



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA**

**DESENVOLVIMENTO DE EXTRATO SECO
PADRONIZADO DE FRUTOS SEM SEMENTES DE
Caesalpinia ferrea C. Mart. E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTI-INFLAMATÓRIA**

ELIENE CANTO DUARTE

MANAUS

2010

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE
PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA**

ELIENE CANTO DUARTE

**DESENVOLVIMENTO DE EXTRATO SECO PADRONIZADO
DE FRUTOS SEM SEMENTES DE *Caesalpinia ferrea* C. Mart. E
AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA**

Dissertação apresentada à Coordenação do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para a obtenção de título de Mestre em Biotecnologia, área de concentração de Biotecnologias para a Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Antonio José Lapa

Co-orientadora: Prof^a Dra. Tatiane Pereira de Souza

MANAUS

2010

Ficha Catalográfica
Catalogação realizada pela Biblioteca Central da UFAM)

Duarte, Eliene Canto

D812d Desenvolvimento de extrato seco padronizado de frutos sem sementes de *Caesalpinia ferrea* C. Mart. e avaliação da atividade anti-inflamatória / Eliene Canto Duarte. - Manaus: UFAM, 2010.

110 f.; il. color.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) — Universidade Federal do Amazonas, 2010.

Orientador: Prof. Dr. Antonio José Lapa

Co-Orientador: Prof^a Dra Tatiane Pereira de Souza

1. *Caesalpinia ferrea* Mart. 2. Plantas medicinais 3. Jucá - Atividade anti-inflamatória I. Lapa, Antonio José II. Souza, Tatiane Pereira de III. Universidade Federal do Amazonas IV. Título

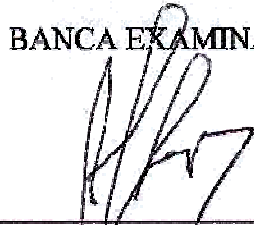
CDU 633.88(811.3)(043.3)

ELIENE CANTO DUARTE

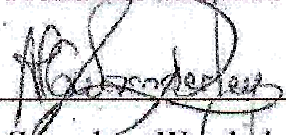
**DESENVOLVIMENTO DE EXTRATO SECO PADRONIZADO DE FRUTOS SEM
SEMENTES DE *Caesalpinia ferrea* C. Mart. E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-
INFLAMATÓRIA**

Aprovado em 03 de dezembro de 2010.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Antônio José Lapa
Universidade Federal do Estado de São Paulo – UNIFESP/CBA
Presidente da Banca



Dr Almir Gonçalves Wanderley - UFPE
Professor Titular



Prof.ª Dra. Silvana Cristina Pando
Universidade Federal do Amazonas – UFAM
Professora Titular

Ao meu esposo Enio Lucio

e às minhas filhas Amanda e

Vitória porque me inspiram e me

motivam.

À meu orientador Professor Dr. Antonio José Lapa, sempre solícito e cientificamente competente, enriqueceu este trabalho com suas intervenções.

À minha co-orientadora Professora Dra. Tatiane Pereira de Souza, mas não menos reconhecida como arquiteta desta pesquisa.

AGRADECIMENTOS

À minha família: minha origem, meu alicerce.

Aos diretores da fundação Alfredo da Matta Dra.Adele S. Benzaken e Sr. Sebastião Pascoal de Faria e da Maternidade Ana Braga Adelaide Marques Setubal, pela compreensão e apoio em me permitir dedicar tempo a esta pesquisa.

Aos Professores Thereza Christina de Lima (UFSC); Dr. Afonso Caricatti, Maria Teresa R. Lima-Landman (UNIFESP), que estiveram conosco durante o período de nosso trabalho e em especial a Professora Mirtes Tanae (UNIFESP).

Aos funcionários da Faculdade de Farmácia- UFAM e em especial à Dorotéia Couto, Isis Rodrigues e José Maria Guimarães pelo assessoramento nos ensaios tecnológicos.

Ao Luiz Augusto Gomes de Souza (INPA) por fornecer a matéria-prima vegetal para esta pesquisa.

Aos amigos do Laboratório de Farmacologia, Toxicologia de Medicamentos e Biotério: Andrezza de Andrade, Danilo Costa, Francianne Retroz, Herbenya Peixoto, Jeffeson de Moraes, Kaori Isla, Márcia Caroline Vilhena, Marnyce Peres, Ricardo Silva, Siglia Neves, Suelen Silva, Thaís Biondo, Vânia Silva, Maria Geane Freire e Jackeline Silva, Alzemir Alves Stener Diniz, Tony Silva e Leandro maquine que sempre dispostos a auxiliarem nos ensaios farmacológicos.

Aos colegas do curso de pós-graduação: Suzana Martins, Juliana Barros, Thiago Lima, Lucinei Maciel,e em especial, Karla Feitosa porque me ajudou muito com suas valiosas contribuições.

Aos colegas da Fundação Alfredo da Matta: Meguni Sadhiro, Júlio César sampaio,Yama Mayura, Sandra Valéria Gouveia, D. Elzenir da Silva, Paulo David de Souza e em especial Isabelle Lins Carlos; e da Maternidade Ana Braga: Danilo Marcos de Almeida, Maurício Alexandre Pinto, Ileida Maria Pinheiro, Mery Deollene Perrone, Ruth de Moraes, Jacimeire Aranha, Núcia Regina Souza, Eduardo Antonio Vieira, Janilce Maria Pereira, Karla Alessandra D'elia, Maria Edice Vieira, Sarde Souza, Ildison da Silva, Carlos Augusto Lima, Josenildo Silva, Jane Jelly Almeida, Hécio dos Santos, Paulo Luiz Castro e em especial ao Ismael de Melo de Barros, pelo apoio e entenderem que a qualificação faz parte não só do crescimento individual mas, principalmente do coletivo.

À Direção e Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, nas pessoas dos professores Dr. Edmar Vaz de Andrade, Dr. José Odair Pereira e Dr. Spartaco Astolfi Filho, sempre buscando a excelência na qualidade do trabalho de pesquisa.

Ao Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA) e à Faculdade de Farmácia (UFAM) pelo suporte técnico.

A todos minha gratidão.

Soli Deo Gloria

RESUMO

Caesalpinia ferrea C. Mart (Fabaceae), conhecida na Amazônia como jucá, é amplamente utilizada na medicina popular como anti-inflamatória, cicatrizante e no tratamento da anemia. Entretanto, não há estudos que garantam a qualidade da matéria-prima de *C. ferrea*, sendo necessárias padronização de técnicas de extração e padronização química com identificação das substâncias responsáveis pelos efeitos farmacológicos. Neste trabalho, após caracterização da matéria-prima, foram padronizados dois extratos de *C. ferrea* e comparadas as atividades anti-inflamatória e analgésica dos mesmos. Os extratos aquosos foram obtidos por decocção dos frutos sem sementes a 2,5%. Após filtração e concentração, os extratos foram secos por aspersão ou liofilização, dando origem ao ESA – extrato seco por aspersão e ao ESL – extrato seco por liofilização. O ESA e ESL foram padronizados segundo o teor de umidade e concentrações de polifenóis e de taninos totais. O teor de umidade (14% e 11%), taninos totais (13% e 11%) e polifenóis (49% e 43%) não foram diferentes entre ESA e ESL, respectivamente. No teste farmacológico geral em camundongos, os extratos padronizados nas doses de 0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o., não produziram sinais de ataxia, incoordenação motora, irritabilidade ou hiperreatividade a estímulos nociceptivos. Não houve morte entre os animais, demonstrando que os extratos não produziram efeitos tóxicos graves. Nas maiores doses, os extratos produziram aumento da duração do sono induzido por barbitúrico e por éter etílico, indicando ação depressora do SNC sem afetar, no entanto, a atividade motora, como observado no teste do “rota-rod”. No teste da formalina (1,5%), os extratos ESA e ESL diminuíram o tempo de lambertura na 1ª e na 2ª fase do teste; esse efeito foi bloqueado com a administração prévia (15 min) de naloxona (5 mg/kg, i.p.). No teste de contorções abdominais induzida por ácido acético (0,8%), os extratos (0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, v.o.) diminuíram o número de contorções até 30 min após a injeção de ácido acético. Os extratos não mudaram a latência basal de reação ao estímulo térmico (55 °C) no teste de retirada da cauda (“tail flick”) e nem inibiram o edema de pata induzido por carragenina (1%); o controle positivo indometacina inibiu o edema em 60% após 2 h. No teste do edema de pata induzido por dextrana (0,1%), o tratamento com ESA ou ESL inibiu o edema em 30%, sem relação dose-efeito; o controle positivo ciproheptadina (10 mg/kg, v.o.) reduziu o edema em 81% no mesmo tempo. Com esses resultados, concluímos que os efeitos farmacológicos não foram diferentes entre os dois extratos - ESA e ESL - padronizados de *Caesalpinia ferrea* C. Mart. Esses extratos contendo ~46% de polifenóis e ~12% de taninos têm efeito antinociceptivo envolvendo vias comuns aos opióides e atividade inibidora do edema induzido por dextrana, mas não inibem o edema induzido por carragenina.

Palavras chaves: *Caesalpinia ferrea* Mart., extrato seco, atividade antinociceptiva, atividade anti-inflamatória.

ABSTRACT

Caesalpinia ferrea C. Mart (Fabaceae), known in Amazonian region as “jucá” is widely used in the folk medicine in inflammation and to treat wounds and anemia. However, there are no studies on the quality control of the *C. ferrea* raw material, lacking the standardization of the chemical and extractive procedures, identifying the substances responsible for the pharmacological effects. In this work, after the raw material characterization, two standardized extracts were produced and their analgesic/anti-inflammatory activities were compared. The aqueous extracts were obtained by decoction of the fruits without seeds at 2,5%. After filtration and concentration, the extracts were dried by aspersion or freeze-dryer, generating the ADE - aspersion dried extract, and the FDE – freeze-dried extract. ADE and FDE were standardized by the humidity ratio and total tannins and polyphenols concentrations. The humidity ratio (14% and 11%), total tannins (13% and 11%) and polyphenols (49% and 43%) were not different between ADE and FDE, respectively. In the general pharmacological test, the standardized extracts (0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, p.o.), did not cause ataxia, motor incoordination, irritability or hiper-reactivity to nociceptive stimulation. Death was not observed, showing that the extracts did not produce potential toxic effects. At the major doses, the extracts increased the ethyl ether and the pentobarbital induced-sleeping time, indicating the depression of the central nervous system without affecting the motor activity, as confirmed in the rota-rod test. In the formalin test, the extracts reduced the licking-time in the 1st and in the 2nd phase; this effect was blocked by the previous (15 min) administration of naloxone (5 mg/kg, i.p.). In the acetic acid-induced abdominal contortions test, the extracts (0,1; 0,3 e 1,0 g/kg, p.o.) diminished the number of contortions until 30 min after acetic acid administration. The extracts neither change the basal latency of the thermal stimulation reaction (55 °C) in the tail-flick test nor inhibited the carrageenan-induced acute paw edema; the positive control indomethacin inhibited the edema in 60% after 2 h. In the dextran-induced acute paw edema test, the treatment with ADE or FDE reduced the edema in 30%, without dose-effect relationship; the positive control cypheptadine (10 mg/kg, p.o.) reduced the edema in 81% in the same time. With these results, we concluded that the pharmacological effects were not different between the two standardized extracts - ADE and FDE from *Caesalpinia ferrea* C. Mart. The anti-nociceptive effect in the extracts containing ~46% polyphenols and ~12% tannins involves common pathways to the opioids. ADE and FDE inhibited the dextran-induced acute paw edema, but did not inhibit the carrageenan-induced acute paw edema.

Keywords: *Caesalpinia ferrea* Mart., dry extract, antinociceptive activity, antiinflammatory activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Caesalpinia ferrea</i> C. Mart (A - Flores, B-Fruto e sementes, C-Folha, D-caule)....	26
Figura 2 - Substâncias isoladas de <i>Caesalpinia ferrea</i>	28
Figura 3 – Ilustração esquemática dos componentes das respostas inflamatórias agudas e crônicas	36
Figura 4 – Etapas do processo de migração leucocitária dos vasos sanguíneos	43
Figura 5 - Histograma de distribuição da granulometria da matéria-prima vegetal oriunda de <i>Caesalpinia ferrea</i> C. Mart	62
Figura 6 - Curva de retenção e passagem da matéria-prima vegetal de <i>Caesalpinia ferrea</i> (FP = fração de passagem, FR = fração de retenção)	63
Figura 7 - Efeito do tratamento prévio (1 h) com extrato seco por aspersão (ESA) de <i>Caesalpinia ferrea</i> (0,1; 0,3 e 1 g/kg, v.o.) no sono induzido por pentobarbital (50 mg/kg, i.p.) em camundongos	66
Figura 8 – Efeito do tratamento prévio (1 h) com extrato seco por liofilização (ESL) de <i>Caesalpinia ferrea</i> (0,1; 0,3 e 1 g/kg, v.o.) no sono induzido por pentobarbital (50 mg/kg, i.p.) em camundongos	67
Figura 9 – Efeito do tratamento prévio (1 h) com extrato seco por aspersão (ESA) de <i>Caesalpinia ferrea</i> (0,1; 0,3 e 1 g/kg, v.o.) no sono induzido por éter etílico em camundongos	68
Figura 10 – Efeito do tratamento prévio (1 h) com extrato seco por liofilização (ESL) de <i>Caesalpinia ferrea</i> (0,1; 0,3 e 1 g/kg, v.o.) no sono induzido por éter etílico em camundongos	69
Figura 11 – Efeito do tratamento prévio (1 h) com extrato seco por aspersão (ESA) de <i>Caesalpinia ferrea</i> (0,1; 0,3 e 1 g/kg, v.o.) no teste do rota-rod em camundongos	70
Figura 12 – Efeito do tratamento prévio (1 h) com extrato seco por liofilização (ESL) de <i>Caesalpinia ferrea</i> (0,1; 0,3 e 1 g/kg, v.o.) no teste do rota-rod em camundongos	71
Figura 13 - Efeito do tratamento prévio (1 h) com extrato seco por aspersão (ESA) de <i>Caesalpinia ferrea</i> (0,1 e 0,3 g/ kg, v.o.) no teste da formalina 1,5% em ratos	72
Figura 14 - Efeito do tratamento prévio (30 min) com extrato seco por aspersão (ESA) de <i>Caesalpinia ferrea</i> (0,1 g/ kg, v.o.) no teste da formalina 1,5 % em ratos	73
Figura 15 – Efeito do pré-tratamento com naloxona (5 mg/kg, i.p.) 15 minutos antes do tratamento com ESA de <i>Caesalpinia ferrea</i> (0,03; 0,1 e 0,3 g/kg, v.o.) no teste de formalina 1,5% em ratos	73
Figura 16 - Efeito do tratamento prévio (1 h) com extrato seco por liofilização (ESL) de <i>Caesalpinia ferrea</i> (0,1 e 0,3 g/ kg, v.o.) no teste da formalina à 1,5 % em ratos	74
Figura 17 - Efeito do tratamento prévio (30 min) com extrato seco por liofilização (ESL) de <i>Caesalpinia ferrea</i> (0,1 g/ kg, v.o.) no teste da formalina 1,5 % em ratos	75
Figura 18 - Efeito do pré-tratamento com naloxona (5 mg/kg, i.p.) 15 minutos antes do	

tratamento com ESL de <i>Caesalpinia ferrea</i> (0,03; 0,1 e 0,3 g/kg, v.o.) no teste de formalina 1,5% em ratos	75
Figura 19 - Efeito do tratamento prévio (1 h) com extrato seco por aspersão (ESA) de <i>Caesalpinia ferrea</i> (0,1; 0,3 e 1 g/ kg, v.o.) no teste da contorção abdominal induzida por ácido acético (0,8%) em camundongos	76
Figura 20 - Efeito do tratamento prévio (1 h) com extrato seco por liofilização (ESL) de <i>Caesalpinia ferrea</i> (0,1; 0,3 e 1 g/ kg, v.o.) no teste da contorção abdominal induzida por ácido acético (0,8%) em camundongos	77
Figura 21 - Efeito do tratamento prévio (1 h) com extrato seco por aspersão (ESA) de <i>Caesalpinia ferrea</i> (0,1; 0,3 e 1 g/ kg, v.o.) no tempo de retirada da cauda em ratos	78
Figura 22 - Efeito do tratamento prévio (1 h) com extrato seco por liofilização (ESL) de <i>Caesalpinia ferrea</i> (0,1; 0,3 e 1 g/ kg, v.o.) no teste da retirada da cauda em ratos	79
Figura 23 – Efeito do tratamento prévio (1 h) com extrato seco por aspersão (ESA) de <i>Caesalpinia ferrea</i> (0,1; 0,3 e 1g/ kg, v.o.) no edema de pata induzido por carragenina 1% em ratos	80
Figura 24 – Efeito do tratamento prévio (1 h) com extrato seco por liofilização (ESL) de <i>Caesalpinia ferrea</i> (0,1; 0,3 e 1 g/ kg, v.o.) no edema de pata induzido por carragenina 1% em ratos	81
Figura 25 – Efeito do tratamento prévio (1 h) com extrato seco por aspersão (ESA) de <i>Caesalpinia ferrea</i> (0,1; 0,3 e 1 g/ kg, v.o.) no edema de pata induzido por dextrana 0,1 % em ratos	82
Figura 26 – Efeito do tratamento prévio (1 h) com extrato seco por liofilização (ESL) de <i>Caesalpinia ferrea</i> (0,1; 0,3 e 1 g/ kg, v.o.) no edema de pata induzido por dextrana 0,1 % em ratos	83
Figura 27 – Efeito do tratamento prévio (1 h) com extrato seco por aspersão (ESA) de <i>Caesalpinia ferrea</i> (0,1; 0,3 e 1 g/ kg, v.o.) na peritonite induzida por carragenina 1% (1 mL, i.p.) em ratos	84
Figura 28 – Efeito do tratamento prévio (1 h) com extrato seco por liofilização (ESL) de <i>Caesalpinia ferrea</i> (0,1; 0,3 e 1 g/ kg, v.o.) na peritonite induzida por carragenina 1 % (1 mL, i.p.) em ratos	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Atividades biológicas atribuídas a <i>Caesalpinia ferrea</i>	31
Tabela 2 – Condições de secagem utilizadas na obtenção do extrato seco por liofilização	55
Tabela 3 - Condições de secagem utilizadas na obtenção do extrato seco por aspersão ...	55
Tabela 4 - Características da matéria-prima vegetal de <i>Caesalpinia ferrea</i> C. Mart.....	62
Tabela 5 - Características do extrato aquoso 2,5 % (m/V).....	63
Tabela 6 - Características dos extratos secos por liofilização (ESL) e por aspersão (ESA)	64
Tabela 7 - Efeito dos extratos seco por aspersão (ESA) e por liofilização (ESL) de <i>Caesalpinia ferrea</i> (0,1; 0,3 e 1 g/kg, v.o.) em camundongos avaliados no teste hipocrático.....	65
Tabela 8 – Efeito do tratamento prévio (1 h) com extrato seco por aspersão (ESA) de <i>Caesalpinia ferrea</i> (0,1; 0,3 e 1 g/kg, v.o.) sobre o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético (0,8%) em camundongos	76
Tabela 9 – Efeito do tratamento prévio (1 h) com extrato seco por liofilização (ESL) de <i>Caesalpinia ferrea</i> (0,1; 0,3 e 1 g/kg, v.o.) sobre o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético (0,8%) em camundongos	77
Tabela 10 – Efeito do tratamento prévio (1 h) com extrato seco por aspersão (ESA) de <i>Caesalpinia ferrea</i> (0,1; 0,3 e 1 g/kg, v.o.) no edema de pata induzido por dextrana 0,1% em ratos	82
Tabela 11 – Efeito do tratamento prévio (1 h) com extrato seco por liofilização (ESL) de <i>Caesalpinia ferrea</i> (0,1; 0,3 e 1 g/kg, v.o.) no edema de pata induzido por dextrana 0,1% em ratos	83

LISTA DE ABREVIATURAS

1. ACh – acetilcolina
2. AAEs - aminoácidos excitatórios
3. ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária
4. ATP - trifosfato de adenosina
5. Bk - bradicinina
6. CBA - Centro de Biotecnologia da Amazônia
7. CEME - Central de Medicamentos
8. 5-HT5 - hidroxitriptamina
9. CLAE - cromatografia líquida de alta eficiência
10. COX - ciclooxigenase
11. CSF - fatores estimuladores de colônias
12. ESA - extrato seco por aspersão
13. ESL - extrato seco liofilizado
14. FD - fator de diluição
15. FNT - fração não-tanante
16. G-CSF – fator estimulador de colônia de granulócito
17. GM-CSF - fator estimulador de colônia de granulócito macrófago
18. H - histamina
19. CCK - colecistocinina
20. CGRP - peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
21. IASP - Associação Internacional para o Estudo da Dor
22. IFN – interferon
23. IL – interleucina
24. LPS - lipopolissacarídeo

25. LT - leucotrienos
26. MAC – complexo de ataque à membrana
27. MPV - matéria-prima vegetal
28. MS - Ministério da Saúde
29. NAPs – neurônios aferentes primários
30. NK – células “natural killers”
31. NO - óxido nítrico
32. OMS - Organização Mundial de Saúde
33. PAF – fator ativador de plaquetas
34. PG - prostaglandinas
35. PT - polifenóis totais
36. SNC – Sistema Nervoso Central
37. SP – substância P
38. SUS - Sistema Único de Saúde
39. TGF- fator de crescimento tumoral
40. TNF – fator de necrose tumoral
41. TT - taninos totais
42. TX – tromboxano
43. VIP - peptídeo intestinal vasoativo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 OBJETIVOS	22
2.1 Geral	23
2.2 Específicos	23
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	24
3.1. Material Vegetal	25
3.2. <i>Caesalpinia ferrea</i> C. Mart.	25
3.2.1 Estudos botânicos e agrônômicos	27
3.2.2 Estudos fitoquímicos	27
3.2.3 Estudos etnofarmacológicos e farmacológicos	28
3.2.4 Estudos tecnológicos	32
3.3 Processos tecnológicos para obtenção de extratos secos vegetais	32
3.3.1 Liofilização	33
3.3.2 Secagem por aspersão	34
3.4 Inflamação	35
3.4.1 Fenômenos irritativos – mediadores químicos	38
3.4.2 Fenômenos vasculares	41
3.4.3 Fenômenos exsudativos	42
3.4.4 Fenômenos celulares	42
3.4.5 Fenômenos reparativos	43
3.5 Dor	44
4 MATERIAIS	48
4.1 Material vegetal	49
4.2 Animais	49
4.3 Fármacos, reagentes e solventes	49
4.4 Composição das Soluções	50
5 MÉTODOS	51
5.1 Tratamento do Material Vegetal	52
5.2 Caracterização da matéria-prima vegetal	52
5.2.1 Determinação de perda por dessecação	52
5.2.2 Determinação do teor de extrativos	52
5.2.3 Análise granulométrica através de tamisação	53
5.3 Obtenção do extrato aquoso	53

5.4 Caracterização do Extrato Aquoso	53
5.4.1 Determinação do pH	53
5.4.2 Determinação da densidade relativa	54
5.4.3 Determinação de resíduo seco	54
5.4.4 Rendimento operacional	54
5.5. Obtenção dos extratos secos	54
5.5.1 Secagem por Liofilização	54
5.5.2 Secagem por Aspersão	55
5.6 Caracterização dos extratos secos	56
5.6.1 Determinação de umidade	56
5.6.2 Análise quantitativa de taninos totais	56
5.6.3 Rendimento operacional	57
5.7 Triagem farmacológica geral	57
5.8 Sistema nervoso central – Atividades centrais específicas	57
5.8.1 Sono induzido por barbitúrico	57
5.8.2 Sono induzido por éter etílico	58
5.9 Avaliação da atividade motora - teste do “rota-rod”	58
5.10 Atividade em nocicepção e inflamação	58
5.10.1 Teste da formalina 1,5%	58
5.10.2 Contorções abdominais induzidas por ácido acético 0,8%	59
5.10.3 Teste da retirada da cauda	59
5.10.4 Edema de pata induzido por carragenina 1% e dextrana 0,1%	59
5.10.5 Peritonite induzida por carragenina - Migração celular	60
5.11 Análise estatística	60
6 RESULTADOS	61
6.1 Caracterização da Matéria-Prima Vegetal (MPV)	62
6.2 Caracterização do extrato aquoso	63
6.3 Caracterização dos extratos secos	64
6.4 Triagem farmacológica geral	65
6.5 Atividades centrais específicas	66
6.5.1 Sono induzido por barbitúrico	66
6.5.1.1 Efeito do extrato de <i>C. ferrea</i> seco por aspersão (ESA)	66
6.5.1.2 Efeito do extrato de <i>C. ferrea</i> seco por liofilização (ESL)	67

6.5.2 Sono induzido por éter etílico	68
6.5.2.1 Efeito do extrato de <i>C. ferrea</i> seco por aspersão (ESA)	68
6.5.2.2 Efeito do extrato de <i>C. ferrea</i> seco por liofilização (ESL)	69
6.6 Atividade motora	70
6.6.1 Efeito do extrato de <i>C. ferrea</i> seco por aspersão (ESA) no teste do rota-rod	70
6.6.2 Efeito do extrato de <i>C. ferrea</i> seco por liofilização (ESL) no teste do rota-rod	71
6.7 Atividade em nocicepção e inflamação	72
6.7.1 Teste da formalina (1,5%)	72
6.7.1.1 Efeito do extrato seco de <i>C. ferrea</i> por aspersão (ESA)	72
Tratamento 30 minutos antes da injeção de formalina	72
Ação da naloxona	73
6.7.1.2 Efeito do extrato seco de <i>C. ferrea</i> por liofilização (ESL)	74
Tratamento 30 minutos antes da injeção de formalina	74
Ação da naloxona	75
6.7.2 Teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético (0,8%)	76
6.7.2.1 Efeito do extrato de <i>C. ferrea</i> seco por aspersão (ESA)	76
6.7.2.2 Efeito do extrato de <i>C. ferrea</i> seco por liofilização (ESL)	77
6.7.3 Teste da retirada da cauda	78
6.7.3.1 Efeito do extrato de <i>C. ferrea</i> seco por aspersão (ESA)	78
6.7.3.2 Efeito do extrato de <i>C. ferrea</i> seco por liofilização (ESL)	79
6.7.4 Edema de pata induzido por carragenina 1%	80
6.7.4.1 Efeito do extrato de <i>C. ferrea</i> seco por aspersão (ESA)	80
6.7.4.2 Efeito do extrato de <i>C. ferrea</i> seco por liofilização (ESL)	81
6.7.5 Edema de pata induzido por dextrana 0,1%	82
6.7.5.1 Efeito do extrato de <i>C. ferrea</i> seco por aspersão (ESA)	82
6.7.5.2 Efeito do extrato de <i>C. ferrea</i> seco por liofilização (ESL)	83
6.7.6 Teste da migração celular induzida por carragenina 1%	84
6.7.6.1 Efeito do extrato de <i>C. ferrea</i> seco por aspersão (ESA)	84
6.7.6.2 Efeito do extrato de <i>C. ferrea</i> seco por liofilização (ESL)	85
7 DISCUSSÃO	86
8 SUMÁRIO E CONCLUSÕES	98
REFERÊNCIAS	101

1 INTRODUÇÃO

O estudo da farmacologia e fisiologia tem recebido avanços significativos vindos da pesquisa farmacológica de plantas medicinais (DOHADWALLA, 1985). Enfermidades que preocupam a humanidade como a dor e a febre, associadas ou não, a processos inflamatórios, levaram ao isolamento do ácido salicílico a partir de *Salix alba vulgaris* (casca do salgueiro) por LEROUX em 1827. Essa descoberta propiciou a introdução de novos produtos com ações analgésica, antipirética e anti-inflamatória e, valorizou a riqueza e diversidade da flora (BERNARDI *et al.*, 2003 apud BOGO, 2009, p.23 , KAPADIA, 2003).

No Brasil, estudos de algumas espécies vegetais utilizadas na medicina tradicional foram realizados para avaliar atividades anti-inflamatória, antimicrobiana, antitumoral e citotóxica (HOLETZ *et al.*, 2002; PIMENTA *et al.*, 2003; SUYENAGA *et al.*, 2002;).

Estima-se que nos países em desenvolvimento, 80% das pessoas dependem da Medicina Tradicional para seus tratamentos de saúde, e que cerca de 85% desses tratamentos envolvem o uso de extratos vegetais (FARNSWORTH, 1997).

No entanto, o número de plantas medicinais estudadas sob a ótica da farmacologia e toxicologia, com o intuito de comprovar o seu uso popular e segurança, respectivamente, ainda é muito pequeno, por isso, a ciência tem buscado comprovar os efeitos terapêuticos das plantas medicinais (CARRARA, 1995).

Atualmente, os esforços para a descoberta de novas drogas são dirigidos no sentido de se buscarem alternativas para superar a dependência externa já que 84% dos fármacos comercializados no Brasil são importados e as multinacionais são responsáveis por 78% da produção brasileira (SIMÕES, 2007). No Brasil, os medicamentos fitoterápicos movimentaram R\$ 270 milhões em 2001, equivalendo a aproximadamente 6% do mercado brasileiro de medicamentos, maior do que a comercialização de medicamentos genéricos que foi de R\$ 226 milhões no mesmo ano (CALIXTO, 2003).

Estima-se que cerca de 40% dos fármacos empregados na terapêutica sejam provenientes de fontes naturais, sendo 25% de plantas. Este percentual aumenta ainda mais se nos restringirmos apenas aos fármacos antineoplásicos e antibióticos (SHU, 1998). Das 252 drogas consideradas básicas pela Organização Mundial de Saúde (OMS), 11% são exclusivamente de origem natural e um número significativo são drogas sintéticas obtidas de precursores naturais.

Embora haja uma grande demanda pelos produtos naturais, uma das principais dificuldades para o desenvolvimento de fitomedicamentos e/ou novas substâncias bioativas encontra-se na definição de critérios para avaliação da qualidade da matéria-prima vegetal e seus derivados (FARIAS, 2003; LIST, SCHMIDT, 1989; MAGALHÃES, 1997). Nesse contexto, os estudos etnobotânicos e etnofarmacológicos podem indicar possíveis ações farmacológicas, aproximando a ciência e a descoberta de novas drogas (COX, BALICK, 1994).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) referência na Conferência de Alma-Ata (1978) recomendou o uso de terapias alternativas, integrando a medicina ocidental à tradicional, recrutando os praticantes dessa medicina como aliados na organização e implementação de medidas para melhorar a saúde da comunidade (BRASIL, 2006).

Caesalpinia ferrea C. Mart é uma planta amplamente utilizada na medicina popular como anti-inflamatório, cicatrizante e auxiliar no tratamento da anemia (CARVALHO *et al.*, 1996) sendo uma das espécies selecionadas para o Programa Nacional Plantas Medicinais e Fitoterápicos do Ministério da Saúde – MS (BRASIL, 2006). Estudos farmacológicos realizados para comprovar a atividade terapêutica desta espécie vegetal, demonstraram atividades anti-úlceras e anti-diabéticas relacionadas à capacidade de inibição da aldose-redutase (BACHI *et al.*, 1995; UEDA *et al.*, 2001).

Dentre os constituintes químicos descritos na literatura destaca-se a presença de polifenóis, principalmente ácido gálico e ácido elágico que podem ser as possíveis substâncias químicas responsáveis por parte da atividade biológica dos frutos da *C. ferrea* (UEDA *et al.*, 2001).

A importância e multiplicidade de usos da *C. ferrea* justifica o estudo com os diferentes tecidos desta planta para avaliação e obtenção de moléculas bioativas. Apesar de vários trabalhos indicarem que extratos dos diferentes tecidos são empregados na medicina popular, não há relatos na literatura acerca de estudo das cascas dos frutos sem as sementes.

Estudos iniciados pelo grupo de pesquisa em produtos naturais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas com as cascas dos frutos sem sementes de *C. ferrea* estabeleceram alguns parâmetros físico-químicos e tecnológicos para o controle de qualidade dessa matéria-prima vegetal, bem como o melhor método de extração para alcançar um maior teor de taninos totais e concentração de sólidos solúveis no extrato (dados ainda não publicados).

Considerando o amplo uso de *C. ferrea* na medicina popular e baseando-se na literatura que comprova algumas atividades terapêuticas, a obtenção de um extrato padronizado dessa espécie vegetal é muito importante visando à elaboração futura de um fitoterápico.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar a atividade anti-inflamatória de dois extratos secos padronizados a partir de frutos sem sementes de *Caesalpinia ferrea* C. Mart.

2.2 Específicos

- Caracterizar as propriedades físicas da matéria-prima vegetal de *C. ferrea* C.Mart.;
- Obter e caracterizar as propriedades físico-químicas do extrato aquoso;
- Obter e caracterizar extratos secos por diferentes métodos de secagem: liofilização e aspersão;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória e antinociceptiva dos extratos secos.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1. Material Vegetal

A eficácia da utilização de plantas medicinais e produtos derivados, com finalidade terapêutica, têm sido comprovados através de estudos etnofarmacológicos, bem como experimentais *in vitro* e *in vivo* (BRASIL, 2004).

No entanto, para garantir a qualidade de um produto de origem vegetal e/ou medicamento fitoterápico, é fundamental a padronização de todas as etapas para obtenção dos mesmos, desde o cultivo da espécie vegetal até procedimentos posteriores para elaboração da matéria-prima, tais como, secagem, moagem, armazenamento e transporte (SIMÕES *et al.*, 2007).

3.2. *Caesalpinia ferrea* C. Mart.

A família Fabaceae (Leguminose), originalmente descrita por Antoine Laurent de Jussieu, possui 642 gêneros e cerca de 18.000 espécies cosmopolitas. Inclui desde árvores, arbustos até lianas e ervas. Comumente é dividida em três subfamílias: Caesalpinioideae, Faboideae (Papilionoideae) e Mimosoideae (RIBEIRO *et al.*, 1999). A espécie *Caesalpinia ferrea* C. Martius pertence ao reino Plantae, filo Magnoliophyta, classe Magnoliopsida, ordem Fabales, família Fabaceae e gênero *Caesalpinia* (ILDIS, 2007).

A espécie *Caesalpinia ferrea* C. Mart., popularmente conhecida como jucá e pau-ferro, é nativa do Brasil, mas atualmente cultivada em vários lugares do mundo. Como exemplo, pode ser encontrada na Ásia em países como a Índia, Malásia e Paquistão; na Austrália, Papua Nova Guiné e no oeste bengalês (SOUZA, 2007).

Na região Amazônica, está presente em todos os estados, tendo sido encontrada no Pará, Rondônia, Amazonas, Roraima, Amapá e no Acre, onde foi plantada pelos migrantes nordestinos, principalmente cearenses que colonizaram essa parte da Amazônia. A variedade *cearensis* é da caatinga, sendo muito cultivada em todo o nordeste do Brasil. Por outro lado,

na Mata Atlântica, predomina, a subespécie *leiostachya* recebendo o nome de pau-ferro (SOUZA, 2007).

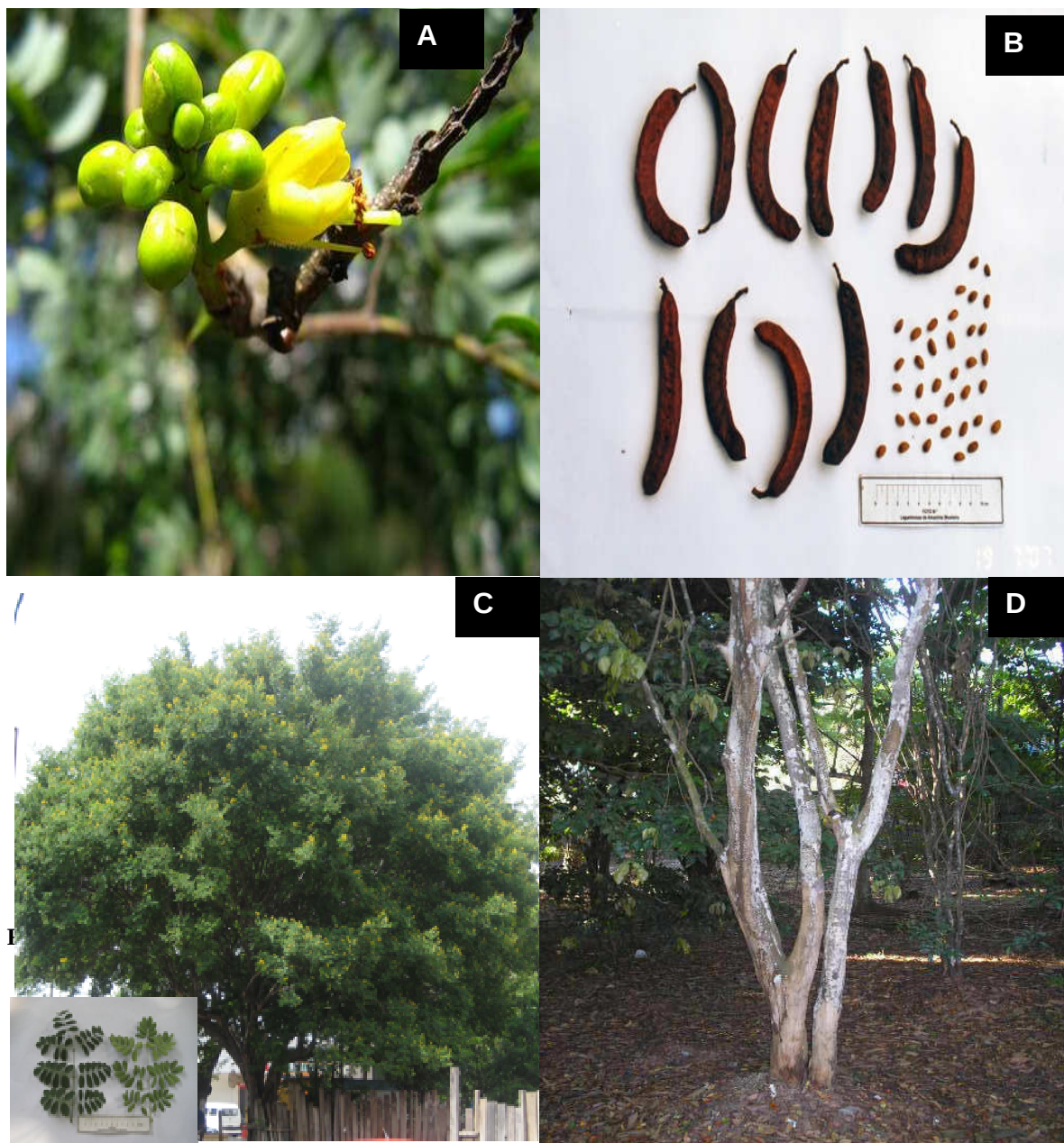


Foto: SOUZA, L.A.G., DUARTE, E. C., FALCÃO, N. V. S.

3.2.1 Estudos botânicos e agronômicos

Caesalpinia ferrea é uma árvore com crescimento de até 10 m de altura e 120 cm de diâmetro do tronco. Apresenta tronco liso e com manchas esbranquiçadas devido à sua descamação. A madeira é dura, justificando seu nome popular “pau-ferro”, como é conhecido em algumas regiões do Brasil. Suas folhas são compostas e bipinadas, apresentando até cinco pares de folíolos, de aproximadamente 20 cm. Os frutos da espécie, *C. ferrea*, são legumes (vagens) que medem aproximadamente 9,6 cm de comprimento, 2,1 cm de largura e 0,9 cm de espessura. Pesam aproximadamente 8,67 g e contêm de 3 a 9 sementes. As sementes são duras e lisas, medem cerca de 1 cm de comprimento e pesam em média de 0,20 g. Os estudos agronômicos com a espécie *C. ferrea* demonstraram que sua propagação é feita através das sementes. Sendo uma planta com aspecto ornamental, pode ser cultivada em locais não encharcados como praças e jardins, ou mesmo nos quintais. Tem crescimento rápido e aceita bem ser consorciada com outras espécies de frutíferas, possuindo potencial para a combinação de espécies em sistemas agroflorestais. Além disso, a folhagem fornece bom alimento para o gado (SOUZA, 2007).

Suas flores são vistosas, de coloração amarelada e em cachos, sendo possível o florescimento da planta sem folhas. Na Amazônia Central a floração do jucá ocorre nos meses de março e abril, e a frutificação entre maio e agosto (PORTELA *et al.*, 2001).

3.2.2 Estudos Fitoquímicos

No caule foram identificados flavonóides, saponinas, taninos, cumarinas, esteróides, compostos fenólicos e antraderivados (GONZALEZ *et al.*, 2004). Um trímero de chalcona, denominado pauferrol A, foi isolado de um extrato obtido do caule da espécie vegetal (NOZAKI *et al.*, 2007).

COELHO (2004) isolou a partir das folhas do vegetal as substâncias galato de metila, lupeol, alfa e beta-amirina.

Segundo UEDA *et al.* (2001), foram isolados dos frutos secos de *C. ferrea*, ácido elágico e ácido 2-(2,3,6-trihidroxí-4-carboxifenil) gálico.

NAKAMURA *et al.*, (2002a), identificaram o ácido gálico e metil galato como principais constituintes químicos e possíveis responsáveis pelas atividades biológicas dessa espécie vegetal. Na continuação da pesquisa, foram isoladas 49 substâncias, sendo a maioria derivadas do ácido gálico e de acetofenonas (NAKAMURA *et al.*, 2002b).

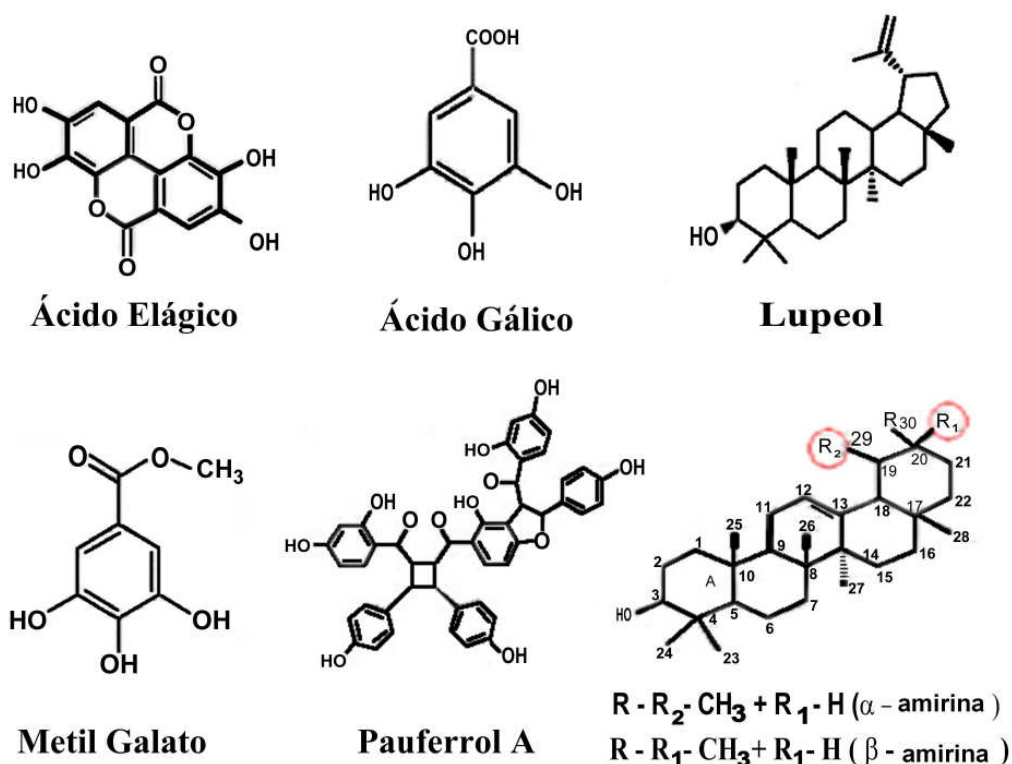


Figura 2 - Substâncias isoladas de *Caesalpinia ferrea* (UEDA *et al.* 2001, COELHO, 2004; NOZAKI *et al.*, 2007)

3.2.3 Estudos etnofarmacológicos e farmacológicos

O uso popular dessa planta nativa do Brasil como um anti-inflamatório, conduziu vários pesquisadores a investigar suas propriedades terapêuticas. A *C. ferrea* é empregada na medicina tradicional como: antimicótico, anti-anêmico, antihemorragico, antidiarréico,

cicatrizante, nas afecções dos pulmões, sedativo, adstringente, anti-diabético, utilizada em tosse, asma, tuberculose, coqueluche, contusões, cicatrização de feridas, tratamento de úlcera, afecções da boca e garganta, entre outros (BORRÁS , 2003; BRAGANÇA, 1996).

Popularmente, as diversas partes do vegetal (folhas, cascas, semente, raízes, pedaços de madeira e frutos secos) são utilizadas no tratamento de diversas infecções, como a leishmaniose (BORRÁS , 2003; DI STASI *et al.*, 2002).

A avaliação da atividade anti-inflamatória e analgésica de um extrato aquoso obtido fruto de *C. ferrea*, demonstrou que a utilização com dose de 0.3 g/kg, via oral, provocou uma redução significativa do número de contorções abdominais induzido por ácido acético em ratos Wistar (CARVALHO, 1993 Os frutos dessa espécie também passaram por estudos para comprovar sua atividade antitumoral, que foi evidenciada *in vitro* com uso do vírus Epstein-Barr, sendo que o ácido gálico e metil-galato, presentes no fruto da espécie, foram identificados como responsáveis por essa atividade (NAKAMURA *et al.*, 2002a).

Outro estudo realizado com os frutos de *C. ferrea* demonstrou atividade hipoglicêmica em ratos diabéticos graças a componentes inibidores não competitivos da aldose redutase (UEDA *et al.*, 2001).

Em 2004, CORTEZ observou atividade leishmanicida *in vitro* de extrato metanólico obtido de frutos de *C. ferrea*, contra a *Leishmania (Viannia) guyanensis* e *L. (Leishmania) amazonensis*, através de bioensaios colorimétricos utilizando um indicador de óxido-redução.

O extrato da casca de *C. ferrea* apresentou uma potente atividade inibidora contra a topoisomerase II humana e proliferação celular por indução de apoptose nas células HL60 leucêmicas mielóides agudas (NOZAKI *et al.*, 2007).

O extrato aquoso obtido da casca do caule de *C. ferrea* induziu a hipotensão arterial associada à taquicardia em ratos normotensos; provocando, no entanto, bradiarritmias transientes. O mesmo extrato (40 mg/kg) causou vasodilatação na artéria mesentérica de

ratos, o qual pode ser mediado por canais de K^+ sensíveis ao ATP (MENEZES *et al.*, 2007). Pesquisas demonstram que esta planta parece ter um potencial clínico para uso em doenças cardiovasculares, entretanto, maiores estudos são necessários para garantir a segurança e margem terapêutica, perante o uso humano (MENEZES *et al.*, 2007).

O estudo de citotoxicidade realizado em ratos Wistar, aos quais foi administrado extrato aquoso do fruto de *C. ferrea* em três doses diferentes (0,5; 1 e 1,5 g/kg) e ciclofosfamida na concentração de 30 mg/kg, demonstrou que não houve alterações significativas observadas em células ósseas coletadas 24 horas após o tratamento, bem como não foram observadas modificações quanto a aberrações cromossômicas ou mutações durante a mitose nos ratos em estudo, quando comparados com o grupo controle tratado apenas com água, sendo assim a pesquisa sugere que o extrato testado não possui citotoxicidade (SOUZA *et al.*, 2006).

Estudo feito pela extinta Central de Medicamentos (CEME) avaliou o extrato aquoso do fruto e casca quanto à possível ação anti-inflamatória, analgésica e antipirética, bem como a toxicidade destas preparações. Os resultados apesar de não confirmarem estas ações, atribuídas popularmente à espécie vegetal, não revelaram efeitos tóxicos (BRASIL, 2006).

Um recente estudo realizado com um extrato obtido dos frutos de *C. ferrea*, contra infecções dentárias, evidenciou ação antimicrobiana contra agentes formadores de biofilme causador de cárie dentária (SAMPAIO *et al.*, 2009).

A Tabela 1 resume as principais atividades biológicas atribuídas ao vegetal de acordo com os estudos pré-clínicos descritos na literatura.

Tabela 1 – Atividades biológicas atribuídas a *Caesalpinia ferrea*

Farmacógeno	Tipo de extrato	Atividade Biológica	Substância	Referência
Frutos	metanólico	Antimicrobiano	Polifenóis	SAMPAIO, <i>et al.</i> , 2009
Casca	-	Inibidor da Topoisomerase II	Pauferrol A	NOZAKI <i>et al.</i> , 2007.
Casca caule	aquoso	Hipotensão arterial	-	MENEZES <i>et al.</i> , 2007.
Fruto	aquoso	Analgésica, anti-inflamatória	-	CARVALHO, 1996
Folhas	-	-	Galato de metila, lupeol, alfa, beta-amirina	COELHO, 2004
Fruto	metanólico	Leshmanicida	-	CORTEZ, 2004
Fruto	metanólico	Atividade inibitória tumoral em ensaio de ativação antigênica com o vírus Epstein Barr	Derivados de acetofenona fenona	NAKAMURA <i>et al.</i> , 2002.
Fruto	Etanólico	Analgésico, anti-inflamatório, hipoglicemiante e anticancerígeno	Ácido gálico e Ácido elágico	UEDA <i>et al.</i> , 2001; NAKAMURA <i>et al.</i> , 2002
Caule	-	Tratamento de úlceras gástricas	-	BACCHI <i>et al.</i> , 1995
Folhas, cascas, semente, raízes, pedaços de madeira e frutos secos	-	Leishmaniose	-	DI STASI <i>et al.</i> , 2002; BORRÁS <i>et al.</i> , 2003.

3.2.4 Estudos tecnológicos

Estudos tecnológicos realizados com frutos de *C. ferrea*, pelo grupo de pesquisa em produtos naturais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas (UFAM), visando a obtenção de matéria-prima vegetal padronizada, estabelecimento de parâmetros para o controle de qualidade, bem como a avaliação de diferentes métodos extrativos, demonstraram que o material vegetal oriundo de diferentes localidades, originou matérias-primas com significativas diferenças nas propriedades físico-químicas e tecnológicas. O mesmo estudo demonstrou que a decocção por refluxo é o melhor método extrativo de taninos a partir dos frutos de *C. ferrea*. Além disso, constatou-se que a relação droga:solvente e o método de extração são variáveis importantes tanto no teor de resíduo seco como no teor de taninos totais presentes na solução extrativa. Com relação à variação do tipo de solvente de extração, água ou etanol, apesar de proporcionar diferentes teores de resíduo seco e de taninos totais, essa diferença não foi significativa. No entanto, em geral, a água proporcionou maior extração dos constituintes da *C. ferrea* e a relação droga:solvente de 2,5% (m/V) foi a que apresentou maior resposta na extração de taninos totais (MARINHO; DE SOUZA, 2008).

3.3 Processos tecnológicos para obtenção de extratos secos vegetais

A preparação de extratos, contendo substâncias de interesse terapêutico, constitui uma etapa preliminar que, após a retirada da água ou solvente, conduz a obtenção de um produto intermediário, geralmente, um extrato seco. Os extratos secos vegetais são produtos intermediários que apresentam vantagens de maior estabilidade química e facilidade de armazenamento, manuseio e transporte (LIST; SCHIMIDT, 1989). O tipo e condições de

secagem devem ser estabelecidos de acordo com a constituição química do material a secar, bem como com as características desejadas ao produto acabado.

A secagem de extratos vegetais contendo substâncias termolábeis exige, preferencialmente, técnicas de secagem a baixas temperaturas.

3.3.1 Liofilização

A liofilização, técnica que consiste no congelamento do produto a temperaturas negativas e posterior secagem, através de sublimação do gelo, sob ação de vácuo, pode ser uma boa escolha para produtos termolábeis, no entanto, essa técnica produz pós extremamente leves muitos volumosos e com elevada higroscopicidade o que a torna pouco utilizada na indústria de fitoterápicos devido a problemas tecnológicos (LIST; SCHMIDT, 1989; WENDEL; ÇELIC, 1998).

O processo da liofilização consiste em quatro etapas diferentes:

- I) congelamento da água presente na amostra a -40°C ou, no mínimo, 20°C abaixo do seu ponto eutético;
- II) diminuição da pressão do sistema a 0,01 bar ou menos;
- III) elevação da temperatura em -4 a -5°C e,
- IV) sublimação do gelo.

A energia radiante no ambiente vedado, fornecida por uma lâmpada de infravermelho, é suficiente para evaporar pequenas quantidades de gelo (LIST; SCHMITT, 1989). A forma porosa do produto obtido confere a facilidade de dissolução. A grande porosidade, facilidade de redispersão e suspensão em solução são as principais características dos produtos liofilizados. No entanto, a ampla faixa de distribuição granulométrica apresentada pelo produto obtido por liofilização requer etapas de processamento posteriores, tais como trituração e classificação. Esta desvantagem, adicionada ao custo elevado de sua utilização e

à elevada higroscopicidade dos produtos liofilizados, muitas vezes limita o seu emprego (LIST; SCHMIDT, 1989; MASTERS, 1978; VOIGT, 2000).

3.3.2 Secagem por aspersão

A secagem por aspersão é uma técnica muito utilizada para a produção de extratos vegetais, pois, apesar de ser uma técnica executada em temperaturas elevadas, entre 150 e 200 °C, o reduzido tempo de contato do produto com a fonte calorífica permite sua utilização para substâncias sensíveis ao calor, além do que origina pós com melhores características tecnológicas e passíveis da otimização através de alterações de alguns parâmetros de secagem (BROADHEAD *et al.*, 1992; MASTERS, 1978).

A secagem por aspersão (*Spray-drying*) consiste em uma operação de secagem de produtos na forma de soluções, suspensões, emulsões ou pastas por divisão dos mesmos em finas gotículas no interior de uma câmara provida de ar quente, a fim de obter a evaporação do solvente e a recuperação de um produto seco no estado particulado. Existem várias denominações para os produtos obtidos por essa técnica tais como, produto seco por aspersão, produto seco por nebulização e produto seco por pulverização (MASTERS, 1978; WENDEL; ÇELIC, 1998).

A otimização das características físicas e químicas dos produtos secos, obtidos através dessa técnica, envolve a comparação entre os parâmetros do processo, tais como aquecimento, vazão de ar, fluxo de alimentação, viscosidade, tensão superficial do produto fluido a secar, desenho, dimensão e princípio de funcionamento do dispositivo de aspersão (BROADHEAD *et al.*, 1992).

A técnica de secagem por aspersão tem recebido um grande destaque no desenvolvimento de fitoterápicos, principalmente, devido a maior facilidade de obtenção de produtos com maior concentração de constituintes químicos, sem degradação e perda da

atividade farmacológica e, comparada a outras técnicas de secagem, com melhores características tecnológicas (MARTINS, 1997).

O produto pulveréneo obtido a partir de uma suspensão apresenta-se, geralmente, na forma de aglomerados porosos, de forma esférica e superfície rugosa. Quando obtido a partir de emulsões ou soluções, as partículas são ocas, de forma esférica e superfície lisa, apresentando um grau maior ou menor de fragmentação das estruturas. O tamanho de partícula e a faixa granulométrica dependem, principalmente, do desenho, dimensão e princípio de funcionamento do dispositivo de aspersão, assim como da viscosidade e tensão superficial do produto a secar. Os produtos pulveréneos obtidos apresentam características físicas bem definidas, como a forma e tamanho de partícula e, em certos casos, com formação de uma estrutura esponjosa que permite a solubilização instantânea do produto em água (BROADHEAD *et al.*, 1992).

No campo da indústria farmacêutica de fitoterápicos, o produto seco obtido através de secagem por aspersão, encontra aplicação na preparação de comprimidos, cápsulas, granulados, pomadas e outras formas farmacêuticas. Entre outras vantagens, apresenta maior estabilidade, menor higroscopicidade, distribuição homogênea dos constituintes da preparação, assim como uma manipulação mais simples, o que permite a pesagem e o doseamento mais fácil e exato (MASTERS, 1978).

3.4 Inflamação

A inflamação é clinicamente definida como processo patofisiológico inicial dos tecidos vivos a uma variedade de estímulos lesivos da função celular ou estrutural (SOSA *et al.*, 2002; STEVENS; LOWE, 2002) (Figura 3). É uma resposta relativamente inespecífica, pois o padrão inicial independe do agente ou do evento causal (SILVERTHORN, 2003; STEVENS; LOWE, 2002). A inflamação ocorre não somente em resposta a um processo

infeccioso, mas também diante de agentes físicos, como traumas, radiações e agressores químicos, entre os quais as substâncias tóxicas.

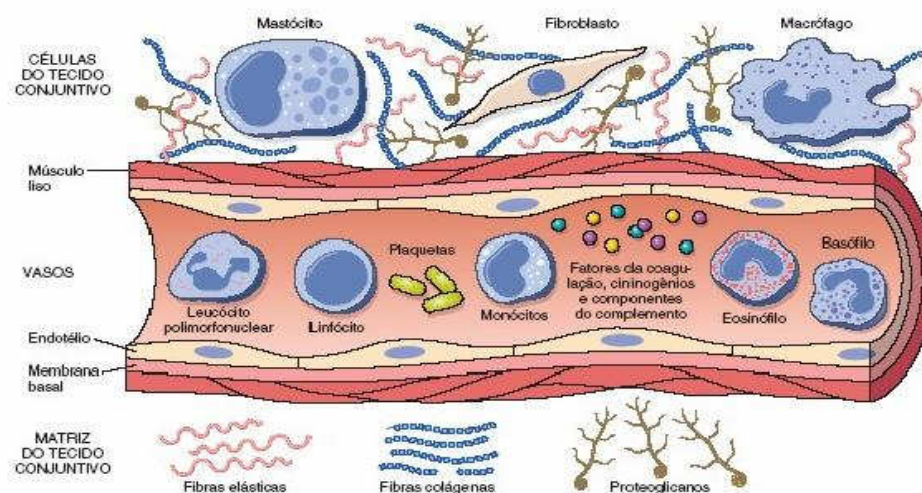


Figura 3 – Ilustração esquemática dos componentes das respostas inflamatórias agudas e crônicas: células e proteínas circulantes, células dos vasos sanguíneos e células e proteínas da matriz extracelular
 FONTE: KUMAR, 2005

Nela tomam parte alguns componentes da resposta imunológica. É interpretada como resultado das diferentes respostas na tentativa do sistema imunológico restabelecer a homeostasia do organismo. Ocorre aumento do fluxo sanguíneo no local atingido, mediado por substâncias que causam vasodilatação, como as prostaglandinas e as citocinas como $\text{TNF-}\alpha$ e $\text{IFN-}\gamma$. Há aumento da permeabilidade capilar, retração de células endoteliais e expressão de moléculas de adesão em células endoteliais e leucócitos, com conseqüente passagem de mediadores solúveis e saída de células da circulação, como as proteínas (mediadores solúveis) da fase aguda da inflamação, os leucotrienos, o fator ativador de plaquetas, a bradicinina, os componentes C3a, C5a, C3b e C5b, o complexo de ataque à membrana (MAC) do complemento e as citocinas, incluindo as quimiotáticas. Inúmeras células são atraídas, principalmente os neutrófilos, monócitos, macrófagos, eosinófilos, mastócitos, plasmócitos, células NK e linfócitos B e T, cujo predomínio depende

principalmente do agente agressor. Os neutrófilos são as primeiras células no início de uma resposta inflamatória, seguida de monócitos e de macrófagos. Após a estimulação de neutrófilos e monócitos/macrófagos é que são acionados os linfócitos. O processo da ativação de linfócitos ocorre quatro a cinco dias após o início do processo infeccioso. Há ainda síntese de citocinas e ativação de fibroblastos que promovem a restauração tecidual. Quando esse processo ocorre, temos os sinais clássicos da inflamação: dor, calor, rubor e edema. Pode haver concomitante à inflamação, febre, ativação de osteoclastos, adipócitos, fibroblastos, distúrbios do metabolismo, incluindo aumento da glicemia, variações hormonais, assim como várias outras alterações generalizadas, resultantes principalmente das atividades biológicas das citocinas. Em casos de traumas, outros mecanismos protetores são acionados: sistema cinina, com formação de bradicinina, aumentando a permeabilidade vascular e sistema de coagulação, resultando em coágulos que dificultam a entrada de patógenos na circulação. (FORTE, 2007).

Na inflamação aguda o rubor e a hipertermia resultam da dilatação dos vasos e aumento do fluxo sanguíneo na região inflamada. O edema é provocado pelo acúmulo de líquido e células inflamatórias (exsudato) nos espaços intersticiais, principalmente pelos componentes fluidos. A combinação de fatores como a pressão das terminações nervosas causada pelo edema e de um efeito direto causado por fatores químicos liberados durante a resposta inflamatória, tem como resultado a dor. A perda da função (total ou parcial) deve-se diretamente à injúria ou secundariamente ao edema e dor provocados pelo dano (HANSEL; DINTZIS, 2007).

As principais funções da inflamação aguda são: facilitar a ação das células e moléculas de defesa local para suprimir a infecção; destruição e eliminação do agente causal infectante pelos componentes do exsudato que formam uma barreira física evitando a disseminação da infecção e reparação do tecido lesado. Para isso, a inflamação deve ser de vida curta,

dependendo, principalmente, do controle cuidadoso entre mediadores pró- e anti-inflamatórios (CHANG *et al.*, 2001).

A inflamação consiste em eventos celulares e humorais interdependentes que culminam com a reparação do tecido e recuperação da função (CARVALHO, 2002) e pode ser dividida resumidamente em quatro fenômenos: irritativos, vasculares, exsudativos e reparativos (BORNE, 2002).

3.4.1 Fenômenos irritativos – mediadores químicos

São modificações provocadas pelo agente inflamatório (físico, químico ou biológico) que resultam na liberação de mediadores químicos responsáveis pelos fenômenos subsequentes da inflamação.

O ponto de partida para ativação de uma série de sistemas que sintetizam e liberam vários mediadores, é a alteração protéica pela ação de enzimas líticas (proteases, esterases, collagenase) liberadas pela lesão tissular ou ruptura da membrana dos lisossomas pela ação dos fagócitos (WANNMACHER; FERREIRA, 2004a).

Os mediadores inflamatórios podem ser de ação rápida, como as aminas vasoativas (histamina, serotonina) ou de ação prolongada (substâncias plasmáticas, citocinas e lipídeos ácidos) (BORNE, 2002).

Na fase inicial da inflamação (1-1,5 horas) ocorre a liberação de histamina e serotonina (LEE; KATAYAMA, 1992). A histamina promove a vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular. Além disso, desempenha papel central na hipersensibilidade imediata e respostas alérgicas, secreção gastrointestinal e neurotransmissão (NELSON, 2002; WHITE, 2004).

A histamina e também outros agentes endógenos induzem alterações da permeabilidade de parede dos vasos da microcirculação. O efeito é preponderante, senão exclusivo, em vênulas. O mecanismo parece depender da contração de fibrilas de actomiosina

nas células endoteliais venulares, determinando a abertura das junções interendoteliais. (REPKA-RAMIREZ, 2002).

A serotonina (5-hidroxitriptamina – 5-HT) encontra-se em altas concentrações nas plaquetas de onde é liberada quando estas sofrem agregação em locais de lesão tecidual. Está envolvida na sensibilização de nociceptores e controle microvascular (GLENON; DUKAT, 2002).

As substâncias plasmáticas compreendem os sistemas do complemento, das cininas, de coagulação e fibrinolítico. Estes sistemas são ativados pelo fator XII (fator de Hageman). O sistema do complemento, consiste em mais de 20 proteínas plasmáticas, normalmente presentes em formas inativas, participam dos fenômenos vasculares, adesão, quimiotaxia e ativação dos leucócitos e fagocitose (BARRINGTON, 2001; WALPORT, 2001).

O sistema de cininas é uma cascata de enzimas que produz diversos peptídeos vasoativos, por proteases específicas denominadas calicreínas sobre substratos (cininogênios). Este sistema, quando ativado libera bradicinina que provoca vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e estimulação direta de terminações nervosas para a dor, entre outros efeitos (COUTURE *et al* , 2001).

O sistema de coagulação é uma cascata de enzimas proteolíticas e co-fatores, cujo principal evento consiste na conversão do fibrinogênio solúvel em filamentos insolúveis de fibrina pela trombina, que participa da ativação dos sistemas do complemento e das cininas. Concomitantemente é iniciada a cascata fibrinolítica por vários ativadores do plasminogênio e resulta na formação (dentro do coágulo) da plasmina, que digere a fibrina. Assim, o sistema fibrinolítico contribui para eventos vasculares durante a inflamação (ESMON, 2005).

As citocinas, produzidas por várias células do sistema imunológico, influenciam o comportamento de outras células e assim coordenam a resposta imune (CAMPBELL, 2000; ROITT, 2003). Podem ser classificadas em interferons, interleucina, quimiocinas, fatores de estimulação de colônias e fatores de necrose tumoral.

Os interferons (IFN) são responsáveis pela resistência das células à replicação viral (IFN- α e IFN- β) e também exercem papel significativo na regulação da resposta imune específica (IFN γ) produzido quase exclusivamente por células NK e certos grupos de células T ativadas (HANSEL; DINTZIS, 2007). As interleucinas (IL), produzidas por leucócitos, atuam intensamente em todas as fases da inflamação. A IL-1, um importante mediador na resposta inflamatória inicial, recruta e ativa células inflamatórias e causa a liberação de outras citocinas. Também ativa células endoteliais, aumenta a expressão de moléculas de adesão, a atividade da fosfolipase e conseqüentemente a biossíntese de prostaglandinas (BORNE, 2002; CALL *et al.*, 2001). As quimiocinas são proteínas quimioatraentes e controlam a migração de leucócitos ao interagirem fisicamente com a matriz extracelular (MANTOVANI *et al.*, 2006; STEVENS; LOWE, 2002).

Os fatores estimuladores de colônias (CSF) estimulam a proliferação de determinadas células progenitoras comprometidas e também induzem diferenciação irreversível. O fator de necrose tumoral (TNF), produzido por células T e macrófagos, juntamente com a IL-1 são as principais citocinas que participam da inflamação, sendo responsáveis pelas respostas sistêmicas da fase aguda associadas a infecções ou traumas.

Sua produção é estimulada, sobretudo, por lipopolissacarídeo (LPS), vírus, bactérias intracelulares e células neoplásicas, mas também por IFN, IL-1, IL-2, fator estimulador de colônia de granulócito macrófago (GM-CSF), substância P, bradicinina, imunocomplexos, inibidores da cicloxigenase e fator ativador de plaqueta (PAF) (FORTE, 2007; HANSEL; DINTZIS, 2007; BARRINGTON, 2001; WALPORT, 2001).

Mediadores lipídicos incluem prostaglandinas (PGs), tromboxanos (TXs), leucotrienos (LTs), metabólitos derivados do ácido araquidônico via cicloxigenases e lipoxigenases, e o PAF. O último é um potente vasodilatador, aumenta a permeabilidade vascular, adesão leucocitária ao endotélio, quimiotaxia e outros mediadores (BLOEMEN *et al.*, 2007).

Leucotrienos e PGs são liberados principalmente por células endoteliais e macrófagos. Intensa vasoconstrição, broncoespasmo e ampliação da permeabilidade vascular são causados pelos LTC₄, LTD₄ e LTE₄. O LTB₄ é um potente quimiotático e ativador das respostas dos neutrófilos (FUNK, 2001; KHANAPURE, 2007).

Prostaglandinas geralmente são vasodilatadoras, promovem o edema e a infiltração de leucócitos. Além disso, sensibilizam as terminações nervosas periféricas à ação de histamina, bradicinina e outros mediadores liberados localmente durante a inflamação (CORRÊA, 2010). Em resposta a estímulos químicos ou mecânicos, são liberados mediadores lipídicos (prostaglandinas) de quase todas as células. Sua síntese é regulada por enzimas denominadas de Prostaglandina Endoperoxídeo Sintetase ou ciclooxigenase (COX), existentes pelo menos como duas isoformas principais, COX-1 e COX-2. A primeira, expressa constitutivamente, é responsável pela formação de prostaglandinas associadas com eventos fisiológicos como a integridade da mucosa gástrica e fluxo sanguíneo renal, enquanto que COX-2 está relacionada aos eventos da resposta inflamatória (GRANGEIRO, 2008).

3.4.2 Fenômenos vasculares

Na inflamação, ocorrem alterações nos vasos sanguíneos visando facilitar o movimento das proteínas plasmáticas e células sanguíneas da circulação para o local inflamado (MEHTA, 2006). As modificações hemodinâmicas e reológicas são comandadas pelos mediadores químicos liberados durante os fenômenos irritativos ou por ação direta do agente flogógeno.

Inicialmente ocorre dilatação (histamina, PGE_2 , PGI_2 , etc.) das pequenas arteríolas, aumentando o fluxo sanguíneo. Em seguida, o fluxo é reduzido (leucócitos deixam a região central da corrente sanguínea e se deslocam na margem do fluxo) e segue-se a estase do sangue e aumento da permeabilidade das vênulas pós-capilares, com exsudação de líquido (PEREIRA, 2006).

3.4.3 Fenômenos exsudativos

Compreendem a saída de elementos do sangue (plasma e células) do leito vascular para o interstício. A exsudação plasmática e a celular são independentes, mas a primeira geralmente antecede a segunda e a predominância entre elas depende de cada caso. O elemento mais característico da inflamação é a exsudação de leucócitos (PEREIRA, 2004).

A exsudação plasmática inicia-se geralmente nas fases iniciais de hiperemia, continuando durante o processo inflamatório. Dependendo desse exsudato, a inflamação pode ser fibrinosa (exsudato rico em proteínas) ou serosa (exsudato pobre em proteínas).

Quanto à constituição do exsudato inflamatório, compõe-se basicamente de fluido (sais e altas concentrações de proteínas), fibrina (proteína filamentosa insolúvel), muitos neutrófilos polimórficos, poucos macrófagos e alguns linfócitos. Todos são derivados do sangue e resultam das alterações ocorridas nos vasos sanguíneos ao redor da área lesada (STEVENS; LOWE, 2002).

3.4.4 Fenômenos celulares

Na inflamação aguda duas classes celulares importantes interagem. As células inflamatórias derivadas de progenitores da medula óssea (leucócitos e plaquetas) têm acesso à área inflamada a partir do sangue. As células tissulares (células endoteliais, mastócitos e macrófagos teciduais) estão normalmente presentes nos tecidos.

Os eventos do extravasamento dos leucócitos podem ser divididos nas seguintes etapas (figura 4):

1) Ativação do endotélio por produtos do dano tecidual: marginação, captura e rolamento de leucócitos seguido de sua ativação (para favorecer suas funções de fagocitose) e adesão firme.

2) Transmigração através das aberturas entre as células endoteliais (diapedese).

3) Migração nos tecidos intersticiais em direção ao estímulo quimiotáticos.

No local da lesão, inicia-se o processo da fagocitose liberação de moléculas pelos leucócitos (principalmente neutrófilos) e macrófagos para eliminar o agente lesivo (CUZZOCREA, 2005).

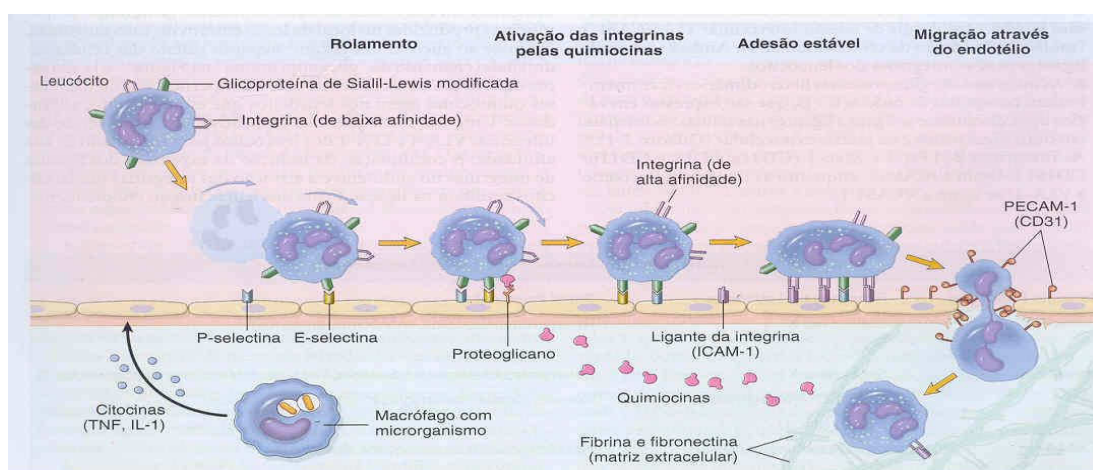


Figura 4 – Etapas do processo de migração leucocitária dos vasos sanguíneos. Os leucócitos rolam na superfície do endotélio, são ativados, aderem-se e transmigram, atravessando a membrana basal e migram seguindo um gradiente quimiotático originado no local da lesão. Moléculas com papel fundamental nestas etapas: selectinas (rolamento), quimiocinas (ativação de leucócitos aumentando afinidade das integrinas), integrinas (adesão) e CD31 (PECAM-1) (transmigração)

FONTE: KUMAR, 2005

3.4.5 Fenômenos reparativos

Os mediadores possuem meia-vida curta e são degradados após serem liberados, consequentemente, os fenômenos vasculares e exudativos são reduzidos. Além disso, durante o processo inflamatório são produzidos mediadores anti-inflamatórios, que aumentam com a progressão do processo e atuam ativamente para o seu término (KUMAR, 2005).

Os mecanismos envolvidos incluem mudança nos derivados do ácido araquidônico (LT para lipoxinas anti-inflamatórias); liberação de TGF- β , macrófagos e outras células e

impulsos neurais (colinérgicos) que inibem a produção de TNF nos macrófagos. Assim, a produção de mediadores pró-inflamatórios é reduzida, aumentando a de anti-inflamatórios naturais que inibem a inflamação. Estes efeitos têm a contribuição das antiproteases e removedores de radicais livres (NATHAN, 2002; TRACEY, 2002).

Desse modo, a inflamação aguda pode evoluir para:

- Resolução completa: quando a lesão é limitada, de curta duração ou quando ocorre pouca destruição tissular e as células parenquimatosas podem ser regeneradas, restaurando a normalidade no local da inflamação.

- Cicatrização pela substituição do tecido conjuntivo (fibrose): após uma lesão tecidual considerável envolvendo tecidos incapazes de se regenerar ou quando há exsudato rico em fibrina.

- Progressão para inflamação crônica: persistência do patógeno.

3.5 Dor

A dor é uma condição complexa e faz parte do sistema de vigilância da homeostase do organismo. Embora na maioria das vezes tenha etiologia indefinida, possui valor biológico fundamental como mecanismo de defesa (SILVA; MORAES, 2000; SILVERTHORN, 2003).

De acordo com o comitê de taxonomia da Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) a dor é conceituada como “*uma experiência sensorial e emocional desagradável, que é associada a uma lesão tecidual ou potencial, ou descrita em termos de tal lesão*”.

De acordo com a duração, são reconhecidos três tipos de dor:

- Dor transitória, causada pela ativação de nociceptores (neurônio sensorial primário ativado por um estímulo capaz de causar lesão tecidual) na pele ou no tecido, mas não é acompanhada de lesão. Sua função básica é proteger contra agentes que possam causar dano.

- Dor aguda (ou fisiológica): ocorre pela estimulação nociceptiva intensa de nociceptores em resposta à lesão de algum tecido corporal. É bem localizada e de curta duração.

- Dor crônica (ou patológica): quando a dor persiste durante a recuperação da lesão, podendo permanecer mesmo após a recuperação ou excede-la, como pela perda de um membro, a *dor do membro fantasma*. Apresenta etiologia incerta, representando um fenômeno de sensibilização nociceptiva, caracterizada pela redução do limiar da dor (alodinia), amplificação da resposta a estímulos nocivos (hiperalgesia) e sensação de dor prolongada (hiperpatia). Este tipo de dor possui uma fase aguda, associada a dano tecidual ou inflamação e uma fase crônica associada à alteração ou danos ao tecido nervoso (dor neuropática), quando perde qualquer função adaptativa e torna-se de fato patológica (FERREIRA; TORRES, 2004).

A dor também pode ser classificada de acordo com outros critérios como topográficos (localizada e generalizada; tegumentar e visceral), fisiopatológicos (orgânica ou psicogênica) e de intensidade (leve, moderada e intensa) (WANNMACHER; FERREIRA, 2004c).

A nocicepção (percepção da dor) é um fenômeno subjetivo. É atividade do sistema nervoso aferente, induzida por estímulos nocivos exógenos (mecânicos, físicos, químicos ou biológicos) ou endógenos (inflamação, aumento do peristaltismo, isquemia tecidual) e sua recepção se dá em nociceptores (do latim *nocere* = machucar) que representam as terminações livres do axônio periférico dos neurônios aferentes primários (NAPs). Muitos são silenciosos em condições normais e ativados apenas em condições patológicas. Encontram-se em todo o corpo, exceto no cérebro e tecido ósseo (CORDEIRO; COELI, 2000).

As fibras aferentes primárias podem ser classificadas, essencialmente, em três tipos, de acordo com seu diâmetro, estrutura e velocidade de condução. Fibras C (polimodais) são

finas (0,4 a 1,2 μm de diâmetro), não mielinizadas e de condução lenta (0,5 a 2,0 m/s). As fibras A δ são médias (2 a 6 μm de diâmetro), mielinizadas e de condução intermediária (12 a 30 m/s). As fibras A β são espessas (mais de 10 μm de diâmetro), mielinizadas e de condução rápida (30 a 100 m/s) (MILLAN, 2002).

Estas fibras respondem de maneira diferente a estímulos inócuos e agressivos. Todas transmitem informações não relacionadas à dor (não nociceptivas), mas somente as fibras C e A δ transmitem informações exclusivamente nociceptivas em condições normais (na ausência de lesões teciduais ou nervosas), enquanto as fibras A β sob as mesmas condições respondem somente ao toque, vibração, pressão e outros estímulos não nociceptivos (MILLAN, 2002).

Os corpos celulares dos NAPs são encontrados nos gânglios da raiz dorsal, que sintetizam diversas substâncias com potencial para atuar como neurotransmissores ou neuromoduladores e exercem papel tanto na dor periférica quanto centralmente. A substância P (SP), glutamato, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), colecistocinina (CCK), nociceptina e peptídeo intestinal vasoativo (VIP) estimulam células espinhais nociceptivas. Neuropeptídeos opióides (encefalinas e dinorfinas), somatostatina e galanina possuem predominantemente ação inibitória sobre as células nociceptivas. Os terminais periféricos dos NAPs são sensibilizados pela ação de substâncias algio gênicas, destacando-se trifosfato de adenosina (ATP), óxido nítrico (NO), prostaglandinas (PGs), neuropeptídeo Y, neurotrofinas, bombesina, acetilcolina (ACh), bradicinina (Bk), histamina (H), serotonina, e outros aminoácidos excitatórios (AAEs), mediadores que podem ser liberados também por células não neuronais como plaquetas, células sanguíneas, mastócitos, células endoteliais, fibroblastos e células de Schwann (PRADO, 2001).

Os estímulos nociceptivos são traduzidos como atividade elétrica e levados às terminações nervosas periféricas e conduzidos até o gânglio da raiz dorsal, mais precisamente no corno dorsal, uma estrutura dividida em lâminas, com base na sua citoarquitetura. Cada

lâmina recebe tipos diferentes de informações (figura 5). As fibras A δ , possuem limiar alto, correspondem à via neoespino-talâmica (somatotópica, constituída pelo trato espino-talâmico lateral) e são responsáveis pela sensação primária, rápida denominada dor somática (sensação intensa aguda, penetrante cortante ou em ferroadas, e localizada) (MACHADO, 2006; SILVERTHORN, 2003).

As fibras C correspondem à via paleoespino-talâmica (não-somatotópica, constituída pelo trato espino-reticular e fibras retículo-talâmicas), são responsáveis pela sensação de dor secundária, lenta, denominada visceral (difusa e espalhada, constante, ardida, em queimação) que persiste mesmo após cessar o estímulo doloroso (MACHADO, 2006; SILVERTHORN, 2003).

Após receber os estímulos a informação é encaminhada para substância gelatinosa no corno dorsal, cruza para o lado oposto da medula e ascende ao cérebro pelos tratos espino-talâmicos até o tálamo de onde os sinais são transmitidos para diversas áreas do córtex sensorial somático, substância cinzenta periaquedutal, hipotálamo, amígdala e cerebelo, onde a informação é integrada com outras experiências passadas e processada para produzir a percepção da dor e/ou provocar a resposta que é enviada à medula espinhal (WANNMACHER; FERREIRA, 2004c). Alguns reflexos, no entanto, não exigem integração no encéfalo e são denominados reflexos medulares (SILVERTHORN, 2003).

4.1 Material vegetal

Foram coletados frutos de uma árvore cultivada no Campus do INPA em Manaus (AM) em março de 2009. As coordenadas geográficas da área são 03° 05' 48, 0'' S e 59° 59' 55,0'' W.Gr., em altitude de 197 pés ou cerca de 65,7 m acima do nível do mar. Foi preparada exsicata para correta identificação do táxon, depositada no herbário do INPA como *Caesalpinia ferrea* sob registro número 228022.

4.2 Animais

Foram utilizados ratos Wistar (*Rattus norvegicus*) e camundongos Swiss (*Mus musculus*) machos ou fêmeas, entre 4 – 6 meses de idade, fornecidos pelo biotério do Centro de Biotecnologia da Amazônia (CBA). Os animais permaneceram alojados em número de seis por caixa-moradia, em sala com temperatura 23 ± 1 °C, iluminação com ciclo 12 horas, recebendo água e ração *ad libitum*). Os estudos farmacológicos foram realizados no Laboratório de Farmacologia de Medicamentos, Toxicologia e Biotério do CBA.

Todos os protocolos experimentais foram de acordo com as normas do Comitê de Ética em Pesquisa da instituição.

4.3 Fármacos, reagentes e solventes

Ácido acético glacial P.A (Nuclear-Brasil), carragenina (Sigma), ciproheptadina (Cobavital® Solvey Farma), citrato de fentanila (Fentanest®-Cristália), cloreto de sódio P.A (Merck-Brasil), dextrana 72000 (Sigma), etanol P.A (Merck-Brasil), éter etílico P.A (Nuclear-Brasil), heparina (Hipolabor), indometacina (Sigama - EUA), naloxona (Sigma), pentobarbital (Sigma), formaldeído (Bioquímica).

4.4 Composição das Soluções

Líquido para pletismômetro: NaCl 0,1% + 8 gotas de extran 10%

Tampão fosfato salino (PBS) heparinizado: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0,2 M; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 M + heparina (5 UI/mL).

Líquido de Türk: ácido acético glacial, água destilada; azul de metileno a 1%

5 METÓDOS

5.1 Tratamento do Material Vegetal

O material vegetal coletado foi selecionado manualmente, sendo retiradas e desprezadas as sementes dos frutos. Após a seleção, foi realizada análise da perda por dessecação (PD%) nos frutos sem sementes. O material com valor de PD acima de 12% foi submetido à secagem em estufa de ar circulante à temperatura de $45\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por um período de sete dias. Após a secagem, o material foi submetido à moagem em moinho de facas de 1 mm, constituindo a matéria-prima vegetal (MPV). Os estudos tecnológicos foram realizados no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas na Universidade Federal do Amazonas – UFAM.

5.2 Caracterização da matéria-prima vegetal

5.2.1 Determinação de perda por dessecação (F. BRAS. IV, 1988)

500 mg de matéria-prima vegetal, exatamente pesados, foram colocados em pesa-filtro, previamente tarado, e submetidos à dessecação em estufa a $105\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 horas. Após esse tempo, os pesa-filtros foram retirados da estufa e colocados em dessecador para arrefecimento por 20 minutos, pesando-se em seguida. Esse procedimento foi repetido a cada hora até atingir peso constante. O ensaio foi realizado em triplicata.

5.2.2 Determinação do teor de extrativos (BUNDESVEREINIGUNG, 1986)

1g de matéria-prima vegetal, exatamente pesado, foi submetido à extração com 100 mL de água destilada por decocção num período de 10 minutos. Após seu arrefecimento, o volume de água perdido foi reconstituído e filtrado, desprezando os primeiros 20 mL do filtrado. Em seguida, 20 g do filtrado, exatamente pesados, foram colocados em pesa-filtros previamente tarados e evaporados a secura em banho-maria com agitação ocasional. Depois disso, os pesa-filtros foram colocados em estufa a $105\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 horas. Após esse tempo, os pesa-filtros foram retirados da estufa e colocados em dessecador para arrefecimento por 20 minutos, pesando em seguida. Esse procedimento foi repetido a cada

hora até atingir peso constante. O ensaio foi realizado em triplicata e o cálculo do teor extrativo determinado de acordo com a equação 1.

$$TE = \frac{g \times FD}{m - pd} \times 100 \quad \text{equação 1}$$

Onde: TE = teor extrativo (%m/m); g = massa do resíduo seco (g); FD = Constante (5); m = massa da MPV (g); pd = perda por dessecação (%m/m).

5.2.3 Análise granulométrica através de tamisação (VOIGT, 2000)

50g da matéria-prima vegetal, exatamente pesados, foram submetidos à passagem através de tamises, previamente tarados, com abertura de malha de 1,0; 0,8; 0,71; 0,6; 0,5; 0,4; 0,33 e 0,25 mm. A tamisação foi realizada a 60 vibrações por minuto durante 15 min. As frações retidas, nos tamises e coletor, foram pesadas e os dados analisados por método gráfico, construindo-se curvas de retenção e passagem e histograma de distribuição, a fim de se obter o diâmetro médio de partículas e a amplitude granulométrica do pó. O ensaio foi realizado em triplicata.

5.3 Obtenção do extrato aquoso

O extrato aquoso foi preparado com uma relação droga: solvente de 2,5% (m/V), através de decocção por refluxo por um período de 15 minutos, utilizando água destilada como líquido extrator.

5.4 Caracterização do Extrato Aquoso

5.4.1 Determinação do pH (F. BRAS. IV, 1988)

O pH foi determinado utilizando 20 mL de extrato aquoso, em potenciômetro, previamente calibrado. O resultado foi expresso pela média de seis determinações.

5.4.2 Determinação da densidade relativa (F.BRAS.IV,1988)

Foi realizada em picnômetro de 25 mL, previamente calibrado através da aferição do mesmo vazio e contendo água. Em seguida, foi determinada a massa do picnômetro contendo o extrato aquoso. A densidade foi expressa pela média de três determinações e calculada segundo a equação 2:

$$d_{25}^{25} = \frac{m_{se}}{m_{H_2O}} \quad \text{equação 2}$$

Onde: d_{25}^{25} = densidade relativa; m_{se} = massa do extrato aquoso; m_{H_2O} = massa da água

5.4.3 Determinação de resíduo seco (HARTKE; MUTSCHLER, 1986)

Alíquota de 20 mL da solução extrativa foi exatamente pesada, diretamente em pesa-filtros, previamente tarados e evaporada até secura em banho-maria, sob agitação ocasional. Após evaporação da solução extrativa, o pesa-filtro contendo o resíduo foi colocado em estufa a $105\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 horas. Após esse tempo, os pesa-filtros foram retirados da estufa e colocados em dessecador para arrefecimento por 20 minutos, pesando em seguida. Esse procedimento foi repetido até atingir peso constante. O ensaio foi realizado em triplicata.

5.4. 4 Rendimento operacional

O rendimento foi calculado pela diferença entre o valor teórico de sólidos solúveis (resíduo seco) presente na solução extrativa e o valor experimental do extrato seco obtido após a operação de secagem.

5.5. Obtenção dos extratos secos

5.5.1 Secagem por Liofilização

O extrato aquoso foi previamente concentrado até redução de 93% do volume inicial. A concentração foi realizada em um evaporador rotatório (Rotary Evaporator RE 47,

Yamato), sob pressão reduzida. Em seguida, a solução concentrada foi congelada e levada ao Liofilizador (Modulyo D – Termo Electron corporation), segundo as condições de secagem descritas na tabela 2.

O extrato seco liofilizado (ESL) obtido foi armazenado em frascos âmbar, hermeticamente fechados.

Tabela 2 – Condições de secagem utilizadas na obtenção do extrato seco por liofilização

Condições de liofilização	Especificações
Tempo de liofilização	120 horas
Pressão	-1 bar
Temperatura	-40°C

5.5.2 Secagem por Aspersão

O extrato aquoso foi seco em aparelho *Spray-drying* (MSD 1,0 - Labmaq), provido de atomizador do tipo pneumático e câmara de secagem em sistema de fluxo co-corrente. A alimentação foi realizada por bomba peristáltica. As condições de secagem estão descritas na tabela 3.

O extrato seco por aspersão (ESA) obtido foi armazenado em frascos âmbar, hermeticamente fechados.

Tabela 3 - Condições de secagem utilizadas na obtenção do extrato seco por aspersão

Condições de aspersão	Especificações
Temperatura de entrada	140 ± 2 °C
Temperatura de saída	104 ± 2 °C
Fluxo de alimentação	8 mL/min
Pressão de ar comprimido	4 Bar
Diâmetro de atomizador	0,7 mm

5.6 Caracterização dos extratos secos

5.6.1 Determinação de umidade (F. BRAS. IV, 1988)

500 mg do extrato seco, exatamente pesados, foram colocados em pesa-filtro previamente tarado e submetidos à dessecação em estufa a $105\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 2 horas, após esse tempo, os pesa-filtros foram retirados da estufa, e colocados em dessecador para arrefecimento por 20 minutos, pesando-se em seguida. Esse procedimento foi repetido a cada hora até atingir peso constante. O ensaio foi realizado em triplicata.

5.6.2 Análise quantitativa de taninos totais (SOARES, 2002)

Polifenóis totais (PFT): Preparou-se uma solução-mãe utilizando-se 0,01g de extrato seco dissolvido em 100 mL de água. Em seguida, transferiu-se uma alíquota de 5 mL dessa solução para um balão de 25 mL e completou-se o volume com água destilada. A leitura da absorbância foi realizada a 264 nm. O ensaio foi realizado em triplicata.

Fração não-tanante (FNT): 150 mg de caseína foi adicionada a 10,0 mL da solução-mãe. A mistura foi homogeneizada em agitador magnético, durante uma hora e, em seguida, filtrada em papel de filtro. 5,0 mL do filtrado foi transferido para um balão volumétrico de 25 mL e o volume completado com água destilada, sendo realizada leitura da absorbância em comprimento de onda a 264 nm. O ensaio foi realizado em triplicata.

Determinação do teor de taninos totais (TT): Os teores de polifenóis totais, fração não-tanante e de taninos totais foram calculados através das equações 3, 4 e 5.

$$PFT = \frac{A1 \cdot FD}{A_{1cm}^{\%} \cdot (m - p)} \quad (\text{Equação 3})$$

$$FNT = \frac{A2 \cdot FD}{A_{1cm}^{\%} \cdot (m - p)} \quad (\text{Equação 4})$$

$$TT = PFT - FNT \quad (\text{Equação 5})$$

Onde: PFT = polifenóis totais (g%); FNT = fração não-tanante (g%); TT = taninos totais; A1 = absorbância de polifenóis totais; A2 = absorbância da fração não-tanante; FD = fator de diluição; m = massa de matéria-prima vegetal (g); p = perda por dessecação de matéria-prima vegetal (g); $A_{1cm}^{1\%}$ = coeficiente de absorção específica do ácido gálico.

5.6.3 Rendimento operacional

O rendimento foi calculado pela diferença entre o valor teórico de sólidos solúveis (resíduo seco) presente na solução extrativa e o valor experimental do extrato seco obtido após secagem.

5.7 Triagem farmacológica geral (IRWIN, 1968)

Teste realizado para determinação de doses efetivas, via de administração, comparação da biodisponibilidade, tempo de observação relativo e principais efeitos a serem comprovados em outros testes. Grupos de camundongos (6/grupo) foram tratados com os extratos ESA e ESL (0,1; 0,3 e 1 g/kg, v.o.), colocados em caixas-moradia e avaliados após 30 minutos, uma, duas, três, quatro e 24 horas. Nestes intervalos foram observados: contorções abdominais, pêlos arrepiados, ptose palpebral, locomoção, tônus muscular, tremores, paralisia do trem posterior, salivação, cromadocriorréia, secreção brônquica, convulsões e mortes.

5.8 Sistema nervoso central – Atividades centrais específicas

Em todos os experimentos, grupos de camundongos (8/grupo), machos ou fêmeas, foram tratados com veículo (água), ESA e ESL 0,1; 0,3 e 1 g/kg v.o., volume máximo de 5 mL/kg, 60 minutos antes dos experimentos.

5.8.1 Sono induzido por barbitúrico (CARLINI *et al.*, 1986)

Sessenta minutos após os tratamentos, foi aplicado pentobarbital sódico (50 mg/kg, i.p.) e mediu-se o tempo de indução do sono (latência) e o tempo para recuperação do sono (duração) até 3 horas após a injeção de barbitúrico.

5.8.2 Sono induzido por éter etílico (VIEIRA, 2001)

Sessenta minutos após os tratamentos os animais foram colocados em uma câmara de vidro transparente (30 cm x 20 cm de diâmetro), hermeticamente fechada, saturada com éter e foram registradas a latência e a duração da hipnose induzida pelo éter etílico.

5.9 Avaliação da atividade motora - teste do “rota-rod” (DUNHAM ; MYA, 1957)

O aparelho utilizado neste teste é constituído de uma barra de 2,5 cm de diâmetro subdividido em seis compartimentos, colocada a 25 cm de altura e girando a 12 rpm. Os animais foram selecionados 24h antes do teste, em sessões de 2 minutos de duração, sendo escolhidos aqueles que permaneceram na barra giratória por este período. No dia do teste, os animais selecionados receberam o tratamento e foram colocados na barra por um minuto. Foram registrados a latência para a primeira queda e o tempo total de permanência na barra (com três reconduções no máximo) à barra.

5.10 Atividade em nocicepção e inflamação

Ratos ou camundongos (6/grupo) foram tratados com extrato seco por aspersão (ESA) ou por liofilização (ESL) 0,1; 0,3 e 1 g/kg, v.o., uma hora antes dos experimentos.

5.10.1 Teste da formalina 1,5% (HUNSKAAR *et al.*, 1985)

Sessenta minutos após os tratamentos, foi aplicada formalina 1,5% (300 µL/pata, subplantar) na pata posterior direita de cada rato. Em seguida, os animais foram imediatamente colocados em uma caixa de acrílico transparente e observados durante 30 minutos em dois intervalos de tempo: de 0 a 5 minutos e de 15 a 30 minutos. A quantificação foi obtida registrando-se o tempo que o animal permaneceu lambendo a pata (*licking-time*), frequentemente usado como índice de nocicepção. Naloxona 5 mg/kg, i.p. administrada 15 minutos antes do tratamento com ESA ou ESL, foi utilizada para avaliar a possível ação tipo opióide dos extratos.

5.10.2 Contorções abdominais induzidas por ácido acético 0,8% (KOESTER *et al.*, 1959)

O ácido acético foi diluído em salina 0,9% e utilizado por um período máximo de duas horas, preparando-se nova diluição após esse período. Após sessenta minutos dos tratamentos foi injetado ácido acético (0,8%, 10 mL/kg, i.p.) em camundongos. Os animais foram colocados em caixas de acrílico e as contorções foram contadas cumulativamente a cada 5 minutos durante os 30 minutos subsequentes à injeção do ácido acético.

5.10.3 Teste da retirada da cauda (*tail-flick*) (EMIM *et al.*, 2000)

O método consistiu na imersão do terço inferior da cauda dos ratos na água aquecida a 55 °C por duas vezes consecutivas (sem secar a cauda), anotando-se o segundo tempo de reação. Os ratos foram colocados em contensores cinco minutos antes das medidas de reatividade ao calor. Após a medida basal, os animais foram tratados, procedendo-se as medidas a cada 30 minutos até duas horas após a administração das drogas. Foi estabelecido tempo de corte de 15 segundos para minimizar danos tissulares.

5.10.4 Edema de pata induzido por carragenina 1% e dextrana 0,1% (WILLIAMS, 1979)

O volume das patas de ratos foi medido pelo deslocamento de líquido em um pletismômetro digital LE 7500. Após a medida do volume basal de ambas as patas traseiras, ratos foram submetidos ao tratamento com as drogas. Sessenta minutos após os tratamentos, os animais receberam uma injeção de carragenina 1% ou dextrana 0,1% (300 µL/pata, s.pl.) em uma das patas traseiras e igual volume de salina 0,9 % foi injetado na pata contralateral.

Imediatamente após a injeção do estímulo inflamatório, o volume das patas foi medido, repetindo-se a cada hora até completar 5 horas da injeção da carragenina e 3 horas da dextrana. O volume do edema foi obtido pela diferença entre a pata injetada com carragenina e a pata injetada com salina.

5.10.5 Peritonite induzida por carragenina - Migração celular

Para a realização deste teste, foi utilizado protocolo experimental proposto por Ferrándiz e Alcaraz (1991). Decorridos 60 minutos dos tratamentos, ratos receberam injeção de carragenina 1% (1 mL, i.p.) e foram devolvidos às caixas onde permaneceram com livre acesso à ração e a água durante cinco horas. Após esse período, os animais foram anestesiados e mortos por deslocamento cervical. O exsudato peritoneal foi coletado com uma pipeta Pasteur através de laparotomia abdominal. Para facilitar a coleta, todos os animais receberam injeção de 10 mL de tampão fosfato (PBS) heparinizado (5 UI/mL), massageando-se o abdômen para soltar as células aderidas. Uma amostra do lavado peritoneal foi diluída 1:20 em líquido de Türk e as células foram contadas em câmara de Neubauer.

5.11 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão. Os dados biológicos foram analisados por análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Dunnett ou Newman Kells e teste *t* de Student utilizando-se o programa Graphpad Prism[®] versão 5.0. Os dados da caracterização tecnológica dos extratos foram analisados através de teste *t* de Student utilizando o programa Excel. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 Caracterização da Matéria-Prima Vegetal (MPV)

Os resultados de caracterização estão descritos na Tabela 4. Observou-se que o teor de umidade da Matéria-Prima Vegetal encontra-se abaixo do máximo permitido, ou seja, menor que 14% (LIST; SCHMIDT, 1989), mostrando que o tratamento de secagem ao qual foi submetido o material vegetal, frutos sem sementes de *C. ferrea*, originou uma MPV com adequada condição para armazenamento.

Tabela 4 - Características da matéria-prima vegetal de *Caesalpinia ferrea* C. Mart.

Ensaio	Resultados $\bar{x} \pm s$
Perda por dessecação (PD %)	$11,52 \pm 0,338$
Teor extrativo (g %)	$28,69 \pm 0,289$
Tamanho médio de partículas (μm)	$372,66 \mu\text{m}$

Na figura 5 pode ser observada a granulometria da MPV estudada. Verifica-se, no histograma de distribuição, uma alta frequência de partículas na faixa granulométrica menor que 250 μm (aproximadamente 42%).

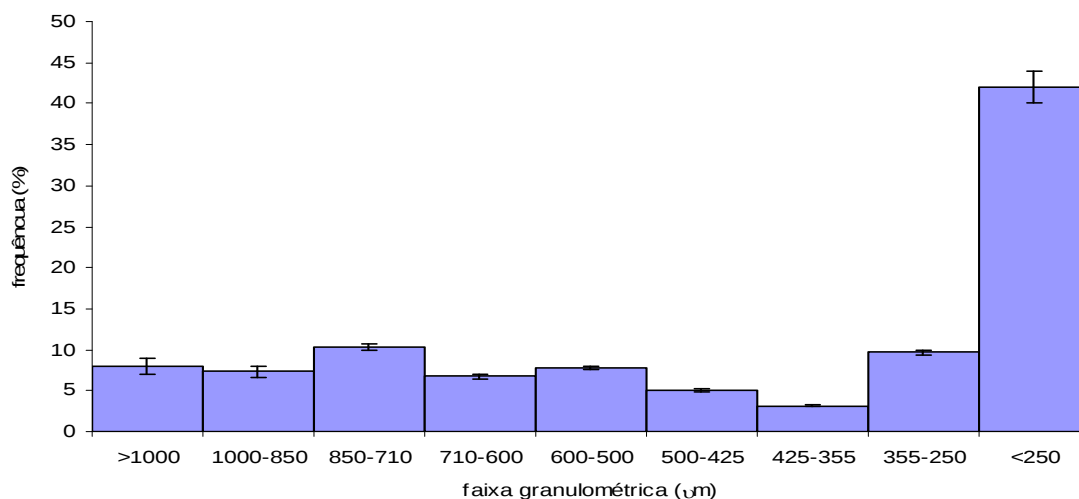


Figura 5 - Histograma de distribuição da granulometria da matéria-prima vegetal oriunda de *Caesalpinia ferrea* C. Mart.

O pequeno diâmetro médio de partícula (372,66 μm), obtido a partir do gráfico das curvas de retenção e passagem da MPV (figura 6) ratifica o histograma de distribuição e permite classificar a MPV estudada como pó moderadamente fino (F. BRAS. IV, 1988).

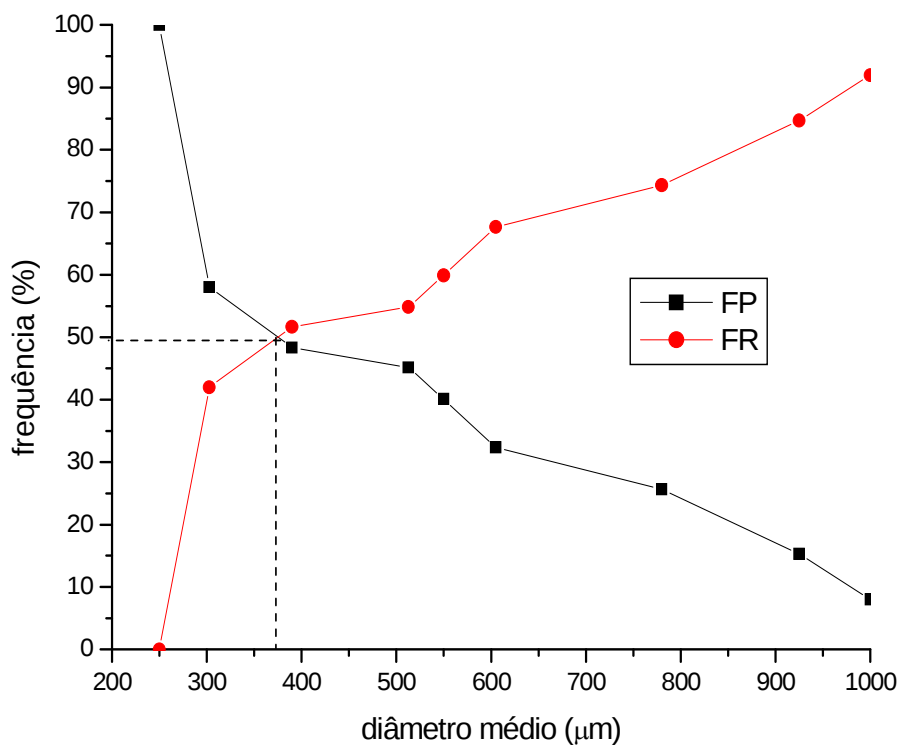


Figura 6 - Curva de retenção e passagem da matéria-prima vegetal de *Caesalpinia ferrea* (FP = fração de passagem, FR = fração de retenção)

6.2 Caracterização do extrato aquoso

As características do extrato aquoso estão descritas na Tabela 5.

Tabela 5 - Características do extrato aquoso 2,5 % (m/V)

Ensaio	Valor $\bar{x} \pm s$
Resíduo seco (g %)	$0,98 \pm 0,008$
pH	$3,366 \pm 0,081$
Densidade relativa (g/mL)	$1,003 \pm 0,001$

O resíduo seco é um ensaio onde se determina a quantidade de sólidos extraídos da droga vegetal pelo solvente. A solução extrativa padronizada apresentou um resíduo seco de 0,98 g%, significando que 100 g da solução extrativa preparada conforme descrito acima origina uma solução com 0,98 g de substâncias sólidas solúveis. Esse valor de resíduo seco é importante para prever o rendimento de um produto seco.

O pH de 3,37, pode ser explicado pela presença na espécie vegetal estudada de ácidos fenólicos, taninos e flavonóides, conforme descrito na literatura (GONZALEZ *et al.*, 2004). Essas substâncias apresentam bastantes grupos hidroxila tornando as soluções extrativas com característica ácida. Exemplos de taninos são os ácidos gálico e elágico.

A densidade da solução extrativa de *Caesalpinia ferrea* foi 1,0003 g/mL indicando um valor da relação massa e volume semelhante ao da água, o que é justificado por esta ser o líquido extrator utilizado.

6.3 Caracterização dos extratos secos

As características dos extratos secos por liofilização (ESL) e por aspersão (ESA) estão descritas na Tabela 6.

Tabela 6 - Características dos extratos secos por liofilização (ESL) e por aspersão (ESA)

Ensaio	ESL $\bar{x} \pm s$	ESA $\bar{x} \pm s$
Umidade (g %)	11,51 ^a $\pm$ 0,22	14,34 ^b $\pm$ 0,48
Polifenóis totais (g%)	43,38 ^c $\pm$ 0,97	49,03 ^c $\pm$ 0,97
Taninos Totais (g%)	11,66 ^c $\pm$ 0,97	13,12 ^c $\pm$ 1,45
Rendimento (%)	81.63	40.81

Médias seguidas de mesma letra não há diferença significativa ($\alpha=0,05$)

Pode ser observado que apesar da diferença estatística no teor de umidade de ambos os extratos, o mesmo não acontece com os marcadores químicos (polifenóis e taninos totais), demonstrando assim que os diferentes métodos de secagem empregados (liofilização e secagem por aspersão) não influenciaram na composição química dos extratos secos obtidos.

6.4 Triagem farmacológica geral

No teste geral de atividades, os extratos secos por aspersão (ESA) e por liofilização (ESL) foram administrados nas doses 0,1; 0,3; e 1g/kg, v.o. Nos dois tratamentos, os camundongos tratados (n = 6/grupo) apresentaram: aumento do movimento das vibrissas, do número de levantadas e tentativas de escalar. Também foi observado sinal de alteração autonômica com aumento da defecação em relação ao grupo controle tratado apenas com água (5 mL/kg, v.o.) até 2 horas após o tratamento.

Sinais de ataxia, incoordenação motora, irritabilidade ou hiperreatividade a estímulos nociceptivos não foram registrados em nenhum período de observação. Não houve morte dos animais tratados com os extratos, demonstrando que estes não foram tóxicos graves até a dose de 1 g/kg (Tabela 7).

Tabela 7 - Efeito dos extratos seco por aspersão (ESA) e por liofilização (ESL) de *Caesalpinia ferrea* (0,1; 0,3 e 1 g/kg, v.o.) em camundongos avaliados no teste hipocrático

Comportamento	ESL e ESA (g/kg)		
	0,1	0,3	1
SNC-Estimulante	Movimento intenso das vibrissas + (até 2 h)	Movimento intenso da vibrissas + (até 2 h)	Movimento intenso da vibrissas + (até 2 h)
SNC-Depressor	Perda do reflexo do endireitamento e auricular + (2-24 h)	Perda do reflexo do endireitamento e auricular + (2-24 h)	Perda do reflexo do endireitamento e auricular + (até 24 h)
Outros	Pedalar + (3-24 h)	Levantar + (1 h) Escalar + (até 30 min) Pedalar + (24 h)	Pedalar + (até 24 h)
SNA	Tônus muscular + (até 24 h) Força para agarrar + (até 24 h)	Tônus muscular + (até 24h) Força para agarrar + (até 24 h) Defecção + (2h)	Tônus muscular + (até 24 h) Força para agarrar + (até 24h) Defecção + (1 até 24h)
Morte	ausente	ausente	ausente

Observações realizadas 30 minutos, 1, 2, 3, 4 e 24 horas após o tratamento

Quantificação (-) inibição (0) sem efeito observável (+) efeito presente (++) efeito intenso

6.5 Atividades centrais específicas

6.5.1 Sono induzido por barbitúrico

6.5.1.1 Efeito do extrato de *C. ferrea* seco por aspersão (ESA)

A injeção de pentobarbital (50 mg/kg, i.p.) nos camundongos controles tratados com água (5 mL/kg, v.o.) induziu sono com latência de $3,6 \pm 0,2$ minutos e duração de $81,6 \pm 7,7$ minutos (8/grupo).

O tratamento com o extrato ESA (0,1; 0,3 e 1 g/kg, v.o.) uma hora antes da injeção do pentobarbital não mostrou efeito sobre a latência para o sono ($3,8 \pm 0,1$; $4,3 \pm 0,2$ e $3,4 \pm 0,3$ minutos, respectivamente). Nestes animais, a duração do sono foi $106,8 \pm 11,5$; $129,1 \pm 16,4$ e $148,3 \pm 13,6$ minutos, respectivamente. As maiores doses aumentaram a duração do sono de 58% e 82%, respectivamente (Figura 7). Não houve diferença estatística significativa entre os extratos testados.

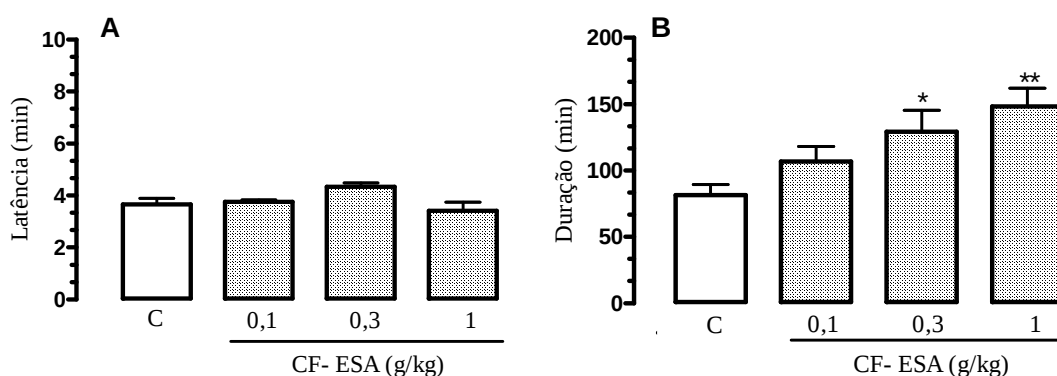


Figura 7 – Efeito do tratamento prévio (1 h) com extrato seco por aspersão (ESA) de *Caesalpinia ferrea* (0,1; 0,3 e 1 g/kg, v.o.) no sono induzido por pentobarbital (50 mg/kg, i.p.) em camundongos. **A** – Latência para indução do sono (min); **B** – Duração do sono (min). As colunas e barras representam as médias $\pm$ erro padrão (oito animais/grupo). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ (ANOVA seguida pelo teste de Dunnett)

6.5.1.2 Efeito do extrato de *C. ferrea* seco por liofilização (ESL) no sono induzido por barbitúrico

A injeção de pentobarbital (50 mg/kg, i.p.) nos camundongos controles tratados com água (5 mL/kg, v.o.) produziu sono com latência de $4,2 \pm 0,5$ minutos e duração de $74,6 \pm 8,9$ minutos (8/grupo).

O tratamento com o extrato ESL (0,1; 0,3 e 1 g/kg, v.o.) uma hora antes da injeção do pentobarbital não mostrou efeito sobre a latência para o sono ($5,0 \pm 0,6$; $5,4 \pm 0,6$ e $5,4 \pm 1,0$ minutos, respectivamente). Nesses animais, a duração do sono foi $88,3 \pm 11,7$; $140,6 \pm 39,5$ e $148,3 \pm 39,0$ minutos, respectivamente. As maiores doses aumentaram a duração do sono de 88% e 99%, respectivamente (Figura 8). Não houve diferença estatística significativa entre os dois extratos testados.

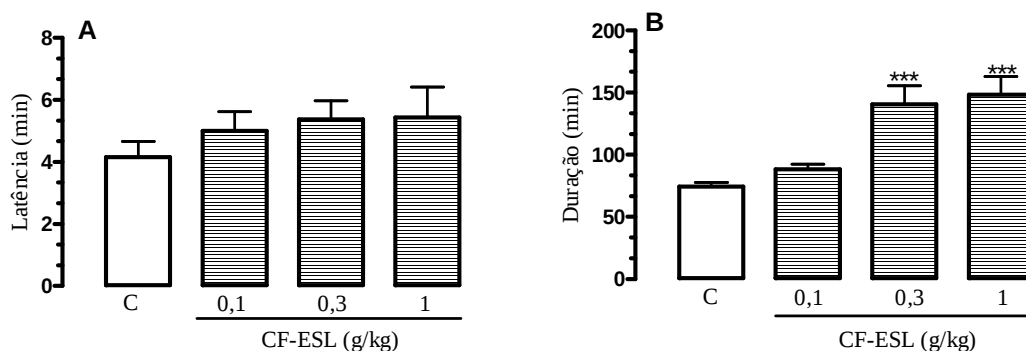


Figura 8 – Efeito do tratamento prévio (1 h) com extrato seco por liofilização (ESL) de *Caesalpinia ferrea* (0,1; 0,3 e 1 g/kg, v.o.) no sono induzido por pentobarbital (50 mg/kg, i.p.) em camundongos. **A** – Latência para indução do sono (min); **B** – Duração do sono (min). As colunas e barras representam as médias $\pm$ erro padrão (oito animais/grupo). ***p < 0,001 (ANOVA seguida pelo teste de Dunnett)

6.5.2 Sono induzido por éter etílico

6.5.2.1 Efeito do extrato de *C. ferrea* seco por aspersão (ESA)

A exposição ao éter etílico nos camundongos controles tratados com água (5 mL/kg, v.o.) produziu sono com latência de $43,5 \pm 11,7$ segundos e duração de $65,2 \pm 7,1$ segundos (8/grupo).

O tratamento com ESA (0,1; 0,3 e 1 g/kg, v.o.), uma hora antes da exposição ao éter etílico diminuiu a latência para o sono ($30,0 \pm 9,1$; $28,6 \pm 14,4$ e $24,2 \pm 6,7$ segundos, respectivamente). Somente com a dose de 1g/kg (56% menor que a dos animais controle). Nesses animais, a duração do sono foi $86,2 \pm 2,7$; $101,7 \pm 5,3$ e $115,6 \pm 3,6$ segundos, respectivamente. O sono dos animais tratados com as três doses do ESA aumentou 32, 56 e 77%, respectivamente, em relação ao grupo controle (Figura 9). Não houve diferença significante entre os dois extratos testados.

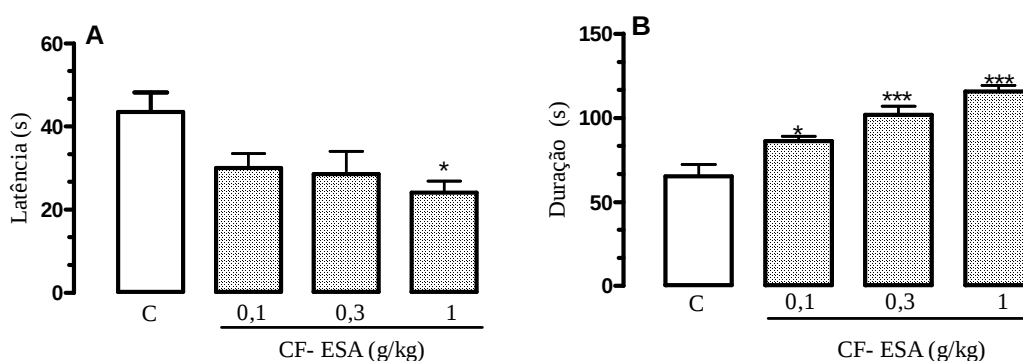


Figura 9 – Efeito do tratamento prévio (1 h) com extrato seco por aspersão (ESA) de *Caesalpinia ferrea* (0,1; 0,3 e 1 g/kg, v.o.) no sono induzido por éter etílico em camundongos. **A** – Latência para indução do sono (s); **B** – Duração do sono (s). As colunas e barras representam as médias $\pm$ erro padrão (oito animais/grupo). * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ (ANOVA seguida pelo teste de Dunnett)

6.5.2.2 Efeito do extrato de *C. ferrea* seco por liofilização (ESL) no sono induzido por éter etílico

A exposição ao éter etílico produziu sono com latência de $40,0 \pm 4,2$ segundos e duração de $65,7 \pm 6,7$ segundos (8/grupo) nos camundongos controles tratados com água (5 mL/kg, v.o.).

O tratamento prévio com ESL (0,1; 0,3 e 1 g/kg, v.o.), uma hora antes da exposição ao éter etílico não alterou a latência para o sono ($33,9 \pm 1,9$; $44,6 \pm 3,6$ e $45,4 \pm 5,1$ segundos, respectivamente). Nesses animais, a duração do sono foi $107,9 \pm 8,3$; $112,8 \pm 12,2$ e $120,7 \pm 14,9$ segundos, respectivamente. O sono dos animais tratados com as três doses do ESL aumentou 64, 72 e 84%, respectivamente, em relação ao grupo controle (Figura 10). Não houve diferença estatística significativa entre os dois extratos utilizados.

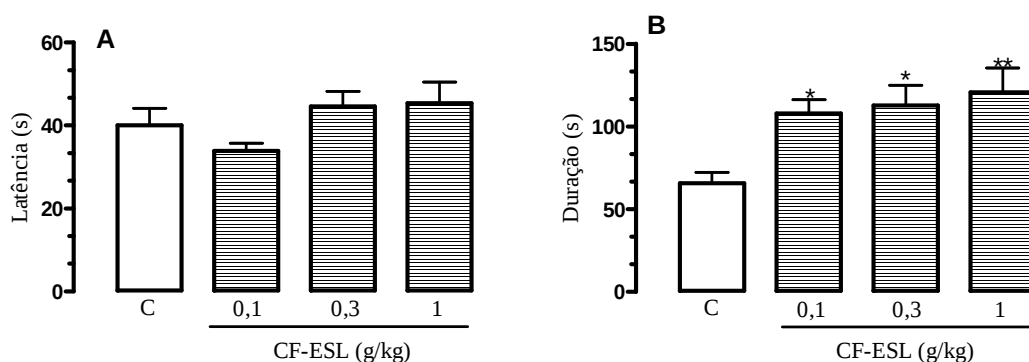


Figura 10 – Efeito do tratamento prévio (1 h) com extrato seco por liofilização (ESL) de *Caesalpinia ferrea* (0,1; 0,3 e 1 g/kg, v.o.) no sono induzido por éter etílico em camundongos. **A** – Latência para indução do sono (s); **B** – Duração do sono (s). As colunas e barras representam as médias $\pm$ erro padrão (oito animais/grupo). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ (ANOVA seguida pelo teste de Dunnett)

6.6 Atividade motora

6.6.1 Efeito do extrato de *C. ferrea* seco por aspersão (ESA) no teste do rota-rod

Em camundongos controles tratados previamente com água (5 mL/kg, v.o.), a latência para a primeira queda da barra giratória foi $13,2 \pm 3,2$ segundos e o tempo de permanência foi $25,0 \pm 5,7$ segundos em um minuto de duração do teste (8/grupo).

O tratamento prévio com ESA (0,1; 0,3 e 1 g/kg) não alterou a latência para a primeira queda ($6,5 \pm 2,1$; $6,3 \pm 2,0$ e $5,8 \pm 1,5$ segundos, respectivamente) e nem o tempo de permanência na barra ($18,8 \pm 7,5$; $22,8 \pm 5,0$ e $21,3 \pm 6,0$ segundos, respectivamente) (Figura 11). Não houve diferença estatística significativa entre os dois extratos utilizados.

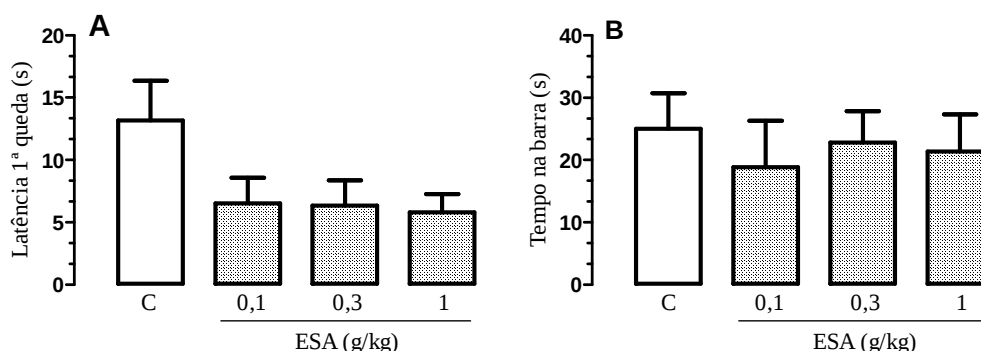


Figura 11 – Efeito do tratamento prévio (1 h) com extrato seco por aspersão (ESA) de *Caesalpinia ferrea* (0,1; 0,3 e 1 g/kg, v.o.) no teste do rota-rod em camundongos. **A** – Latência para a primeira queda (s); **B** – tempo de permanência na barra (s). As colunas e barras representam as médias $\pm$ erro padrão (oito animais/grupo). (ANOVA seguida pelo teste de Dunnett)

6.6.2 Efeito do extrato de *C. ferrea* seco por liofilização (ESL) no teste do rota-rod

Em camundongos controles tratados previamente com água (5 mL/kg, v.o.), a latência para a primeira queda da barra giratória foi $8,4 \pm 2,0$ segundos e o tempo de permanência $21,4 \pm 4,2$ segundos em um minuto de duração do teste (8/grupo).

O tratamento prévio com ESL (0,1; 0,3 e 1 g/kg) não alterou a latência para a primeira queda ($8,0 \pm 2,1$; $10,3 \pm 4,6$ e $6,6 \pm 1,6$ segundos, respectivamente) e nem o tempo de permanência na barra ($23,4 \pm 2,7$; $31,8 \pm 6,3$ e $24,0 \pm 1,6$ segundos, respectivamente) (Figura 12). Não houve diferença estatística significativa entre os dois extratos utilizados.

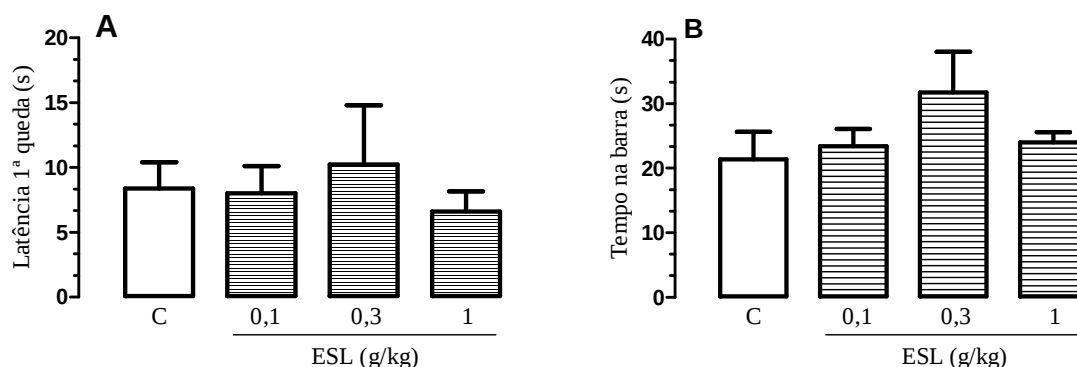


Figura 12 – Efeito do tratamento prévio (1 h) com extrato seco por liofilização (ESL) de *Caesalpinia ferrea* (0,1; 0,3 e 1 g/kg, v.o.) no teste do rota-rod em camundongos. **A** – Latência para a primeira queda (s); **B** – tempo de permanência na barra (s). As colunas e barras representam as médias $\pm$ erro padrão (oito animais/grupo) (ANOVA seguida pelo teste de Dunnett)

6.7 Atividade em nocicepção e inflamação

6.7.1 Teste da formalina (1,5%)

6.7.1.1 Efeito do extrato seco de *C. ferrea* por aspersão (ESA)

Em ratos controles tratados previamente com água (5 mL/kg, v.o.), o tempo de lambertura da pata na primeira fase do teste (0-5 minutos) foi $94,8 \pm 5$ segundos e na segunda fase (15-30 minutos) foi $160,2 \pm 19,8$ segundos (6/grupo).

O tratamento prévio (1h) com ESA 0,1 e 0,3 g/kg, v.o. diminuiu o tempo de lambertura da pata na primeira fase para $52,0 \pm 3,1$ e $65,4 \pm 8,5$ segundos, respectivamente. Este efeito foi 55% e 69% menor que nos animais controle. Na segunda fase do teste, o tempo de lambertura foi reduzido para $80 \pm 11,9$ e $105,4 \pm 11,1$ segundos, respectivamente. Estas doses diminuíram o tempo de 50% e 67% em relação aos animais controles (Figura 13). Não houve diferença estatística significativa entre os dois extratos utilizados.

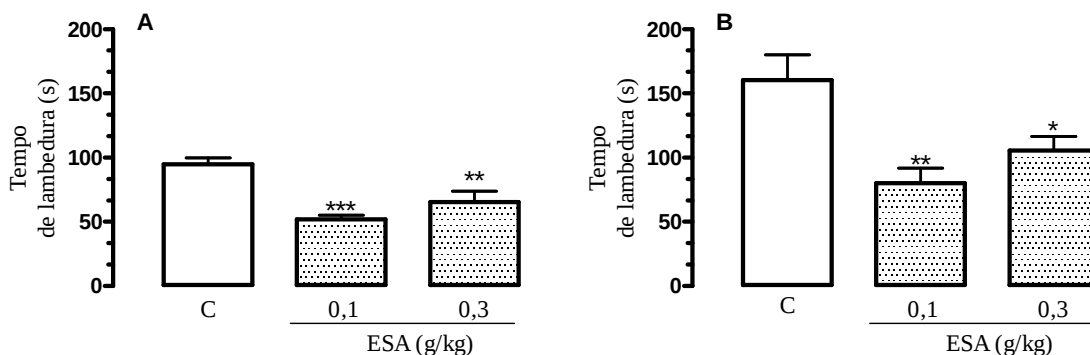


Figura 13 - Efeito do tratamento prévio (1 h) com extrato seco por aspersão (ESA) de *Caesalpinia ferrea* (0,1 e 0,3 g/ kg, v.o.) no teste da formalina 1,5% em ratos. **A** - tempo de lambertura da pata na primeira fase (0-5 min) e **B** - na segunda fase (15-30 min). As colunas representam as médias $\pm$ erro padrão (seis animais/grupo). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ (ANOVA seguida pelo teste de Dunnett)

- **Tratamento 30 minutos antes da injeção de formalina**

Em ratos controles tratados previamente com água (5 mL/kg, v.o.) 30 minutos antes da injeção de fomalina (1,5%) o tempo de lambertura na primeira fase foi $72,2 \pm 4,7$ e na segunda fase foi $103,0 \pm 12,4$ segundos (6/grupo).

O tratamento com ESA (0,1 g/kg,v.o) 30 minutos antes da injeção de formalina diminuiu o tempo na primeira fase para $39,0 \pm 6,5$ segundos e $68,2 \pm 4,0$ segundos na segunda fase, correspondendo à diminuição de 54% e 57%, respectivamente (Figura 14). Não houve diferença estatística significativa entre os dois extratos testados.

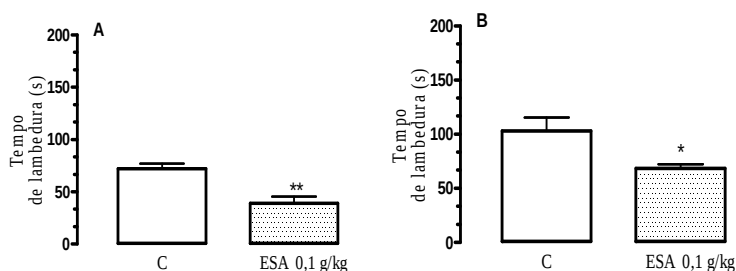


Figura 14 - Efeito do tratamento prévio (30 min) com extrato seco por aspersão (ESA) de *Caesalpinia ferrea* (0,1 e 0,3 g/ kg, v.o.) no teste da formalina 1,5 % em ratos. **A** - tempo de lambedura da pata na primeira fase (0-5 min) e **B** - na segunda fase (15-30 min). As colunas representam as médias $\pm$ erro padrão (seis animais/grupo). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ (ANOVA seguida pelo teste de Dunnett)

• Ação da naloxona

O pré-tratamento com naloxona (5 mg/kg, i.p.), um antagonista opiáceo não seletivo, 15 minutos antes da administração oral dos extratos, bloqueou o efeito do ESA (0,03; 0,1 e 0,3 g/kg) (Figura 15) nas duas fases.

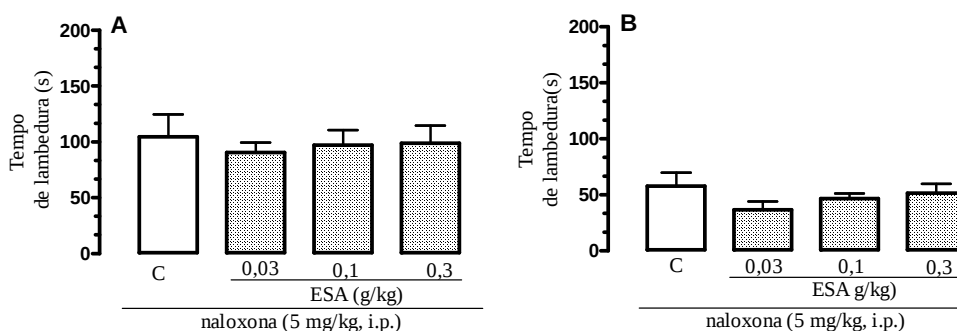


Figura 15 – Efeito do pré-tratamento com naloxona (5 mg/kg, i.p.) 15 minutos antes do tratamento com ESA de *Caesalpinia ferrea* (0,03; 0,1 e 0,3 g/kg, v.o.) no teste de formalina 1,5% em ratos. **A** - tempo de lambedura da pata na primeira fase (0-5 min) e **B** - na segunda fase (15-30 min). As colunas representam as médias $\pm$ erro padrão (seis animais/grupo). (ANOVA seguida pelo teste de Dunnett)

6.7.1.2 Efeito do extrato seco de *C. ferrea* por liofilização (ESL)

Em ratos controles tratados previamente com água (5 mL/kg, v.o.), o tempo de lambertura da pata na primeira fase do teste (0-5 minutos) foi $94,8 \pm 5$ segundos e na segunda fase (15-30 minutos) foi $160,2 \pm 19,8$ segundos (6/grupo).

O tratamento prévio com ESL 0,1 e 0,3 g/kg, v.o. diminuiu o tempo de lambertura da pata na primeira fase para $54,4 \pm 2,8$ e $48,8 \pm 9,9$ segundos, respectivamente. Estes efeitos foram 57% e 51% menores que nos animais controle.

Na segunda fase do teste, o tempo de lambertura foi reduzido para $79,2 \pm 11,5$ e $97 \pm 8,8$ segundos, respectivamente. Estas doses diminuíram o tempo de 49% e 61% em relação aos animais controles (Figura 16). Não houve diferença estatística significativa entre os dois extratos testados.

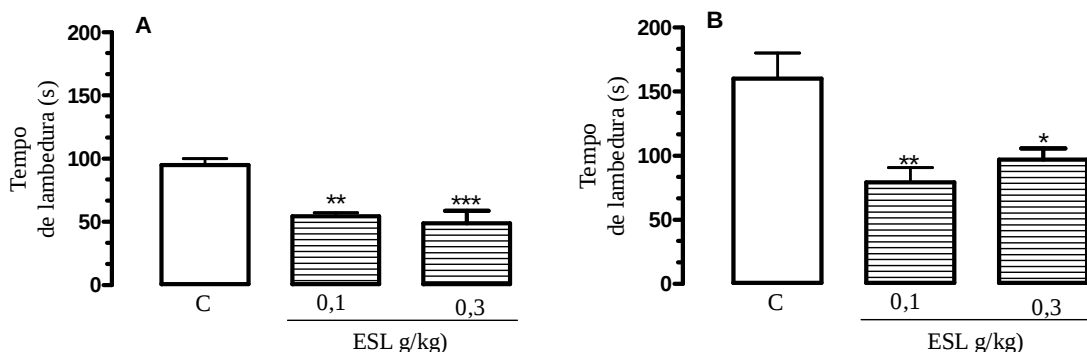


Figura 16 - Efeito do tratamento prévio (1 h) com extrato seco por liofilização (ESL) de *Caesalpinia ferrea* (0,1 e 0,3 g/ kg, v.o.) no teste da formalina à 1,5 % em ratos. **A** - tempo de lambertura da pata na primeira fase (0-5 min) e **B** – na segunda fase (15-30 min). As colunas representam as médias $\pm$ erro padrão (seis animais/grupo). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ (ANOVA seguida pelo teste de Dunnett)

- **Tratamento 30 minutos antes da injeção de formalina**

Em ratos controles tratados com água (5 mL/kg, v.o.) 30 minutos antes da injeção de fomalina 1,5%, o tempo de lambertura na primeira fase foi $72,2 \pm 4,7$ segundos e na segunda fase foi $103,0 \pm 12,4$ segundos (6/grupo).

O tratamento prévio com ESL (0,1 g/kg, v.o) 30 minutos antes da injeção de formalina, diminuiu o tempo na primeira fase para $41,4 \pm 5,5$ segundos e $67,9 \pm 7,9$ segundos na segunda fase, correspondendo a diminuição de 57% e 66%, respectivamente (Figura 17).

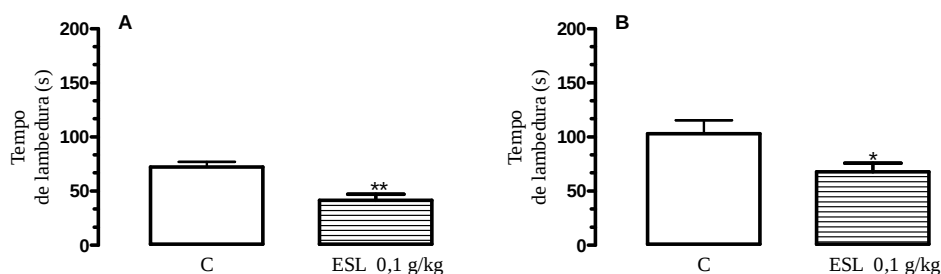


Figura 17 - Efeito do tratamento prévio (30 min) com extrato seco por liofilização (ESL) de *Caesalpinia ferrea* (0,1 e 0,3 g/ kg, v.o.) no teste da formalina 1,5 % em ratos. **A** - tempo de lambertura da pata na primeira fase (0-5 min) e **B** - na segunda fase (15-30 min). As colunas representam as médias $\pm$ erro padrão (seis animais/grupo). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ (ANOVA seguida pelo teste de Dunnett)

• Ação da naloxona

O pré-tratamento com naloxona (5 mg/kg, i.p.), um antagonista opiáceo não seletivo, 15 minutos antes da administração oral dos extratos, bloqueou o efeito do ESL (0,03; 0,1 e 0,3 g/kg) (Figura 18) nas duas fases.

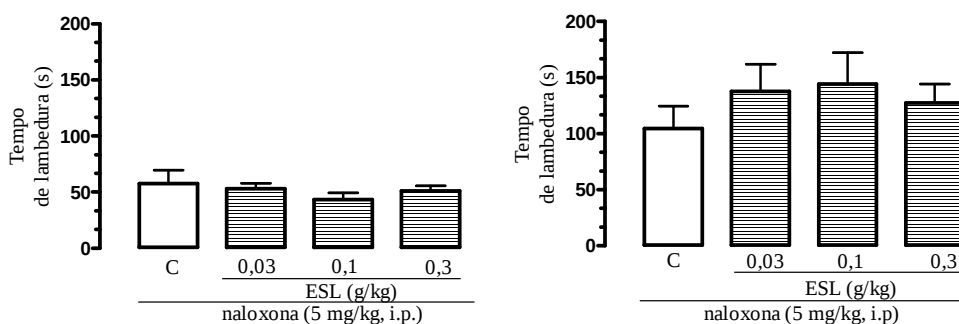


Figura 18 - Efeito do pré-tratamento com naloxona (5 mg/kg, i.p.) 15 minutos antes do tratamento com ESL de *Caesalpinia ferrea* (0,03; 0,1 e 0,3 g/kg, v.o.) no teste de formalina 1,5% em ratos. **A** - tempo de lambertura da pata na primeira fase (0-5 min) e **B** - na segunda fase (15-30 min). As colunas representam as médias $\pm$ erro padrão (seis animais/grupo). (ANOVA seguida pelo teste de Dunnett)

6.7.2 Teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético (0,8%)

6.7.2.1 Efeito do extrato de *C. ferrea* seco por aspersão (ESA)

Em camundongos controles (6/grupo) tratados com água (5 mL/kg, v.o.), o número de contorções abdominais induzidas pela injeção de ácido acético (0,8%, 10 mL/kg, i.p.) Figura 19 e Tabela 8.

O tratamento prévio com ESA (0,1; 0,3 e 1 g/kg, v.o.) inibiu o número de contorções até 30 minutos após a injeção de ácido acético (0,8%) (Figura 19 e Tabela 8). Não houve diferença estatística significativa entre os dois extratos utilizados.

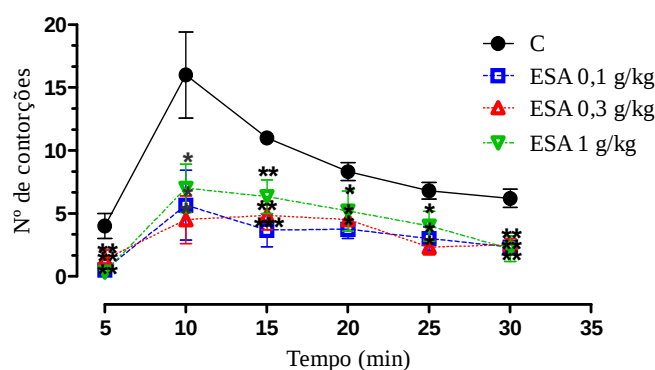


Figura 19 - Efeito do tratamento prévio (1 h) com extrato seco por aspersão (ESA) de *Caesalpinia ferrea* (0,1 e 0,3 e 1g/kg v.o.) no teste da contorção abdominal induzida por ácido acético (0,8%) em camundongos. As colunas representam as médias $\pm$ erro padrão (seis animais/grupo). * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ (ANOVA seguida pelo teste de Newman-Keuls)

Tabela 8 – Efeito do tratamento prévio (1 h) com extrato seco por aspersão (ESA) de *Caesalpinia ferrea* (0,1; 0,3 e 1 g/kg, v.o.) sobre o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético (0,8%) em camundongos

Tratamento	Dose (g/kg)	Média e EP e % de inibição											
		5		10		15		20		25		30	
Controle	-	4,0 $\pm$ 1,0		16,0 $\pm$ 3,4		11,0 $\pm$ 0,4		8,3 $\pm$ 0,7		6,8 $\pm$ 0,7		6,2 $\pm$ 0,7	
	0,1	0,5 $\pm$ 0,3	87**	5,7 $\pm$ 2,8	64*	3,7 $\pm$ 1,3	66***	3,8 $\pm$ 0,8	54*	3,0 $\pm$ 0,9	56*	2,3 $\pm$ 0,4	63**
ESA	0,3	1,3 $\pm$ 0,8	67**	4,5 $\pm$ 1,9	72*	4,8 $\pm$ 1,1	56**	4,5 $\pm$ 0,4	46*	2,3 $\pm$ 0,6	66*	2,5 $\pm$ 0,5	60**
	1	0,3 $\pm$ 0,3	92**	7,0 $\pm$ 1,9	56*	6,3 $\pm$ 1,3	43**	5,2 $\pm$ 1,6	37*	4,0 $\pm$ 1,2	41*	2,2 $\pm$ 1,0	65**

Valores expressos como média $\pm$ erro padrão (n = 6). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ (ANOVA seguida pelo teste de Newman-Keuls)

6.7.2.2 Efeito do extrato de *C. ferrea* seco por liofilização (ESL)

Em camundongos controles (6/grupo) tratados com água (5 mL/kg, v.o.) o número de contorções abdominais induzidas pela injeção de ácido acético (0,8%) foi $3,3 \pm 1,1$; $16,0 \pm 3,4$; $11,0 \pm 0,4$; $8,3 \pm 0,7$; $6,8 \pm 0,7$ e $6,2 \pm 0,7$ após 5, 10, 15, 20, 25 e 30 minutos da injeção.

O tratamento prévio (1h) com ESL (0,1; 0,3 e 1 g/kg, v.o.) inibiu o número de contorções até 30 minutos após a injeção de ácido acético (0,8%) (Figura 20 e Tabela 9). Não houve diferença estatística significativa entre os dois extratos utilizados.

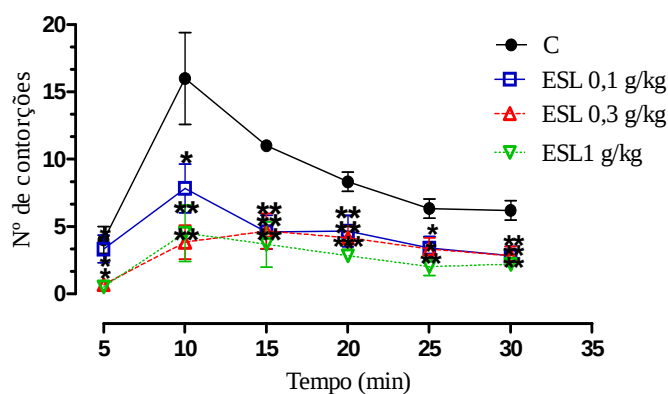


Figura 20 - Efeito do tratamento prévio (1 h) com extrato seco por liofilização (ESL) de *Caesalpinia ferrea* (0,1 e 0,3 g/ kg, v.o.) no teste da contorção abdominal induzida por ácido acético (0,8%), em camundongos. As colunas representam as médias $\pm$ erro padrão (seis animais/grupo). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ (ANOVA seguida pelo teste de Newman-Keuls)

Tabela 9 – Efeito do tratamento prévio (1 h) com extrato seco por liofilização (ESL) de *Caesalpinia ferrea* (0,1; 0,3 e 1 g/kg, v.o.) sobre o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético (0,8%) em camundongos

Tratamento	Dose (g/kg)	Média e EP e % de inibição					
		5	10	15	20	25	30
Controle		4,0 $\pm$ 1,0	16,0 $\pm$ 3,4	11,0 $\pm$ 0,4	8,3 $\pm$ 0,7	6,8 $\pm$ 0,7	6,2 $\pm$ 0,7
	0,1	3,3 $\pm$ 1,0	7,8 $\pm$ 1,8	4,6 $\pm$ 1,2	4,7 $\pm$ 1,2	3,4 $\pm$ 0,9	2,8 $\pm$ 0,7
ESL	0,3	0,7 $\pm$ 0,3	3,8 $\pm$ 1,2	4,7 $\pm$ 1,3	4,2 $\pm$ 0,9	3,3 $\pm$ 0,8	2,8 $\pm$ 0,7
	1	0,5 $\pm$ 0,3	4,5 $\pm$ 2,1	3,7 $\pm$ 1,7	2,8 $\pm$ 0,6	2,0 $\pm$ 0,6	2,2 $\pm$ 0,2

Valores expressos como média $\pm$ erro padrão (n = 6). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ (ANOVA seguida pelo teste de Newman-Keuls)

6.7.3 Teste da retirada da cauda

6.7.3.1 Efeito do extrato de *C. ferrea* seco por aspersão (ESA)

Em ratos controles tratados com água (5 mL/kg, v.o.), a latência basal de reação ao estímulo térmico (55 °C) foi $2,7 \pm 0,3$ segundos e $2,6 \pm 0,3$; $2,3 \pm 0,1$; $2,4 \pm 0,3$ e $2,5 \pm 0,3$ segundos após 30, 60, 90 e 120 minutos do tratamento (6/grupo). Ratos tratados previamente (1 h) com ESA (0,1; 0,3 e 1 g/kg, v.o.) apresentaram latência basal de $2,0 \pm 0,2$; $2,3 \pm 0,2$ e $2,2 \pm 0,3$ segundos, respectivamente. Os efeitos não foram diferentes nos grupos controles tratados (Figura 21). Houve diferença estatística significativa somente no intervalo de 30 minutos.

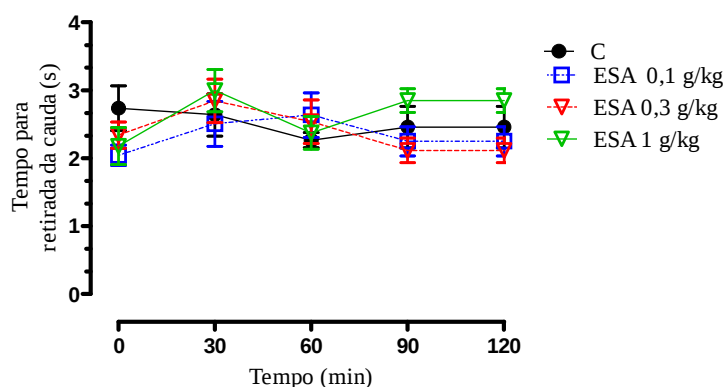


Figura 21 - Efeito do tratamento prévio (1 h) com extrato seco por aspersão (ESA) de *Caesalpinia ferrea* (0,1 e 0,3 g/ kg, v.o.) no tempo de retirada da cauda em ratos. A cauda foi submersa em água a 55 °C. As colunas representam as médias $\pm$ erro padrão (seis animais/grupo) (ANOVA seguida pelo teste de Newman-Keuls)

6.7.3.2 Efeito do extrato de *C. ferrea* seco por liofilização (ESL)

Em ratos controles tratados com água (5 mL/kg, v.o.), a latência basal de reação ao estímulo térmico (55 °C) foi $1,6 \pm 0,1$ segundos e $1,5 \pm 0,1$; $1,6 \pm 0,1$; $1,6 \pm 0,1$ e $1,7 \pm 0,1$ segundos após 30, 60, 90 e 120 minutos do tratamento (6/grupo).

Ratos tratados previamente (1 h) com ESL (0,1; 0,3 e 1g/kg, v.o.) apresentaram latência basal de $1,6 \pm 0,1$; $1,6 \pm 0,1$ e $1,7 \pm 0,2$ segundos, respectivamente. As respostas não diferiram do grupo controle (Figura 22). Houve diferença estatística significativa somente no intervalo de 30 minutos.

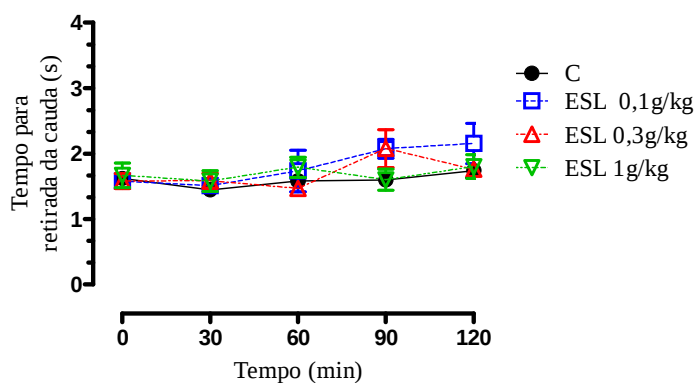


Figura 22 - Efeito do tratamento prévio (1 h) com extrato seco por liofilização (ESL) de *Caesalpinia ferrea* (0,1 e 0,3 g/ kg, v.o.) no teste da retirada da cauda em ratos. A cauda foi submersa em água a 55 °C. As colunas representam as médias $\pm$ erro padrão (seis animais/grupo). (ANOVA seguida pelo teste de Newman-Keuls)

6.7.4 Edema de pata induzido por carragenina 1%

6.7.4.1 Efeito do extrato de *C. ferrea* seco por aspersão (ESA)

O volume médio das patas dos animais imediatamente após a injeção de carragenina foi $2,2 \pm 0,1$ mL (6/grupo). A injeção subplantar de carragenina 1% produziu reação edematogênica aguda progressiva atingindo pico máximo após 180 minutos. Nos animais controle, o aumento do volume das patas injetadas com o agente flogístico em relação às patas contralaterais foi de $0,2 \pm 0,1$; $1,0 \pm 0,1$; $1,5 \pm 0,1$; $1,6 \pm 0,1$; $1,5 \pm 0,1$ e $1,5 \pm 0,1$ mL após 30 min, 1, 2, 3, 4 e 5 horas, respectivamente. O tratamento prévio (1 h) dos ratos com ESA de *C. ferrea* (0,1; 0,3 e 1 g/kg, v.o.) não reduziu a formação do edema. A indometacina (10 mg/kg, v.o.) reduziu o edema de 21, 61, 61, 65 e 64% após 1, 2, 3, 4 e 5 h da administração da carragenina (Figura 23).

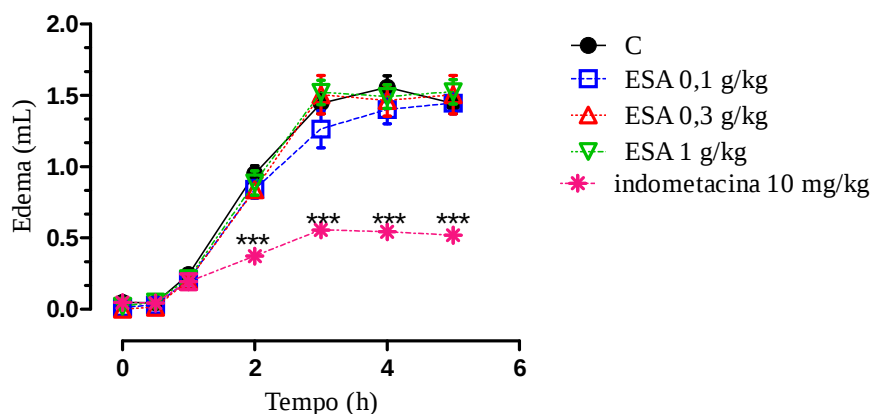


Figura 23 – Efeito do tratamento prévio (1 h) com extrato seco por aspersão (ESA) de *Caesalpinia ferrea* (0,1; 0,3 e 1g/ kg, v.o.) no edema de pata induzido por carragenina 1% em ratos. Grupo controle tratado com água (5 mL/kg, v.o.) e o controle positivo com indometacina (10 mg/kg, v.o.). Os símbolos representam as médias $\pm$ erro padrão (seis animais/grupo). *** $p < 0,001$ (ANOVA seguida pelo teste de Newman-Keuls)

6.7.4.2 Efeito do extrato de *C. ferrea* seco por liofilização (ESL)

O volume médio das patas dos animais imediatamente após a injeção de carragenina foi $2,2 \pm 0,1$ mL (6/grupo). A injeção subplantar de carragenina 1% produziu reação edematogênica aguda progressiva atingindo pico máximo após 180 minutos. Nos animais controle, o aumento do volume das patas injetadas com o agente flogístico em relação às patas contralaterais foi de $0,2 \pm 0,02$; $0,6 \pm 0,02$; $0,9 \pm 0,05$; $1,1 \pm 0,06$; $1,0 \pm 0,08$ e $1,0 \pm 0,09$ mL após 30 min, 1, 2, 3, 4 e 5 h, respectivamente. O tratamento prévio (1 h) dos ratos com ESL de *C. ferrea* (0,1; 0,3 e 1 g/kg, v.o.) reduziu a formação do edema. A indometacina (10 mg/kg, v.o.) reduziu o edema de 65, 60, 50, 44 e 45 % após 1,2, 3, 4 e 5 h da administração da carragenina (Figura 24).

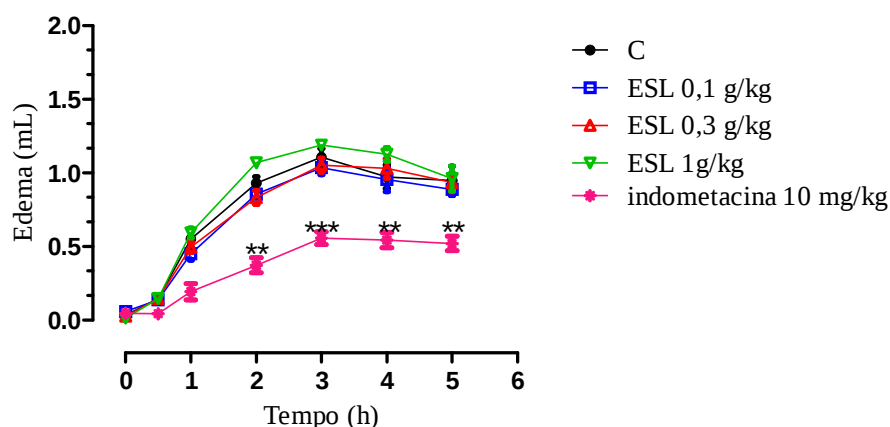


Figura 24 – Efeito do tratamento prévio (1 h) com extrato seco por liofilização (ESL) de *Caesalpinia ferrea* (0,1; 0,3 e 1 g/ kg, v.o.) no edema de pata induzido por carragenina 1% em ratos. Grupo controle tratado com água (5 mL/kg, v.o.) e o controle positivo com indometacina (10 mg/kg, v.o.). Os símbolos representam as médias $\pm$ erro padrão (seis animais/grupo). ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ (ANOVA seguida pelo teste de Newman-Keuls)

6.7.5 Edema de pata induzido por dextrana 0,1%

6.7.5.1 Efeito do extrato de *C. ferrea* seco por aspersão (ESA)

A injeção subplantar de dextrana nas patas de ratos produziu uma reação edematogênica de latência pequena e intensidade máxima após 60 minutos (6/grupo). Nos animais controles (6/grupo), o aumento do volume das patas injetadas com dextrana em relação às patas contralaterais foi de $0,8 \pm 0,10$; $1,3 \pm 0,10$; $1,3 \pm 0,04$ e $1,2 \pm 0,04$ mL após 30 min, 1, 2 e 3 horas, respectivamente. O tratamento prévio com ESA (0,1; 0,3 e 1 g/kg, v.o.) inibiu a formação do edema, mas não houve relação dose-efeito (Figura 25 e Tabela 10). A ciproheptadina (10 mg/kg, v.o.) reduziu o edema durante todo o tempo de avaliação experimental de 81 a 86 % em relação aos animais controles.

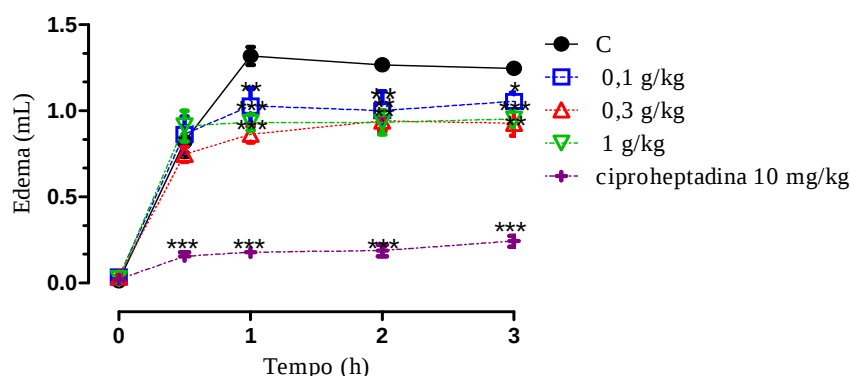


Figura 25 – Efeito do tratamento prévio (1 h) com extrato seco por aspersão (ESA) de *Caesalpinia ferrea* (0,1; 0,3 e 1 g/ kg, v.o.) no edema de pata induzido por dextrana 0,1 % em ratos. Grupo controle (água, 5 mL/kg, v.o.) e controle positivo ciproheptadina (10 mg/kg, v.o.). Os símbolos representam as médias $\pm$ erro padrão (seis animais/grupo). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ (ANOVA seguida pelo teste de Newman-Keuls)

Tabela 10 – Efeito do tratamento prévio (1 h) com extrato seco por aspersão (ESA) de *Caesalpinia ferrea* (0,1; 0,3 e 1 g/kg, v.o.) no edema de pata induzido por dextrana 0,1%. Ciproheptadina (10 mg/kg,v.o.) foi controle positivo

Tratamento	Dose (g/kg)	Média e EP e % de inibição			
		0,5	1	2	3
Controle	-	$0,8 \pm 0,10$	$1,3 \pm 0,10$	$1,3 \pm 0,04$	$1,2 \pm 0,04$
	0,1	$0,9 \pm 0,1$	$1,0 \pm 0,10$	$1,0 \pm 0,11$	$1,1 \pm 0,10$
ESA	0,3	$0,7 \pm 0,04$	$0,9 \pm 0,05$	$0,9 \pm 0,10$	$0,9 \pm 0,1$
	1	$0,9 \pm 0,10$	$0,9 \pm 0,05$	$0,9 \pm 0,10$	$1,0 \pm 0,05$
Ciproheptadina	0,01	$0,2 \pm 0,02$	$0,2 \pm 0,02$	$0,2 \pm 0,03$	$0,2 \pm 0,03$

Valores expressos como média $\pm$ erro padrão (n = 6). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ (ANOVA seguida pelo teste de Newman-Keuls)

6.7.5.2 Efeito do extrato de *C. ferrea* seco por liofilização (ESL)

A injeção subplantar de dextrana nas patas de ratos produziu uma reação edematogênica de latência pequena e intensidade máxima após 60 minutos. Nos animais controle (6/grupo), o aumento do volume das patas injetadas com dextrana em relação às patas contralaterais foi de $0,8 \pm 0,10$; $1,3 \pm 0,10$; $1,3 \pm 0,04$ e $1,2 \pm 0,04$ mL após 30, 60, 120 e 180 minutos, respectivamente. O tratamento prévio com ESA (0,03; 0,1 e 0,3 g/kg, v.o.) diminuiu a formação do edema, sem relação dose-efeito (Figura 26 e Tabela 11). A ciproheptadina (10 mg/kg, v.o.) reduziu o edema durante todo o tempo de avaliação experimental de 80 a 87 % em relação aos animais controles.

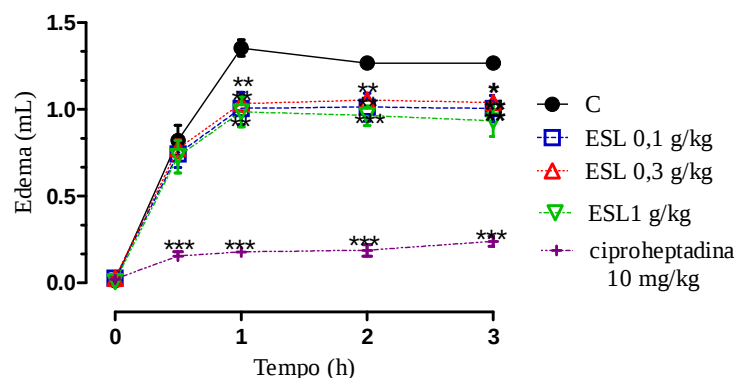


Figura 26 – Efeito do tratamento prévio (1 h) com extrato seco por liofilização (ESL) de *Caesalpinia ferrea* (0,1; 0,3 e 1 g/kg, v.o.) no edema de pata induzido por dextrana 0,1 % em ratos. Grupo controle (água, 5 mL/kg, v.o.) e controle positivo ciproheptadina (10 mg/kg, v.o.). Os símbolos representam as médias $\pm$ erro padrão (seis animais/grupo). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ (ANOVA seguida pelo teste Student Newman-Keuls)

Tabela 11 – Efeito do tratamento prévio (1 h) com extrato seco por liofilização (ESL) de *Caesalpinia ferrea* (0,1; 0,3 e 1 g/kg, v.o.) no edema de pata induzido por dextrana 0,1%. Ciproheptadina (10 mg/kg, v.o.) foi controle positivo

Tratamento	Dose (g/kg)	Média e EP e % de inibição							
		0,5	1	2	3				
Controle	-	$0,8 \pm 0,10$	$1,3 \pm 0,10$	$1,3 \pm 0,04$	$1,2 \pm 0,04$				
	0,1	$0,7 \pm 0,10$	$1,0 \pm 0,09$	23**	$1,0 \pm 0,08$	23**	$1,0 \pm 0,08$	17*	
ESL	0,3	$0,8 \pm 0,05$	$1,0 \pm 0,04$	23**	$1,1 \pm 0,03$	15**	$1,0 \pm 0,04$	17**	
	1	$0,7 \pm 0,09$	$1,0 \pm 0,90$	23**	$0,9 \pm 0,06$	31***	$1,0 \pm 0,09$	17**	
Ciproheptadina	0,01	$0,2 \pm 0,02$	$0,2 \pm 0,02$	85***	$0,2 \pm 0,03$	85***	$0,2 \pm 0,03$	83***	

Valores expressos como média $\pm$ erro padrão (n = 6) * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ (ANOVA seguida pelo teste de Newman-Keuls)

6.7.6 Teste da migração celular induzida por carragenina 1%

6.7.6.1 Efeito do extrato de *C. ferrea* seco por aspersão (ESA)

Após 5 horas da injeção de carragenina (1%, 1 mL, i.p.), o exsudato peritoneal coletado de ratos controles (6/grupo) tratados com água (5 mL/kg, v.o.) apresentou $3,4 \pm 0,3 \times 10^3$ células/mm³.

O tratamento prévio com ESA (0,1; 0,3 e 1 g/kg, v.o.) reduziu a migração celular para $2,4 \pm 0,3$; $2,4 \pm 0,1$ e $2,3 \pm 0,1 \times 10^3$ células/mm³, respectivamente. Esses valores foram 30, 29 e 31% menores que dos controles (Figura 27). Não houve diferença estatística significativa entre os dois extratos testados.

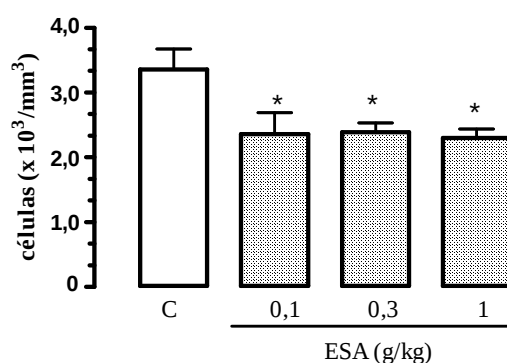


Figura 27 – Efeito do tratamento prévio (1 h) com extrato seco por aspersão (ESA) de *Caesalpinia ferrea* (0,1; 0,3 e 1 g/ kg, v.o.) na peritonite induzida por carragenina 1% (1 mL, i.p.) em ratos. Número de células (10³/mm³). Grupo controle tratado com água (5 mL/kg, v.o.). Os símbolos representam as médias ± erro padrão (seis animais/grupo). * p < 0,05 (ANOVA seguida pelo teste de Dunnett)

6.7.6.2 Efeito do extrato de *C. ferrea* seco por liofilização (ESL)

Após 5 horas da injeção de carragenina (1%, 1 mL, i.p.), o exsudato peritoneal coletado de ratos controles (6/grupo) tratados com água (5 mL/kg, v.o.) apresentou $3,4 \pm 0,1 \times 10^3$ células/mm³.

O tratamento prévio com ESL (0,1; 0,3 e 1 g/kg, v.o.) reduziu a migração celular para $2,3 \pm 0,4$; $2,1 \pm 0,3$ e $2,2 \pm 0,3 \times 10^3$ células/mm³, respectivamente. Esses valores foram 31, 39 e 34 % menores que dos controles (Figura 28).

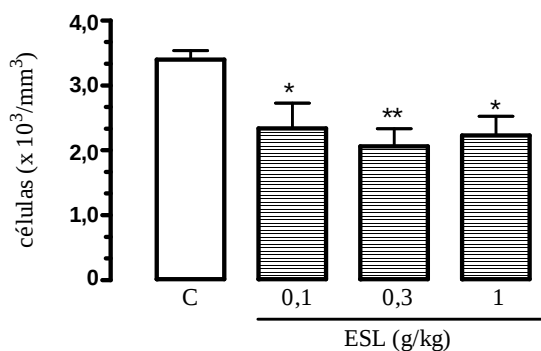


Figura 28 – Efeito do tratamento prévio (1 h) com extrato seco por liofilização (ESL) de *Caesalpinia ferrea* (0,1; 0,3 e 1 g/ kg, v.o.) na peritonite induzida por carragenina 1 % (1 mL, i.p.), em ratos. Número de células (10³/mm³). Grupo controle tratado com água (5 mL/kg, v.o.). Os símbolos representam as médias ± erro padrão (seis animais/grupo). * p < 0,05 (ANOVA seguida pelo teste de Dunnett)

7 DISCUSSÃO

Caesalpinia ferrea C. Mart. é uma planta amplamente utilizada na medicina popular como anti-inflamatório, cicatrizante e auxiliar no tratamento da anemia (CARVALHO *et al.*, 1996), sendo uma das espécies selecionadas para o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos do Ministério da Saúde – (BRASIL, 2006).

É importante considerar que até o presente momento, não há na literatura especificações e/ou códigos oficiais¹ (Farmacopéia Brasileira), ou seja, estudos, que garantam a qualidade da matéria-prima de *Caesalpinia ferrea* C. Mart.

Por sua ampla utilização, principalmente na região norte do Brasil, tornou-se necessário padronizar técnicas de extração de fácil reprodução que permitissem também, a padronização química com a identificação das substâncias majoritárias e a correlação das quantidades relativas destas com os efeitos farmacológicos produzidos.

Alguns estudos químicos já realizados identificaram na planta: polifenóis (SAMPAIO, *et al.*, 2009); pauferrol A (NOZAKI *et al.*, 2007);. Foram identificados triterpenos, ácido fenólico e flavonóides C-glicosilados isoorientina, orientina e vitexina (COELHO, 2004), derivados de acetofenona (NAKAMURA *et al.*, 2002); ácido gálico e ácido elágico (UEDA *et al.*, 2002).).

No presente trabalho foram utilizados frutos de *Caesalpinia ferrea* C.Mart sem sementes, coletados no Instituto de Pesquisas da Amazônia-INPA, Manaus - AM. Folhas e flores foram coletadas para preparo da exsicata, que foi depositada no INPA sob o número 228022.

¹. A maioria das plantas não se encontra em códigos oficiais (formulários e farmacopéias). Dentre as inúmeras espécies de plantas, apenas 324 estão descritas na farmacopéia alemã, 60 na Cooperativa Européia Científica de Fitoterapia, 13 na Farmacopéia Americana, 60 na Organização Mundial de Saúde e 34 na Farmacopéia Brasileira (EVANS,2002;United States Pharmacopéia – USP XXIV, 2000 apud TOLEDO, 2003).

O extrato aquoso foi preparado a partir da matéria-prima vegetal, com uma relação droga:solvente de 2,5% (m/V), por decocção com refluxo por 15 minutos, utilizando água destilada como solvente.

Para a padronização dos extratos de *Caesalpinia ferrea* C. Mart. foram utilizadas ferramentas da farmacotecnica descritas nos códigos oficiais, tais como, granulometria, perda por dessecação, teor extrativo, pH, densidade, polifenóis e taninos totais, as quais são fundamentais para a caracterização de matéria-prima vegetal, incluindo os produtos derivados, solução extrativa e extrato seco.

Estudos farmacológicos anteriores demonstraram atividades analgésica e anti-inflamatória no teste do edema de pata, atribuídas ao ácido gálico e ácido elágico (CARVALHO *et al.*, 1996); ação hipoglicêmica por inibição da aldose redutase em ratos diabéticos atribuída ao ácido gálico e metil galato (UEDA *et al.*, 2001); inibição tumoral, *in vitro* (NAKAMURA *et al.*, 2002a); atividade leishmanicida *in vitro* (CORTEZ, 2004.); inibição da topoisomerase II humana atribuída ao Pauferrol A (NOZAKI *et al.*, 2007); hipotensão arterial em ratos normotensos (MENEZES *et al.*, 2007); ação preventiva de infecções orais e cáries dentárias *in vitro* (SAMPAIO *et al.*, 2009).

Para a obtenção da qualidade do produto final e a confiabilidade dos resultados alcançados durante os ensaios de caracterização da Matéria-Prima Vegetal (MPV), foram analisados alguns parâmetros físico-químicos: o teor de umidade, pois o excesso de umidade no material vegetal pode promover o crescimento microbiano, a presença de fungos ou insetos, a deterioração de substâncias por hidrólise; o teor extrativo que auxilia na verificação da quantidade de sólidos solúveis presentes na droga vegetal (LIST; SCHMIDT, 1989) e a determinação do diâmetro médio da partícula, que é importante para garantir a reprodutibilidade do processo extrativo, uma vez que a superfície de contato entre o líquido extrator e a droga vegetal influencia na extração (LIST; SCHMIDT, 1989).

Para a determinação do tamanho da partícula da matéria-prima vegetal foi importante a análise granulométrica, uma vez que a granulometria da matéria-prima é um dos fatores de grande influência no processo extrativo, exigindo assim, uma padronização (LIST; SCHMIDT, 1989; SIMÕES *et al.*, 2007). Do ponto de vista tecnológico, a padronização da granulometria das matérias-primas vegetais é importante, uma vez que partículas muito grandes ou muito reduzidas costumam diminuir a eficiência do processo extrativo (LIST, SCHMIDT, 1989). Sendo assim, um diâmetro médio em torno de 500 μm é bastante favorável para a extração dos componentes químicos.

O pequeno diâmetro médio de partícula (372,66 μm), obtido a partir das curvas de retenção e passagem da MPV ratifica o histograma de distribuição e permite classificar a MPV estudada como pó moderadamente fino.

O parâmetro físico-químico de perda por dessecação após secagem da planta fornece um indicativo sobre as condições de coleta e armazenamento da droga vegetal, informações importantes para a conservação da mesma. Os limites estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) para drogas vegetais são de 8 a 14% (m/m) (LIST; SCHMIDT, 1989). Portanto, o valor encontrado de $11,52\% \pm 0,3\%$ neste trabalho, está dentro dos limites estabelecidos na literatura e códigos oficiais.

O resíduo seco é um parâmetro de qualidade tecnológica que expressa a concentração de sólidos solúveis presentes na solução extrativa, servindo como referência para a obtenção do rendimento do processo extrativo, bem como para o cálculo do rendimento de operação de secagem ao qual a solução extrativa é submetida (CARVALHO, 1997; DE SOUZA, 2004; SOARES, 2002).

O ensaio de perda por dessecação, realizado com o ESA e ESL indica que o produto apresentou teor de umidade residual muito acima do limite máximo de 5% estabelecido para extratos secos (F. Bras. IV) sendo que para produtos com acondicionamento não hermético é

permitido um valor de perda por dessecação de até 7% (LIST, SCHIMIDT, 1989). A elevada umidade residual dos extratos secos de *C. ferrea* pode ser justificada pela alta higroscopicidade dos produtos, provavelmente, pela presença de substâncias glicosiladas. Comparando-se o teor de umidade residual do ESA e ESL, verifica-se que, embora haja diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), tecnologicamente não há grandes variações de umidade.

O resultado de perda por dessecação do extrato seco por aspersão foi maior se comparado com o liofilizado. Esta discrepância resulta da elevada higroscopicidade do extrato seco por aspersão e do fato da operação não ter sido realizada em atmosfera desumidificada. Além disso, alterações das características macroscópicas dos mesmos foram facilmente detectadas no decorrer do trabalho experimental.

O ESA apresenta-se como pó amorfo, amarelo com odor característico da espécie vegetal e com tendência a formar aglomerados. Por outro lado, o ESL apresenta-se como pó amorfo, com coloração marrom e odor característico da espécie.

Em geral, os produtos secos por aspersão de soluções extrativas apresentam elevada higroscopicidade, necessitando assim, de adequado acondicionamento e rigoroso controle de umidade residual (CARVALHO, 1997; DE SOUZA, 2004).

Os taninos, por serem substâncias majoritárias na *Caesalpinia ferrea* C. Mart., aos quais pode ser atribuída grande parte da atividade terapêutica, foram utilizados como marcadores químicos nos extratos secos por aspersão e extrato seco liofilizado. Por esse motivo, no presente trabalho, foi dada especial ênfase ao método de doseamento dessas substâncias.

SOARES (2002) demonstrou que a quantificação dessas substâncias através de espectroscopia molecular, por leitura direta, em comprimento de onda máximo do extrato, utilizando caseína como agente precipitante dos taninos, é um método de fácil execução com

resultados bastante satisfatório. Dessa forma, essa técnica foi selecionada para quantificação de taninos totais presentes nos extratos secos aqui obtidos.

A densidade relativa da solução extrativa foi de $1,003 \pm 0,001$ g/mL, próxima da densidade da água, servindo como critério de caracterização e controle de rendimento da solução extrativa. Na determinação da densidade pelo método gravimétrico utilizando picnômetro, prevaleceu uma precisão de $\pm 0,0003$ g/mL.

O pH é um parâmetro de qualidade parcialmente responsável pela estabilidade e manutenção da solubilidade dos constituintes, assim como pela aceitação do extrato por parte do paciente. Para a solução aquosa de *Caesalpinia ferrea* C. Mart., o valor ácido de $3,37 \pm 0,08$ está em concordância com a presença expressiva de substâncias polifenólicas. O coeficiente de variação de 0,029% é baixo e resulta da comparação dos valores médios obtidos de diferentes amostras, em duplicata.

Os teores de taninos totais (13,12% e 11,53%) e polifenóis (49,03% e 43,38%) não foram diferentes em ESA e ESL, respectivamente. Da mesma forma, nos ensaios farmacológicos, ambos os extratos apresentaram atividades analgésica e anti-inflamatória comparáveis, não havendo diferença estatística significativa entre eles.

CARVALHO (1993), por meio da prospecção fitoquímica, identificou como possíveis substâncias presentes em extratos aquosos e hidroalcoólicos de frutos de *Caesalpinia férrea*, esteróides e triterpenóides saponínicos com atividades biológicas intimamente relacionadas à ação anti-inflamatória.

Como não há dados na literatura quanto aos efeitos da *C.ferrea* no sistema nervoso central, iniciamos a triagem farmacológica utilizando a metodologia proposta por Irwin (1968), um teste preliminar com finalidade de registrar as alterações comportamentais dos camundongos após tratamento com o extrato, bem como, detectar possíveis efeitos tóxicos e estabelecer limites das doses a serem avaliadas. O teste de observação geral das respostas a

estímulos padronizados (força de preensão no arame, resistência a compressão dorsal, reação ao pinçamento da cauda, postura de alerta a palmas inesperadas), ou teste hipocrático, avalia a resposta comportamental ativa complementar aos sinais de simples observação como: contorções abdominais, pêlos eriçados, ptose palpebral, locomoção espontânea, flacidez, tremores, paralisia do trem posterior, salivação, cromadocriorréia, secreção nasal, convulsões e mortes (LAPA *et al.*, 2008).

No teste geral de atividades, os extratos padronizados da *C. ferrea* foram administrados v.o. com auxílio de uma cânula intragástrica. Os camundongos tratados não apresentaram sinais evidentes de atividade farmacológica do extrato nas doses de 0,1; 0,3 e 1,0 g/kg. Não foram registrados em nenhum período de observação, sinais de ataxia, incoordenação motora, irritabilidade ou hiperreatividade a estímulos nociceptivos. Não houve morte dos animais tratados com os extratos (ESA e ESL), demonstrando que estes não produziram efeitos tóxicos graves.

No teste do sono induzido por barbitúrico, os animais tratados previamente com os extratos padronizados de *C. ferrea* não apresentaram alteração na latência para o sono, e as maiores doses de ambos extratos aumentaram a duração do sono; não houve diferença estatística significativa entre os efeitos dos dois extratos.

O aumento da duração do sono no teste com barbitúrico indica uma ação depressora do SNC. Este efeito poderia ser relacionado também com inibição do metabolismo enzimático hepático pelos extratos, o que diminuiria a velocidade de oxidação do barbitúrico, aumentaria a sua vida média plasmática e a duração do efeito anestésico. Para comprovar esta possibilidade, o sono foi induzido com éter etílico, que não tem metabolização hepática. Nesse teste, os extratos padronizados também foram capazes de aumentar a duração do sono, confirmando a ação depressora direta do SNC.

No entanto, quando submetidos ao teste de equilíbrio no rota-rod, os animais tratados não apresentaram diminuição do equilíbrio ou da atividade motora, o que também não foi visível na deambulação. Os resultados indicaram, portanto, que as ações produzidas pelos extratos são sedativas de pequena intensidade, sem efeitos no comportamento, mas suficientes para potenciar a ação de outros depressores do SNC. Esta observação é um alerta importante para usuários da planta sob tratamento crônico com depressores (ansiolíticos ou anti-convulsivantes), e deve ser lembrada sempre que houver necessidade de anestesia geral em eventuais cirurgias.

A comprovação dos efeitos anti-nociceptivo/anti-inflamatório dos extratos padronizados da *C. ferrea* foi importante por serem estas as atividades mais relatadas na medicina popular.

O estudo dessas atividades teve início com o teste da formalina, que permite avaliar a resposta nociceptiva (lambertura da pata) em duas fases: a primeira fase está relacionada com a estimulação química direta de fibras aferentes sensitivas mielinizadas (fibras A δ) e não mielinizadas (fibras sensitivas C); as respostas dessa fase podem ser suprimidas por drogas analgésicas opiáceas como a morfina e análogos. As respostas da segunda fase são mais tardias, pois dependem da inflamação periférica provocada pela formalina e de modificações no processamento central das informações dolorosas aferentes (DUBUISSON; DENNIS, 1977; GONÇALVES *et al.*, 2008; HUNSKAAR, HOLE, 1987; TJØLSEN *et al.*, 1997). As respostas da 2ª. fase são inibidas por agentes analgésicos/anti-inflamatórios e por analgésicos opiáceos.

Os extratos padronizados diminuíram as respostas de lambertura em ambas as fases, porém não houve relação dose-efeito. O pré-tratamento prévio dos animais com naloxona (5 mg/kg, i.p.), um antagonista opiáceo não seletivo, 15 minutos antes da administração oral dos extratos, bloqueou o efeito analgésico dos extratos ESA e ESL.

Para comprovar o mecanismo da ação antinociceptiva, os experimentos foram separados em testes que permitem a detecção de antinocicepção central e testes da ação anti-inflamatória dos extratos.

O teste de contorção abdominal induzido pelo ácido acético (1%) é usado para avaliar possíveis efeitos antinociceptivos periféricos de natureza inflamatória, uma vez que o ácido acético, na concentração utilizada, induz contorções em consequência de uma inflamação aguda no peritônio (IKEDA *et al.*, 2001). A irritação local após a injeção de ácido acético desencadeia a liberação de mediadores como a bradicinina, substância P e prostaglandinas, principalmente a PGI₂, bem como algumas citocinas como IL-1 β , TNF α e IL-8 (KOSTER *et al.*, 1959, LAPA *et al.*, 2008; RIBEIRO *et al.*, 2000).

Os extratos padronizados reduziram as contorções abdominais até 30 minutos após a injeção de ácido acético. Este efeito parece estar relacionado à inibição da liberação de mediadores pró-inflamatórios induzida pelo ácido acético (HUNSKAAR; HOLE, 1978; IKEDA *et al.*, 2001). De fato, DERAEDT *et al.* (1980), dosando prostaglandinas por radioimunoensaio no fluido peritoneal de ratos após injeção de ácido acético (i.p), demonstraram que neste processo algogênico, o teor de prostaglandinas do tipo PGE_{2a} e PGF_{2a} é alto nos primeiros 30 minutos. Entretanto, DUARTE *et al.* (1988) demonstraram que a administração de ácido acético (i.p) além de induzir a síntese de prostaglandinas, induziu também a liberação de mediadores do sistema simpático. Por estas e outras evidências, podemos afirmar que substâncias anti-inflamatórias também podem estar envolvidas na atividade analgésica em nível periférico.

Para comprovarmos o possível efeito analgésico em nível central, foi utilizado o teste do *tail flick* que baseia-se na resposta reflexa de retirada da cauda a um estímulo térmico nela aplicado. O tempo de resposta está relacionado à intensidade do estímulo percebida pelo

animal. Além disso, por ser um reflexo com bases anatômicas medulares, o teste do *tail-flick* permite obter informações do local da atividade antinociceptiva. Como o tempo de resposta não foi alterado após o tratamento com os extratos, a indicação de ação analgésica central, detectada antes no teste da formalina, foi questionada. A ação anti-inflamatória dos extratos foi testada nos modelos de edema de pata induzido por carragenina e no modelo do edema por dextrana.

O edema de pata induzido por carragenina é um importante modelo no estudo da inflamação. A carragenina, um polissacarídeo sulfatado, é derivada de algas marinhas *Chondrus crispus* é usada como estímulo inflamatório. A liberação de mediadores inflamatórios durante o edema induzido pelo irritante pode ser dividida em três fases: a primeira fase envolve a ação da histamina e serotonina (até 90 min), na segunda fase há a mediação de cininas (90 min a 150 min) e, na terceira fase, há a mediação de prostaglandinas (150 a 360 min) (DI ROSA *et al.*, 1971; GILLIGAN *et al.*, 1994; CORRÊA, 2010).

Esta implicação de várias fases e mediadores no edema desencadeado por carragenina está de acordo com experimentos de WILLIAMS (1979) que, usando a técnica de perfusão, foi capaz de detectar a liberação de histamina, serotonina, cininas e prostaglandinas na exsudação induzida por carragenina. O modelo pode indicar o mecanismo da ação anti-inflamatória pela depressão no gráfico da fase do edema: anti-histamínicos e inibidores da degranulação mastocitária diminuem a instalação da primeira fase do edema; inibidores da COX-2 diminuem o edema total que é mais dependente da síntese de prostaglandinas (LAPA *et al.*, 2008).

Drogas que interferem com a ação edematogênica da histamina e serotonina são melhor estudadas no modelo de edema induzido por dextrana, polímero que induz a liberação de histamina e serotonina de mastócitos (LAPA *et al.*, 2008). A histamina é sintetizada e liberada por diferentes células humanas, especialmente basófilos, mastócitos, plaquetas,

neurônios histaminérgicos, linfócitos e células enterocromafínicas, sendo estocada em vesículas ou grânulos liberados sob estimulação (JUTEL *et al.*, 2005). Esta substância é um importante mediador das respostas alérgicas na pele, no nariz e nos olhos e causa vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular (edema) e contração da musculatura lisa (brônquica e gastrointestinal) através da ativação dos receptores H₁ (FORTE, 2007).

O tratamento prévio de ratos com os extratos padronizados da *C. ferrea* não reduziu o edema induzido pela carragenina em nenhuma fase.

No teste do edema de pata induzido por dextrana, o tratamento dos animais com ESA e ESL (0,1; 0,3 e 1 g/kg, v.o.) inibiu a formação do edema. O efeito foi de pequena intensidade quando comparado com a ação da ciproheptadina (10 mg/kg, v.o.) que reduziu o edema durante todo o tempo de avaliação experimental.

Estes resultados foram semelhantes aos descritos por Carvalho *et al.* (1996) no estudo dos extratos da casca do tronco da *C. ferrea* colhida no Amapá.

Os anti-inflamatórios não esteroidais possuem a característica comum de não aumentar o estímulo limiar para evocar a resposta da dor em tecidos normais, como é o caso dos analgésicos narcóticos (por exemplo a morfina) ou anestésicos locais. De fato, eles restauram o limiar para a dor somente em tecidos inflamados e, dessa forma, o efeito de alívio da dor deste grupo é referido como anti-álgico em preferência a analgésico (FERREIRA *et al.*, 1978).

No decorrer da peritonite há um aumento no transporte de pequenos e grandes solutos entre o plasma e a membrana porosa dos capilares, além da produção paralela de migração celular. Essas mudanças podem ser explicadas pela vasodilatação dos capilares na membrana peritoneal e pela abertura dos poros nos microvasos, causados por mediadores celulares e inflamatórios, como a prostaglandina E₂ (PAULINO *et al.*, 2008).

No teste da migração celular por carragenina, o tratamento com ESA e ESL (0,1; 0,3 e 1 g/kg, v.o.) demonstrou que a inibição da migração de leucócitos para a cavidade peritoneal

foi muito discreta. Avaliando os números de células leucocitárias envolvidas no processo inflamatório, pôde-se perceber que os extratos não produziram redução do número de leucócitos de forma significativa e dose-dependente.

8 SUMÁRIO E CONCLUSÕES

Caesalpinia ferrea C. Mart. conhecida popularmente como jucá na região Norte, é utilizada para tratar doenças, e principalmente como anti-inflamatória.

O objetivo deste trabalho foi caracterizar e padronizar as propriedades físico-químicas da *C.ferrea* a partir de frutos sem sementes e investigar a atividade anti-inflamatória e/ou analgésica.

Os resultados obtidos foram:

a. A caracterização dos extratos secos demonstrou que apesar de haver diferenças morfológicas, quanto ao aspecto do pó, e do teor de umidade presente nos diferentes extratos secos, o mesmo não aconteceu quanto ao aspecto químico, uma vez que a análise estatística demonstrou que não houve diferença significativa entre os teores dos marcadores químicos (polifenóis e taninos totais) presentes nos extratos secos, sugerindo que as diferentes técnicas de secagem utilizadas não alteraram a composição química do extrato aquoso original, o qual deu origem aos diferentes produtos secos: liofilizado (ESL) e seco por aspersão (ESA).

b. A triagem farmacológica geral, dos extratos secos obtidos por diferentes métodos de secagem (liofilização e aspersão), demonstrou que não houve morte entre os animais tratados.

3- No sistema nervoso central ambos os extratos aumentaram a duração do sono, houve efeito depressor, sem alteração do equilíbrio motor.

4- Os extratos apresentaram atividade anti-inflamatória e antinociceptiva no teste da formalina 1,5%. O tempo de pré-tratamento (30 min ou 1h) com os extratos não interferiu nos resultados no teste de formalina.

5- Os extratos reduziram as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. A inibição deve-se possivelmente a inibição dos mediadores pró-inflamatórios.

6- Os extratos não alteraram a resposta da retirada da cauda de ratos no teste “*tail-flick*”, diminuindo a probabilidade dos extratos possuírem atividade analgésica central.

7- O volume do edema de pata induzido por dextrana (i.p) foi inibido pelos extratos. Provavelmente, este mecanismo deva-se a inibição dos mediadores pró-inflamatórios histamina e serotonina, que promovem vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular.

8- Os extratos não reduziram o volume de pata induzido por carragenina.

9- Os extratos inibiram a migração celular induzida pela administração intraperitoneal de carragenina, que é sustentado principalmente por prostaglandinas.

Por fim, o estudo demonstrou que, apesar de algumas diferenças tecnológicas, principalmente quanto ao aspecto e umidade dos produtos, em relação aos testes farmacológicos realizados não houve diferença estatística entre os extratos padronizados avaliados. As ações produzidas pelos extratos no SNC são sedativas de pequena intensidade, sem efeitos no comportamento, mas suficientes para potenciar a ação de outros depressores do SNC. Sugere-se que a ação anti-inflamatória desses produtos possa ocorrer através de uma interferência na síntese e/ou liberação de histamina e serotonina, ou por agir sobre esses receptores envolvidos na resposta inflamatória; entretanto são necessários outros estudos para elucidar estas hipóteses.

REFERÊNCIAS

BACCHI, E. M.; SERTIE, J. A. A.; VILLA, N., KATZ, H. Antiulcer action and toxicity of *Styrax-camporum* and *Caesalpinia ferrea*. **Planta Médica**, Stuttgart, v. 61, n.3, p. 204-207, 1995.

BARRINGTON, R.; ZANG, M.; FISCHER M.; CARROL, M.C. The role of complement in inflammation and adaptive immunity. **Immunological Reviews**, v.180, n.1, p.5, 2001.

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

BOGO, D. **Avaliação *in vitro* da atividade antineoplásica do ácido lecanórico e de seus produtos de modificação estrutural**. 2009. 67f. Dissertação (mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande.

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

BORRÁS, M.R.L. **Plantas da Amazônia: medicinais ou mágicas?: plantas comercializadas no mercado municipal Adolpho Lisboa**. Manaus: Valer, 2003. 322p.

BRAGANÇA, L.A.R. (org) **Plantas medicinais antidiabéticas: uma abordagem multidisciplinar**. São Paulo: EDUFF, Niterói, p. 10-25, 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada nº 48 de 16 de março de 2004. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, 16. mar. 2004.

BRASIL. Ministério de Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **A fitoterapia no SUS e o Programa de Pesquisa de Plantas Medicinais da Tecnologia e Insumos Estratégicos do Departamento de Assistência Farmacêutica**. Brasília: Ministério da Saúde. 148 p. (Série B. Textos Básicos de Saúde) páginas 61,78 e 99, 2006.

BROADHEAD, J. ROUAN, S.K.E; RHODES, C.T The Spray-drying of Pharmaceuticals. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.18, n.11/12, p.1169-1206, 1992.

BUNDESVEREINIGUNG Deutscher Apothekerverbände (Hrsg.). **Deutscher Arzneimittel – Codex**. 1986. Frankfurt: Govi; Stuttgart: Deutscher Apotheker, a. v.1; Codex – Probe 4,9, 1986.

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

CALIXTO, J.B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, v.55, n.3, p.37-39. 2003.

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

CARRARA, D. **Possangaba: o pensamento médico popular**. Maricá: Ribro Soft, 1995. 260 p.

CARLINI, E.A.; DE OLIVEIRA, A.B.; DE OLIVEIRA, G.G. Psychopharmacological effects of the essential oil fraction and of the hydrolate obtained from the seeds of *Licaria puchury-major*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 8, n. 2, p. 225-236, 1983.

CARVALHO, J.C.T. ***Caesalpinia ferrea* (pau-ferro): avaliação da atividade antiinflamatória e analgésica.** 1993. p.72. Dissertação (Mestrado em Fármacos e Medicamentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

CARVALHO, J.C.T.; TEIXEIRA, J.S.R.M.; PERGENTINO, J.C.; SOUZA C.; JAIRO K. Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Caesalpinia ferrea* crude extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v.53, p.175-178, 1996.

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

CHANG, Y. H.; LEE, S. T.; LIN, W. W. Effects of cannabinoids on LPS-stimulated inflammatory mediator release from macrophages: involvement of eicosanoids. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 81, n. 4, p. 715-723, 2001.

COELHO, R.G. **Estudo Químico de *Zollernia ilicifolia* (Fabacea), *Wilbrandia ebracteata* (Curcubitacea) e *Caesalpinia ferrea* (Caesalpiniaceae).** 2004. 181 p. Doutorado em Química - Instituto de Química, Universidade Paulista “Julio de Mesquita Filho”, Araraquara.

CORDEIRO, S.M.; COELI CORDEIRO, S.M.; COELI, M. Câncer e dor. In: BARACAT, F.F.; FERNANDES JR.; H.J.; SILVA M.J. **Cancerologia atual: um enfoque multidisciplinar.** São Paulo: Roca, 2000. p. 366-376.

CORRÊA, L. **Pato arte geral: inflamação: fenômeno irritativo.** Disciplina de Patologia Geral do Departamento de Estomatologia – Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo. 2010. Disponível em: <<http://www.fo.usp.br/lido/patoartegeral/patoarteinfl4.htm>>. Acesso em: 20 jan. 2010.

CORTEZ, A.C.A. **Avaliação da atividade “in vitro” dos extratos fitoquímicos de *Caesalpinia ferrea* Martius e *Senna reticulata* (Willd.) Irwin & Barneby (Fabales – Caesalpiniaceae) para *Leishmania* spp. e *Trichophyton* spp.** 2004. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal do Amazonas, Manaus-AM.

COUTURE, R. HARRISON, M.; VIANNA, R. M.; CLOUTIER, F. Kinin receptors in pain and inflammation. **European Journal of pharmacology**, v. 429, n. 1-3, p. 161-176, 2001.

COX, P.A. & BALICK, M.J. The ethnobotanical approach to drug discovery. **Scientific American**, v. 270, n. 6, p. 82-87, 1994.

CUZZOCREA, S. Shock, inflammation and PARP. **Pharmacological Research**, v. 52, n. 1, p. 72-82, 2005.

DE SOUZA, T. P. **Desenvolvimento de formas farmacêuticas sólidas contendo alto teor de produtos secos por aspersão *Phyllanthus Niruri*.** Tese de doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2004.

DERAEDT, R.; JOUQUEY, S.; DELEVALLEE, F.; FLAHAUT, M. Release of prostaglandins E and F in an algogenic reaction and its inhibition. **European Journal of Pharmacology**, v. 61, n. 1, p.17-24, 1980.

DI ROSA, M.; GIROUD, J.P.; WILLOUGHBY, D.A. Study of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **The Journal of Pathology**, v. 104, n. 1, p. 15-29, 1971.

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2ed. São Paulo: UNESP, 2002. 607p.

DOHADWALLA, A.N. Natural product pharmacology: strategies in search of leads for new drug designs. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 6, p.49, 1985.

DUARTE, J.D.G.; NAKAMURA, M.; FERREIRA, S.H. Participation of the sympathetic system in acetic acid induced writhing in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 21, p. 341-343, 1988.

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

DUHAM, N.W; MIYA, T.S . A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **Journal of the American Pharmacists Association**, 46:208-209, 1957.

EMIM, J.A.S. **Atividades farmacológicas de um inibidor da calicreína tecidual em processos nociceptivos e inflamatórios de camundongos**. [Tese de doutorado]. Departamento de Farmacologia. São Paulo, SP : UNIFESP / EPM, 1996.

ESMON, C.T. The interactions between inflammation and coagulation. **British Journal of Haematology**, v.131, n.4, p.417-430, 2005.

FARIAS, M.R. Avaliação da qualidade de matérias-primas vegetais. In: SIMÕES, C.M.O; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A; PETROVICK, P.R. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. rev. ampl. Porto Alegre: UFRGS, Florianópolis: UFSC, 2003, cap. 12. p. 263-288.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4.ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

FARNSWORTH, N. R.; SOEJARTO, D. D. Global importance of medicine plants. In AKERELE, O.; HEYWOOD, V.; SYNGE, H. (editors). **Conservation of Medicinal Plants**. Cambridge University Press, 1997. p. 25-51.

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

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

FERREIRA, S. H. ; LORENZETTI, B. B.; CASTRO,M.S.A.; CORREA, F. M. A. Antialgic effect of aspirin-like drugs and the inhibition of prostaglandin synthesis. IN: DUMONDE, D.C. JASANI, M.K., ed. **The recognition of rheumatic drugs**. Lancaster. MTP Press Limited, St. Leonard House, p. 25-37, 1978.

FORTE, W.C.N. **Imunologia: do básico ao aplicado**. 2.ed. Porto Alegre: Artmed, 2007. p.120-123.

FUNK, C.D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. *Science*, v.294, n.5548, p.1871-75.9, 2001.

GILLIGGAN, J.P; LOVATO,S.J; ERION, M.D.; JENG, A.Y. Modulation of carragenin hind paw oedema by substance P. **Inflammation**, v. 18, p. 285-292, 1994.

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

GONÇALVES, J. C. R.; OLIVEIRA, F. S.; BENEDITO, R. B.; SOUSA, D. P.; ALMEIDA R. N.; ARAÚJO, D. A. M. Antinociceptive activity of (-)-carvone: evidence of association with decreased peripheral nerve excitability. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, p. 1017-1020, 2008.

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

GRANGEIRO, N.M.G.C.; CHAVES, H.V.; SILVA, A.A.R.; GRAÇA, J.R.V.; LIMA, V.; BEZERRA, M.M. Enzimas ciclooxigenases 1 e 2: inflamação e gastro-cardio proteção. **Revista Eletrônica Pesquisa Médica**, v.2, n.3, p. 13-20, jul./set.2008.

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

HARTKE, K; MUTSCHELER, E. **Deutsches Arzneibuch – 9**. Ausgab 1986. Kommentar. Stuttgart: Wissenschaftliche, 1987. p. 305-307.

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

HUNSKAAR, S.; FASMER, O.B.; HOLE, K. Formalin test in mice: a useful technique for evaluating mild analgesics. **Journal of Neuroscience Methods**, v.14, n. 1, p. 69-76, 1985.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. Formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non- inflammatory. **Journal of neuroscience Methods**, Pain, v.30, n. 1, p. 103-114, 1987.

IKEDA, Y.; UENO, A.; NARABA, H.; OH-ISHI, S. Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanooids in the acid-induced writhing responses of mice. **Life Sciences**, v. 69, p. 2911-2919, 2001.

ILDIS: banco de dados. Disponível em: <http://www.ildis.org/Legume_web?version 3~10.01 2007>. Acesso em: 20 jun. 2009.

IRWIN, S. Comparative observation assessment: in a systematic quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state oh the mouse. **Psychopharmacology** (Berlim) v. 13, p. 222-257, 1968.

JUTEL, M., Bblaser K, Akdis CA. Histamine in chronic allergic responses. **Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology**, v.15, p.1-8, 2005.

KAPADIA, G.J. Medicinal Plants of the World. Volume I: Chemical Constituents, Traditional and Modern Uses. Second Edition By Ivan A. Ross. **Journal of medicinal Chemistry**, v. 46, n. 23, p. 5095, 2003.

KHANAPURE, S.P.; GARVEY, D.S.; JANERO, D.R.; LETTS , L.G. Eicosanoids in inflammation: biosynthesis, pharmacology, and therapeutic frontiers. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v.7, n.3, p.311-40, 2007.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; DE BEER, E.J. Acetic acid for analgesic screening. **Federation Proceedings**, v. 18, p. 142-421, 1959.

KUMAR, V.; ABBAS, A.K.; FAUSTO, N.; ASTER, J.C. In: ROBBINS; COTRAN: **Patologia: bases patológicas das doenças**. 7.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. p. 817-827.

LAPA, A.J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M.T.R.; CASTRO, M.S.A.; DE LIMA T.C.M. **Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais**. Campinas: Sociedade Brasileira de Plantas Medicinais – SBPM, 2008. 144 p.

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

LIST, P.H.; SCHIMDT, P.C. **Phytopharmaceutical technology**. Boca Raton: CRC, 1989.

MACHADO, A. **Neuroanatomia funcional**. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2006. p.287-308.

MAGALHÃES, P.M. **O caminho medicinal das plantas: aspectos sobre o cultivo**. São Paulo: CPQBA-UNICAMP, 1997.

MANTOVANI, A.; BONECCHI, R.; LOCATI, M. Tuning inflammation and immunity by chemokine sequestration: decoys and more. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, p. 907-918, 2006.

MARINHO, J. V. N., DE SOUZA, T. P. **Caracterização físico-química e tecnológica de matéria-prima vegetal de *Caesalpinia ferrea* Mart.** XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil. Technological characteristics of fruits of *Caesalpinia ferrea* Mart. (Leguminosae) as medicinal raw material. 2008. (Simpósio).

MARTINS, G.A. **Avaliação analítica e farmacológica da influência de fatores tecnológicos relevantes na obtenção de produtos secos nebulizados de *Maytenus ilicifolia* Martius ex Reiss.** **Dissertação.** Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1997.

MASTERS, K. **Spray drying.** 2.ed., New York: John Wiley, 1978.

MEHTA, D.; MALIK, A.B. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. **Physiological Reviews**, v.86, n.1, p.279-367, 2006.

MENEZES, I. A.C.; MOREIRA, I. J.A.; CARVALHO, A. A.; ANTONIOLLI, A. R.; SANTOS, M. R.V. Cardiovascular effects of the aqueous extract from *Caesalpinia ferrea*: Involvement of ATP-sensitive potassium channels. **Vascular Pharmacology**, v. 47, n. 1, p. 41-47, 2007.

MILLAN, M. J. Descending control of pain. **Progress in Neurobiology**, v. 66, p. 355-474, 2002.

NAKAMURA, E.S.; KUROSAKI, U.; ARISAWA, M.; MUKAINAKA, T.; TAKAYASU, J.; OKUDA, M.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; FLORIANO PASTORE, F. Cancer chemopreventive effects constituents of *Caesalpinia ferrea* and related compounds. **Cancer Letters**, v. 177, p. 119-124, 2002a.

NAKAMURA, E.S.; KUROSAKI, U.; ARISAWA, M.; MUKAINAKA, T.; TAKAYASU, J.; OKUDA, M.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; PASTORE JR, FLORIANO. Cancer chemopreventive effects of a Brazilian folk medicine, Juca, on in vivo two-stage skin carcinogenesis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, p.135-137, 2002b.

NATHAN, C. F. Points of control in inflammation. **Nature**, v. 420, p. 846-852, 2002.

NELSON, W. L.. Antihistamines and related antiallergic and antiulcer agents. In: WILLIAMS, D. A.; LEMKE, T. L. **Foyes principles of medicinal chemistry.** 5 ed. Baltimore, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002. p. 794-818.

NOZAKI, H., HAYASHI, K., KIDO, M., KAKUMOTO, K., IKEDA, S., MATSUURA, N., TANI, H., TAKAOKA, D., IINUMA, M. AND AKAO, Y. Paufferol A, a novel chalcone trimer with a cyclobutane ring from *Caesalpinia ferr, ea* mart exhibiting DNA topoisomerase II inhibition and apoptosis-inducing activity. **Tetrahedron Letters**, v.48, n.47, 19 nov.2007, p.8290-8292.

PAULINO, N.; ABREU, S. R. L.; UTO, Y.; KOYAMA, D.; NAGASAWA, H.; HORI, H.; DIRSCH, V. M.; VOLLMAR, A. M.; SCREMIN, A. & BRETZ, W. A. Anti inflammatory effects of a bioavailable compound, Artepillin C, in Brazilian propolis. **European Journal of Pharmacology**, v. 587, n. 1-3, p. 296-301, 2008.

PEREIRA, F. E. L. Inflamações In: BRASILEIRO FILHO, G. B.: **Patologia.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 134-174.

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

PORTELA, A.C.; SOUZA, L.A.G.; LOPES, M.C. Organização do genoplasma de leguminosas arbóreas do INPA/CPCA: fenologia e desenvolvimento inicial das espécies. In: Jornada de Iniciação Científica, 10.1, PIBIC CNPq/INPA, **Resumos Expandidos**, p.223-226. Manaus, 2001.

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

REPKA-RAMIREZ, M.S.; BARANIUK, J.N. Histamine in health and disease. **Clinical Allergy Immunology**, v.17, p.1-25, 2002.

RIBEIRO, J.E.L.S.; HOPKINS, M.J.G.; VICENTINI, A.; SOTHERS, C.A.; COSTA, M.A.S.; BRITO, J.M.; SOUZA, M.A.D.; MARTINS, L.H.P.; LOHMANN, L.G.; ASSUNÇÃO, P.A.C.L.; PEREIRA, E.C.; SILVA, C.F.; MESQUITA, M.R.; PROCÓPIO, L.C. **Flora da Reserva Ducke: guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra firme na Amazônia Central**. Manaus: INPA, 1999. 816p.

RIBEIRO, R. A.; VALE, M.L.; THOMAZZI, S. M.; PASCHOALATO, A. B.; POOLE, S.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **European Journal Pharmacology**, Netherlands, v. 387, n. 1, p. 111-118, 2000.

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

SAMPAIO, F.C., PEREIRA, M.S.V.; DIAS, C.S.; COSTA, V.C.O; CONDE, N.C.O.; BUZALAF, A.R.. In vitro antimicrobial activity of *Caesalpinia ferrea* Martius fruits against oral pathogens. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 124, n. 2, p. 289-294, 2009.

SHU, Y.Z. Recent natural products based drug development: A pharmaceutical industry perspective. **Journal of Natural Products**, v. 61, p. 1053-1071, 1998.

SILVA, E. D.; MORAES, T. M. Controle da dor. In: BARACT, F. F.; FERNANDES JR. H.J.; SILVA, M. J. **Cancerologia atual: um enfoque multidisciplinar**. São Paulo: Roca, 2000. p. 145-149.

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

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R MENGUE, S.S.; IRGANG, B.E.;. (Org). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2007.

SOARES, L. A. L. **Obtenção de comprimidos contendo alto teor de produto seco por aspersão de *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex. Reissek – Celastraceae**. Desenvolvimento tecnológico de produtos intermediários e final. 2002. Tese (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas). UFRGS, Porto Alegre.

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

SOUZA, A.B.; SOUZA, L.M.S.; CARVALHO, J.C.T.; MAISTRO, E.L. No clastogenic activity of *Caesalpinia ferrea* Mart. (Leguminosae) extract on bone marrow cells of Wistar rats. **Genetics and Molecular Biology**, v.29, n. 2, p.380-383, 2006.

SOUZA, L. A. G.. **Leguminosas da Amazônia**: jucá *Caesalpinia ferrea* C. Mart. Manaus: Editora do INPA, 2007 (Folder).

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

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

TJØLSEN, A.; HOLE, K. Animal models of analgesia. In: BESSON, M. J.; DICKENSON, A. **The pharmacology of pain**. Berlim: Springer-Verlag, p. 21-41, 1997.

TOLEDO, A.C.O.; HIRAT, L.L.; CRUZ, M.; BUFFON, M.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G. M. Fitoterápicos: uma abordagem farmacotécnica. **Revista Lecta**, Bragança Paulista, v. 21, n. 1-2, p. 7-13, jan./dez. 2003.

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

UEDA, H.; TACHIBANA, Y.; MORIYASU, M.; KAWANISHI AND, K.S.; ALVES, M. Aldose reductase inhibitors from the fruits of *Caesalpinia ferrea* Mart. **Phytomedicine**, v.8, n. 5, p. 377–381, 2001.

VIEIRA, R.A. Avaliação da possível atividade central da *Stachytarpheta cayennensis* (gervão-roxo). **Dissertação de mestrado**, Farmacologia, UFSC, 2001.

VOIGT, R. **Pharmazeutische Technologie**. 7. Überarb, 2000.

WALPORT, M.J. Complement: first of two parts. **The New England Journal of Medicine**, n.344, p.1058, 2001.

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

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

WENDEL, S.; ÇELIC, M. Uma visão geral sobre o uso da tecnologia de spray-drying. **Pharmaceutical Technology**, v. 5, 31-43, 1998.

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

WILLIAMS, T. J. Prostaglandin E2, prostaglandin I2 and the vascular changes of inflammation. **Brazilian Journal of Pharmacology**, v. 65, p. 517-524, 1979.