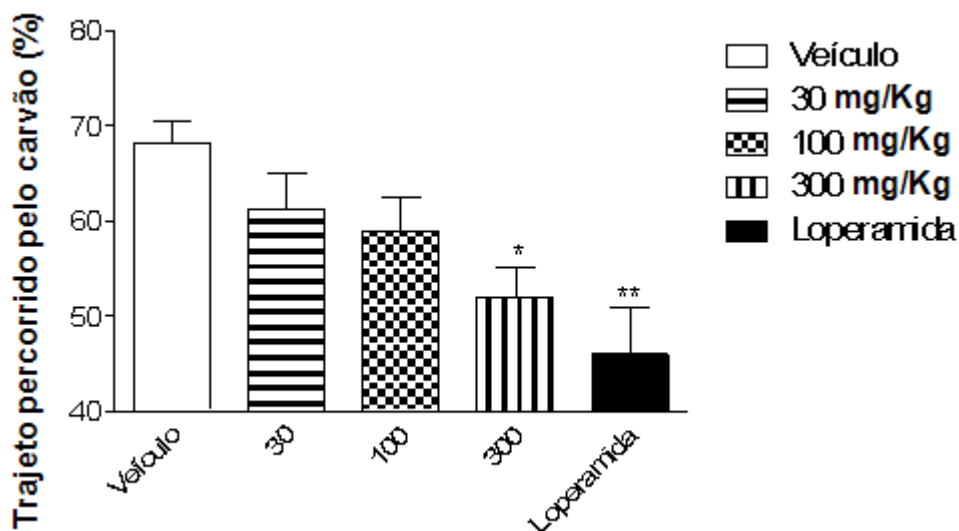


Figura 16: Efeito da administração do extrato liofilizado de cascas de *Byrsonima intermedia* ou cloridrato de loperamida (2 mg/kg) no índice peristáltico em ratos. Cada coluna representa a média  $\pm$ S.E.M. de oito animais por grupo. Os asteriscos denotam níveis de importância, quando comparados com o grupo veículo: \* P <0,05; \*\* P <0,01.

#### 6.6.2 AVALIAÇÃO *IN VITRO*

Na Figura 17 pode-se observar a curva concentração-resposta para ach ( $10^{-9}$  M- $10^{-4}$  M) em fragmento de íleo de rato. Houve menor resposta máxima ( $E_{máx}$ ) nos grupos tratados com extratos nas doses de 1; 3 e 10 mg/mL, quando comparados com o controle. Em relação à concentração de acetilcolina, que promove metade do efeito máximo (-Log EC50), houve um aumento de -Log EC50 no grupos que foram tratados com doses de 0,1 e 0,3 mg/mL, quando comparados com a atropina.

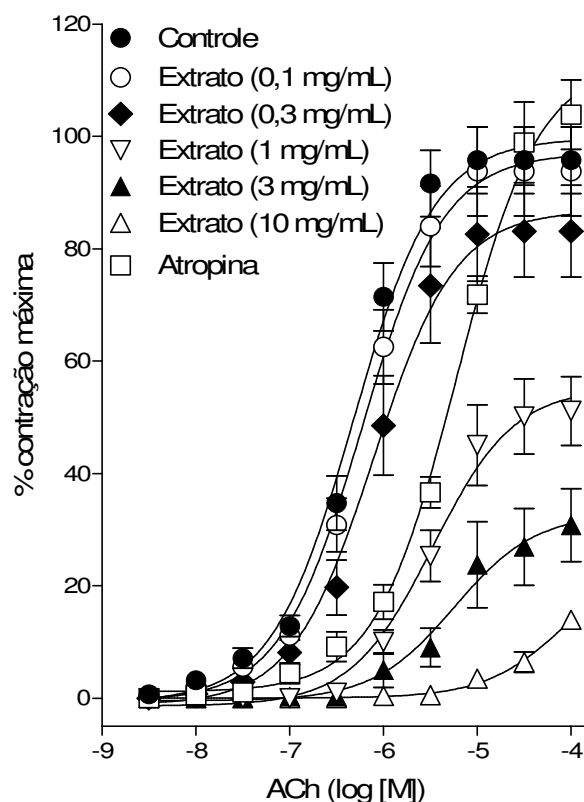


Figura 17: Efeito do extrato liofilizado de cascas de *Byrsonima intermedia* e atropina  $10^{-8}$  M sobre a resposta contrátil induzida por acetilcolina em fêo de ratos. Os dados representam a média  $\pm$ S.E.M. de seis animais por grupo.

Tabela 2- Efeito do extrato liofilizado de cascas de *Byrsonima intermedia* e atropina  $10^{-8}$  M sobre a resposta contrátil induzida por acetilcolina em fêo de ratos

	-log EC50	E <sub>max</sub> %
Controle	6,320 $\pm$ 0,07387	99,64 $\pm$ 2,643
Atropina	5,220 $\pm$ 0,05785	113,1 $\pm$ 3,551
ELBi 0,1 mg/mL	6,228 $\pm$ 0,08948	97 $\pm$ 3,215
ELBi 0,3 mg/mL	6,103 $\pm$ 0,1153	86,81 $\pm$ 3,902
ELBi 1 mg/mL	5,476 $\pm$ 0,1201	55,28 $\pm$ 3,319
ELBi 3 mg/mL	5,246 $\pm$ 0,2144	32,88 $\pm$ 3,866
ELBi 10 mg/mL	4,038 $\pm$ 0,2091	26,6 $\pm$ 6,898

Na Figura 18 observa-se uma curva concentração-resposta para  $\text{CaCl}_2$  ( $10^{-4}$ M- $10^{-1}$ M) em fragmento de fêo de rato. Houve uma menor resposta máxima (E<sub>máx</sub>) nos grupos tratados com extratos nas doses de 3 e 10 mg/mL, quando comparados com a nifedipina. Em relação à concentração de  $\text{Ca}^{+2}$ , que promove metade do efeito máximo (-Log EC50), houve um

aumento de  $-\text{Log EC}_{50}$  no grupos que foram tratados com doses de 0,1 e 0,3 mg/mL, quando comparados com o controle.

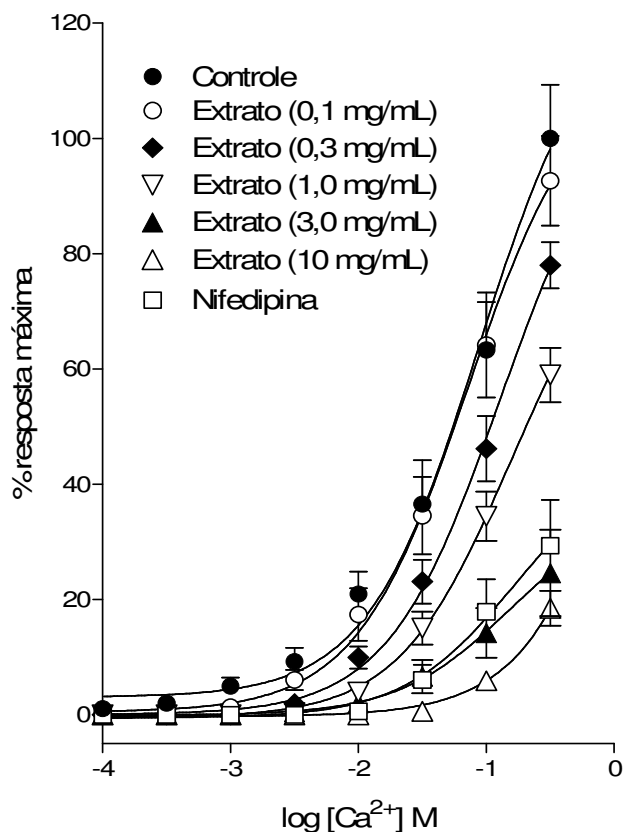


Figura 18: Efeito do extrato liofilizado de cascas de *Byrsonima intermedia* e nifedipina  $10^{-6}$  M sobre a resposta contrátil induzida por  $\text{CaCl}_2$  em íleo de ratos. Os dados representam a média  $\pm$ S.E.M. de seis animais por grupo.

Tabela 3- Efeito do extrato liofilizado de cascas de *Byrsonima intermedia* e nifedipina  $10^{-6}$  M sobre a resposta contrátil induzida por  $\text{CaCl}_2$  em íleo de ratos

	$-\log \text{EC}_{50}$	$\text{E}_{\text{max}} \%$
Controle	$1,059 \pm 0,1157$	$124,4 \pm 11,37$
Nifedipina	$0,7808 \pm 0,2759$	$45,47 \pm 12,81$
ELBi 0,1 mg/mL	$1,147 \pm 0,1058$	$112,4 \pm 8,990$
ELBi 0,3 mg/mL	$0,8993 \pm 0,08145$	$108,3 \pm 8,077$
ELBi 1 mg/mL	$0,8152 \pm 0,09460$	$87,79 \pm 8,193$
ELBi 3 mg/mL	$0,8245 \pm 0,2964$	$36,24 \pm 10,49$
ELBi 10 mg/ mL	$0,6698 \pm 1,815$	$29,42 \pm 11,55$



Nas Figuras 19 e 20 pode-se observar uma curva concentração-resposta para glibenclamida ( $10^{-9}$  a  $10^{-4}$  M) e extrato liofilizado de *Byrsonima intermedia* (0,1; 0,3; 1; 3; 10 mg/mL) em fragmento de íleo de rato. Esse tecido foi submetido à alta concentração de  $K^+$  (80 mM), em que podemos observar uma diminuição significativa da contratilidade do tecido diante dos dois tratamentos. A resposta máxima ( $Emáx$ ) para glibenclamida foi de  $96,71\% \pm 2,171$  e a concentração de glibenclamida, que promove metade do efeito máximo ( $-\text{Log EC}_{50}$ ) foi de  $5,944 \pm 0,1426$ . Já a resposta máxima do extrato foi de  $91,99\% \pm 2,251$  e a concentração de extrato que promove metade do efeito máximo ( $-\text{Log EC}_{50}$ ) foi de  $4,028 \pm 0,1177$ .

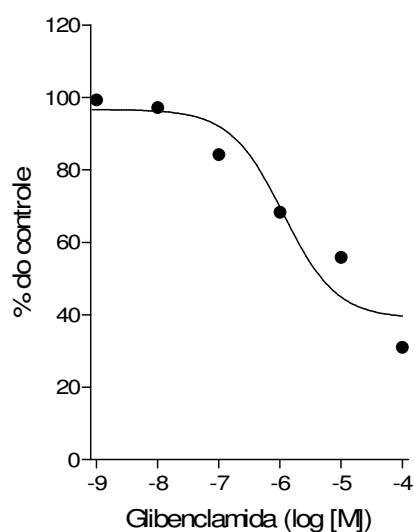


Figura 19: Efeito da glibenclamida sobre a resposta contrátil induzida por KCl em íleo de ratos. Os dados representam a média  $\pm$ S.E.M. de seis animais por grupo.

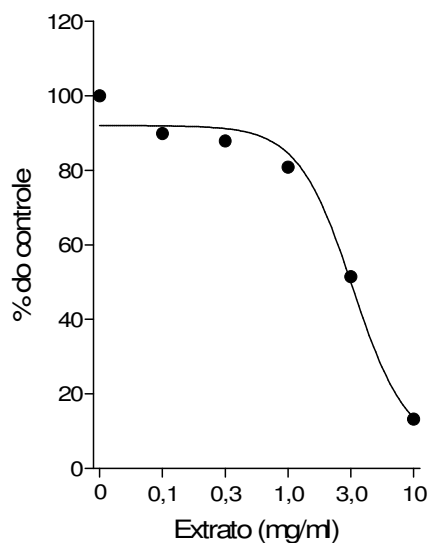


Figura 20: Efeito do extrato liofilizado de cascas de *Byrsonima intermedia* sobre a resposta contrátil induzida por KCl em íleo de ratos. Os dados representam a média  $\pm$ S.E.M. de seis animais por grupo.

## 7 DISCUSSÃO

A triagem fitoquímica do extrato ELBi revelou a presença de fenólicos totais e flavonoides, grupos de substâncias a que se podem atribuir as atividades estudadas nesta dissertação. Powell e Field (1980) revelaram que o ácido gálico, composto fenólico utilizado como padrão neste trabalho, tem potencial efeito como antidiarreico; já os flavonoides também têm sido associados por exercerem sua ação como anti-inflamatórios e analgésicos (GARCIA-LEME et al., 1973). Como foi detectado um teor de fenólicos totais de 37,3 mg de ácido gálico/g de amostra, podemos sugerir que uma parte desses compostos seja de taninos, já que o extrato apresentou baixa concentração de flavonoides, apenas 6,3 mg de quercetina/g de amostra. Correa (1984) afirma que a espécie *Byrsonima intermedia* apresenta cascas ricas em taninos (metabólitos secundários fenólicos), que tem atividade antidiarreica e anti-inflamatória, que são confirmadas pelos resultados obtidos no estudo farmacológico deste trabalho.

Em estudos realizados por Lima e seus colaboradores (2008), foi demonstrado que *Byrsonima fagifolia* tem significativa atividade contra diarreia induzida por óleo de rícino, que foi semelhante ao efeito produzido pela loperamida, fármaco padrão utilizado, assim como neste trabalho. A espécie também reduz a motilidade intestinal e essas atividades podem ser devido à presença de compostos fenólicos, principalmente flavonoides glicosilados.

Outra espécie do gênero estudado neste trabalho é a *Byrsonima cinera*, que também reduziu de forma significativa a motilidade intestinal em camundongos. Essa atividade pode estar relacionada com a presença de catequinas e flavonoides nos extratos polares desta planta (FIGUEIREDO et al., 2005).

Os dados obtidos neste trabalho mostram-se relevantes, já que corroboram aqueles realizados para espécies da mesma família.

A atividade antinociceptiva do extrato liofilizado de cascas de *Byrsonima intermedia* pode ser sugerida pela redução na liberação de mediadores inflamatórios ou o bloqueio dos receptores para estes mediadores, resultando em um efeito antinociceptivo periférico. Isto explica os resultados obtidos na segunda fase do teste de formalina.

O teste da formalina consiste em modelo com duas fases de avaliação distintas. A primeira fase (fase neurogênica), de curta duração, é causada pelo efeito direto da formalina nas fibras sensoriais C. A segunda fase (fase inflamatória), fase tardia, é associada com o desenvolvimento de uma resposta inflamatória e a liberação de mediadores nociceptivos (HUNSKAAR; HOLE, 1987). Esta fase corresponde à dor inflamatória que é inibida por anti-

inflamatórios não-esteroidais, como os inibidores da ciclo-oxigenase (HUNSKAAR; HOLE, 1987; TJØLSEN et al., 1992).

Neste teste, fármacos de ação central, como narcóticos, inibem ambas as fases igualmente, enquanto fármacos de ação periférica, como os anti-inflamatórios não-esteroidais e corticosteroides inibem somente a segunda fase (DICKENSON; SULLIVAN, 1987; DUBUISSON; DENNIS, 1977; YAKSH et al., 2001).

Nos resultados demonstrados na Figura 10 o tempo gasto para o animal lambear a pata ferida foi reduzido significativamente pela administração de extrato liofilizado de cascas de *Byrsonima intermedia*, nas doses de 100 e 300mg/kg, na primeira fase e nas três doses na segunda fase da hipernocicepção. Neste caso, podemos sugerir uma provável atividade anti-inflamatória do extrato. Sendo assim, o extrato deve exercer ação na liberação de serotonina, histamina, bradicinina e prostaglandina, que podem provocar sensibilização dos neurônios nociceptivos centrais (VERMA et al., 2005).

O teste da placa quente consiste em um modelo que avalia a nocicepção central; o efeito antinociceptivo de ELBi implica no envolvimento de componentes supraespinhais, bem como espinhais (YAKSH; RUDY, 1976; YAKSH; RUDY, 1977; YEUNG et al., 1977). Os resultados sugerem que o efeito antinociceptivo central de ELBi é mostrado pela resposta tardia, quando os animais são submetidos ao estímulo nociceptivo, neste caso, térmico, no teste da placa quente.

A procura por analgésicos opioides que atuam em seus receptores fora do sistema nervoso central tem sido realizada nos estudos com fármacos antinociceptivos, visando à diminuição dos efeitos colaterais, como tolerância e dependência (BENYHE, 1994; VANEGAS; TORTORICI, 2002). Para avaliar o sistema opioide envolvido no efeito antinociceptivo do ELBi, os animais foram pré-tratados com antagonista de receptor opioide, naloxano.

O método de von Frey eletrônico é utilizado para quantificar alodinia neuropática e hipernocicepção inflamatória em ratos (MOLLER et al., 1998; VIVANCOS et al., 2004). Os termos alodinia e hiperalgesia descrevem sintomas nociceptivos distintos nos homens (ONTTONEN; PERTOVAARA, 2000; VRINTEN et al., 2000) e filamentos de von Frey têm sido utilizados para medir o aumento da sensibilidade do nociceptor.

A hipernocicepção induzida pela carragenina pode ser detectada na pata inflamada dos camundongos, estimulando as patas com o filamento de von Frey. A indometacina, um anti-inflamatório não esteroide, muito empregada em dores inflamatórias, foi utilizada como fármaco padrão no teste de von Frey e atua como um seletivo inibidor de enzimas ciclo-

oxigenase (COX) (VANE; BOTTING, 1987; MITCHELL; WARNER, 1999; FERREIRA, 2002; SULEYMAN et al., 2007). Seu efeito analgésico se deve a uma série de mecanismos, incluindo um mecanismo central envolvendo inibição da síntese de prostaglandinas e, provavelmente, mudanças no sistema endocanabinoide monoaminérgico (MCCORMACK, 1994; PINI et al., 1995; BJORKMAN, 1995; SANDRINI et al., 2002; HAMZA; DIONNE, 2009).

Os resultados sugerem que o efeito antinociceptivo periférico de ELBi avaliado pela diminuição da intensidade de hipernocicepção no teste de von Frey se dá pela inibição ou redução na síntese de mediadores.

O método de granuloma induzido por “pellets” de algodão tem sido amplamente empregado para avaliar componentes transudativos, exsudativos e proliferativos da inflamação crônica, devido ao fato de o peso seco dos “pellets” denotar a quantidade de tecido granulomatoso (SWINGLE; SHIDEMAN, 1972).

A atividade anti-inflamatória do extrato foi avaliada após o oitavo dia de tratamento com extrato liofilizado de cascas de *Byrsonima intermedia*, por meio da diferença de peso dos granulomas implantados. Assim sendo, o extrato diminuiu significativamente o peso dos “pellets”, quando comparado com o fármaco padrão, dexametasona, sugerindo uma potencial redução do número de fibroblastos e da síntese de colágeno e mucopolissacarídeo, eventos proliferativos naturais na formação do tecido granulomatoso (ARRIGONI, 1977).

Peritonite é uma condição inflamatória associada com morbidade e mortalidade e sua etiologia infecciosa inclui bactérias, fungos e parasitas. Um componente bacteriano muito estudado é o lipopolissacarídeo (LPS), presente na membrana externa da parede celular de bactérias gram-negativas, muito importante na indução de eventos fisiopatológicos durante a inflamação e sepse (GIUSTI-PAIVA et al., 2003). LPS (lipopolissacarídeo) se liga a receptores do tipo Toll (TLR4) presentes em células fagocíticas e produz citocinas pró-inflamatórias e migração leucocitária (DANTZER, 2009). Peritonite induzida por LPS (lipopolissacarídeo) assemelha-se a uma infecção bacteriana e representa um modelo de estudos para inflamação peritoneal aguda (CUNHA et al., 1989; VILELA et al., 2010).

Em estudos realizados anteriormente, peritonite induzida por LPS (lipopolissacarídeo proveniente de *E. coli* sorotipo 026: B6-Sigma) provocou um aumento significativo no recrutamento de leucócitos em cavidades peritoneais em ratos, quando comparado com grupo controle tratado apenas com veículo (CUNHA et al., 1989).

O recrutamento de células durante a inflamação depende de uma liberação de mediadores locais que são responsáveis por alterar o tecido e recrutar células hospedeiras de defesa (THOMAZZI et al., 2010).

Neste modelo experimental, os resultados demonstraram que o pré-tratamento com extrato liofilizado de cascas de *Byrsonima intermedia* reduziu significativamente o número de células recrutadas, demonstrando a presença de possíveis agentes anti-inflamatórios ativos no extrato.

O teste mais utilizado para a seleção de agentes anti-inflamatórios é o edema induzido por carragenina em pata de animais (CHEN et al., 2008), que é frequentemente utilizado para avaliar o efeito anti-edematogênico de produtos naturais (THOMAZZI et al., 2010). A resposta inflamatória induzida por carragenina é caracterizada por uma resposta bifásica que resulta na formação do edema com rápida produção de vários mediadores inflamatórios (MENDES et al., 2010). A primeira fase é caracterizada pela liberação de histamina, serotonina e bradicinina, enquanto a fase tardia é caracterizada pela produção de prostaglandina (OGONOWSKI et al., 1997).

A resposta inflamatória é quantificada pelo aumento do tamanho da pata (formação do edema) e é modulada por inibidores específicos que ativam uma cascata inflamatória, como os anti-inflamatórios não esteroidais (MORRIS, 2003).

Neste caso, o tratamento com extrato liofilizado de cascas de *Byrsonima intermedia* foi efetivo na resposta de redução edematogênica causada pela injeção de carragenina e o efeito nas doses de 100 e 300 mg/kg foi similar àquele exibido pelo grupo tratado com indometacina na terceira hora.

Pode-se sugerir que o efeito foi devido à redução de liberação de mediadores, como histamina, serotonina e/ou bradicinina, no local da inflamação ou por bloquear receptores de diferentes mediadores citados anteriormente.

Diarreia é a passagem frequente de fezes líquidas e envolve tanto um aumento da motilidade do trato gastrointestinal, quanto o aumento da secreção e a diminuição da absorção de líquido e, portanto, uma perda de eletrólitos (particularmente de sódio) e água (RANG et al., 2003).

Assim, para restaurar o conforto pessoal, muitos pacientes necessitam de terapia antidiarreica e o tratamento é realizado para alcançar, entre outros objetivos, aumento da resistência ao fluxo (contração segmentar, redução da propulsão e peristaltismo) e aumento da absorção da mucosa ou diminuição da secreção (BURKS, 1991; AKINDELE; ADEYEMI, 2006).

Os dados obtidos pelo teste de trânsito intestinal demonstram que o extrato liofilizado de cascas de *Byrsonima intermedia* na dose de 300 mg/kg provocou uma diminuição do trajeto percorrido pelo carvão ativo. A loperamida, um fármaco antidiarreico tradicional utilizado no teste, também demonstrou tal efeito.

A loperamida, um derivado opioide, retarda a motilidade intestinal por agir nos receptores opioides no plexo submucoso neural da parede intestinal (ALTMAN, 2001; CAMILLEN et al., 2002; WALLER et al., 2005).

Em estudos “in vitro” e em animais foi demonstrado que o cloridrato de loperamida, atua em receptores  $\mu$  plexos submucoso e mioentérico, diminuindo a motilidade intestinal propulsiva por ação direta sobre as camadas musculares circular e longitudinal da parede intestinal, por reduzir a liberação de mediadores que promovem a contração da musculatura lisa. Nos seres humanos, ele prolonga o tempo de trânsito intestinal, reduz o volume fecal diário e diminui a perda de água e eletrólitos. Também aumenta o tônus do esfíncter anal, reduzindo a sensação de urgência e a incontinência fecal. Em virtude de sua alta afinidade pela parede intestinal e intensa metabolização na primeira passagem pela circulação hepática, a quantidade do cloridrato de loperamida que atinge a circulação sistêmica é muito limitada. Dessa forma, não atua sobre receptores opioides no sistema nervoso central.

Nesse contexto, foram realizados testes sobre a motilidade intestinal “in vitro”, utilizando diferentes mediadores para descobrir um possível mecanismo de ação do extrato, já que foi confirmada uma diminuição da motilidade intestinal pelo teste do trânsito intestinal.

A acetilcolina é um neurotransmissor do sistema nervoso parassimpático que estimula o trato gastrointestinal por meio da ativação dos receptores muscarínicos (BROWN; TAYLOR, 2006). A atropina, um antagonista de receptor muscarínico, inibe a motilidade gastrointestinal, reduz a secreção de fluidos intestinais e atrasa o esvaziamento gástrico, melhorando, assim, a diarreia (ADEYEMI; AKINDELE, 2006). Uma vez que o extrato foi capaz de reduzir o efeito contrátil máximo induzido pela acetilcolina (e não apenas deslocando a curva para a direita), isso indica que ele poderia interferir nos processos contracteis. Dessa forma, observou-se que o extrato pode reduzir a força contrátil, sendo assim foi estudado a influencia do extrato sobre as contrações induzidas pela despolarização celular (por aumento de  $K^+$  extracelular) e avaliado uma possível influencia do extrato sobre os canais de cálcio.

Concentração alta de potássio causa contração do músculo liso através da abertura de canais de cálcio, permitindo, assim, o influxo extracelular de cálcio, causando um efeito contrátil (BOLTON, 1979). Dessa forma, em uma preparação com alta concentração de potássio e ausência de cálcio, é possível construir uma curva concentração-efeito para  $Ca^{++}$ .

Nossos resultados mostraram que o extrato reduziu a contratilidade do fragmento de intestino, de forma similar ao bloqueador de  $\text{Ca}^{2+}$  (nifedipina) (GODFRAIND et al., 1986). Também foi possível verificar que o extrato relaxou a preparação com alta concentração de potássio e, na presença de cálcio, foi possível verificar relaxamento similar ao bloqueador dos canais de  $\text{K}^+$ , indicando que este também poderia ser um dos possíveis mecanismos de ação do extrato sobre a redução da contratilidade da musculatura lisa intestinal, resultando em redução do trânsito e, conseqüentemente, dando suporte ao uso do extrato para o tratamento da diarreia.

## 8 CONCLUSÃO

Neste trabalho mostrou-se o efeito do extrato liofilizado da casca do caule de *Byrsonima intermedia* em diferentes respostas antinociceptivas geradas por estímulo nocivo químico produzido por injeção de formalina ou carragenina, ou por estímulo nocivo térmico no teste de placa quente.

O extrato ELBi também apresentou um efeito anti-inflamatório, uma vez que diminuiu o peso do granuloma no teste realizado, assim como reduziu o edema de pata induzido por carragenina e a migração leucocitária induzida por LPS no teste de peritonite, semelhante à indometacina.

Os dados do teste para o efeito do ELBi na motilidade intestinal indicam uma redução no comprimento médio percorrido pelo carvão no teste do trânsito intestinal. O extrato também apresenta resposta semelhante aos fármacos padrões utilizados no teste “in vitro”, como a atropina, a nifedipina e a glibenclamida.

Estes efeitos podem estar associados à presença de metabólitos secundários presentes na espécie em estudo, como taninos.

Como *Byrsonima intermedia* é conhecida e utilizada popularmente, é essencial esclarecer os mecanismos de ação do extrato, bem como isolar substâncias que possam ser responsáveis pelos efeitos apresentados neste trabalho.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULLAHI, A. L., et al. Antidiarrhoeal activity of the aqueous extract of *Terminalia avicennoides* roots. **Phytotherapy Research**, v.15, p. 431–434, 2001.

ADEYEMI, O. O. et al. Evaluation of the antidiarrhoeal effect of *Sansevieria liberica* Gerome & Labroy (Agavaceae) root extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 123, p. 459-63, 2009.

ADEYEMI, O. O., AKINDELE, A. J. Antidiarrhoeal activity of the ethyl acetate extract of *Baphia nitida* (Papilionaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, p. 407-412, 2008.

AFROZ, S., et al. Antidiarrhoeal activity of the ethanol extract of *Paederia foetida* Linn. (Rubiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, n. 1-2, p. 125–130, 2006.

AGBOR, G. A. et al. The antidiarrhoeal activity of *Alchornea cordifolia* leaf extract. **Phytotherapy Research**, v.18, p. 873–876, 2004.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Resolução-RDC n.14, de 31 de março de 2010. **Diário Oficial da União**, n. 63, p.85, 5 abr., 2010.

AGNATI, L. F., et al. Pain, analgesia and stress: an integrated view. **Clinical Journal Pain**, n. 7, p. 23-37, 1991.

AGUIAR, R. M., et al. Unusual naphthoquinones, catechin and triterpene from *Byrsonima microphylla*. **Phytochemistry**, v.66, p. 2388–2392, 2005.

AKAH, P. A., et al. Studies on the antidiarrhoeal properties of *Pentaclethra macrophylla* leaf extracts. **Phytotherapy Research**, v.13, p. 292–295, 1999.

AKERELE, O. Summary of WHO guidelines for the assessment of herbal medicines. **Herbal Gram**, n. 28, p.13-19, 1993.

AKINDELE, A. J., ADEYEMI, O. O. Evaluation of the antidiarrhoeal activity of *Byrsocarpus coccineus*. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 108, p. 20–25, 2006.

ALDERTON, W. K., et al. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochemical Journal**, n.357, p. 593-615, 2001.

ALLEN S. J., et al. Probiotics for treating infectious diarrhoea. **Cochrane Database Systematic Reviews**. n.4. 2003.

ALTMAN, D. F. Drugs used in gastrointestinal diseases. In: Katzung, B.G. (Ed.). **Basic and Clinical Pharmacology**, 8. ed. San Francisco: McGraw-Hill, 2001, p. 1070–1071.

AMABEOKU, G. J. Antidiarrhoeal activity of *Geranium incanum* Burm. f. (Geraniaceae) leaf aqueous extract in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 123, p. 190–193, 2009.

AMARAL, F. M. M., et al. Plants and chemical constituents with giardicidal activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, n. 16, p. 696-720, 2006.

ANASTASI, J. K., et al. Diarrhea and human immunodeficiency virus: a possible synergy for clinical practice **Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 3, n. 2, p. 163–168, 1997.

ANDERSON, W. R. Floral conservatism in neotropical Malpighiaceae. **Biotropica**, 1979a.

ANDERSON, W. R. The origin of the Malpighiaceae: the evidence from morphology. **Memoirs of the New York Botanical Garden**, n. 64, p. 210-224, 1990b.

ARAWWAWALA, M., et al. Anti-inflammatory activity of *Trichosanthes cucumerina* Linn. in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, p. 538–543, 2010.

ARRIGONI, M. E., Prostaglandins: possible mechanism of anti-inflammatory drugs. In: Inflammation and Anti-inflammatories. **Spectrum Publication**, New York, p. 119–120, 1977.

ASHBURN, M. A.; STAATS, P. S. Management of chronic pain. **Journal Lancet**, n. 353, p. 1865-1869, 1999.

BAJAD, S., et al. Antidiarrhoeal activity of piperine in mice. **Planta Medica**, n. 67, p. 284–287, 2001.

BANJI, et al. Antidiarrhoeal Activity of the Alcoholic Extract of the Leaves of *Butea frondosa* Koen. Ex Roxb **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 72, p. 238-240, n. 2, 2010.

BARROSO, G. M. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. Universidade Federal de Viçosa, MG. 1991.

BEJAR, E., et al. Constituents of *Byrsonima crassifolia* and their spasmogenic activity. **International Journal of Pharmacognosy**, n. 33, p. 25–32. 1995.

BENYHE, S. Morphine: new aspects in the study of an ancient compound. **Life Sciences**. n. 55, p. 969-979, 1994.

BERNARD, J. F. et al. Involvement of the spinobarabrachio-amygdaloid and hypothalamic pathways in the autonomic and effective emotional aspects of pain. **Progress in Brain Research**, n. 107, p. 243-255, 1996.

BJORKMAN, R. Central antinociceptive effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs and paracetamol. Experimental studies in the rat. **Acta Anaesthesiologica Scandinavica Supplementum**, n. 103, p.1-44, 1995.

BOLTON, T. B. Mechanism of action of transmitters and other substances on smooth muscles. **Physiological Review**, n. 59, p.606-718, 1979.

BONZANI DA SILVA, J. Gallic acid, pyrogallol, and pyrocatequine in *Byrsonima intermedia latifolia*. **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v. 8, p.187-192, 1970a.

BONZANI DA SILVA, J.  $\beta$ -Amyrin in roots of *Byrsonima intermedia*. **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, v. 8, p. 53-67. 1970b.

BRESOLIN, T. M. B.; CECHINEL FILHO, V. **Ciências químico-farmacêuticas: Contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos**. Itajaí: UNIVALI, 2003.

BRIJESH, S., et al. Studies on *Pongamia pinnata* (L.) Pierre leaves: understanding the mechanism(s) of action in infectious diarrhea. **Journal of Zhejiang University Science B**, v. 7, n. 8, p. 665–674, 2006.

BROWN, J. H.; TAYLOR, P. Cholinergic agonists. In: **The Pharmacological Basis of therapeutics**. 11. ed. New York: McGraw-Hill, 2006, p.183-200.

BRUNE, K.; HINZ, B. The discovery and development of anti-inflammatory drugs. **Arthritis and Rheumatism**, v.50, p. 2391-2399, 2004.

BURKS, T.F. Gastrointestinal drugs. In: Kist, K. (Ed.), **Human Pharmacology: Molecular to Clinical**. London: Wolfe Publishing Ltd., 1991. p. 789– 800.

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

CALIXTO, J. B., et al. Naturally occurring antinociceptive substances from plants. **Phytotherapy Research**, v.14, p. 401–418, 2000.

CALIXTO, J. B.; OTUKI, M. F.; SANTOS, A. R. S. Antiinflammatory compounds of plant origin: Part I. Action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor Kb (NF-Kb). **Planta Medica**, v.69, p. 1-12, 2003.

CAMILLEN, M., et al. Consensus report: clinical mechanisms, diagnosis and management of irritable bowel syndrome. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, n. 16, v. 8, 1407, 2002.

CARVALHO, J. C. T. **Validação química-farmacológica da espécie vegetal *Pterodon emarginatus* Vog. (Atividade antiinflamatória)**. Tese (Doutorado) - FCF/USP, São Paulo. p. 220, 1998.

CARVALHO, M. M. J. **Dor, um estudo multidisciplinar**. São Paulo: Summus Editorial, 1999.

CAVALCANTI, I. L.; MADDALENA, M. L. **Dor**. Rio de Janeiro: SAERJ, 2003.

CHAN, A. C.; CARTER, P. J. Therapeutic antibodies for autoimmunity and inflammation. Nature reviews. **Immunology**, n. 10,p. 301-316, 2010.

CHEN, L. G., et al. Anti-inflammatory activity of mangostins from *Garcinia mangostana*. **Food and Chemical Toxicology**, n. 46, p. 688–693, 2008.

CIOCALTEU, V. **J. Biol Chem.** v.73, p.627-650, 1927.

CORRÊA, M. P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura - IBDF, v. I-VI, 1984.

CUNHA, F. Q., et al. In-vivo blockage of neutrophil migration by LPS is mimicked by a factor released from LPS-stimulated macrophages. **British Journal of Experimental Pathology**, n. 70, p.1-8, 1989.

CUNHA, T. M. et al. An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. **Brazilian Journal Medical Biological Research**, v. 37, n.3, p. 401-407, 2004.

DANTZER, R. Cytokine, Sickness Behavior and Depression. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, n. 29, p. 247–264, 2009.

DICKENSON, A. H.; SULLIVAN, A. F. Peripheral origins and central modulation of subcutaneous formalin-induced activity of rat dorsal horn neurones. **Neuroscience Letters**, v. 83, p. 207–211. 1987.

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

EDDY, N. B; LEIMBACK, D. **Journal of Pharmacology Experimental Therapeutics**, n.107, p. 385 -393, 1953.

ELISABETSKY., E., et al. Analgesic activity of *Psychotria colorata* (Willd. ex R. & S.) Muell. Arg. alkaloids. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 48, p.77-83, 1995.

**FARMACOPÉIA** Brasileira. 5.ed. São Paulo: Siqueira, 2010.

FARNSWORTH, N. R. et al. **Medicinal plants in therapy**. Bull World Health Organ, v. 63, n.6, p. 965-981, 1985.

FELÍCIO, J. D., et al. Triterpenos isolados de folhas de três espécies de *Byrsonima*. **Arquivos do Instituto de Biologia**. São Paulo. 62, p.91-92, 1995.

FERRÁNDIZ, M. L.; ALCARAZ, M. J. Anti-inflammatory activity in inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. **Agents Actions**, n. 32, p. 283-288, 1991.

FERREIRA, S. H. Peripheral analgesic sites of action of anti-inflammatory drugs. **International Journal Clinical Practice Supplement**, n. 128, p. 2-10, 2002.

FERREIRA, M. B. **Frutos comestíveis nativos do Distrito Federal-IV**. Fundação Zoobotânica do DF. p. 15-21, 1973.

FIELD, M. Intestinal ion transport and the pathophysiology of diarrhea. **Journal of Clinical Investigation**, v. 111, n. 7, p. 931-943, 2003.

FIGUEIREDO M. E. et al. Avaliação química e anti-diarréica das folhas de *Byrsonima cinera* DC. (Malpighiaceae). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, n. 41, p. 79-83, 2005.

FLECKENSTEIN, A. Specific pharmacology of  $Ca^{++}$  in myocardium cardiac pacemakers and vascular smooth muscle. **Reviews of Pharmacology and Toxicology**, n. 17, p.149-166, 1977.

GALLIN, J. I., et al. **Overview in inflammation: basic principles and clinical correlates**. Hagerstown: Lippincott, Williams and Wilkins, 3. ed., 1360p. 1999.

GALVÃO, F. H. F, et al. Permeabilidade intestinal de intestino delgado de ratos, preservados hipotermicamente com as soluções da Universidade de Winsconsin e Euro-collins **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 8, p. 54-58, 1993.

GALVEZ, J. et al. Antidiarrhoeic activity of *Euphorbia hirta* extract and isolation of an active flavonoid constituent. **Planta Medica**, v. 59, p. 333-336, 1993.

GANONG, W. The stress response: a dynamic overview. **Hospital Practice**, n. 23, p.155-190, 1988.

GARCIA, C. G., et al. Photoelectrochemical solar cell using extract of *Eugenia jambolana* Lam as a natural sensitizer **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 75, n. 2, p. 163-165, 2003.

GARCIA-LEME, J., et al. Pharmacological analysis of the acute inflammation process induced in rat's paw by local injection of carrageenan and heating. **British Journal of Pharmacology**, n. 64, p. 91-98, 1973.

GIULIETTI, A.M. **Byrsonima do Distrito Federal**. Cood. Mário Guimarães Ferri. EDUSP & Editora Edgar Bluches Ltda. 1971, p. 133-149, III Simpósio sobre cerrado.

GIUSTI-PAIVA, A., et al. Role of nitric oxide in lipopolysaccharide-induced release of vasopressin in rats. **Neuroscience Letters**, n. 346, p. 21–24. 2003.

GODFRAIND T, et al. Calcium antagonism and calcium entry blockade. **Pharmacological Reviews**, n. 38, p. 321-416. 1986.

GRIGG, P. et al. Mechanical sensitivity of group III and IV afferents from posterior articular nerve in normal and inflamed cat knee. **Journal of Neurophysiology**, n.55, p. 2531-2538, 1986.

HAMZA, M.; DIONNE, R.A. Mechanisms of non-opioid analgesics beyond cyclooxygenase enzyme inhibition. **Current Molecular Pharmacology**, v.2, n.1, p.1-14, 2009.

HOSKIN, P. J.; HANKS, G. W. Opioid agonist – antagonist drugs in acute and chronic pain states. **Drugs**, n. 41, p. 326-344, 1991.

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

JACOBS, J., et al. Homeopathic combination remedy in the treatment of acute childhood diarrhea in Honduras. **Journal of Alternative and Complementary Medicine**, v. 12, n. 8, p. 723–732, 2006.

JOLY, A. B. **Botânica**: introdução à taxonomia vegetal. 4. ed. São Paulo: Nacional, 1977. 777 p.

JONES, S. L. Dypirone into the nucleous raphe magnus inhibits the rat nociceptive tail flick reflex. **European Journal of Pharmacology**, n. 318, p. 37-40, 1996.

JUDD, W.S., et al. Plant Systematics: a phylogenetic approach. **Sinauer Associates**, Sunderland. 1999.

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

KALIA, et al. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n.21, p.10129-134, 2008.

KAPIKIAN, A. Z., et al. Jennerian and modified Jennerian approach to vaccination against rotavirus diarrhea using a quadrivalent rhesus rotavirus (RRV) and human-RRV reassortant vaccine. **Archives of Virology Supplement**, v. 12, p. 163–175, 1996.

KASPER, S. *Hipericum perforatum*- a review of clinical studies. **Pharmacopsychiatry**, Stuttgart, v. 34, supl. 1, p. S51-S55, 2001.

KIDD, B. L.; URBAN, L. A. Mechanisms of inflammatory pain. **British Journal Anaesthesia**, n.87, 2001.

KIM, J. M., et al. Comparative Analysis of the Anti-inflammatory Activity of Huang-lian Extracts in Lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 Murine Macrophage-like Cells Using Oligonucleotide Microarrays. **Archives Pharmacal Research**, v. 33, n. 8, p.1149-1157, 2010.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N. **Patologia**: bases patológicas das doenças. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

LAPA, A. J., et al. **Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais**. São Paulo: CYTED, 2002.

LEAL, L. K. A. M., et al. Antinoceptive, antiinflammatory and broncodilator activities of Brazilian medicinal plants containing coumarin: a comparative study. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 70, p. 151-159, 2000.

LIMA, Z. P. et al. *Byrsonima fagifolia*: An integrative study to validate the gastroprotective, healing, antidiarrheal, antimicrobial and mutagenic action. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, p. 149–160, 2008.

LOESER, J; MELZACK, R. Pain, an overview. **Lancet**, n. 353, p.1607-1609, 1999.

MAHDI, J.G., et al. The historical analysis of aspirin discovery, its relation to the willow tree and antiproliferative and anticancer potential. **Cell Proliferation**, n. 39, p.147-155, 2006.

MALDINI, M., et al. Screening of the topical anti-inflammatory activity of the bark of *Acacia cornigera* Willdenow, *Byrsonima crassifolia* Kunth, *Sweetia panamensis* Yakovlev and the leaves of *Sphagneticola trilobata* Hitchcock. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 122, p. 430-433, 2009.



MAMEDE, M. C. H. **O gênero *Byrsonima* Rich. Ex. A.L. Juss. (Malpighiaceae)**. Na Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil. Tese de Mestrado. Universidade de São Paulo, São Paulo. 1981.

MARTINEZ, H., et al. An intercultural comparison of home case management of acute diarrhea in Mexico: implications for program planners. **Archives of Medical Research**, Mexico, D. F., v. 29, p. 351-360, 1998.

McCORMACK, K. The spinal actions of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the dissociation between their anti-inflammatory and analgesic effects. **Drugs**, n. 47, Suppl 5, p. 28-45; discussion 46-27, 1994.

McCURDY, C. R.; SCULLY, S. S. Analgesic substances derived from natural products (natureceuticals). **Life Sciences**, v.78, p. 476-484, 2005.

McQUEEN, D. S. Opioid peptide interactions with respiratory and circulatory systems. **British Medical Bulletin**, n. 39, p. 77-82, 1983.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, n. 454, p. 428-435, 2008.

MEIER, R. et al., L – Usnic Acid: tumor inhibitor isolated from Lichens. **Experimentia**, v. 6, n. 46, p. 469-471, 1950.

MENDES, C. C., et al. Triterpenos esterificados com ácidos graxos e ácidos triterpênicos isolados de *Byrsonima microphylla*. **Química Nova**, v.22, p. 185–188, 1999.

MENDES, S. S. et al. Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Lippia gracilis* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 129, p. 391–397, 2010.

MENDONÇA, R. C., et al. **Flora vascular do cerrado**. In Cerrado: ambiente e flora (S.M. Sano e S.P. Almeida, eds.). EMBRAPA-CPAC, Planaltina, p.289-556. 1998.

MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in Neurobiology**, n. 57, p.1-164, 1999.

MITCHELL, J.A., WARNER, T.D. Cyclo-oxygenase-2: pharmacology, physiology, biochemistry and relevance to NSAID therapy. **British Journal of Pharmacology**, v.128, n.6, p.1121-1132, 1999.

MÖLLER, K.Ä., et al.. Assessing mechanical allodynia in the rat paw with a new electronic algometer. **Journal of Neuroscience Methods**, n. 84, p. 41-47, 1998.

MORRIS, C.J., Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. **Methods in Molecular Biology**, n. 225, p. 115–121, 2003.

MUJUMDAR, A. M., et al. Antidiarrhoeal activity of ethanol extract of the bark of *Dalbergia lanceolaria*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, n. 2, p. 213–216, 2005.

MUKHERJEE, D., et al. Risk of cardiovascular events associated with selective COX-2 inhibitors. **JAMA**, n. 286, p. 954-959. 2001.

MURRAY, C. J. L.; LOPEZ, A. D. Mortality by cause for eight regions of the world: global burden of disease study, **The Lancet**, v. 349, n. 9061, p. 1269–1276, 1997.

MURUGESAN, T., et al. Evaluation of antidiarrhoeal profile of *Jussiaea suffruticosa* Linn. extract in rats. **Phytotherapy Research**, v.14, p. 381–383, 2000.

NIEHAUS, M. D. et al. Early childhood diarrhea is associated with diminished cognitive function 4 to 7 years later in children in a north-est Brazilian shantytown. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 66, p. 590-593, 2002.

NIEMEGGEERS, C. J. E., et al., **The activity of suprofen on nystatin – induced paw edema in rats.** *Arzneimittel- Forrschung*, v. 23, p. 1519, 1975.

NUKI, G. Nonsteroidal analgesic and inflammatory agents. **British Medical Journal**, n.287, p. 39-42, 1983.

NWAFOR, P. A., et al. Antidiarrhoeal and antiulcerogenic effects of methanolic extract of *Asparagus pubescens* root in rats **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, n. 3, p. 421–427, 2000.

OGONOWSKI, A. A., et al. Anti-inflammatory and analgesic activity of an inhibitor of neuropeptide amidation. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** v. 280, p. 846–853, 1997.

ONTTONEN, T.; PERTOVAARA, A. The mechanical antihyperalgesic effect of intrathecally administered MPV-2426, a novel alpha2- adrenoceptor agonist, in a rat model of postoperative pain. **Anesthesiology**, v. 92, p. 1740-1745, 2000.

PALOMBO, E. A. Phytochemicals from Traditional Medicinal Plants used in the Treatment of Diarrhoea: Modes of Action and Effects on Intestinal Function. **Phytotherapy research**, n. 20, p. 717–724, 2006.

PATWARDHAN, B.; GAUTAM, M. Botanical immunodrogs: scope and opportunities. **Drug Discovery Today**, Oxford, v.10, p. 495-502, 2005.

PETROVICK, P. R. et al., New rules for phytopharmaceutical drug registration in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 66, p.51-55, 1999.

PICARD, P., et al.. Use of non-peptide tachykinin receptor antagonists to substantiate the involvement of NK1 and NK2 receptors in a spinal nociceptive reflex in the rat **European Journal of Pharmacology**, v. 232, p. 255-261, 1993.

PINI, L. A. et al. Involvement of brain serotonergic system in the antinociceptive action of acetylsalicylic acid in the rat. **Inflammation Research**, v. 44, n.1, p. 30-35, 1995.

PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V. **Textos acadêmicos**: cultivo e processamento de plantas medicinais. Lavras: FAEPE/UFLA, 2002. 169 p.

PORTH, C. M.; KUNERT, M. P. **Fisiopatologia**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2004.

POWELL, D.W., FIELD, M., Pharmacological approaches to treatment of secretory diarrhoea. In: Field, M., Fordtran, J.S., Schultz, S.G. (Eds.), **Secretory Diarrhoea**. **American Physiological Society**, Bethesda, MD, p. 187–209. 1980.

RAINDSFORD, K. D.; VELO,G. P. Side effects of anti – inflammatory/analgesic drugs. **Lancaster: Kluwer academic Publishers**, 1992.

RANG, H.P., et al. The gastrointestinal tract. In: **Pharmacology**, 5 ed. Churchill Livingstone, Edinburgh, p. 367–379. 2003.

RAO, V.S.N., et al. Investigations on the gastroprotective and antidiarrhoeal properties of ternatin, a tetramethoxyflavone from *Egletes viscosa*. **Planta Medica**, v.63, p.146 –149, 1997.

RASTRELLI, R., et al. Glycolipids from *Byrsonima crassifolia*. **Phytochemistry**, v. 45, p. 647–650, 1997.

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

RIEDEL, W.; NEECK, G. Nociception, pain, and antinociception: current concepts. **Z Rheumatology**, n.60, p. 404-415, 2001.

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. de. **Plantas medicinais no domínio dos cerrados**. Lavras: UFLA, 2001. 180 p.

ROUF, R., et al. Assessment of antidiarrhoeal activity of the methanol extract of *Xylocarpus granatum* bark in mice model. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, n. 3, p. 539–542, 2007.

SANDRINI, M., et al. Effect of rofecoxib on nociception and the serotonin system in the rat brain. **Inflammation Research**, v. 51, n.3, p.154-159, 2002.

SANNOMIYA, M., et al . Application of liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry to the analysis of polyphenolic compounds from an infusion of *Byrsonima crassa* Niedenzu. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v.19, p. 2244–2250, 2005b.

\_\_\_\_\_. Mutagenic evaluation and chemical investigation of *Byrsonima intermedia* A. Juss. leaf extracts. **Journal of Ethnopharmacology**. v.112. 319-326p. 2007.

\_\_\_\_\_. Application of preparative highspeed counter-current chromatography for the separation of flavonoids from the leaves of *Byrsonima crassa* Niedenzu (IK). **Journal of Chromatography**, 1035, p. 47–51. 2004.

\_\_\_\_\_. Flavonoids and antiulcerogenic activity from *Byrsonima crassa* leaves extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 1–6, 2005a.

SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. Further evidence for the involvement of tachykinin receptor subtypes in formalin and capsaicin models of pain in mice. **Neuropeptides**, v. 31, n.4, p. 381-389, 1997.

SERHAN, C.N. Systems approach with inflammatory exudates uncovers novel anti-inflammatory and pro-resolving mediators. **Prostaglandins, leukotrienes, and essential fatty acids**, n.79, p.157-163, 2008.

SHOBA F. G; THOMAS M. Study of antidiarrhoeal activity of four medicinal plants in castor-oil induced diarrhea. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, n. 1, p. 73–76, 2001.

SILVA, S.R. et al. **Guia de plantas do Cerrado utilizadas na Chapada dos Veadeiros**. WWF, Brasília. 2001.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia da planta do medicamento**. Florianópolis. Porto Alegre: UFRGS/UFSC, p. 221-258, 2003.

SMITH, E. S. J.; LEWIN G. R. Nociceptors: a phylogenetic view. **Journal Comparative Physiology – A – Sensory, neural and behavioral physiology**, v. 195, p.1089–1106, 2009.

SOMMER, C., BIRKLEIN, F. Fighting off pain with resolvins. **Nature medicine**, v.16, p. 518-520. 2010.

SOUTO, L.S.; OLIVEIRA, D.M.T. Morfoanatomia e ontogênese do fruto e semente de *Byrsonima intermedia* A. Juss. (Malpighiaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 28, p. 697- 712, 2005.

SOUZA, A H. **Avaliação do Potencial Antinociceptivo e Mecanismo de ação do 2-[5 triclórometil-5-hidroxi-3-fenil-4,5-dihidro-1Hpirazol- 1-IL] 4-(4 bromofenil)-5 metiltiazol (B50) em camundongos**. Dissertação de Mestrado apresentado ao PPGBT/CCNE/UFSM, 2005.

SULEYMAN H. et al. Anti-inflammatory and side effects of cyclooxygenase inhibitors. **Pharmacological Reports**, v.59, n.3, p.247-258, 2007.

SWINGLE, K.F., SHIDEMAN, F.E. Phases of inflammatory response to sub- cutaneous implantation of cotton pellet and other modifications by certain anti-inflammatory agents. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.183, p. 226–234, 1972.

TEIXEIRA, J. C.; HELLER, L. Impact of water supply, domiciliary water reservoirs and sewage on faeco-orally transmitted parasitic diseases in children residing in poor areas in Juiz de Fora, Brazil, **Epidemiology and Infection**, v. 134, n. 4, p. 694–698, 2006.

THAPAR N., SANDERSON I.R. Diarrhoea in children: an interface between developing and developed countries. **Lancet**, v. 363, p. 641– 653, 2004.

THEODOROU, V., et al., Antidiarrhoeal properties of a novel sigma ligand (JO 2871) on toxigenic diarrhoea in mice: mechanisms of action **Gut**, v. 51, n. 4, p. 522–528, 2002.

THOMAZZI, S. M. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Bowdichia virgilioides* (sucupira). **Journal of Ethnopharmacology**, v.27, p. 451–456, 2010.

TJØLSEN, A., et al. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain** v. 51, p.5–17, 1992.

VANE, J.; BOTTING, R. Inflammation and the mechanism of action of anti-inflammatory drugs. **The Faseb Journal**, v.1, n.2, p. 89-96, 1987.

VANE, J.R.; BOTTING, R.M. Mechanism of action of anti-inflammatory drugs. **Scand. J. Rheumatol.**, v.25, p. 9-21, 1996.

VANEGAS, H.; TORTORICI, V. Opioidergic effects of nonopioid analgesics on the central nervous system. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 22, p. 655–661, 2002.

VERMA, P.R., et al. Antinociceptive activity of alcoholic extract of *Hemidesmus indicus* R.Br. in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.102, p. 298–301, 2005.

VIANA, G.S.B., et al. Analgesic and antiinflammatory effects of chalcones isolated from *Myracrodruon urundeuva* Allemão. **Phytomedicine**, v. 10, p.189-195, 2003.

VILELA, F. C., et al. Anti-inflammatory and antipyretic effects of *Sonchus oleraceus* in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, p.737–741, 2010.

VIVANCOS G.G., et al An electronic pressure-meter nociception paw test for rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.37, p. 391-399, 2004.

VRINTEN, D.H., et al. Antagonism of the melanocortin system reduces cold and mechanical allodynia in mononeuropathic rats. **Journal of Neuroscience**, v.20, p. 8131- 8137, 2000.

WALLER, D.G., et al. **Medical Pharmacology and Therapeutics**, 2 ed. London: Elsevier Saunders, p. 417–418, 2005.

WOOLF, C. J.; COSTIGAN, M. Transcriptional and posttranslational plasticity and the generation of inflammatory pain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, n. 96, p.7723-7730, 1999.

YAKSH, T.L., et al. An automated flinch detecting system for use in the formalin nociceptive bioassay. **Journal Applied Physiology**, v.90, p.2386–2402, 2001.

YAKSH, T.L., RUDY, T.A. Analgesia mediated by a direct spinal action of narcotics. **Science**, v.192, p. 1357–1358, 1976.

YAKSH, T.L., RUDY, T.A., Studies on the direct spinal action of narcotics in the production of analgesia in the rat. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 202, p. 411- 428, 1977.

YAVADA, R.N., JAIN, S. A new bioactive flavone glycoside from the seeds of *Melilotus indica* All. **Journal Asian of Natural Products Research** v.7, p.595–599, 2005.

YEUNG, J.C., et al. Concurrent mapping of brain sites for sensitivity to the direct application of morphine and focal electrical stimulation in the production of antinociception in the rat. **Pain**, vol.4, p. 23–40, 1977.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **A manual for the treatment of diarrhoea**. ver. 2. Washignton (DC): 1990.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Regulatory situation of herbal medicines. A worldwide review**. Geneva, p.1-43. 1998.

ZHENG, J. H.; CHEN, J. Differential roles os spinal neurokinin  $\frac{1}{2}$  receptors in development of persistent spontaneous nociception and hyperalgesia induced by subcutaneous bee venom injection in the conscious rat. **Neuropeptides**, n.35, p. 32-44, 2001.

ZHOU, W. et al. Clinical use and molecular mechanisms of action of extract of *Ginkgo biloba* leaves in cardiovascular diseases. **Cardiovascular Drug Reviews**, Branford, v.22, p.309-319, 2004.