

CRISTIANE JUNQUEIRA RIBEIRO

**ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE RIZOMAS DE
Echinodorus grandiflorus (Cham. & Schldl.) Micheli
("Chapéu de Couro").**

Juiz de Fora, MG
2012

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

**ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE RIZOMAS DE
Echinodorus grandiflorus (Cham. & Schldl.) Micheli (“Chapéu de Couro”).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas – Área de concentração: Bioprospecção de Novos Fármacos.

JUIZ DE FORA

2012

Ribeiro, Cristiane Junqueira.

Atividade anti-inflamatória de rizomas de *Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schltdl.) Micheli (“Chapéu de Couro”)/Cristiane Junqueira Ribeiro.

– 2012.

109 f.: il.

Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)–
Universidade Federal Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2012.

1. *Echinodorus grandiflorus*. 2. Rizomas. 3. Atividade anti-inflamatória | Título.

CRISTIANE JUNQUEIRA RIBEIRO

**ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE RIZOMAS DE
Echinodorus grandiflorus (Cham. & Schltl.) Micheli (“Chapéu de Couro”).**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas – Área de concentração: Bioprospecção de Novos Fármacos.

Aprovado em: 27/07/2012.

BANCA EXAMINADORA

Dr. Daniel Sales Pimenta

Universidade Federal de Juiz de Fora

Dra. Elita Scio Fontes

Universidade Federal de Juiz de Fora

Dra. Selma Ribeiro de Paiva

Universidade Federal do Rio de Janeiro

“Não há bons ventos para quem não sabe para onde vai”

Lucius Annaeus Seneca (4 a.C – 65 d.C.)

“Dedico a Deus, sempre comigo em todos os momentos,

Aos meus pais e irmãs, pelo incentivo

Ao meu esposo Leandro, pelo apoio incondicional

***Aos professores Daniel Sales Pimenta e Luciana Moreira
Chedier, por fazerem de suas carreiras algo mais que lecionar***

E aos meus amigos do Laboratório de Fitoquímica...”

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo aprendizado.

Aos meus pais, pelo exemplo, amor, dedicação e por terem me ensinado que a única maneira de mudarmos o nosso mundo é através da educação.

As minhas irmãs por serem minha fonte de inspiração e força.

Ao meu esposo Leandro por dividir comigo todos os momentos difíceis dessa jornada, sem cobranças ou dúvidas.

Ao Prof. Dr. Daniel Sales Pimenta pela oportunidade, confiança e comprometimento.

À Prof^a Dr^a Luciana Moreira Chedier pelo carinho, apoio, atenção e amizade.

À Alessa pelo carinho e esforço para tornar este trabalho possível.

Aos companheiros do Laboratório de Fitoquímica, em especial, aos amigos Arthur e Carol pela paciência, dedicação, amizade e apoio nos momentos difíceis, a Lorena e Samara pelo carinho e a Ana Patrícia por me ajudar desde os primeiros passos.

À Flávia com quem sempre pude contar.

Ao pessoal do Laboratório de Farmacologia dos Produtos Naturais pelo apoio.

Aos colegas de mestrado, em especial, aos amigos Arthur, Carlos, Nicolas e Vanessa sempre dispostos a ajudar e com quem muitas vezes compartilhei minhas dificuldades.

À equipe de Farmanguinhos (FIOCRUZ), pelas análises realizadas.

À equipe da Farmácia Universitária – Unidade Centro amigos que levarei para a vida toda.

A minha chefia imediata por confiar no meu trabalho e permitir que eu pudesse alcançar esse sonho.

A minha amiga Nádia por sempre dizer o que pensa, por me mostrar a verdade e principalmente por me proporcionar a alegria de ter a sua amizade.

Às amigas da graduação Vanessa Diniz, Juliana Brandi, Nayara Pedroso e Priscilla Azevedo com as quais descobri o que realmente era amizade.

RESUMO

Echinodorus grandiflorus (Cham. & Schltl.) Micheli é uma planta reconhecida popularmente por seus efeitos medicinais e teve sua monografia descrita em 2010 na 5ª edição da Farmacopeia Brasileira. Entretanto, apesar do uso de rizomas pela população, poucos são os estudos envolvendo esse órgão da planta. O objetivo desse trabalho foi avaliar a atividade farmacológica de frações semi-purificadas do extrato bruto metanólico de rizomas de *E. grandiflorus*. Em princípio foi realizado o estudo de 8 cromatogramas em CLAE-UV obtidos de extratos brutos etanólicos de rizomas frescos e secos nas diferentes estações do ano. Após este estudo, foi obtido o extrato bruto metanólico de rizomas que, posteriormente, foi fracionado por partição líquido-líquido (v/v) obtendo-se três frações distintas: fração em hexano/acetato de etila 9:1, fração em acetato de etila 100% e fração residual aquosa. O extrato bruto metanólico de rizomas assim como as frações, foram estudados através de análises por CLAE-UV e análise na literatura acerca dos constituintes químicos e comparação com os já observados em folhas. A fração em acetato de etila 100% foi utilizada para a avaliação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória *in vivo*. Foram realizados os testes de contorções abdominais, formalina e placa quente frente à ação antinociceptiva e os testes de edema de pata e pleurisia, ambos induzidos por carragenina, para avaliar a ação anti-inflamatória. Foi realizado ainda, o teste de produção de óxido nítrico por células J774.A1, teste relacionado à ação anti-inflamatória das três frações semi-purificadas. A citotoxicidade das três frações testadas foi verificada no teste de MTT. Os resultados demonstraram que os extratos brutos etanólicos e o extrato bruto metanólico são constituídos principalmente por uma mistura de ácidos fenólicos derivados do ácido hidroxicinâmico, com maior produção de constituintes na primavera e no verão. As frações semi-purificadas apresentaram constituições químicas diferentes, com destaque para a fração em acetato de etila 100% que concentrou a mistura de ácidos fenólicos derivados do ácido hidroxicinâmico. A fração em acetato de etila 100% não apresentou ação analgésica central, uma vez que não agiu na primeira fase do teste de formalina e também não aumentou o tempo de latência ao estímulo térmico no teste da placa quente. Entretanto, apresentou ação anti-inflamatória, uma vez que foi capaz de inibir a formação de edema de pata e diminuiu o volume do exsudato e o número total de leucócitos no teste de pleurisia. Quanto à avaliação da produção de óxido nítrico, a fração em hexano 9:1 acetato de etila inibiu de forma mais significativa a produção desse mediador inflamatório, porém as demais frações também demonstraram possuir essa atividade. As três frações não apresentaram ação citotóxica nas concentrações testadas.

PALAVRAS-CHAVE: *Echinodorus grandiflorus*. 2. rizomas. 3. atividade anti-inflamatória

ABSTRACT

Echinodorus grandiflorus (Cham. & Schldl.) Micheli it is a plant popularly known by its effects medicinals and had described his monograph in 2010 in the 5th edition of the Brazilian Pharmacopoeia. However, despite the use the rhizomes the population there are few studies involving this plant organ. The purpose of this study was to evaluate the activity of pharmacological semi-purified fractions of the methanolic crude extract of the rhizomes of *E. grandiflorus*. The principle was carried out a study of eight chromatograms in HPLC-UV obtained from crude ethanol extracts of fresh and dried rhizomes in different seasons. After this study was obtained the methanolic crude extract of rhizomes which was subsequently fractionated by liquid-liquid partition (v/v) to obtain three different fractions: fraction in 9:1 hexane ethyl acetate, ethyl acetate fraction in 100% and residual aqueous. The methanolic crude extract of rhizomes and three semi-purified fractions were studied by HPLC-UV analysis and review the literatue on the chemical constituents and comparison with literature reports with those observed in leaves. The fraction in ethyl acetate 100% was used to measure the antinociceptive and anti-inflammatory effect *in vivo*. Tests were performed abdominal writhing, formalin and hot plate before antinociceptive testing and paw edema and pleurisy induced by carrageenan both to evaluate the anti-inflammatory action. It was conducted further testing production nitric oxide by J774. A1 cells, test-related anti-inflammatory action of the three semi-purified fractions. The cytotoxicity of the three fractions was found in the MTT assay. The results showed that the crude ethanolic and methanolic extract are mainly a mixture of phenolic acid derivative from the hidroxicinâmico acid, with greater production of constituents in the spring and summer. The semi-purified fractions showed different chemical constitutions with emphasis on the fraction of ethyl acetate 100% to a concentrated mixture of phenolic acid derivative from the hidroxicinâmico acid. The fraction in ethyl acetate 100% showed no central analgesic action, since it did not act in the first phase of the formalin test and did not increase the latency time to the thermal stimulus in the hot plate test. However active-inflammatory action showed, since it was able to inhibit paw edema formation and decreased exudate volume and the total number of leukocytes in the pleurisy test. The assessment of NO production, the fraction in 9:1 hexane ethyl acetate inhibited more significantly the production of inflammatory mediators, but the other fractions also showed have this activity. The three fractions showed no cytotoxic action at different concentrations.

KEYWORDS: *Echinodorus grandiflorus*. 2. rhizomes. 3. anti-inflammatory activity

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Rota biossintética dos derivados do ácido hidroxicinâmico	25
Figura 2	Ácidos Fenólicos isolados por Pimenta (2002) a partir de folhas de <i>Echinodorus grandiflorus</i> .	26
Figura 3	Estrutura química dos flavonoides isoorientina, isovitexina e swertisina.	27
Figura 4	Estrutura química dos diterpenos Clerodano e Cembrano.	28
Figura 5	Estrutura química dos componentes majoritários do óleo essencial de <i>Echinodorus grandiflorus</i> detectados por Pimenta e colaboradores (2006).	28
Figura 6	Esquema de fracionamento do extrato bruto metanólico de rizomas de <i>Echinodorus grandiflorus</i> .	47
Figura 7	Espectros a 335 nm de extratos etanólicos brutos de rizomas de <i>Echinodorus grandiflorus</i> , rizomas secos: A – Primavera; B – Verão e rizomas frescos: C – Primavera, D – Verão.	56
Figura 8	Espectros a 335 nm de extratos brutos etanólicos de rizomas frescos de <i>E. grandiflorus</i> : A – Primavera; B – Verão; C – Outono e D - Inverno.	57
Figura 9	Espectros de ultravioleta referente às substâncias detectadas a 335nm a partir do extrato bruto etanólico de rizomas frescos de <i>E. grandiflorus</i> – Primavera e padrões obtidos por Canela (1999).	59

- Figura 10 Perfil cromatográfico do extrato bruto metanólico de rizomas de *Echinodorus grandiflorus* obtido por CLAE-UV e detectado a: A - 220, B - 270, C - 335 e D - 360 nm. 62
- Figura 11 Expectros de ultravioleta da substância com concentração no sistema de 30% Acetonitrila : 70% Água detectado a partir dos extratos etanólico de folha (A), etanólico (B) e metanólico (C) de rizomas de *Echinodorus grandiflorus* e espectro de ultravioleta do padrão de ácido ferúlico. 63
- Figura 12 Rendimento das frações obtidas a partir da partição líquido-líquido do extrato bruto metanólico de rizomas de *E. grandiflorus*. 64
- Figura 13 Perfil cromatográfico por CLAE-UV da fração em acetato de etila 100%, obtido do extrato bruto metanólico de rizomas de *Echinodorus grandiflorus* detectado a: A - 220, B - 270, C -335 e D - 360 nm. 67
- Figura 14 Espectros de ultravioleta referente às substâncias majoritárias detectadas no perfil cromatográfico da fração em acetato de etila 100% do extrato bruto metanólico de *Echinodorus grandiflorus* a 335 nm. 70
- Figura 15 Comparação entre os cromatogramas a 335nm do extrato bruto metanólico de rizomas de *Echinodorus grandiflorus* – A, e as frações obtidas por partição líquido-líquido (v/v) do extrato bruto: B – fração residual aquosa; C – fração em acetato de etila 100%; C – fração em hexano 9:1 acetato de etila nos tempos de retenção entre o 0 e 10 minutos de corrida. 83

Figura 16 Comparação entre os cromatogramas a 335nm do extrato 84
bruto metanólico de rizomas de *Echinodorus grandiflorus* –
A, e as frações obtidas por partição líquido-líquido (v/v) do
extrato bruto: B – fração residual aquosa; C – fração em
acetato de etila 100%; C – fração em hexano 9:1 acetato de
etila nos tempos de retenção entre o 10 e 40 minutos de
corrida.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Derivados do ácido hidroxicinâmico detectadas por UV de acordo com a concentração do sistema de eluição Acetonitrila:Água em CLAE, dos extratos etanólicos de folhas e rizomas e do extrato metanólico de rizomas de <i>Echinodorus grandiflorus</i> .	58
Tabela 2	Derivados do ácido hidroxicinâmico detectadas por UV de acordo com a concentração do sistema de eluição ACN: H ₂ O dos extratos etanólicos de folhas e rizomas, do extrato metanólico de rizomas e da fração em acetato de etila 100% obtida do extrato bruto metanólico de rizomas de <i>Echinodorus grandiflorus</i> .	68
Tabela 3	Efeito analgésico da fração em acetato de etila 100% (FAc) de <i>Echinodorus grandiflorus</i> sobre o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético	71
Tabela 4	Teste de tempo de lambida da pata induzida por formalina 2,5%, primeira fase, após administração de 25, 50 e 100 mg/kg,por via oral, da fração em acetato de etila 100% (FAc) de <i>Echinodorus grandiflorus</i> .	72
Tabela 5	Teste de tempo de lambida da pata induzida por formalina 2,5%, segunda fase, após administração de 25, 50 e 100 mg/kg,por via oral, da fração em acetato de etila 100% (FAc) de <i>Echinodorus grandiflorus</i> .	73
Tabela 6	Tempo de latência ao estímulo térmico nociceptivo após a administração oral da fração em acetato de etila 100% (FAc) de <i>Echinodorus grandiflorus</i> .	74

Tabela 7	Efeitos da fração em acetato de etila 100% (FAC) de <i>Echinodorus grandiflorus</i> sobre o edema de pata induzido por carragenina.	75
Tabela 8	Efeitos da fração em acetato de etila 100% (FAC) de <i>Echinodorus grandiflorus</i> sobre o volume e no número de leucócitos totais do exsudato da pleurisia induzida por carragenina.	77
Tabela 9	Comparação entre os dados obtidos por Dutra <i>et al.</i> (2006) no teste de edema de pata a partir do extrato bruto metanólico de rizomas de <i>E. grandiflorus</i> e o resultado obtido nesta pesquisa.	78
Tabela 10	Comparação entre os dados obtidos por Dutra <i>et al.</i> (2006) no teste de pleurisia a partir do extrato bruto metanólico de rizomas de <i>E. grandiflorus</i> e o resultado obtido nesta pesquisa.	78
Tabela 11	Avaliação dos efeitos das frações obtidas por partição líquido-líquido do extrato metanólico bruto de <i>E. grandiflorus</i> na inibição da produção de Óxido Nítrico por células Macrófagos J774A.1 através do método de Griess.	80
Tabela 12	Avaliação dos efeitos das frações obtidas por partição líquido-líquido partir do extrato bruto metanólico de rizoma de <i>Echinodorus grandiflorus</i> sobre a viabilidade celular.	81

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E TERMINOLOGIAS

AAS	Ácido acetilsalicílico
ACN	Acetonitrila
ADP	Difosfato de Adenosina
<i>ad libitum</i>	“à vontade”
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CEEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CG-EM	Cromatografia em Fase Gasosa acoplado a espectrometria de Massa
CGRP	<i>calcitonin generelated peptide</i>
5-LO	Enzima lipoxigenase-5
5-HT	Receptor 5-hidroxitriptamina
5-HT ₁	Receptor 5-hidroxitriptamina-1
5-HT ₂	Receptor 5-hidroxitriptamina-2
5-HT ₃	Receptor 5-hidroxitriptamina-3
C3a	Fragmento originado a partir do fator do Complemento 3
C5a	Fragmento originado a partir do fator do Complemento 5
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLAE-UV	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplado a espectrometria no Ultravioleta
COX	Enzima Ciclooxygenase
COX-1	Enzima Ciclooxygenase-1
COX-2	Enzima Ciclooxygenase-2
CO ₂	Dióxido de Carbono
CSFs	Fatores Estimulantes de Colônia
DAH	Ácidos fenólicos derivados do ácido hidroxicinâmico
DMSO	
D.O.U.	Diário Oficial da União
EBMRE	Extrato bruto metanólico de rizomas de <i>Echinodorus grandiflorus</i>
ELAM	<i>Endothelial Leukocyte Cell Adhesion Molecule</i>
ETHPPE	<i>trans</i> -etil-(3,4,5-trihidroxifenil)-2-propenoato
E ₂ THPPE	dietil-2-(3,4,5-trihidroxifenilmetileno) malonato
EtOH	Etanol
Ext.	Extrato
FAC	Fração em acetato de etila 100% do extrato bruto metanólico de rizomas de <i>Echinodorus grandiflorus</i>
FHAc	Fração em hexano 9:1 acetato de etila do extrato bruto metanólico de rizomas de <i>Echinodorus grandiflorus</i>
FRA	Fração residual aquosa do extrato bruto metanólico de rizomas de <i>Echinodorus grandiflorus</i>
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
GC	Guanilil Ciclase
GMPc	Monofosfato de Guanosina ciclico
GTP	Trifosfato de Guanosina
GTPases	Guanosinas Trifosfatases
HCl	Ácido clorídrico
H ₂ O	Água
IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor

ICAMs	Moléculas de Adesão Intercelulares
ICAM-1	Molécula de Adesão Intercelular-1
ICAM-2	Molécula de Adesão Intercelular-2
IgE	Imunoglobulina E
IL-1	Interleucina-1
IL-2	Interleucina-2
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
INF- γ	Interferon-Gama
IP-3K	Fosfoinositol-3quinase
J774.A1	Linhagem de macrófagos murina
LD 50	Dose letal média
<i>Knockout</i>	Animais que sofreram depleção total ou parcial de um gene
LECAM	<i>Leukocyte Endothelial Cell Adhesion Molecule</i>
LOX	Enzima lipoxigenase
LPS	Lipopolissacarídeo
LTA ₄	Leucotrieno A ₄
LTB ₄	Leucotrieno B ₄
LTC ₄	Leucotrieno C ₄
LTD ₄	Leucotrieno D ₄
LTE ₄	Leucotrieno E ₄
MTT	3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio
NF-KB	Factor Nuclear kappa B
NGF	Fator de Crescimento Nervoso
NK-1	Receptor para Neurocinina-1
NK-2	Receptor para Neurocinina-2
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintases
eNOS	Óxido Nítrico Sintase Endotelial
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Indutível
nNOS	Óxido Nítrico Sintase Neuronal
OD	Densidade Óptica
P.A.	Para Análise
PAF	Fator de Ativação de Plaquetas
PECAM-1	Molécula de Adesão de Plaquetas às células endoteliais-1
PGs	Prostaglandinas
PGI ₂	Prostaglandina I ₂
PGD ₂	Prostaglandina D ₂
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGF _{2α}	Prostaglandina F _{2α}
PNPIC	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
p/v	peso/volume
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RJ	Rio de Janeiro
RNA _m	Ácido Ribonucléico mensageiro
RLO	Radicais Livres de Oxigênio
RPMI	Meio de cultura <i>Royal Park Memorial Institute</i>

s.c.	Subcutânea
SFB	Soro fetal bovino
SUS	Sistema Único de Saúde
TFA	Ácido trifluoracético
TGF- β	Fator de transformação e crescimento-beta
THPPE	Ácido <i>trans</i> -3-(3,4,5-triidroxifenil)-2-propenóico
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral-Alfa
TR	Tempo de Retenção
TxA ₂	Tromboxano A2
UFJF	Universidade Federal de Juiz de Fora
UV	Ultravioleta
VCAMs	Molécula de Adesão Vascular
VCAM-1	Molécula de Adesão Vascular-1
VIP	<i>vasoactive intestinal peptide</i>
v.o.	via oral
v/v	volume/volume

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	21
2.	REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1.	Aspectos Botânicos e Químicos	23
2.2.	Aspectos Farmacológicos	30
2.2.1	Vasodilatação e Edema	31
2.2.2	Migração Leucocitária	33
2.2.3	Mediadores Inflamatórios	35
2.3	Dor	40
3	OBJETIVOS	43
3.1	Objetivo Geral	43
3.2	Objetivos Específicos	43
4	MATERIAIS E MÉTODOS	44
4.1.	Perfil químico de extratos etanólicos brutos de rizomas de <i>E. grandiflorus</i> .	44
4.1.1	Análise dos cromatogramas	44
4.2.	Obtenção do extrato bruto metanólico de rizomas de <i>E. grandiflorus</i>	45
4.2.1	Material Vegetal	45
4.2.2	Perfil químico do extrato bruto metanólico de rizomas de <i>E. grandiflorus</i>	46
4.2.3	Fracionamento do extrato bruto metanólico de rizomas de <i>E. grandiflorus</i>	46
4.2.4	Perfil químico da fração em acetato de etila 100% obtida a partir do extrato bruto metanólico de rizomas de <i>E. grandiflorus</i>	48
4.3.	Investigação Farmacológica	48
4.3.1	Avaliação farmacológica <i>in vivo</i>	48
4.3.1.1	Animais	48
4.3.1.2	Atividade Antinociceptiva	49
4.3.1.2.1	Teste de Contorções Abdominais	49
4.3.1.2.2	Teste da Formalina	49

4.3.1.2.3	Teste da Placa Quente	50
4.3.2.2	Avaliação da Atividade Anti-inflamatória	50
4.3.2.2.1	Teste de Edema de Pata Induzido por Carragenina	50
4.3.2.2.2	Teste de Pleurisia Induzida por Carragenina	51
4.3.2.3	Análise dos Dados	51
4.3.3	Avaliação farmacológica <i>in vitro</i>	51
4.3.3.1	Preparação dos extratos para cultura	51
4.3.3.2	Linhagem celular e cultura	52
4.3.3.3	Determinação da produção de NO	52
4.3.3.4	Avaliação da citotoxicidade	53
4.3.3.5	Perfil químico das frações obtidas por partição líquido-líquido testadas <i>in vitro</i>	53
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
5.1	Perfil químico dos extratos brutos etanólico e metanólico de rizomas de <i>E. grandiflorus</i> por CLAE-UV	55
5.2	Perfil químico da Fração em Acetato de Etila 100% obtida do extrato bruto metanólico de rizomas de <i>E. grandiflorus</i>	67
5.3	Avaliação farmacológica da fração em acetato de etila 100% obtida do extrato bruto metanólico de rizomas de <i>E. grandiflorus</i>	71
5.3.1	Avaliação farmacológica <i>in vivo</i>	71
5.3.1.2	Atividade Antinociceptiva	71
5.3.1.2.1	Teste de Contorções Abdominais	71
5.3.1.2.2	Teste da Formalina	72
5.3.1.2.3	Teste da Placa Quente	73
5.3.2	Avaliação da Atividade Anti-inflamatória	74
5.3.2.1	Teste de Edema de Pata Induzido por Carragenina	74
5.3.2.2	Teste de Pleurisia Induzida por Carragenina	76
5.4	Relação entre a constituição química e a ação farmacológica da mistura de DAH	78
5.5	Avaliação farmacológica <i>in vitro</i>	79
5.5.1	Determinação da Produção de NO	79
5.5.2	Avaliação da Citotoxicidade	80

5.6	Perfil químico das frações testadas <i>in vitro</i>	81
6.	CONCLUSÕES	85
7.	REFERÊNCIAS	86
8.	ANEXOS	105

1. INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial de Saúde, 85% da população mundial utiliza plantas medicinais no tratamento de doenças (OLIVEIRA *et al.*, 2006). Assim, as políticas públicas tem buscado atender à demanda da população pelas plantas medicinais, como pode ser visto pela implementação de políticas voltadas para essa área, como a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS), por exemplo (Brasil, 2006). Segundo Maciel *et al.* (2002), as pesquisas científicas acerca de plantas medicinais são estudos interdisciplinares que procuram viabilizar de maneira segura a validação do uso terapêutico de plantas já utilizadas na medicina tradicional e são um caminho promissor e eficaz para a descoberta de novos fármacos.

O estudo da química de produtos naturais tem por finalidade determinar os constituintes do metabolismo especial dos seres vivos, isso ocorre através do isolamento e elucidação estrutural das substâncias de interesse científico e econômico (MATOS, 1997). Entretanto, para que isso ocorra de forma racional é necessário o conhecimento das classes de constituintes químicos presentes na planta de interesse e assim correlacionar com os possíveis princípios ativos presentes na mesma (LÔBO *et al.*, 2010). Dessa maneira, a prospecção permite determinar o comportamento químico dos extratos de interesse, podendo ser utilizado tanto na seleção da planta a ser estudada quanto no extrato com o qual se deverá trabalhar (RODRIGUES *et al.*, 2010).

No Brasil, uma expressiva parte da população utiliza plantas medicinais com o intuito de prevenir, tratar e curar as mais diversas doenças, dentre essas espécies utilizadas destaca-se *Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schldl.) Micheli que, segundo Di Stasi *et al.* (2002) apresentou uma prevalência de 18% dentre as 114 espécies de plantas medicinais de uso popular em um estudo realizado com moradores rurais e urbanos de três cidades na região do Vale do Ribeira, no estado de São Paulo. Além disso, o autor ressalta que esta é uma planta nativa do Brasil com ampla distribuição, importante recurso econômico para a população e com grande potencial para o desenvolvimento de novas drogas. Vale ressaltar ainda a utilização da mesma como constituinte de refrigerantes como Mineirinho® e Mate

Couro[®], bebidas de grande utilização, comercializadas no Rio de Janeiro e Minas Gerais, respectivamente. Dessa forma, a pesquisa das propriedades farmacológicas *E. grandiflorus* vem de encontro a essa realidade.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Aspectos Botânicos e Químicos

Duas espécies botânicas são referidas como “Chapéu de couro” e são popularmente reconhecidas por seus efeitos medicinais: *Echinodorus macrophyllus* (Kunth) Micheli e *Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schltldl.) Micheli (PIMENTA, 2002). Mesmo a literatura destinada à trazer informações acerca das pesquisas realizadas a partir da planta traz a denominação popular referindo-se às duas espécies (PIMENTA, 2005).

Echinodorus Rich & Engelm ex. Gray possui controvérsias tanto no que diz respeito à delimitação do gênero quanto das próprias espécies. Isso se deve a enorme plasticidade fenotípica das plantas aquáticas, em conjunto com o número reduzido de suas estruturas morfológicas. Entretanto, através de estudos cladísticos, moleculares e morfológicos, admitiu-se que esse gênero pode ser polifilético (LEHTONEN & MYLLYS, 2008). Assim, além de serem propostas ainda algumas subespécies, as diferenças morfológicas entre as duas espécies citadas são mínimas, restritas a entendimento de taxonomistas especialistas (LEHTONEN, 2008).

Desde as primeiras citações destas plantas, observa-se a dúvida de se tratar de *E. macrophyllus* ou *E. grandiflorus*. *E. macrophyllus* foi citado na Farmacopeia Brasileira, na primeira (1926) e segunda (1959) edições, podendo ser considerado como fitoterápico tradicional e *E. grandiflorus* por sua vez teve sua monografia descrita apenas em 2010 na 5ª edição da Farmacopeia Brasileira (2010). Neste mesmo ano, a RDC nº 10 publicada no D.O.U. em 10 de março, que trata da notificação de drogas vegetais junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), cita *E. macrophyllus* com a denominação popular de chapéu de couro e classifica a mesma como droga vegetal, porém utiliza literatura referente também a *E. grandiflorus* quando refere-se ao uso da mesma. A Resolução diz ainda que os produtos descritos no Anexo 1 da mesma, onde encontra-se a descrição de chapéu de couro, estão dispensados de prescrição médica uma vez que “sua efetividade encontra-se amparada no uso tradicional e na revisão de dados disponíveis em literatura relacionada ao tema”(Brasil, 2010).

Echinodorus grandiflorus (Chamisso & Schlechtendal) Micheli é uma das 26 espécies do gênero, pertence à família Alismataceae, que no Brasil é basicamente representada pelos gêneros *Sagittaria* e *Echinodorus* (LESSA *et al.*, 2008). Segundo a 5ª Edição Farmacopeia Brasileira (2010), suas folhas secas possuem odor característico e sabor amargo. A droga vegetal por sua vez é constituída pelas folhas secas contendo no mínimo 2,8% de derivados do ácido *o*-hidroxicinâmico que pode ser doseado através de espectrofotometria de absorção no visível e os dados obtidos expressos em porcentagem de verbascosídeo.

E. grandiflorus é citada como planta medicinal em pesquisas etnobotânicas (SILVA *et al.*, 2009; MAGALHÃES, 2010), estando até entre as dez espécies mais citadas em alguns estudos (KFFURI, 2008; MAGALHÃES, 2010). Segundo a cultura popular, a folha da planta pode ser utilizada no tratamento de problemas renais (DI STASI *et al.*, 2002; LORENZI & MATOS, 2008; KFFURI, 2008; MAGALHÃES, 2010); infecção (SOUZA *et al.*, 2004; KFFURI, 2008; SANTOS & LIMA, 2008); estomatite e gengivite (LORENZI & MATOS, 2008; BETTEGA *et al.*, 2011); febre (MAGALHÃES, 2010); problemas hepáticos (DI STASI *et al.*, 2002; LORENZI & MATOS, 2008; KFFURI, 2008); no tratamento de inflamações e como agente diurético (TESKE & TRENTINI, 2001; LORENZI & MATOS, 2008; SOUZA *et al.*, 2004; KFFURI, 2008;) e como agente hipolipidêmico (PIZZIOLO *et al.*, 2011). Di Stasi e colaboradores (2002) descrevem ações sedativa, analgésica, além da utilização no controle de diabetes e de vermes. A analgesia também é citada por Lorenzi e Matos (2008) que ainda citam a utilização da planta para o combate à sífilis, doenças de pele e como depurativo do sangue.

Ácidos fenólicos caracterizam-se por possuírem em um anel aromático, um grupo carboxila, um ou mais grupos hidroxila e/ou metoxila e são substâncias originadas a partir de duas rotas distintas, a do ácido cinâmico (Figura 1) e do ácido benzóico (ÂNGELO & JORGE, 2007). Estas substâncias participam de inúmeras atividades nas plantas que vão desde a utilização da água até o crescimento de raízes e folhas e podem ainda atuar sobre processos biológicos como síntese de proteínas, respiração celular, permeabilidade da membrana celular e na atividade de algumas enzimas (SOUSA, 2008).

Os derivados do ácido hidroxibenzóico normalmente são constituintes de estruturas complexas, como a dos taninos hidrolisáveis, e raramente estão na forma livre (MANACH *et al.*, 2005). São exemplos os ácidos gálico, *p*-hidroxibenzóico,

vanílico e siríngico, com estrutura comum C6-C1 (ÂNGELO & JORGE, 2007). Quanto aos ácidos fenólicos derivados do ácido hidroxicinâmico (DAH), estes constituem substâncias aromáticas com uma cadeia lateral composta por três carbonos (C6-C3) e destacam-se entre eles os ácidos caféico, ferúlico, *orto*-, *meta*- e *para*-cumárico e sinápico (ÂNGELO & JORGE, 2007; SOARES 2002).

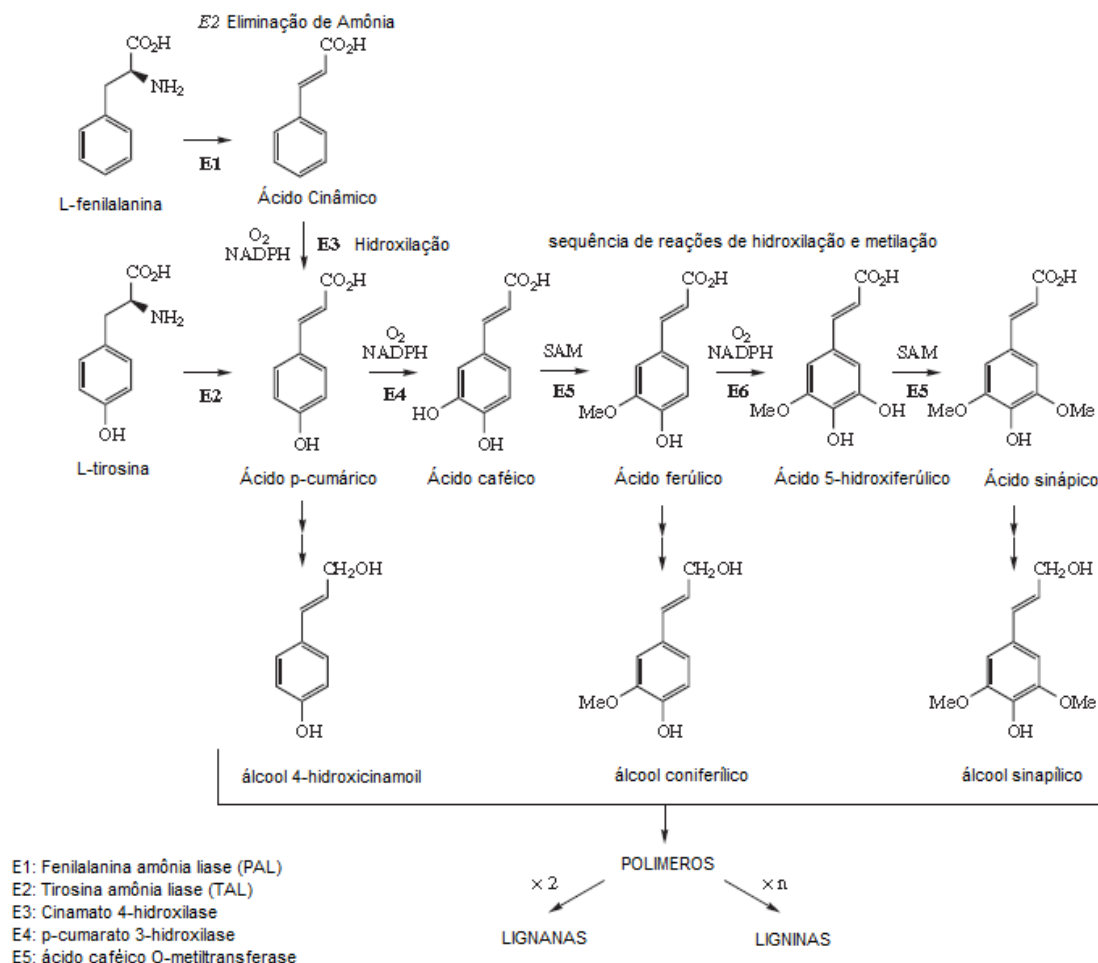


Figura 1: Rota biossintética dos derivados do ácido hidroxicinâmico (IBRAHIM, 2001; DEWICK, 2008).

Ácidos fenólicos derivados do ácido hidroxicinâmico podem ser sintetizados a partir da L-fenilalanina ou da L-tirosina, sendo esta última restrita à Poaceae. A L-fenilalanina sofre uma reação de eliminação para a formação do ácido cinâmico que sofrerá reação de hidroxilação para a formação do ácido *p*-cumárico. A partir de então, este intermediário sofrerá uma série de hidroxilações e metilações

seqüenciais, através de enzimas específicas, para então dar origem aos ácidos caféico, ferúlico, hidroxiferúlico e sinápico (DEWICK, 2008).

Ácidos fenólicos podem ser encontrados na forma livre ou conjugados a açúcares ou proteínas (CROFT, 1998). Para Duran e Padilla (1993), o ácido caféico e o ácido ferúlico estão entre os DAH mais comuns na natureza e geralmente são encontrados na forma de ésteres, de glicosídeos, ou ligados a proteínas e outros constituintes de parede celular, mas raramente como ácidos livres. Mira e colaboradores (2008), ao estudarem os ácidos fenólicos presentes em amostras de arroz utilizando o método de CLAE-UV a fim de determiná-los, em um primeiro momento não conseguiram identificá-los, pois estavam conjugados, não havendo padrões comercialmente disponíveis para comparação, sendo possível a identificação somente após a hidrólise alcalina da fração.

Pimenta (2002) descreveu a presença de ácidos ferúlico, caféico e isoferúlico (Figura 2) em folhas de *E. grandiflorus*, caracterizando a presença desses ácidos fenólicos como constituintes do metabolismo secundário da planta. Ainda nos extratos metanólicos, foi isolado o diterpeno clerodan-3, 13-dien-16-15-olido e os flavonoides isoorientina, isovitexina e swertisina.

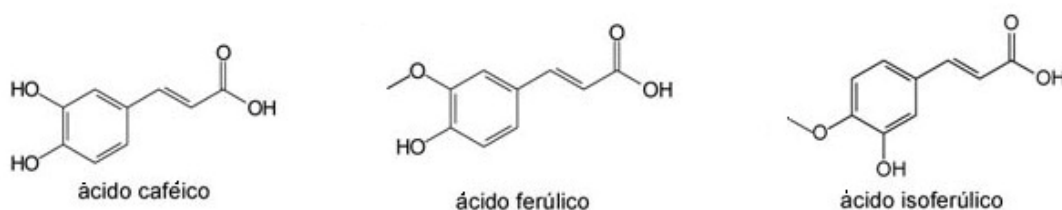
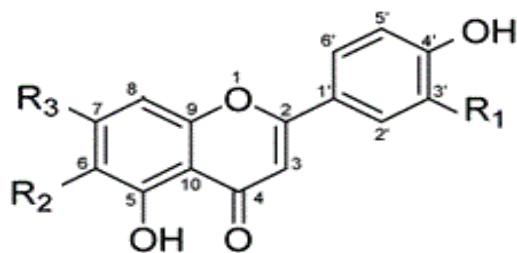


Figura 2: Ácidos fenólicos isolados por Pimenta (2002) a partir de folhas de *E. grandiflorus*.

Folhas de *E. grandiflorus* foram estudadas por Schnitzler e colaboradores (2004) e após extração com diclorometano seguido de etanol 70% (v/v) e análises cromatográficas os autores isolaram ácido trans-acotínico, ácido caftárico, ácido 2-orto-feruloil tartárico, ácido chicórico, ácido cafeoil feruloil tartárico, ácido di-feruloil tartárico, swertiajaponina, isoorientina-7, 3'-dimetil-éter além dos flavonoides isoorientina, swertisina e isovitexina (Figura 3), já descritos por Pimenta (2002).



Flavonoides	R ₁	R ₂	R ₃
Isoorientina	OH	glucose	OH
Isovitexina	H	glucose	OH
swertisina	H	glucose	OCH ₃

Figura 3: Estrutura química dos flavonoides isoorientina, isovitexina e swertisina.

Nos extratos etanólicos obtidos de folhas de *E. grandiflorus* e analisados através de técnicas cromatográficas e espectrofotométricas, foi observado que os constituintes majoritários eram solidagolactona-I e isoorientina, quando verificado o espectro a 220 e 335 nm em CLAE-UV. Nos extratos aquosos, o ácido ferúlico era o constituinte majoritário a 335nm. O melhor marcador químico seria o diterpeno clerodânico solidagolactona-I, uma vez que foi verificado que os componentes fenólicos possuíam maior oscilação em relação à sazonalidade (PIMENTA *et al.*, 2002).

Garcia e colaboradores (2010) confirmaram os estudos anteriores ao identificarem por CLAE os flavonoides isoorientina, isovitexina e os ácidos trans-aconítico e chicórico, a partir dos extratos aquoso, diclorometânico e hidroalcoolicos (30, 50, 70 e 96% EtOH; v/v) de folhas de *E. grandiflorus*.

Tanaka (2000) realizou o isolamento e identificação dos metabólitos especiais presentes em pecíolos e folhas de *E. grandiflorus* e obteve onze diferentes tipos de substâncias, sendo eles o fitol, ácido hardwíckico, ácido echinólico, quatro derivados clerodânicos, dois derivados esteroidais e dois ácidos graxos. Esclareceu ainda que ao comparar por CG/EM os extratos metanólicos brutos de *E. grandiflorus*, *E. macrophyllus*, *E. tenellus*, *E. longipetalus* e *E. aschersonianus* que os clerodanos e cembranos (Figura 4) se mostraram como metabólitos característicos de *E. grandiflorus*, uma vez que, nos demais extratos analisados, essas substâncias foram encontradas em menor quantidade ou apenas como traços, fato esse corroborado

por Costa e colaboradores (1999), que isolaram de folhas de *E. grandiflorus* um derivado clerodânico.

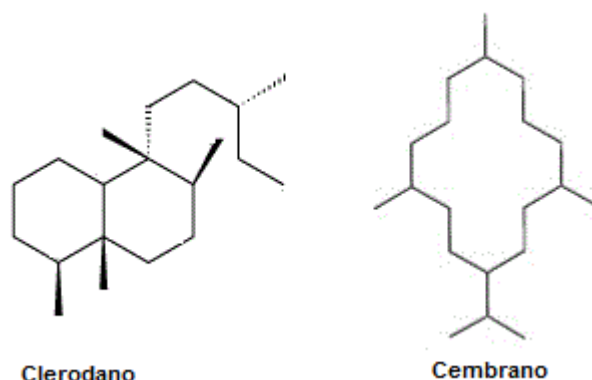


Figura 4: Estrutura química dos diterpenos Clerodano e Cembrano.

Pimenta e colaboradores (2006) pesquisaram os constituintes dos óleos essenciais de folhas obtidos de duas populações distintas de *E. grandiflorus* e identificaram 17 componentes distintos. Destes, o fitol foi o principal componente em ambas as populações, o ácido echinólico aparece como segundo metabólito com maior produção (Figura 5) e dentre os sesquiterpenos, os principais representantes são o (E)-cariofileno, α -humuleno e (E)-nerolidol. Ainda, segundo os autores, a planta pode ser fonte de fitofármacos, uma vez que o fitol tem sido considerado como responsável por importantes atividades terapêuticas.

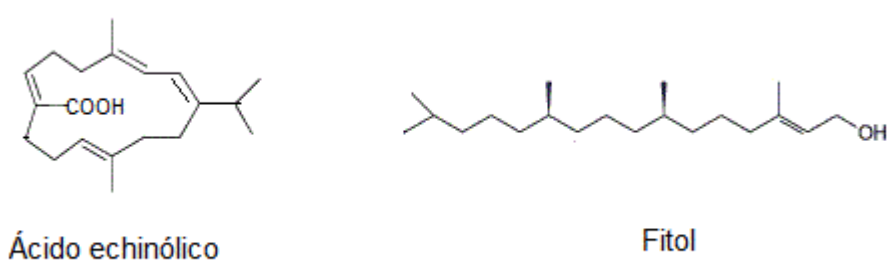


Figura 5: Estrutura química dos componentes majoritários do óleo essencial de *Echinodorus grandiflorus* detectados por Pimenta e colaboradores (2006).

O fitol também foi descrito como constituinte do extrato hexânico de folhas da espécie, onde também foram caracterizados o ácido palmítico, esteroides e o diterpeno clerodan-3, 13-dien-16-15-olido (PIMENTA, 2002).

Algumas das ações farmacológicas de *E. grandiflorus* já foram comprovadas através de experimentos científicos, como a ação anti-hipertensiva (LESSA *et al.*, 2008), vasodilatadora (TIBIRIÇÁ *et al.*, 2007); antimicrobiano (SOUZA *et al.* 2004); ação analgésica e anti-inflamatória (DUTRA *et al.*, 2006; CARDOSO *et al.*, 2003); modulação da inflamação pulmonar alérgica com potencial para agente terapêutico da asma (BRUGIOLO *et al.* 2011).

Quanto à toxidez dos extratos de *E. grandiflorus*, Brugiolo e colaboradores (2010) realizaram estudo frente à reprodução em ratos. Demonstraram que o extrato aquoso das folhas na concentração intermediária (500mg/Kg), acarretou alterações nos órgãos internos levando a reação inflamatória localizada no fígado, diminuição no espaço capsular dos rins e hemossiderina no baço, enquanto na concentração mais elevada (1000mg/Kg) produziu, ainda, anemia. Entretanto não houve qualquer alteração nos parâmetros reprodutivos e na morfologia do feto ou da placenta.

Na revisão de literatura não foram encontradas caracterizações químicas de rizomas de chapéu de couro, mesmo a população fazendo uso desse órgão vegetal, como citado por Lorenzi e Matos (2008) quando descrevem que os rizomas são utilizados em cataplasmas para o tratamento de hérnias. Quanto à pesquisas farmacológicas envolvendo os rizomas, Dutra e colaboradores (2006) ao investigarem a possível ação analgésica e anti-inflamatória do extrato metanólico de rizomas de *E. grandiflorus*, observaram ação analgésica central e periférica, antiedematogênica dependente da dose e ação anti-inflamatória semelhante a indometacina.

Echinodorus é uma planta aquática emergente perene devido ao desenvolvimento de rizomas, que mantém sua propagação vegetativa, independente da produção de sementes ou da produção de brotos vegetativos nos nós do escapo floral, que são outras duas formas de propagação da planta. A utilização de rizomas obriga a retirada de toda a planta do solo, porém, pode-se separar sua porção apical para replantio, utilizando-se o restante do rizoma, até 90% de seu comprimento, para a produção de extratos. A prática de coleta de rizomas apresenta a desvantagem de tornar o recurso natural não renovável, caso não ocorra replantio, porém, no uso tradicional de plantas medicinais ou na busca de novas substâncias bioativas, várias plantas apresentam essa característica não renovável, tais como o uso de cascas de árvores *Hortia brasiliiana* Vand. Ex DC., *Tabebuia heptaphylla* (Vellozo) Toledo e *Stryphnodendron barbatiman* Mart., ou mesmo rizomas e raízes *Pffafia spp*, *Zingiber*

officinalis L. e *Valeriana officinalis* L. (LORENZI, 1991; PANIZZA, 1997; BEVILAQUA & NEDEL, 2000; JOAQUIM 2000; LORENZI E MATOS, 2008; PIMENTA, 2002; PIMENTA, 2005).

2.2. Aspectos Farmacológicos

Os seres humanos possuem em seu organismo um complexo mecanismo de defesa. Dentre estes, está o processo inflamatório que ocorre como uma resposta à injúria celular. A injúria pode ser causada por agentes físicos (trauma, calor, radiação e frio), químicos (substâncias causticas, álcalis, irritantes entre outros) e biológicos (microorganismos, reações imunológica) e desencadeia um fenômeno complexo, dinâmico, multimediado que envolve o extravasamento celular, liberação de mediadores químicos, ativação enzimática, migração celular, sensibilização e ativação de receptores de lise e reparo tecidual (CARVALHO & LEMONICA, 1998).

A inflamação é caracterizada por sinais clássicos como eritema, edema, dor (hiperalgesia) e calor (GOODMAN & GILMAN, 2005) além da possibilidade da perda da função do órgão afetado (OSADEB & OKAYE, 2003; WANNMACHER & FERREIRA, 2004). O processo inflamatório pode ser dividido em três fases: fase aguda, onde desencadeiam-se os processos vasculares, podendo ser observada a vasodilatação local e aumento da permeabilidade capilar, seguida da fase tardia com a migração e infiltração de leucócitos e células fagocíticas e por fim a fase chamada de proliferativa crônica, por se caracterizar pela degeneração tecidual e fibrose (GOODMAN & GILMAN, 2005; LESS *et al.*, 2004), podendo ainda gerar dor através da ativação e sensibilização de nociceptores (LESS *et al.*, 2004). Para Carvalho e Lemonica (1998), isto ocorre devido a alteração do mecanismo de transdução periférica do estímulo nociceptivo, aumentando a sensibilidade de transdução dos nociceptores, com redução no limiar de percepção do estímulo doloroso podendo levar a hiperalgia (resposta exagerada) ou alodínia (sensibilidade a estímulos antes inócuos).

Além disso, a inflamação é muito complexa, podendo ainda ser classificada de acordo com o tempo de duração do processo ou de evolução do mesmo em inflamação aguda e inflamação crônica (BUSNARDO, 2007).

A inflamação aguda é caracterizada por ter um início rápido e ser de curta duração, ocorrendo vasodilatação tanto dos vasos arteriolares quanto dos venulares,

seguido de exsudação de fluídos e proteínas plasmáticas, gerando o edema e por fim migração celular por quimiotaxia, em especial de neutrófilos que migram para o local da lesão após aderirem-se à parede do vaso, através de moléculas denominadas selectinas (LAU *et al.*, 2004 IWALEWA *et al.*, 2007). Para alguns autores, ainda há a ativação dos fatores da coagulação (SPLETTSTOESSER & SCHUFF-WERNER, 2002; CARRAWAY & WELTY-WOLF MILLER, 2003). A inflamação crônica, por sua vez, caracteriza-se por uma duração prolongada, por seu aspecto histológico com a presença de linfócitos, macrófagos, plasmócitos e fibroblastos e por evidências de regeneração do tecido, proliferação de vasos sanguíneos ou até mesmo fibrose e necrose tecidual (GUALILO *et al.*, 2003; IWALEWA *et al.*, 2007).

Para Iwalewa e colaboradores (2007), a inflamação aguda seria responsável pela defesa do organismo a bactérias, vírus e parasitas, além de facilitar o reparo tecidual, enquanto a inflamação crônica persistente seria a responsável pelo aumento de doenças degenerativas como artrite reumatóide, arteriosclerose, doença de Alzheimer, entre outras, o que é reforçado por Liew (2003), ao afirmar que o processo inflamatório pode agir desde uma resposta frente a microorganismos, antígenos até uma resposta inflamatória descompensada gerando alterações fisiológicas, perda da função do órgão afetado até a morte do indivíduo.

2.2.1 Vasodilatação e Edema

A vasodilatação, verificada clinicamente pelo eritema e pelo calor, é um dos processos característicos da inflamação e é responsável por fornecer uma quantidade maior de sangue ao local da lesão, na tentativa de potencializar a ação do sistema de defesa. Isto ocorre através de estase vascular, aumento da permeabilidade capilar, extravasamento de fluidos e proteínas além da liberação de mediadores e migração de leucócitos (HENSEN, 2005; ROTH *et al.*, 2009).

A vasodilatação é originada pela liberação de mediadores químicos como o óxido nítrico (NO) e as prostaglandinas (PGs) vasodilatadoras, no local da injúria (BUSNARDO, 2007). O NO é sintetizado no organismo a partir do oxigênio molecular e da L-arginina, pela ação de um grupo de enzimas denominadas óxido nítrico sintases (NOS). Já foram descritas na literatura três isoformas diferentes de NOS, duas são constitutivamente expressas, sendo elas a neuronal (nNOS) e a

endotelial (eNOS), a terceira isoforma é induzida por estímulos inflamatórios e é denominada de NOS indutível (iNOS) (FLEMING & BUSSE, 1999; VALLANCE & CHAN; 2001; CIRINO *et al.*, 2003).

As três isoformas de NOS possuem semelhança estrutural e necessitam de co-fatores para desempenharem sua função. As isoformas constitutivas (nNOS e eNOS) têm sua ação dependente da concentração de cálcio intracelular (BOGDAN, 2001) e possuem semelhanças na cinética de liberação do NO (WEST *et al.*, 2001). A isoforma indutível por sua vez não requer um aumento de cálcio intracelular para dar início à produção de NO (GRIFFITH & STUEHR, 1995), sendo apenas necessária a presença de L-arginina e a indução através de citocinas inflamatórias como INF- γ , TNF- α , IL-1 ou lipopolissacarídeos (LPS) de bactérias, que levarão a sua transcrição (XIE *et al.*, 1994; HEBA *et al.*, 2001; VALLANCE & CHAN; 2001).

A quantidade de NO produzida pelas isoformas constitutiva e indutível são diferentes (COLEMAN, 2001). As isoformas constitutivas produzem baixos níveis de NO e assim possuem ação rápida e direta. Segundo Salvemini e colaboradores (2003) existem vários mecanismos pelos quais o NO age como um mediador pró-inflamatório. No caso da vasodilatação o NO interage diretamente com a guanilil ciclase (GC), convertendo o trifosfato de guanosina (GTP) em monofosfato de guanosina cíclico (GMPC), que por sua vez ativa enzimas quinases dependentes de GMPC, levando à redução de cálcio intracelular e assim levando ao vasorrelaxamento e aumento da permeabilidade celular (LUGNIER *et al.*, 1999; COLEMAN, 2001).

Por outro lado, as células do sistema imunológico responsáveis pela resposta inflamatória, como os macrófagos, expressam a forma indutível da enzima NO sintase. A concentração de NO produzida após sua ativação é elevada e pode ocasionar a morte da célula ou organismo alvo, uma vez que o NO produzido nessas circunstâncias liga-se às metalo-proteínas do sítio alvo, liberando seus íons metálicos e estes por sua vez são os responsáveis pela formação de oxigênio e hidroxila radicalar com alto potencial de oxidação (BARRETO *et al.*, 2005).

As prostaglandinas são substâncias produzidas pela enzima ciclooxigenase (COX) a partir do ácido araquidônico, liberado pela reação da enzima fosfolipase A2, com os fosfolípidos liberados após uma lesão na membrana celular. Elas colaboram no desenvolvimento de diferentes reações do organismo, entre elas pode-se citar a vasodilatação, eritema, aumento do fluxo sanguíneo no local e

hiperalgesia (HILÁRIO *et al.*, 2006). Para Taberero e colaboradores (2003), a vasodilatação neste caso estaria ligada diretamente às prostaciclina, prostaglandinas primárias como PGI₂, PGD₂, PGE₂ e PGF_{2α}.

Com o decorrer do processo inflamatório, haverá a formação do edema que se caracteriza pela saída do plasma. O estímulo para o aumento da permeabilidade celular e a exsudação plasmática pode ocorrer através de histamina, bradicinina, leucotrienos, complemento, substância P e fator ativador de plaquetas (DENZLINGER *et al.*, 1985; FRIEDL *et al.*, 1989). Dip e colaboradores (2004) afirmam ainda que a histamina seria a responsável pelo aumento da permeabilidade quando a lesão for considerada pequena e pelo próprio endotélio, quando a intensidade da lesão for maior. O fato é que o acúmulo das proteínas plasmáticas no interstício aumenta a pressão oncótica, fazendo com que não haja retorno da água para os vasos, gerando assim o edema (ALLER *et al.*, 2006).

2.2.2 Migração Leucocitária

A migração leucocitária consiste no evento determinante para que o processo inflamatório desencadeado após a agressão atinja seu objetivo primordial de proteção do organismo (ALON *et al.*, 1996; ROSEN, 1993; SHINJI *et al.*, 2003; HEIT *et al.*, 2005, HEBEDA, 2008).

A vasodilatação e o aumento da permeabilidade celular levam a saída do líquido rico em proteínas para o interstício resultando no aumento da concentração de eritrócitos no vaso e aumento na viscosidade sanguínea o que deixa o fluxo mais lento, levando a estase que favorecerá o movimento dos leucócitos para a periferia do vaso (BLIXT *et al.*, 1985; PERRY & GRANGER, 1991; MITCHELL *et al.*, 2006). A migração inicia-se com a formação de agregados de eritrócitos no interior dos vasos, ficando estes maiores que os leucócitos, ocorrendo inversão do fluxo normal vascular. Sabe-se que as células maiores, leucócitos, concentram-se normalmente no centro do vaso e as células menores, eritrócitos, na periferia do vaso (CHIEN, 1982; RAMPART, 1994; WIEDLE *et al.*, 2001; OKAYAMA & KAWAKAMI, 2006).

Após a marginalização, os neutrófilos começam um movimento de rolamento sobre o endotélio dos microvasos (BLIXT *et al.*, 1985; PERRY & GRANGER, 1991). O rolamento só é possível a partir de uma série de processos de adesão mediados por moléculas chamadas selectinas, que se ligam a carboidratos específicos, a L-

selectina (LECAM – *Leukocyte Endothelial Cell Adhesion Molecule*), presente em leucócitos, a E-selectina (ELAM - *Endothelial Leukocyte Cell Adhesion Molecule*) no endotélio e P-selectina nas plaquetas e no endotélio, em um processo dependente de cálcio (SPERANDIO, 2006). A interação entre a L-selectina e a P-selectina promove o processo de rolamento, uma vez que elas estão frouxamente ligadas (YOSHIDA, 1996; MOURA *et al.*, 2001; SILVEIRA & YOSHIDA, 2004; MITCHELL *et al.*, 2006).

As integrinas, por sua vez, são proteínas transmembrana responsáveis pela adesão entre os leucócitos e as células endoteliais, quimiotaxia e fagocitose (SHINJI *et al.*, 2003; HEIT *et al.*, 2005). Dessa forma, após a adesão dos leucócitos ao endotélio, sabe-se que o processo de diapedese e quimiotaxia são necessários ao desenvolvimento da resposta inflamatória e ocorre mediado pelas integrinas (ALON *et al.*, 1996; ROSEN, 1993; SHINJI *et al.*, 2003; HEIT *et al.*, 2005). Essas moléculas são naturalmente expressas por todos os leucócitos, ocorrendo uma mudança em suas subunidades, α e β , para um *status* de alta afinidade pelo respectivo ligante após um processo de ativação da célula, por interação com mediadores endógenos e por estímulos inflamatórios (CARLOS & HARLAN, 1990; YANG *et al.*, 2004; JAKUS *et al.*, 2007).

As integrinas ligam-se a moléculas presentes no endotélio, denominadas imunoglobulinas, das quais fazem parte as Moléculas de Adesão Intercelulares (ICAMs) e as Moléculas de Adesão Vascular (VCAMs), as mais importantes são conhecidas como ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1 e PECAM-1 (ROTHLEIN *et al.*, 1991; HERBEDA, 2008)

Os eventos de adesão e diapedese são afetados por mediadores inflamatórios, especialmente IL-1 e TNF- α , que possuem efeito quimiotático e de amplificar os fatores estimulantes (POBER & COTRAN, 1991; FRANCISCHETTI *et al.*, 2010). Francischetti e colaboradores (2010) afirmam que a quimiotaxia está diretamente relacionada a ligação de agentes quimiotáticos à receptores ligados a proteína G, que ativa, então a via da fosfoinositol-3quinase (IP-3K) que causará aumento na concentração de cálcio intracelular, ativação das guanosinas trifosfatases (GTPases) que levarão a formação de pseudópodes e o movimento leucocitário.

Quando a adesão leucócito-célula endotelial, com a posterior diapedese, ocorre de maneira efetiva, à ação dos leucócitos é otimizada, pois permite que os

mesmos liberem seus mecanismos de defesa, como produção de metabólitos do ácido araquidônico, desgranulação e secreção de enzimas lisossômicas, secreção de citocinas, assim como maior expressão de moléculas de adesão e maior exposição de integrinas, de maneira intensa e no foco da inflamação (NAGATA *et al.*, 1998; FRANCISCHETTI *et al.*, 2010).

2.2.3 Mediadores Inflamatórios

Para que o processo inflamatório ocorra, é necessário que uma série de substâncias químicas sejam produzidas e entrem em contato com seu alvo. Assim, são descritos como mediadores da inflamação: histamina e serotonina, ambas consideradas aminas vasoativas; prostaglandinas, leucotrienos e lipoxinas, provenientes do metabolismo do ácido araquidônico; proteínas plasmáticas provenientes dos sistemas complemento, das cininas e da coagulação; fator de ativação de plaquetas (PAF), citocinas, óxido nítrico (NO), componentes lisossômico dos leucócitos e RLO (FRANCISCHETTI *et al.*, 2010).

Entre os primeiros mediadores químicos da inflamação, estão a histamina e a serotonina. A histamina é encontrada na forma de grânulos pré-formados em mastócitos, basófilos e plaquetas, sendo que a liberação por mastócitos ocorre após a interação com a imunoglobulina IgE, fragmentos do complemento C3a e C5a, citocinas (IL-1, IL8), neuropeptídeos (substância P) entre outros, já a liberação pelas plaquetas é ocorre após o contato com o colágeno, trombina, difosfato de adenosina (ADP), complexos antígeno-anticorpo e fatores ativadores de plaqueta (RANG *et al.*, 2007; FRANCISCHETTI *et al.*, 2010; CRUVINEL *et al.*, 2010).

A histamina é responsável pela contração da musculatura lisa de vários órgãos e aumento da permeabilidade dos capilares venosos produzindo lacunas venulares (COTRAN *et al.*, 2006; RANG *et al.*, 2007; CRUVINEL *et al.*, 2010). Segundo Lees (2003), a histamina também é capaz de estimular nociceptores. Essas atividades relacionadas a histamina se devem à ligação da mesma a quatro diferentes receptores: H1, H2, H3 e H4, presentes nas células alvo. O receptor H1 está relacionado diretamente aos efeitos sobre a microcirculação. A ativação dos receptores H2, por sua vez, aumentam a liberação de ácido gástrico e promove o relaxamento da musculatura lisa. H3 é o responsável pelo *feedback* negativo da

síntese de histamina e H4 é responsável pela quimiotaxia de mastócitos (RANG *et al.*, 2007; CRUVINEL *et al.*, 2010).

A serotonina está presente em plaquetas, mastócitos, basófilos (FRANCISCHETTI *et al.*, 2010) e células enterocromafins (COTRAN *et al.*, 2006; RANG *et al.*, 2007). Sua liberação ocorre durante a agregação plaquetária. Ao ser liberada após estímulos inflamatórios, possui efeitos semelhantes à histamina no que tange a vasculatura, aumento da permeabilidade e vasodilatação (COTRAN *et al.*, 2006; RANG *et al.* 2007), além de estar diretamente relacionada a sensibilização das fibras nervosas durante a inflamação. Acredita-se que esse efeito possa ocorrer de maneira direta ou indireta, seja pela ativação direta de receptores 5-HT₃, produzindo nocicepção, seja pelo estímulo de receptores 5-HT₁ e 5-HT₂ por 5-HT periférica, potencializando os efeitos vasculares e aumentando o fluxo de mediadores inflamatórios, como os eicosanóides presentes no sangue (SOMMER, 2004; TAMBELLI *et al.*, 2006).

Os eicosanóides são produzidos após a metabolização do ácido araquidônico e são capazes de atuar em uma série de processos biológicos que vão desde a manutenção da homeostasia à inflamação (KUMAR *et al.*, 2008; COTRAN *et al.*, 2006). Após uma lesão na membrana celular, ocorre a exposição dos fosfolipídios presentes na membrana, estes sofrerão a ação da fosfolipase A2. A enzima está presente em leucócitos e plaquetas e é ativada por citocinas levando a produção de ácido araquidônico (HILÁRIO *et al.*, 2006).

O ácido araquidônico pode ser metabolizado pela ação de duas enzimas distintas, a ciclooxigenase (COX) que dará origem as prostaglandinas, tromboxanos e a lipoxigenase (LOX) que é capaz de produzir os leucotrienos e as lipoxinas (MITCHELL *et al.*, 2006; ABBAS *et al.*, 2008). Sabe-se que a ciclooxigenase é encontrada ao menos em duas isoformas, COX1 e COX2, que desempenham papéis distintos no organismo (LEES *et al.*, 2004). A primeira é considerada constitutiva, por estar presente em quase todos os tipos de células e por sintetizar prostaglandinas diretamente relacionadas as funções de manutenção da homeostase (LESS *et al.*, 2004; FRANCO *et al.*, 2006). A COX2 é considerada uma isoforma indutiva, uma vez que só é detectável após o estímulo inflamatório como IL1- α e β , IL-2, TNF- α , IFN- γ , LPS, entre outros, sendo então detectada em células migratórias (macrófagos, monócitos, mastócitos), tecidos lesados (epitélio, endotélio, músculo liso) (HERCHMAN, 1996; MORITA, 2002; KUMMER & COELHO, 2002;

FRANCO *et al.*, 2006; STEAGALL *et al.*, 2009) e no sistema nervoso central, mediando dor e febre (HILÁRIO *et al.*, 2006). As prostaglandinas produzidas durante a inflamação possuem importantes efeitos pró-inflamatórios, pois dilatam arteríolas aumentando o fluxo sanguíneo local, eritema, possuem ação sinérgica com outros mediadores no aumento da permeabilidade capilar, aumento da sensibilidade à dor e a febre e incremento da inflamação (LEES, 2003; HILÁRIO *et al.*, 2006).

Além das prostaglandinas, também são sintetizados o Tromboxano A₂ (TxA₂) nas plaquetas. Ele é capaz de causar vasoconstrição e agregação plaquetária, além de agir como quimiotático para neutrófilos, promover ativação e adesão dos mesmos ao endotélio (YOSHIBA, 1996; MITCHELL *et al.*, 2006; HILÁRIO *et al.*, 2006).

A lipoxigenase catalisa uma reação de oxigenação estereoespecífica do ácido araquidônico, com a finalidade de sintetizar os leucotrienos e lipoxinas. Esses metabólitos podem ser gerados por três diferentes tipos de LOX (COTRAN *et al.*, 2006), sendo que a mais importante é a 5-lipoxigenase, que ao final da reação dará origem ao leucotrieno A₄ (LTA₄), que por sua vez pode ser convertido em leucotrieno B₄ ou em LTC₄, LTD₄, LTE₄, chamados cisteinil-leucotrienos (GOODMAN *et al.*, 2009). Esses últimos agem sobre o fluxo sanguíneo e na perfusão por ação direta na microcirculação (YOSHIBA, 1996; MITCHELL *et al.*, 2006), além disso, causam contração do músculo brônquico (BERTOLINI *et al.*, 2002). O leucotrieno B₄ (LTB₄) é capaz de se ligar a receptores na superfície dos leucócitos e desencadear reações que vão desde a ativação do sistema de adesão, através das integrinas β_2 e aderência a célula endotelial à estimulação de proliferação de macrófagos e linfócitos, além da produção de citocinas por essas células (YOSHIBA, 1996; MITCHELL *et al.*, 2006; GOODMAN *et al.*, 2009).

Além dos mediadores lipídicos descritos acima, ainda há a produção dos fatores de ativação de plaqueta (PAF) que são gerados a partir do ácido lisofosfatídico, gerado previamente durante a reação da fosfolipase A₂ com os fosfolípidos de membrana. O PAF é capaz de gerar vasodilatação, aumento da permeabilidade celular e ativação de plaquetas (HIGGS *et al.*, 1984; SERHAN, 2007).

As citocinas são hormônios protéicos responsáveis pela fase efetora da imunidade, seja ela inata ou específica. São produzidas por vários tipos celulares como fagócitos mononucleares e linfócitos T. As secretadas pelos fagócitos mononucleares provocam reações inflamatórias com grande número de neutrófilos,

na tentativa de impedir ou erradicar infecções microbianas. As produzidas por linfócitos T agem principalmente regulando o crescimento e a diferenciação de várias populações linfocitárias, ativando células inflamatórias como fagócitos mononucleares, neutrófilos e eosinófilos. Ambas são capazes de produzir as citocinas, chamadas de fatores estimulantes de colônia (CSFs) que são responsáveis por estimular o crescimento e a diferenciação de leucócitos imaturos na medula óssea, que irão substituir as células consumidas durante a inflamação (ABBAS *et al.*, 2008).

Receptores podem ser do tipo imunoglobulinas, receptores classe I (receptores das hematopietinas), receptores classe II (receptores de interferons), receptores de TNF e por fim receptores de quimiocinas. A maioria desses receptores contém duas subunidades: α , pertencente à família das tirosina quinases, relacionada diretamente à ligação com a citocina e a transdução do sinal, e β , que age no desenvolvimento da cascata de sinalização (BILATE, 2007).

Dessa maneira, após a ligação com os receptores na célula-alvo, ocorre a transdução dos sinais no interior da célula culminando na ação desejada. Estão, entre as ações dessas moléculas, a ativação e regulação da resposta imune celular e humoral (TGF- β , IL-10), a regulação da hematopoiese (fatores de crescimento) e a diferenciação celular (IL-12, INF- γ , IL-4) (BILATE, 2007), além da ativação do endotélio e de leucócitos com geração da resposta de fase aguda (HUME, 2006).

São exemplos importantes desses mediadores inflamatórios a IL-1, que é capaz de gerar febre, neutrofilia, liberação de proteína C reativa, indução de moléculas de adesão e indução da produção de outras citocinas; a IL-6 está relacionada à produção e liberação de mediadores de fase aguda, indução de febre e liberação de hormônio adrenocorticotrófico e a IL-8 que é um potente quimiotático e causa a degranulação dos neutrófilos (MOURA *et al.*, 2001).

As quimiocinas, por sua vez, são um subgrupo das citocinas, consistindo-se de polipeptídeos pequenos que se ligam à receptores transmembrana acoplados a proteína G, gerando a transdução do sinal que levará a ativação de integrinas em leucócitos e posterior adesão a parede do endotélio, geração de radicais livres por fagócitos, liberação de histamina por basófilos e ativação de proteases de neutrófilos (BILATE, 2007).

As enzimas proteolíticas possuem diferentes papéis na inflamação, que vão desde a degradação da matriz extracelular e da membrana basal até defesa do

organismo, a migração de leucócitos e remodelação do tecido (JIANG *et al.*, 2003). Um exemplo disso é a desgranulação de neutrófilos ativados por TNF- α ou pelo fator XIIa, que liberam elastase e colagenase que destruirão moléculas responsáveis pela integridade do endotélio vascular (MOURA *et al.*, 2001; MITCHELL *et al.*, 2006). As proteínas lisossômicas de neutrófilos e monócitos como a lisozima, colagenase, gelatinase, lactoferrina, ativador de plaminogênio, histaminase, mieloperoxidase, lisozima, defensinas e outras hidrolases ácidas podem contribuir para a inflamação, uma vez que podem degradar proteínas e bactérias dentro dos fagolisossomas, aumentar a permeabilidade vascular e contribuir para quimiotaxia (MITCHELL *et al.*, 2006).

Entre os mediadores inflamatórios está o óxido nítrico (NO). Quando os leucócitos são ativados por estímulos inflamatórios, estes passam a produzir a enzima óxido nítrico sintase indutível (iNOS), que passará a produzir NO por um mecanismo de produção enzimática envolvendo a participação do oxigênio molecular e da L-arginina. O NO produzido tanto terá ação citotóxica e citostática, afim de destruir microorganismos parasitas e células tumorais (DUSSE *et al.*, 2003), quanto juntamente com as prostaglandinas causará vasodilatação, uma vez que além da produção de NO pela isoforma indutível, as isoformas constitutivas da NOS estarão aumentadas pelo influxo de cálcio. Dessa maneira, o NO causará relaxamento do músculo liso por um mecanismo dependente de guanosina mono fosfato cíclico (GMPc) (MONCADA *et al.*, 2004). Após a vasodilatação, seguida da formação do edema, ocorre então a migração leucocitária, evento esse fundamental na resposta inflamatória (HEBEDA, 2008). A migração leucocitária ocorre pela expressão de moléculas de adesão pelo endotélio previamente ativado por mediadores inflamatórios (CRUVINEL *et al.*, 2010). O óxido nítrico tem um papel importante neste processo, entretanto há divergências sobre essa atividade. Há estudos que demonstram que na ausência de óxido nítrico seja pela inibição das enzimas NOS, seja pela utilização de animais *Knockout*, ocorre um aumento do recrutamento de leucócitos para o local da inflamação, aumento do comportamento de rolamento e da aderência dos leucócitos ao endotélio, o que indica que o NO teria um papel anti-inflamatório (KUBES *et al.*, 1991; SUEMATSU *et al.*, 1994; NIU *et al.*, 1994; SANZ *et al.*, 2001; VALLANCE *et al.*, 2004; SECCO *et al.*, 2004). Por outro lado, há pesquisas que indicam a ação pró inflamatória do NO, uma vez que ao inibir de forma inespecífica a NOS, ocorre a redução da migração de células para o local

da inflamação (SALVEMINI *et al.*, 1996; MARZOCCO *et al.*, 2004). Em testes utilizando animais *Knockout* para iNOS, houve diminuição de leucócitos em coração de animais com septicemia (CUENCA *et al.*, 2006), mesmo após a inibição da iNOS, em modelo de inflamação pulmonar os dados apontaram para diminuição significativa da migração celular quando comparadas aos animais sem tratamento (REN *et al.*, 2006; PARRISH e ULLOA, 2007; HEBEDA, 2008).

O NO pode ainda reagir com outros componentes celulares produzindo substâncias com capacidade microbicida como o peroxinitrito, o S-nitrosotiol e o dióxido de nitrogênio que são espécies altamente oxidantes (GRACE, 1994; YOSHIDA, 1996; MITCHELL *et al.*, 2006).

Ainda no contexto dos mediadores inflamatórios, destacam-se neuropeptídeos, substância P, neurocinina A, VIP (*vasoactive intestinal peptide*), CGRP (*calcitonin generelated peptide*), somatostatina e encefalinas (HARRISON & GEPETTI, 2001).

2.3. Dor

A dor é definida pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) como sendo uma sendo “uma experiência sensorial e emocional desagradável a qual está associada a lesões teciduais reais ou potenciais ou descrita em termos de tais lesões” (MERSKEY & BOGDUK, 1994), entretanto Lopes (2003) adapta esse conceito em seu livro, determinando que dor é “uma experiência multidimensional desagradável, envolvendo não só um componente sensorial mas também um componente emocional, e que se associa a uma lesão tecidular concreta ou potencial, ou é descrita em função dessa lesão”. Ainda ocorre a dor psicogênica, que se refere a uma sensação de dor que não está relacionada a um estímulo ou uma lesão aparente.

Entretanto, o sistema nervoso central desenvolveu uma maneira de detectar quando um estímulo é potencialmente nocivo. Assim, apenas os estímulos capazes de desenvolver um alto limiar são transmitidos ao sistema nervoso central (WALTERS, 1994). Portanto, a dor é o resultado da ativação de neurônios aferentes (nociceptores) por uma lesão ou por uma disfunção dos nociceptores ou do próprio sistema nervoso central (LOPES, 2003).

A dor pode ser classificada em aguda e crônica quando se leva em consideração apenas a questão temporal e em nociceptiva ou neuropática quando o referencial for à origem do problema (KLAUMANN *et al.*, 2008). Assim, a dor gerada por estímulos diretos nos nociceptores presentes na pele e outros tecidos quando de uma lesão acompanhada de inflamação é chamada de nociceptiva e quando a origem for uma disfunção dos sistemas nervosos central ou periférico, a dor é chamada neuropática (MERSKEY & BOGDUK, 1994).

Os nociceptores são neurônios aferentes de elevado limiar, cujo corpo está localizado nos gânglios das raízes dorsais da medula espinhal, de onde projetam-se dois prolongamentos, o primeiro dirige-se ao corno dorsal da medula espinhal e o segundo constituirá as fibras sensitivas, uma vez que irão terminar em diversos órgãos e tecidos. As fibras sensitivas são divididas em A β , A δ e fibra C. A fibra A β possui maiores diâmetro e velocidade de condução do estímulo, além de ser mielinizada; A δ é uma fibra intermediária já que possui mielinização fina, diâmetro médio e uma velocidade de condução do estímulo inferior a A β e superior à fibra C, que é desmielinizada, possui pequeno diâmetro e baixa velocidade de condução do estímulo quando comparada às demais (LOPES, 2003). Apenas as fibras A δ e C são capazes de conduzir estímulos nociceptivos (CARVALHO & LEMÔNICA, 1998). A δ é responsável pela dor aguda imediatamente após a lesão, em seguida após a ativação da fibra C, que é mais lenta, ocorrerá a dor difusa (BELMONTE & CERVERO, 1996).

Durante a inflamação são produzidas substâncias que atuarão também na sensibilização dos nociceptores. Entre esses estão bradicinina, acetilcolina, prostaglandinas, histamina, serotonina, leucotrieno, tromboxanos, PAF, radicais ácidos e íons potássio. Essas substâncias são consideradas algio gênicas, uma vez que são responsáveis pela hiperalgesia termo-mecânica observada em lesões inflamatórias, traumáticas e isquêmicas (TEIXEIRA, 2001).

A substância P e a neurocinina A são liberadas na medula espinhal após o estímulo nociceptivo. A substância P contribui para a transmissão facilitada do estímulo, uma vez que produz uma despolarização prolongada dos neurônios do corno dorsal. A neurocinina A parece estar envolvida na dor aguda, já que age nos receptores NK-2, os receptores NK-1 são ativados pela substância P e parecem estar envolvidos na hiperalgesia inflamatória (CARVALHO & LEMÔNICA, 1998).

Segundo ROCHA e colaboradores (2007), as prostaglandinas, em especial a PGE₂, e a bradicinina reduzem o limiar necessário para a transdução do sinal pela fibra nervosa, por alterar receptores específicos, reduzindo o tempo de pós-hiperpolarização. Estudos demonstram que o NO também possui alguma ação sobre a transmissão do estímulo nociceptivo prolongado, sugerindo que assim um importante papel na dor crônica e neuropática (DICKENSON, 1995).

Para Mendel (1996), a dor inflamatória ocorre devido à maciça estimulação da fibra C, de condução lenta, levando a soma dos estímulos. Essa somação por sua vez acarretará em uma sensibilização dos neurônios do corno dorsal manifestando-se como uma redução no limiar de estimulação, o que então acarretará em uma resposta exagerada a estímulos somatosensoriais, mecânicos e térmicos. Esse mecanismo fica evidente pelo aumento na condutividade de canais de sódio e cálcio ou pela redução do influxo de potássio ou cloro para o meio intracelular (WRIGHT, 1999). Os mediadores inflamatórios como a acetilcolina, bradicinina, leucotrienos, substância P, PAF, prostaglandinas, tromboxanos, citocinas e o Fator de Crescimento Nervoso (NGF) são capazes de ativar as fibras nervosas A δ e C causando hiperalgesia (exacerbação do estímulo doloroso) ou a alodínia (sensibilidade a estímulos antes inócuos).

Em resumo, qualquer estímulo inflamatório como, por exemplo, lesão tecidual, que levar ao desenvolvimento da resposta inflamatória com produção de eicosanóides e outros mediadores inflamatórios causará a ativação direta das fibras nervosas seguido do processo de sensibilização das fibras C com aumento da resposta a estímulos nociceptivos (KLAUMANN *et al.*, 2008).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar o perfil químico e a atividade farmacológica de frações semi-purificadas do extrato bruto metanólico de rizomas de *Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schltldl.) Micheli.

3.2. Objetivos Específicos

Obter o perfil químico por CLAE-UV dos extratos brutos etanólicos de rizomas de *Echinodorus grandiflorus*, avaliando a variabilidade de seus constituintes.

Obter o perfil químico por CLAE-UV da fração em acetato de etila 100% proveniente do extrato bruto metanólico de rizomas de *E. grandiflorus*, contribuindo para maior controle de qualidade, pela obtenção de marcador(es) químico(s).

Investigar as atividades antinociceptiva e anti-inflamatória *in vivo* da fração em acetato de etila 100% do extrato bruto metanólico de rizomas de *E. grandiflorus*.

Avaliar a produção de óxido nítrico e a viabilidade celular *in vitro* de frações semi-purificadas do extrato bruto metanólico de rizomas de *E. grandiflorus*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Perfil químico de extratos etanólicos brutos de rizomas de *E. grandiflorus*.

A padronização de folhas de *E. grandiflorus* foi estudada por Pimenta (2002) com esse mesmo objetivo o autor coletou rizomas da planta nas mesmas condições ambientais e épocas das folhas, entretanto apenas os dados referentes às folhas foram publicados .

As amostras de rizomas foram coletadas sazonalmente no início do outono (07 de abril), do inverno (01 de julho) e da primavera (08 de outubro) de 1999, e do verão (05 de janeiro) de 2000, em um campo de cultivo de folhas para a produção do refrigerante Mineirinho[®] no município de Tanguá no estado do Rio de Janeiro. A partir dessas coletas foram obtidos oito extratos brutos etanólicos de rizomas que posteriormente foram analisados por CLAE-UV.

Os extratos etanólicos foram obtidos por maceração estática a partir de rizomas secos e frescos nas quatro estações do ano. Para comparação química entre folhas, que apresentam estudos mais detalhados do ponto de vista químico, e rizomas, com poucos estudos, os cromatogramas obtidos dos extratos de rizoma foram avaliados quanto aos seus constituintes.

4.1.1 Análise dos cromatogramas

Para os cromatogramas em CLAE-UV, obtidos a partir dos extratos brutos etanólicos de rizomas nas quatro estações do ano foi utilizado um cromatógrafo líquido Shimadzu class-LC10, equipado com duas bombas LC10AT, um detector de UV com varredura de espectros SPD-M10A, um detector espectrofluorimétrico RF-10^A e um injetor Rheodyne n° 7725i. Foi utilizada uma coluna em fase reversa do tipo Supelcosil C-18 e uma pré-coluna CLC-SIL e o sistema para a análise foi acetonitrila:água, partindo de 100% de água e terminando com 20% de água, após 80 minutos, com um fluxo de 1 ml por minuto, em coluna C-18 fase reversa.

O perfil cromatográfico foi obtido por detecção a 220 nm e 335nm e assim foi possível correlacionar o tempo de retenção (em minutos), tempo em que as substâncias levam para sair da coluna, com os comprimentos de onda absorvidos

durante a irradiação com ultravioleta. Desse sistema são obtidos dois gráficos: o cromatograma da amostra (tempo de retenção *versus* intensidade de absorção) e o espectro de absorção no UV para cada sinal (Canela, 1999).

O sistema utilizado na análise qualitativa foi o mesmo utilizado por Pimenta (2002) na caracterização química de extratos obtidos de folhas de *E. grandiflorus*, assim, o tempo de retenção de cada substância detectada correspondeu a proporção de acetonitrila:água no sistema.

A análise dos cromatogramas obtidos por CLAE a 220 e 335 nm e dos espectros de ultravioleta (UV) dos componentes dos extratos em estudo, foi feita em comparação com espectros de substâncias padrão, a partir de literatura pertinente, bem como com a padronização de extratos obtidos de folhas já publicados (Pimenta, 2002).

4.2. Obtenção do extrato bruto metanólico de rizomas de *E. grandiflorus*

4.2.1 Material Vegetal

Os rizomas de *E. grandiflorus* foram coletados em novembro de 2010 de na área de cultivo para a produção do refrigerante Mineirinho[®], no município de Tanguá/RJ.

Foram colhidos indivíduos de *Echinodorus grandiflorus* (Chamisso & Schlechtendal) Micheli, cuja identificação botânica foi realizada pela Dr. Érika Santos Guimarães, com a coleta atual confirmada pelo Dr. Daniel Sales Pimenta. A exsicata encontra-se depositada sob o número 30.707 no Herbário CESJ da Universidade Federal de Juiz de Fora.

Foram coletados 90% de cada rizoma, sendo os 10% restantes, referentes à porção apical, replantados no local da coleta. Após 24 horas, relativas ao transporte entre a área de coleta e o Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Botânica/UFJF, os rizomas foram rapidamente lavados para retirada da terra e raízes, sendo posteriormente cortados em pequenos pedaços de aproximadamente um centímetro cúbico. Parte da amostra foi seca em estufa de secagem com circulação e renovação de ar Cienlab modelo CE-22/480, com temperatura controlada de 40°C e ventilação forçada até peso constante, para obtenção do teor de umidade de toda a amostra.

Este material vegetal foi submetido à extração por maceração estática com metanol P.A., Merck S/A Indústrias Químicas, com troca periódica do solvente. Para garantir a exaustão do processo, os rizomas foram triturados em liquidificador industrial TRON 2L, após oito extrações, e novamente submetidos à maceração estática com três trocas de solventes.

O solvente foi eliminado do extrato através de evaporador rotatório Fisatom, modelo 802, a 40° C.

4.2.2. Perfil químico do extrato bruto metanólico de rizomas de *E. grandiflorus*

Uma alíquota de 30 mg do extrato bruto metanólico de rizoma foi enviada para análise por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) na Plataforma Analítica de Farmanguinhos, FIOCRUZ/RJ. O perfil químico do extrato metanólico bruto de rizomas de *E. grandiflorus* (EBMRE) foi obtido por CLAE – UV, em equipamento Shimadzu com 2 bombas LC-10AD, degaseificador DGU-12A, injetor automático SIL-10AD, forno de colunas CTO-10A e detector por arranjo de diodos SPD-M10AVP. Os dados foram adquiridos por interface SCL-10A. Aquisição de dados e controle pelo software Shimadzu CLASS-VP versão 6.13 SP2.

Para isso, 5 mg de amostra foram diluídas em 500 µL de metanol e injetados em coluna Supelcosil - C18 - 25cm X 4,6mm - 5 µm, na presença de coluna guarda do tipo supelcoguard : LC 18 - 2cm. Foi utilizado um sistema com gradiente linear que consistiu de uma fase móvel: TFA 0,05% em água (A) e acetonitrila (B), com fluxo de fase a 1 mL/min, partindo no tempo zero com 5% de acetonitrila chegando a 65% em 60 minutos. Entre 60 e 70 min a concentração de B subiu de 65 para 100%, ao atingir os 70 minutos até os 80 min foi mantido os 100% de B, retornando linearmente entre 80 e 83 min a 5% B e mantendo-se por mais 15 min. Foi realizado um monitoramento utilizando-se o detector UV em varredura entre 200 a 400 nm, sendo selecionadas as leituras a 220, 270, 335 e 360 nm, das quais posteriormente foram priorizados para comparação química os comprimentos de onda 220 e 335nm.

4.2.3 Fracionamento do extrato bruto metanólico de rizomas de *E. grandiflorus*

Para a obtenção das frações semi-purificadas, uma alíquota de 15 g do extrato bruto metanólico de rizomas foi ressuspenso em água destilada e fracionado

em funil de separação utilizando um processo cromatográfico do tipo partição líquido-líquido (v/v) com solventes de polaridade crescente, a saber: hexano 9:1 acetato de etila e acetato de etila 100%, como demonstrado no Figura 6. Foram obtidas assim três frações semi-purificadas (hexânica 9:1 acetato de etila - FHAc, acetato de etila 100% - FAc, e a resíduo aquoso final - FRA) que então foram testadas para monitoramento farmacológico.

Além disso, foram retirados 3 g do extrato bruto metanólico de rizomas e aplicados em uma coluna cromatográfica com Sephadex LH-20 como fase estacionária e metanol P.A. como eluente. As frações obtidas foram enviadas para análises cromatográficas e espectrométricas na Plataforma Analítica de Farmanguinhos, FIOCRUZ/RJ.

O fracionamento forneceu 300 frações que, posteriormente, foram reagrupadas em 26 frações utilizando-se cromatografia em camada delgada em cromatoplasas em gel de sílica 60 G F₂₅₄, eluídas em acetato de etila e metanol na proporção 8:2 (v/v), tendo sido visualizadas utilizando-se câmara escura Biothec 254/365 NM em comprimentos de onda de 254 e 365nm e reveladas com iodo ressublimado.

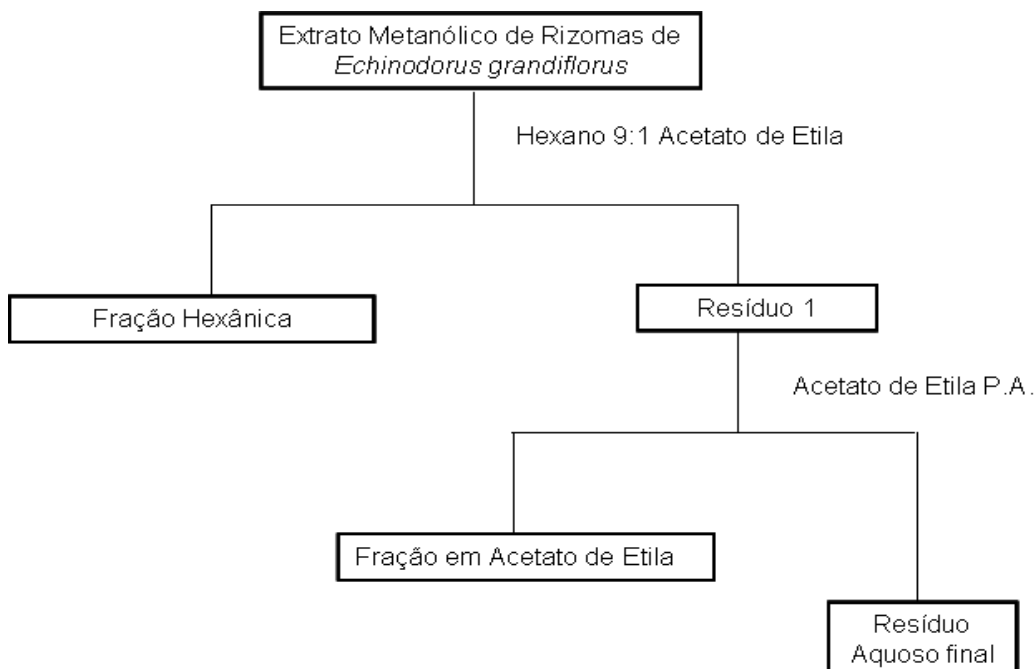


Figura 6: Esquema de fracionamento do extrato bruto metanólico de rizomas de *Echinodorus grandiflorus*.

4.2.4 Perfil químico da fração em acetato de etila 100% obtida a partir do extrato bruto metanólico de rizomas de *E. grandiflorus*

Uma alíquota de 2 mg da FAc foi submetida a análises por CLAE-UV utilizando os mesmos parâmetros descritos no item 4.2.2. Para a obtenção dos espectros de UV foi utilizado-se uma solução da amostra na concentração de 2mg / mL em metanol, filtrados em membrana de 0,22µm - Durapore (Millipore).

Após a confirmação da presença de ácidos fenólicos derivados do ácido hidroxicinâmico nesta fração semi-purificada por CLAE-UV, foi realizado um processo de cromatografia em coluna utilizando-se Sephadex LH-20 de uma amostra de 600 mg da fração.

Foram obtidas 340 frações que foram novamente agrupadas em 35 frações utilizando-se cromatografia em camada delgada em cromatoplaças com gel de sílica 60 G F₂₅₄, eluídas em acetato de etila e metanol na proporção 8:2 (v/v), tendo sido visualizadas utilizando-se câmara escura Biothec 254/365 NM em comprimentos de onda de 254 e 365nm e reveladas com iodo ressublimado.

4.3. Investigação Farmacológica

4.3.1. Avaliação farmacológica *in vivo*

Os testes *in vivo* foram realizados no Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora.

4.3.1.1 Animais

Neste trabalho foram utilizados camundongos Swiss machos com 32 dias de vida (18g) e ratos machos Wistar com 80 dias de nascido (160g). Todos os animais foram provenientes do Centro de Biologia da Reprodução da UFJF e foram mantidos em gaiolas de polipropileno com ração e água *ad libitum* a temperatura ambiente (22°C) e com luminosidade controlada gerando ciclos claro/escuro de doze horas, sendo privados de ração apenas doze horas antes da realização dos experimentos.

Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da Universidade Federal de Juiz de Fora através dos processos n° 42 e 43/2011 (Anexos 1 e 2).

4.3.1.2 Atividade Antinociceptiva

4.3.1.2.1 Teste de Contorções Abdominais

A atividade antinociceptiva de FAc foi avaliada através do Teste de Contorções Abdominais induzidos por ácido acético segundo Collier e colaboradores (1968).

Para o teste de contorções abdominais foi realizado um planejamento estatístico e os grupos continham oito animais. FAc foi administrada nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/kg peso, por via oral uma hora antes da aplicação do agente indutor.

Passado o tempo de latência (1 hora), 10 ml/Kg peso de ácido acético 0,6% em salina estéril foram administrados intraperitonealmente em cada camundongo e o número de contorções abdominais foi contabilizado entre o 10° e o 30° minuto. Os grupos controle negativo e positivo receberam 10 ml/Kg peso de salina e Ácido acetilsalicílico 200 mg/Kg peso, respectivamente por via oral.

Ao final do procedimento experimental, foram administrados 2,5 mg/kg de morfina a cada 4 horas durante 24 horas por via subcutânea para inibir o processo doloroso e os animais voltaram a consumir ração e água normalmente.

4.3.1.2.2 Teste da Formalina

Após sete dias do teste de contorções abdominais, os mesmos animais foram utilizados no Teste de Formalina, uma vez que se tratavam dos mesmos extratos a serem estudados e a administração ocorreu em dose única. O Teste da Formalina foi realizado conforme Hunskaar e Hole (1987).

Assim, para esse teste, foram injetados 20 µL de formalina 2,5%, solubilizada em salina estéril, no espaço subplantar da pata direita dos camundongos e a duração do tempo de reação foi determinada de 0 a 5 minutos (1ª fase – Dor Neurogênica) e 15 a 30 minutos (2ª fase – Dor inflamatória) contados após a

aplicação da formalina. FAc foi testada nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/kg peso e foram administrada, por via oral, 1 hora antes do início do procedimento. Os grupos controle negativo e positivo receberam 10 mL/kg peso de salina e indometacina 10 mg/Kg peso por via oral e Morfina 1 mg/kg por via subcutânea, respectivamente.

4.3.1.2.3 Teste da Placa Quente

Quatro grupos de oito camundongos foram tratados com FAc ou salina (100, 50 ou 25 mg/kg, v.o.; 0,1 mL/10 g). Os animais foram colocados em placa quente aquecida a 55 ± 1 °C (EDDY & LEIMBACH, 1953). As medidas foram realizadas nos tempos zero, 30, 60 e 90 minutos após administração do extrato, com tempo máximo de permanência sobre a placa quente de 30 segundos. A morfina (5 mg/kg, s.c.), foi usada como controle positivo.

4.3.2.2. Avaliação da Atividade Anti-inflamatória

4.3.2.2.1 Teste de Edema de Pata Induzido por Carragenina

A capacidade de inibir o processo inflamatório de FAc foi avaliada através do Teste de Edema de Pata Induzido por Carragenina. Segundo o planejamento estatístico realizado, os ratos foram separados em grupos de seis animais cada.

O procedimento teve início com a anestesia dos animais que participaram do procedimento, para isto foi aplicado por via intraperitoneal uma solução de cetamina e xilazina nas concentrações de 60 mg/kg peso e 10 mg/kg peso, respectivamente. O edema de pata foi induzido pela injeção de 0,2 mL de carragenina, na concentração de 1% p/v em salina estéril, administrada na região subplantar da pata direita dos ratos Wistar. Entretanto, uma hora antes os animais receberam por via oral, como preconizado por Winter e colaboradores. (1962), a FAc, previamente solubilizada em 0,1% de Tween 80 e salina estéril, nas concentrações de 100, 50 e 25 mg/Kg peso e o anti-inflamatório Indometacina na concentração de 10mg/Kg peso, como controle positivo. A pata esquerda dos animais foi utilizada como controle negativo e nela foi injetada 0,1 mL de salina.

A medida do edema em pletismômetro e o cálculo da diferença entre o volume deslocado pela pata direita e pela pata esquerda foi realizado a partir da primeira hora de teste, finalizando na quarta hora após a injeção de carragenina.

4.3.2.2 Teste de Pleurisia Induzida por Carragenina

A pleurisia foi induzida em ratos Wistar pela injeção intrapleural de 0,4 mL, entre a terceira e a quinta costela do lado direito do mediastino, de uma suspensão de carragenina 1% em solução salina estéril (VINEGAR et al., 1973). Grupos de seis ratos foram tratados com FAc (100, 50 ou 25 mg/kg, v.o.), indometacina (10 mg/kg, v.o.) ou salina (10 mL/kg, v.o.) uma hora antes da aplicação do agente inflamatório. Quatro horas após a indução da inflamação, foi realizado um procedimento de aprofundamento da anestesia com cloridrato de cetamina (120 mg/kg) e cloridrato de xilazina (20 mg/kg) e assim eutanasiados. Uma incisão foi feita entre a terceira e quinta costela em cada lado do mediastino. O exsudato pleural foi coletado, transferido a um tubo cônico de centrífuga e o volume foi determinado. Uma solução com de 20 µL do exsudato acrescido de 40 µL de líquido de Turck foi utilizada para determinar a contagem total de leucócitos em câmara de Neubauer.

4.3.2.3 Análise dos Dados

Os dados obtidos foram demonstrados através da média \pm desvio padrão. A análise estatística foi feita por ANOVA seguida de teste de Student Newman-Keuls, que foi utilizado para medir o grau de significância.

4.3.3 Avaliação farmacológica *in vitro*

Os testes *in vitro* foram realizados no Laboratório de Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora.

4.3.3.1 Preparação dos extratos para cultura

As FHAc, FAc e FRA obtidas a partir do extrato bruto metanólico de rizomas de *Echinodorus grandiflorus* foram diluídas nas concentrações de 0,0001; 0,001;

0,01; 0,1; 1; 10; 100; 1000 µg/mL, sendo a concentração máxima em DMSO 1% (v/v), com diluição seriada para as concentrações subsequentes.

4.3.3.2 Linhagem celular e cultura

Macrófagos J774A.1 (2×10^5 células/mL) foram cultivados em placas de 96 poços em RPMI-1640 suplementado com 2 mM L-glutamina, 100 µg/mL de antibiótico (estreptomicina e penicilina), 5% de soro fetal bovino (SFB), mantido a 37°C em 5% de CO₂. Os macrófagos foram cultivados por 48 horas na presença ou ausência dos extratos nas concentrações de 0,0001; 0,001; 0,01; 0,1; 1; 10; 100; 1000 µg/mL e estimulados ou não com LPS (1µg/mL) e IFN-γ (0,9 ng/mL) em triplicata. Como controle negativo foram utilizados células não estimuladas com LPS e IFN-γ e não tratadas. Como controle positivo foram utilizadas células estimuladas com LPS e IFN-γ e tratadas apenas com DMSO 1%.

4.3.3.3 Determinação da produção de NO

A concentração de NO (indiretamente determinada pela dosagem de nitrito) foi medida pela Reação de Griess (GREEN *et al.*, 1982), no sobrenadante de 48 horas de cultura nos poços estimulados com LPS e IFN-γ. Para realização do teste 100 µL de sobrenadante de cada poço foram transferidos para placas de 96 poços. Posteriormente, foi acrescentado igual volume de reagente de Griess (1% de sulfanilamida, 0,1% de *N*-(1-naftil)-etileno diamina hidrocloreto, 5% H₃PO₄, Sigma, St. Louis, MO, USA). A concentração de NO foi determinada por comparação com uma solução padrão de nitrito de sódio a 200 µM. A absorbância foi medida a 540 nm. A porcentagem de inibição da produção de NO foi calculada pela fórmula $100 - [(\bar{x}_1 - \bar{x}_3) / (\bar{x}_2 - \bar{x}_3) * 100]$, considerando \bar{x}_1 , \bar{x}_2 e \bar{x}_3 a média da concentração de NO (µM) nos poços de células estimuladas e tratadas com os extratos, células estimuladas e não tratadas, e células não estimuladas e não tratadas, respectivamente.

4.3.3.4 Avaliação da citotoxicidade

A viabilidade dos macrófagos J774A.1 foi determinada pelo método colorimétrico do MTT (REILLY *et al.*, 1998). Para o teste, após o tempo de cultura de 48 horas nos poços não estimulados com LPS e IFN- γ , os sobrenadantes foram descartados e, a seguir, 100 μ L de RPMI foram adicionados em todos os poços contendo as células. Em seguida, 10 μ L de uma solução a 5 mg/mL de MTT (corante *Thiazol Blue Tetrazolium Bromido* - Sigma, St. Louis, MO, USA) foram acrescentados a cada poço. A placa foi incubada à 37°C em estufa com 5% de CO₂. Transcorrido o período de 4 horas, a reação foi finalizada com o acréscimo de 100 μ L de álcool isopropílico acidificado com HCl 0,4%. A absorbância foi lida a 570 nm e a citotoxicidade (%) obtida pela fórmula $100 - [(\bar{x}_1 / \bar{x}_2) * 100]$, considerando \bar{x}_1 e \bar{x}_2 a média da OD (570 nm) nos poços de células tratadas com os extratos e células não tratadas, respectivamente.

4.3.3.5 Perfil químico das frações obtidas por partição líquido-líquido testadas *in vitro*

Para a avaliação da eficácia do processo de fracionamento do extrato bruto metanólico, realizado através de processo cromatográfico do tipo partição líquido-líquido (v/v), foi realizada a análise em CLAE-UV do EBMRE e das frações FHAc, FAc e FRA no Laboratório de Bioquímica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora utilizando cromatografo líquido Agilent 1200 séries (Waldbronn, Alemanha).

Para tanto 6 mg do EBMRE e da FRA foram solubilizados em 0,5 mL de água Miliquê, previamente filtrada, e as frações FHAc e FRA foram solubilizadas em metanol grau HPLC marca Tedia Company (Fairfield, EUA) nesta mesma concentração. Uma alíquota de 20 μ L foi aplicada utilizando injetor automático em coluna Zorbax SB - C18 - 25cm X 4,6mm - 5 μ m. Foi utilizado um sistema com gradiente linear que consistiu de uma fase móvel: água (A) e acetonitrila (B), com fluxo de fase a 1 mL/min, partindo no tempo zero com 5% de acetonitrila chegando a 65% em 60 minutos. Foi realizado um monitoramento utilizando o detector UV em

varredura entre 190 a 400 nm, sendo selecionadas as leituras a 220, 270, 335 e 360 nm, das quais posteriormente foram priorizados para comparação química os comprimentos de onda 220 e 335nm.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

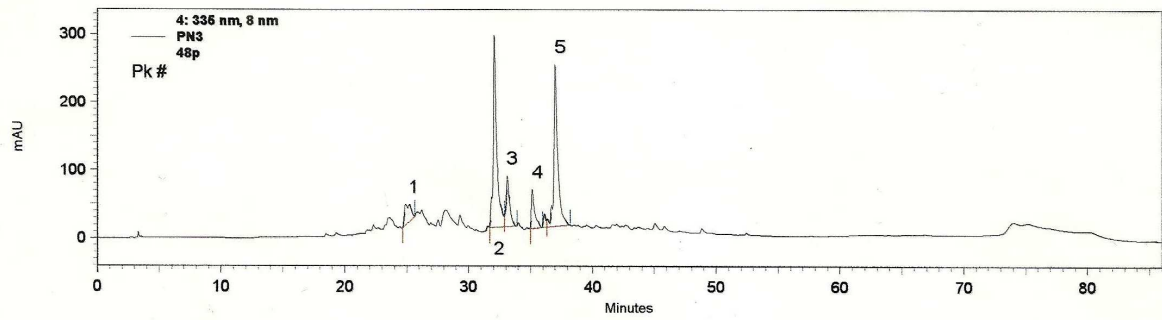
5.1 Perfil químico dos extratos brutos etanólico e metanólico de rizomas de *E. grandiflorus* por CLAE-UV

Com a intenção de conhecer as substâncias presentes nos rizomas de *E. grandiflorus* e assim relacioná-las com a ação descrita por Dutra *et al.* (2006), promoveu-se a análise dos extratos brutos etanólicos e metanólico através de CLAE-UV, observando que nos comprimentos de onda de 220 e 335 nm os sinais presentes nos cromatogramas corresponderam principalmente a derivados do ácido hidroxicinâmico (DAH).

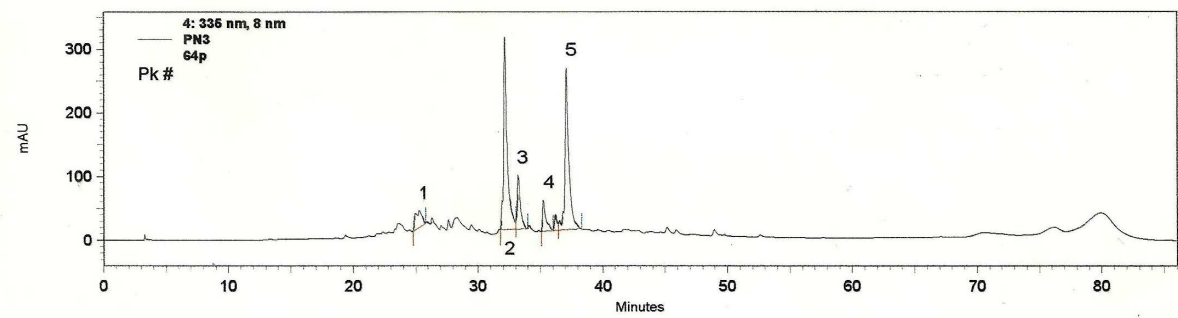
Comparando os cromatogramas de folhas (PIMENTA, 2002) e rizomas sob as mesmas condições ambientais e sistema cromatográfico destacam-se que os extratos etanólicos de rizoma apresentaram maior produção de substâncias detectadas qualitativa e quantitativamente nas estações da primavera e verão, como observado em extratos de folhas. Porém, nos rizomas foram observadas diferenças quanto à sua obtenção, se rizomas secos ou frescos (Figuras 7 e 8). A partir de rizomas frescos é verificado um constituinte detectado a 220 nm, com TR de aproximadamente 13 minutos (13,28 – 13,96 min.) (Figura 8) que não foi detectado a partir de rizomas secos. Em folhas, há a presença de uma substância com TR e UV semelhantes, que ocorre em maior quantidade também em folhas frescas do que secas. A partir de rizomas frescos, bem como nas folhas, na detecção a 335 nm destaca-se um constituinte a aproximadamente 30 min. (29,34 – 30,27 min.) (Figura 9) que pode ser o ácido ferúlico. Já a partir de rizomas secos destacam-se dois constituintes a 335 nm, o primeiro com TR de aproximadamente 32 min. (32,07 – 32,40) e o segundo com TR de aproximadamente 37 min. (37,00 – 37,29).

Na Tabela 1 são listados os DAH encontrados nos extratos etanólicos de folhas e rizomas e no extrato metanólico de rizomas.

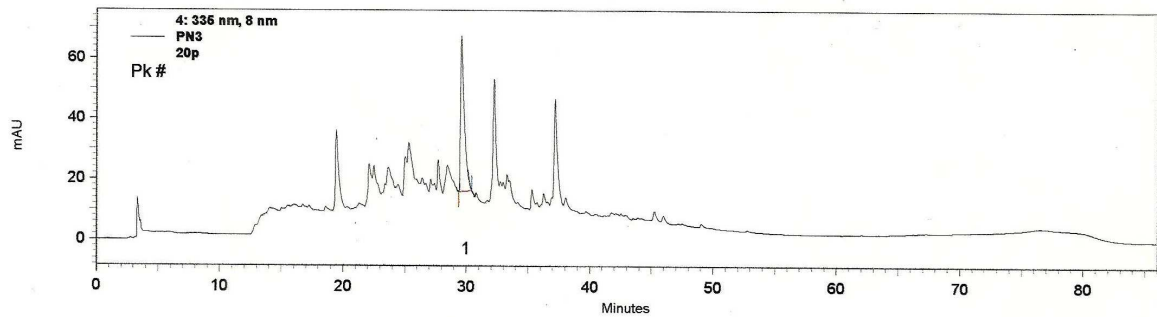
A



B



C



D

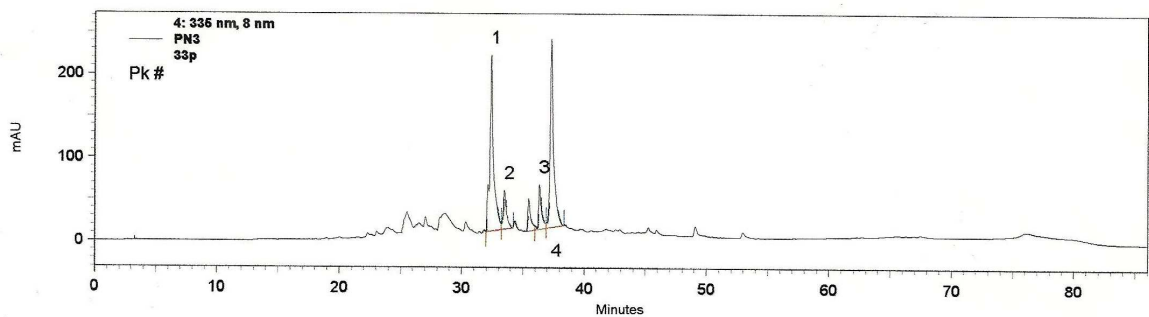
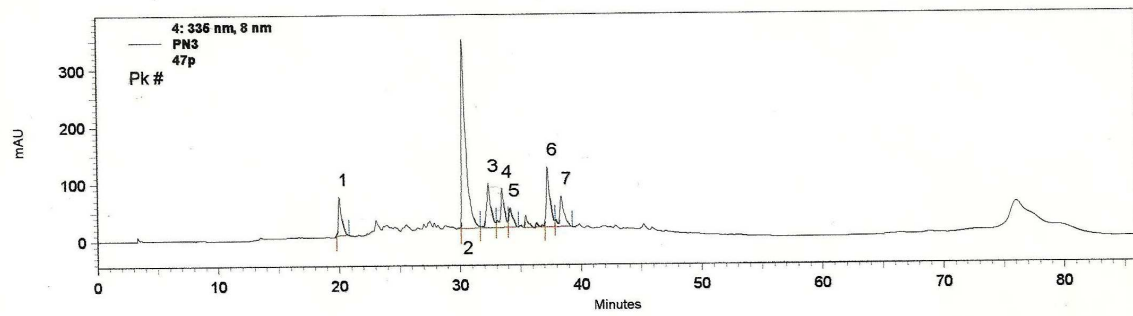
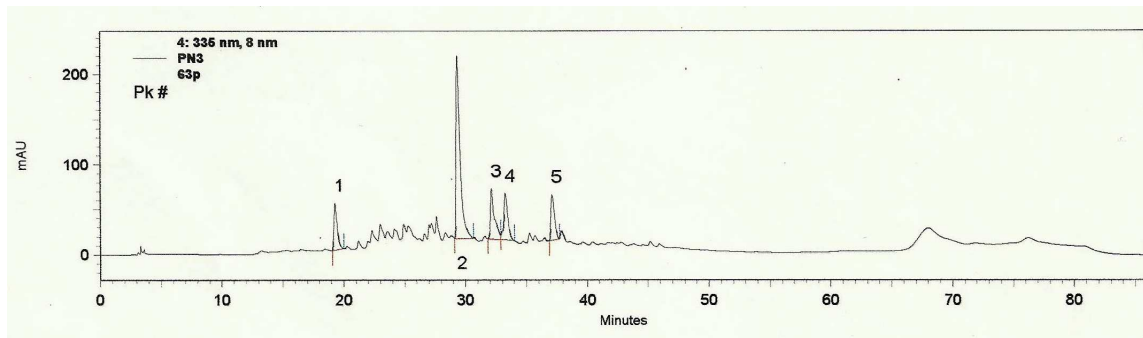


Figura 7: Espectros a 335 nm de extratos etanólicos brutos de rizoma seco de *E. grandiflorus*: A – Primavera; B – Verão; C – Outono e D - Inverno.

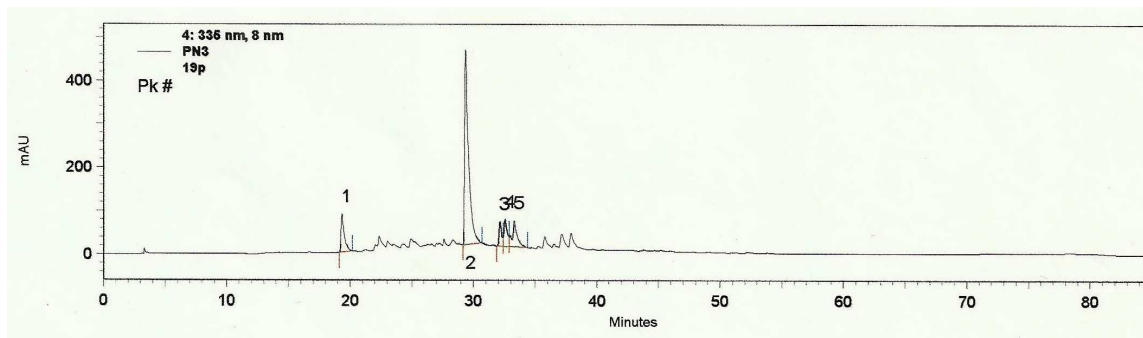
A



B



C



D

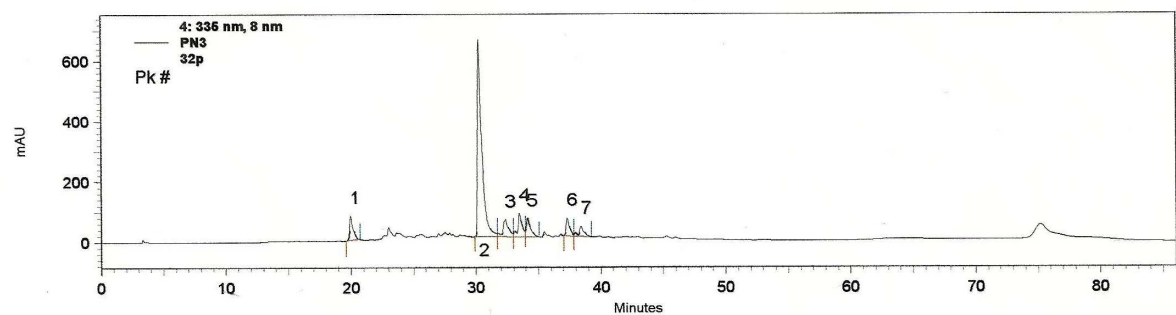


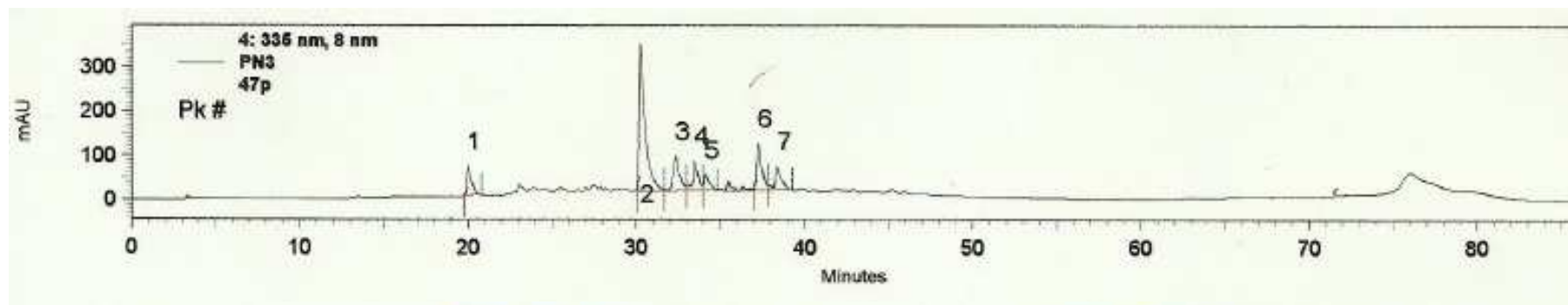
Figura 08: Espectros a 335 nm de extratos brutos etanólicos de rizomas frescos de *E. grandiflorus*: A – Primavera; B – Verão; C – Outono e D - Inverno.

Tabela 1: Derivados do ácido hidroxicinâmico detectadas por UV de acordo com a concentração do sistema de eluição acetonitrila : água em CLAE, dos extratos etanólicos de folhas e rizomas e do extrato metanólico de rizomas de *Echinodorus grandiflorus*.

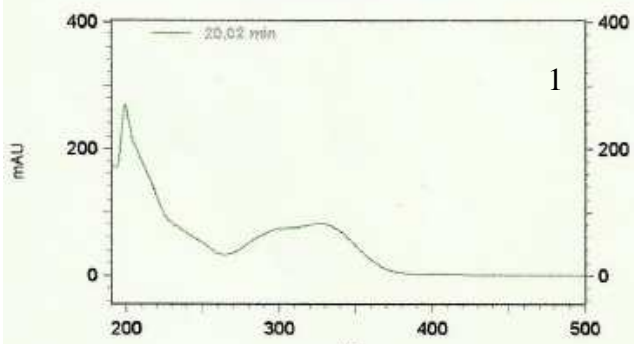
Ext. Etanólico Folha (Pimenta, 2002)	Ext. Etanólico Rizoma	Ext. Metanólico Rizoma
19 ACN : 81 H ₂ O	19 ACN : 81H ₂ O	19 ACN : 81H ₂ O
23 ACN : 77 H ₂ O	-----	-----
-----	25 ACN : 75 H ₂ O	-----
30 ACN : 70 H ₂ O	30 ACN : 70 H ₂ O	30 ACN : 70 H ₂ O
-----	-----	31 ACN : 69 H ₂ O
-----	32 ACN : 68 H ₂ O	32 ACN : 68 H ₂ O
33 ACN : 67 H ₂ O	33 ACN : 67 H ₂ O	33 ACN : 67 H ₂ O
34 ACN : 66 H ₂ O	34 ACN : 66 H ₂ O	34 ACN : 66 H ₂ O
-----	35 ACN : 65 H ₂ O	35 ACN : 65 H ₂ O
37 ACN : 63 H ₂ O	37 ACN : 63 H ₂ O	37 ACN : 63 H ₂ O
-----	38 ACN : 62 H ₂ O	38 ACN : 62 H ₂ O

Em folhas, além da mistura de DAH, também foi verificado a ocorrência de flavonoides e substâncias apolares, com o isolamento de um terpenoide (PIMENTA, 2002). Enquanto que nos rizomas foi verificado a mistura de DAH, que é mais complexa que a observada nos extratos de folha, havendo também a possibilidade da presença de ácido caféico e ácido ferúlico. Contudo, a utilização de espectrometria em UV impede a determinação das substâncias, porém indica classes químicas, dentre as quais estão os derivados do ácido hidroxicinâmico (DAH) e os flavonoides. Portanto, a Tabela 1 não determina a igualdade dos extratos, porém indica a possível semelhança entre eles (Figuras 9 e 10).

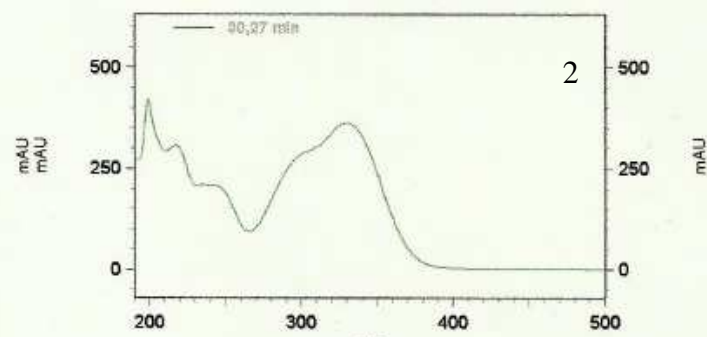
Com base na presente comparação, o uso de folhas de *E. grandiflorus*, recurso mais renovável, não deve substituir o uso de rizomas, visto que os extratos são quimicamente diferentes.



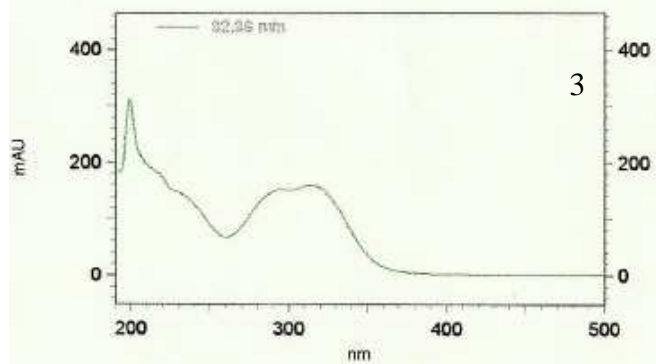
Spectrum at time 20,02 min.



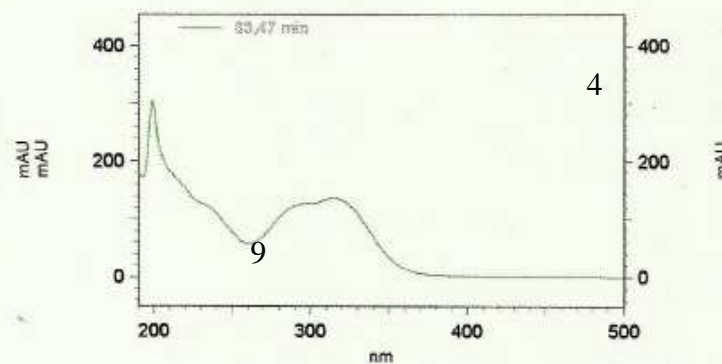
Spectrum at time 30,27 min.



Spectrum at time 32,36 min.



Spectrum at time 33,47 min.



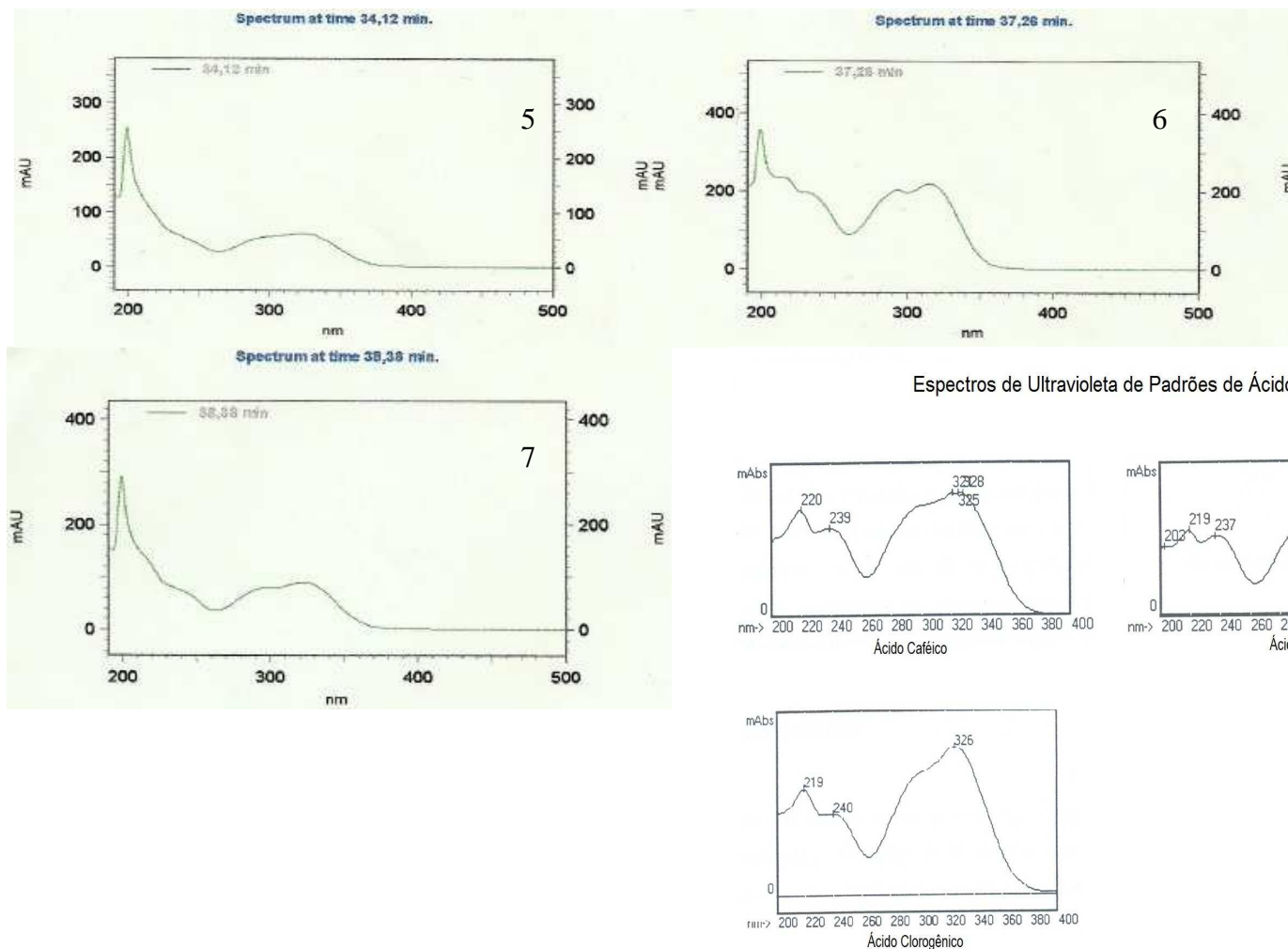


Imagem adaptada de Canela (1999)

Figura 09: Espectros de ultravioleta referente às substâncias detectadas a 335nm a partir do extrato bruto etanólico de rizomas frescos de *E. grandiflorus* – Primavera e padrões obtidos por Canela (1999).

O componente majoritário observado na Figura 11 é o mesmo em todos os comprimentos de onda estudados, uma vez que possui o mesmo tempo de retenção (TR: 24,65), que corresponde à concentração de eluição de 30 ACN : 70 H₂O. Conforme a Tabela 1, corresponde ao ácido ferúlico (Figura 12), tendo sido isolado por Pimenta (2002) no extrato bruto metanólico de folhas e localizado nos extratos brutos etanólicos, metanólicos e aquosos.

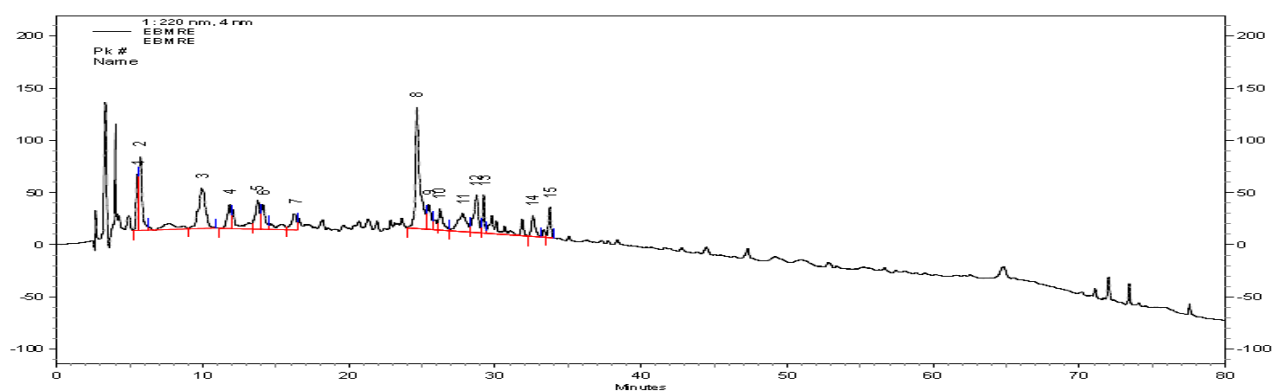
Para tornar possível a comparação entre o perfil químico dos extratos etanólicos e o extrato metanólico estudado (Figura 11), foram utilizados sistemas cromatográficos semelhantes e detecção em UV a 220, 270, 335 e 360 nm. Ainda de acordo com essa mesma Figura, pode-se comprovar que os comprimentos de onda de 220 e 335 nm detectaram um maior número de constituintes.

O perfil cromatográfico apresentado nas Figuras 09 e 10 realça a extração de substâncias mais polares, concentrando os constituintes entre 0 e 40 minutos o que justifica o fracionamento do EBMRE proposto: FHAc que concentra as substâncias menos polares, FAc que concentra as frações medianamente polares, correspondendo ao intervalo de TR entre aproximadamente 20 a 40 minutos e a FRA que concentra substâncias mais polares.

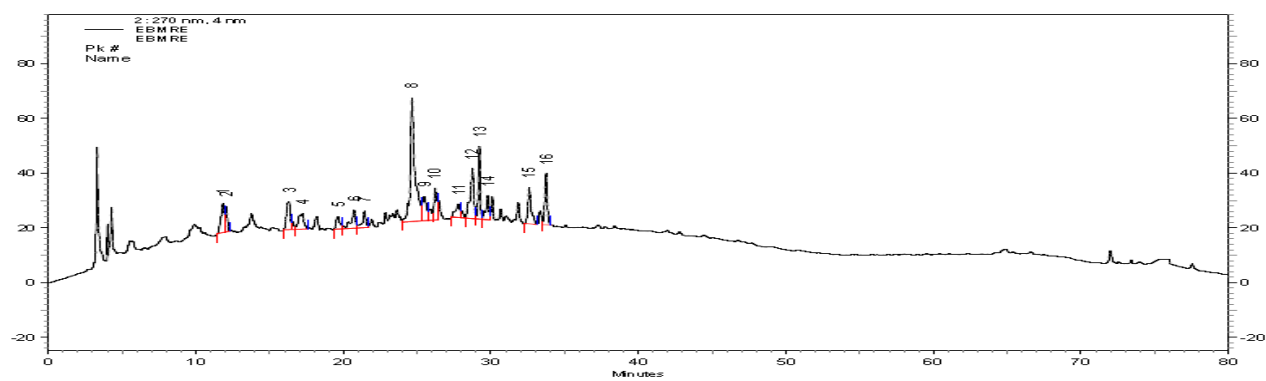
Foram coletados 1380g de rizomas frescos de *E. grandiflorus*, sendo que 100g foram levados a estufa até peso constante, o que determinou que os rizomas possuíam 60% de umidade. O cálculo de rendimento foi obtido com base no peso seco de 512g. Após redução, foram obtidos 23,63g de extrato metanólico bruto, determinando um rendimento de aproximadamente 4,6%.

As frações obtidas a partir do fracionamento por partição líquido-líquido (v/v) de 15 gramas do extrato bruto metanólico tem seu rendimento mostrado na Figura 13.

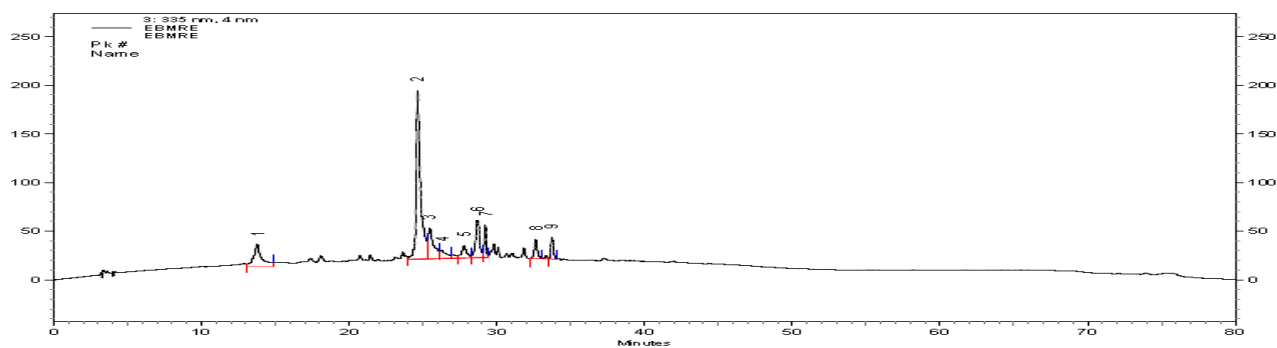
A



B



C



D

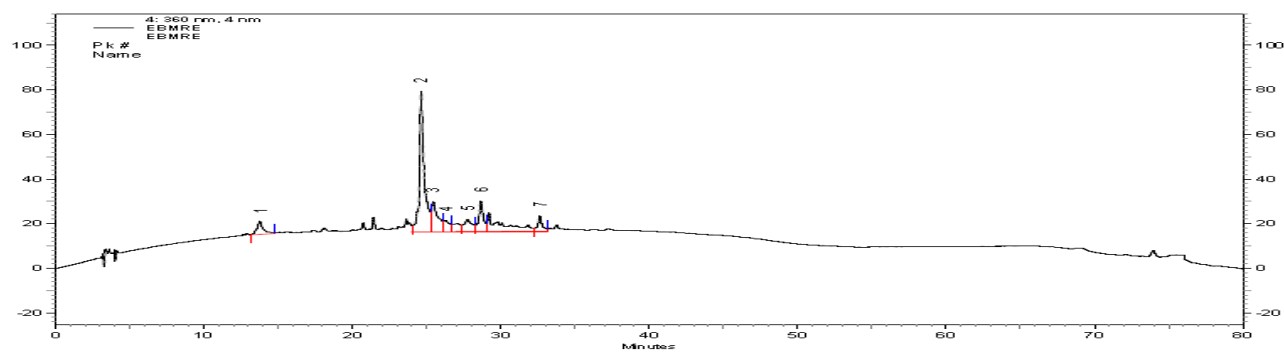
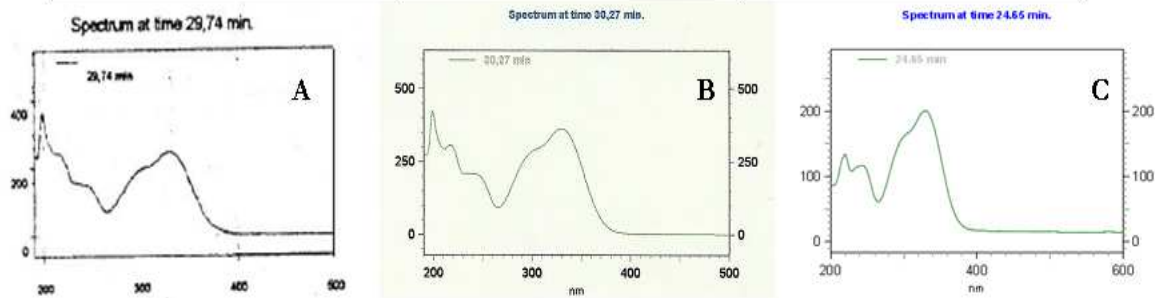
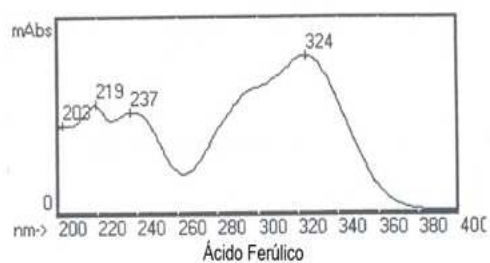


Figura 10: Perfil cromatográfico do extrato bruto metanólico de rizomas de *Echinodorus grandiflorus* obtido por CLAE-UV e detectado a: A - 220, B - 270, C - 335 e D - 360 nm.

Ext. Etanólico Folha	Ext. Etanólico Rizoma	Ext. Metanólico Rizoma
19 ACN : 81 H ₂ O	19 ACN : 81H ₂ O	19 ACN : 81H ₂ O
23 ACN : 77 H ₂ O	-----	-----
-----	25 ACN : 75 H ₂ O	-----
30 ACN : 70 H ₂ O A	30 ACN : 70 H ₂ O B	30 ACN : 70 H ₂ O C
-----	-----	31 ACN : 69 H ₂ O



Pimenta (2002)



Canela (1999)

Figura 11: Espectros de ultravioleta da substância com concentração no sistema de 30% Acetonitrila : 70% Água, detectado a partir dos extratos etanólico de folha (A), etanólico (B) e metanólico (C) de rizomas de *Echinodorus grandiflorus* e espectro de ultravioleta do padrão de ácido ferúlico.

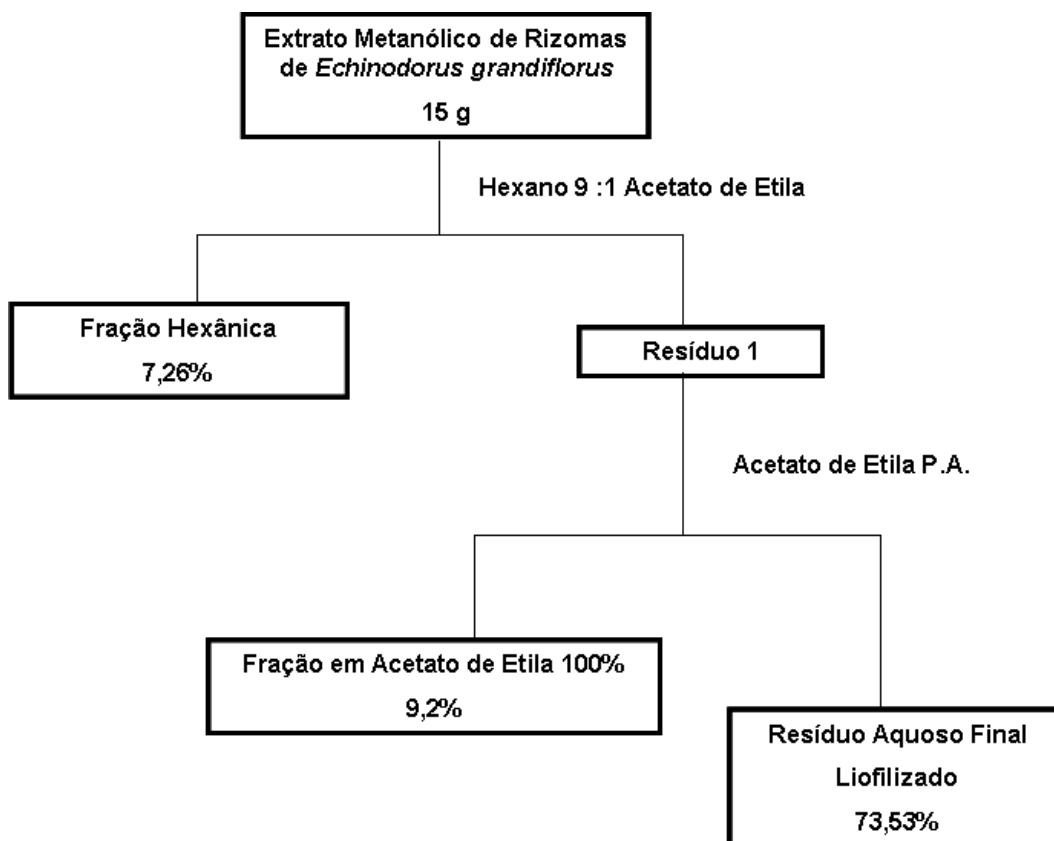


Figura 12: Rendimento das frações obtidas a partir da partição líquido-líquido do extrato bruto metanólico de rizomas de *E. grandiflorus*.

Os resultados de Dutra *et al.* (2006) justificam o biomonitoramento visando a obtenção de mistura semi-purificada e/ou substância(s) como marcador(es) químico(s). A mistura de DAH, presumivelmente presente na FAc, pode ser considerada promissora, uma vez que já foram descritas atividades farmacológicas para diversas substâncias dessa classe química.

Cotelle (2005), classificou o ácido caféico como um potente inibidor da enzima lipoxigenase (5-LO), uma das responsáveis pela biossíntese dos leucotrienos, que são potentes mediadores químicos da inflamação. Assim, controlar sua biossíntese seria uma opção de tratamento de muitas doenças inflamatórias. Khan *et al.*, (2007), por sua vez, verificaram que o éster fenetil do ácido caféico é capaz de inibir a inflamação e o estresse oxidativo causadores das lesões verificadas no acidente vascular cerebral. Nardini *et al.*, (2000) citam o ácido caféico como uma substância capaz de influenciar os processos

celulares e portanto, pode ser considerado um antioxidante, anti-inflamatório, anti-mutagênico e anti-tumoral. A ação anti-inflamatória estaria diretamente ligada a inibição da migração celular, o que é confirmado por Molnar *et al.*, (2005) ao concluir que esta substância é capaz de inibir o fator inibidor de macrófagos.

Chao e Lin (2011) determinaram a presença de ácido ferúlico como constituinte de *Angelica sinensis* (Apiaceae) e lhe atribuíram as atividades anti-inflamatória e imunomodulatória. Ma *et al.* (2010) concluíram que este mesmo ácido é capaz de inibir a expressão de moléculas de adesão, o que propiciaria a substância agir nas mais diversas doenças inflamatórias incluindo aquelas induzidas por radiação. Huang *et al.* (2011) demonstraram ainda que o ácido ferúlico é capaz de suprimir significativamente a produção de óxido nítrico, prostaglandina E2 e interleucina 1 β , além de diminuir a óxido nítrico sintase tipo 2 e a ciclooxygenase-2 nas células da micróglia, fato importante para estados de inflamação do tecido nervoso.

O fenetil éster do ácido caféico mostrou-se um potente anti-inflamatório visto que foi capaz de modular a ação do fator nuclear Kappa-B, um importante mediador inflamatório responsável por estimular a produção de citocinas, proteases, moléculas de adesão e outros mediadores inflamatórios. Em testes *in vitro* o fenetil ester do ácido caféico diminuiu a viabilidade de células de defesa de maneira dependente da dose e diminuiu a LD 50 da dexametasona, quando avaliada *in vivo* em modelo de inflamação subcutânea induzida por carragenina. A substância foi capaz de induzir apoptose em leucócitos, reduzir o número de leucócitos no exsudato e de neutrófilos e monócitos no local da inflamação (ORBAN *et al.*, 2000).

Sousa (2008), ao analisar o efeito antioxidante e anti-inflamatório de três derivados sintéticos do ácido caféico, um ácido hidroxicinâmico, o ácido *trans*-3-(3,4,5-triidroxifenil)-2-propenóico (THPPE) e os respectivos ésteres, *trans*-etil-(3,4,5-triidroxifenil)-2-propenoato (ETHPPE) e dietil-2-(3,4,5-triidroxifenilmetileno) malonato (E₂THPPE) verificou que as substâncias em estudo possuíam a capacidade de inibir tanto COX-1 quanto COX-2, entretanto requeriam concentrações mais elevadas que a Indometacina, utilizada como referência. Além disso, os resultados demonstraram que os mesmos são

capazes de inibir a enzima xantina oxidase, confirmando que os ácidos fenólicos possuem propriedades antioxidantes.

Shin *et al.* (2004), por sua vez, avaliaram os efeitos anti-inflamatórios e antinociceptivos do ácido caféico, do metil éster do ácido caféico e do ácido diacetilcaféico utilizando os modelos de edema de pata induzido por carragenina, testes de contorções abdominais e teste da placa quente respectivamente e demonstraram que o metil éster do ácido caféico, dentre as substâncias testadas, foi o que desempenhou melhor ação anti-inflamatória. Os autores investigaram o mecanismo de ação da substância e concluíram que a mesma é capaz de inibir de forma mais eficaz a produção de NO e prostaglandinas E2 e a liberação de TNF- α . Além disso, nas amostras testadas com metil éster do ácido caféico foram observados redução no RNAm da enzima óxido nítrico sintase indutível e de COX-2, ambos de forma dependente da dose e a mesma foi capaz de regular negativamente o mediador inflamatório NF-KB. Assim, os resultados sugerem que a ação anti-inflamatória do metil éster do ácido caféico seja resultante da inibição de iNOS, COX-2 e de TNF- α através da regulação de NF-KB.

Hosoda *et al.* (2002) sintetizaram derivados do ácido ferúlico e verificaram que estes eram capazes de inibir COX-2. Os testes foram realizados utilizando um modelo de células de câncer de cólon humano, uma vez que uma possível super expressão de COX-2 com elevada produção de prostaglandinas pode estar envolvida neste tipo de câncer (ELDER & PARASKEVA). As substâncias estudadas podem até se tornar possíveis agentes quimiopreventivos (HOSODA *et al.*, 2002)

A partir de rizomas de *Eremostachys glabra* (Lamiaceae), foram isolados dois derivados do ácido ferúlico, o hexacosil-(E)-ferúlico e o leucosceptosídeo. Verificou-se que os mesmos possuíam atividade antioxidante, o que poderia contribuir para a atividade anti-inflamatória descrita tradicionalmente para *E. glabra*, visto que as espécies reativas de oxigênio tem importante contribuição no mecanismo inflamatório. Além disso, outras substâncias estruturalmente semelhantes às identificadas já demonstraram propriedades anti-inflamatórias (Delazar *et al.* 2004).

5.2. Perfil químico da Fração em Acetato de Etila 100% obtida do extrato bruto metanólico de rizomas de *E. grandiflorus*.

A fração escolhida para análise química e posterior investigação farmacológica foi FAc, visto que a polaridade do acetato de etila seria capaz de carrear as substâncias de interesse, ou seja, a mistura de DAH.

As análises por CLAE-UV apresentada nas Figuras 14 e 15 confirmam a presença majoritária de DAH.

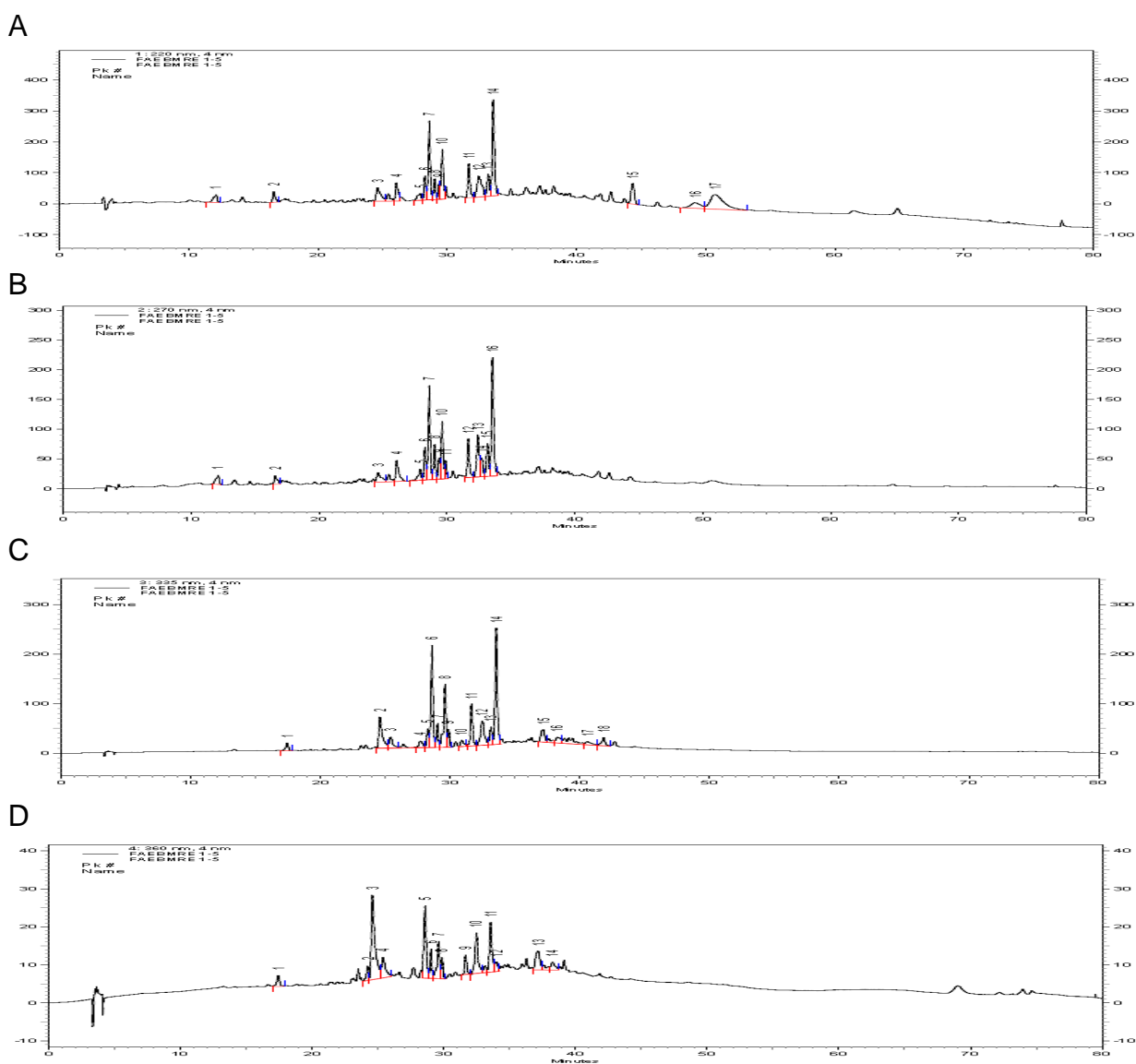


Figura 13: Perfil cromatográfico por CLAE - UV da fração em acetato de etila 100%, obtido do extrato bruto metanólico de rizomas de *Echinodorus grandiflorus* detectado a: A - 220, B - 270, C - 335 e D - 360 nm.

As substâncias majoritárias também mudaram entre o EBMRE e FAc, sendo que nesta última podem ser detectados duas substâncias majoritárias (TR: 28,597 e TR: 33,557 min., UV relativos às substâncias 6 e 14 na figura 14 respectivamente) em todos os comprimentos de onda. No perfil cromatográfico do extrato bruto metanólico, a substância majoritária possui tempo de retenção de 24,651 min., entretanto, pode-se inferir que este também pode ser visualizado no cromatograma da fração em acetato de etila 100%, com o tempo de 24,60 min. e espectro em UV semelhante ao detectado no extrato bruto (Figura 15 – substância 2).

Como era esperado, ao realizar-se a partição do extrato bruto houve a concentração de substâncias com polaridade intermediária em FAc. Esse fato pode ser observado quando se comparam o cromatograma do extrato bruto metanólico de rizoma (Figura 10), com uma gama de substâncias com tempo de retenção entre 20 e 40 min. e o cromatograma de FAc (Figura 13 e Tabela 2).

Tabela 2: Derivados do ácido hidroxicinâmico detectadas por UV de acordo com a concentração do sistema de eluição ACN: H₂O dos extratos etanólicos de folhas e rizomas, do extrato metanólico de rizomas e da fração em acetato de etila 100% obtida do extrato bruto metanólico de rizomas de *Echinodorus grandiflorus*.

Ext. Etanólico Folha	Ext. Etanólico Rizoma	Ext. Metanólico Rizoma	Fração Acetato de Etila 100%
19 ACN : 81 H ₂ O	19 ACN : 81H ₂ O	19 ACN : 81H ₂ O	-----
23 ACN : 77 H ₂ O	-----	-----	-----
-----	25 ACN : 75 H ₂ O	-----	-----
30 ACN : 70 H ₂ O	30 ACN : 70 H ₂ O	30 ACN : 70 H ₂ O	30 ACN : 70 H ₂ O
-----	-----	31 ACN : 69 H ₂ O	-----
-----	32 ACN : 68 H ₂ O	32 ACN : 68 H ₂ O	-----
33 ACN : 67 H ₂ O	33 ACN : 67 H ₂ O	33 ACN : 67 H ₂ O	33 ACN : 67 H ₂ O
-----	-----	-----	33 ACN : 67 H ₂ O
-----	-----	-----	33 ACN : 67 H ₂ O
34 ACN : 66 H ₂ O	34 ACN : 66 H ₂ O	34 ACN : 66 H ₂ O	34 ACN : 66 H ₂ O
-----	-----	-----	34 ACN : 66 H ₂ O
-----	-----	-----	34 ACN : 66 H ₂ O
-----	35 ACN : 65 H ₂ O	35 ACN : 65 H ₂ O	-----
-----	-----	-----	36 ACN : 64 H ₂ O
-----	-----	-----	36 ACN : 64 H ₂ O
37 ACN : 63 H ₂ O	37 ACN : 63 H ₂ O	37 ACN : 63 H ₂ O	37 ACN : 63 H ₂ O
-----	-----	-----	37 ACN : 63 H ₂ O
-----	38 ACN : 62 H ₂ O	38 ACN : 62 H ₂ O	38 ACN : 62 H ₂ O

A Tabela 2 também mostra a capacidade de concentração de DAH em FAc, que apresenta maior quantidade (12) de substâncias dessa classe química. As duas substâncias majoritárias apresentadas na Figura 14 correspondem na Tabela 2 às proporções 33 ACN : 67 H₂O e 38 ACN : 62 H₂O, ou seja, nesta mistura não foi detectado o ácido caféico (25 ACN : 75 H₂O) e só se destaca o possível ácido ferúlico (30 ACN : 70 H₂O) na leitura em 360 nm.

No perfil cromatográfico referente a extratos brutos etanólicos (Figura 7 e 8), foram apresentadas substâncias DAH como majoritárias. A partir de rizomas frescos, uma substância foi eluída na proporção 30 ACN : 70 H₂O e, a partir de rizoma seco, uma substância foi eluída na proporção 32 ACN : 68 H₂O e outra na proporção 37 ACN : 63 H₂O. Avaliando-se a Figura 13, há a possibilidade destas substâncias majoritárias estarem dentre as majoritárias de FAc, o que seria esperado por este solvente carrear substâncias medianamente polares, independente da condição do rizoma estar seco ou fresco. Entretanto, para confirmar essa possibilidade, o isolamento das substâncias é necessário, e sua co-injeção no extrato bruto e em FAc, visto que as substâncias majoritárias observadas na Figura 13 eluem-se nas proporções de 33 ACN : 67 H₂O e 38 ACN : 62 H₂O e o sistema de eluição conta ainda com 0,5% de TFA que, segundo Pineli (2009), acidifica o meio, impedindo a ionização dos grupos fenólico e carboxílicos, alterando o tempo de retenção e melhorando a resolução do cromatograma.

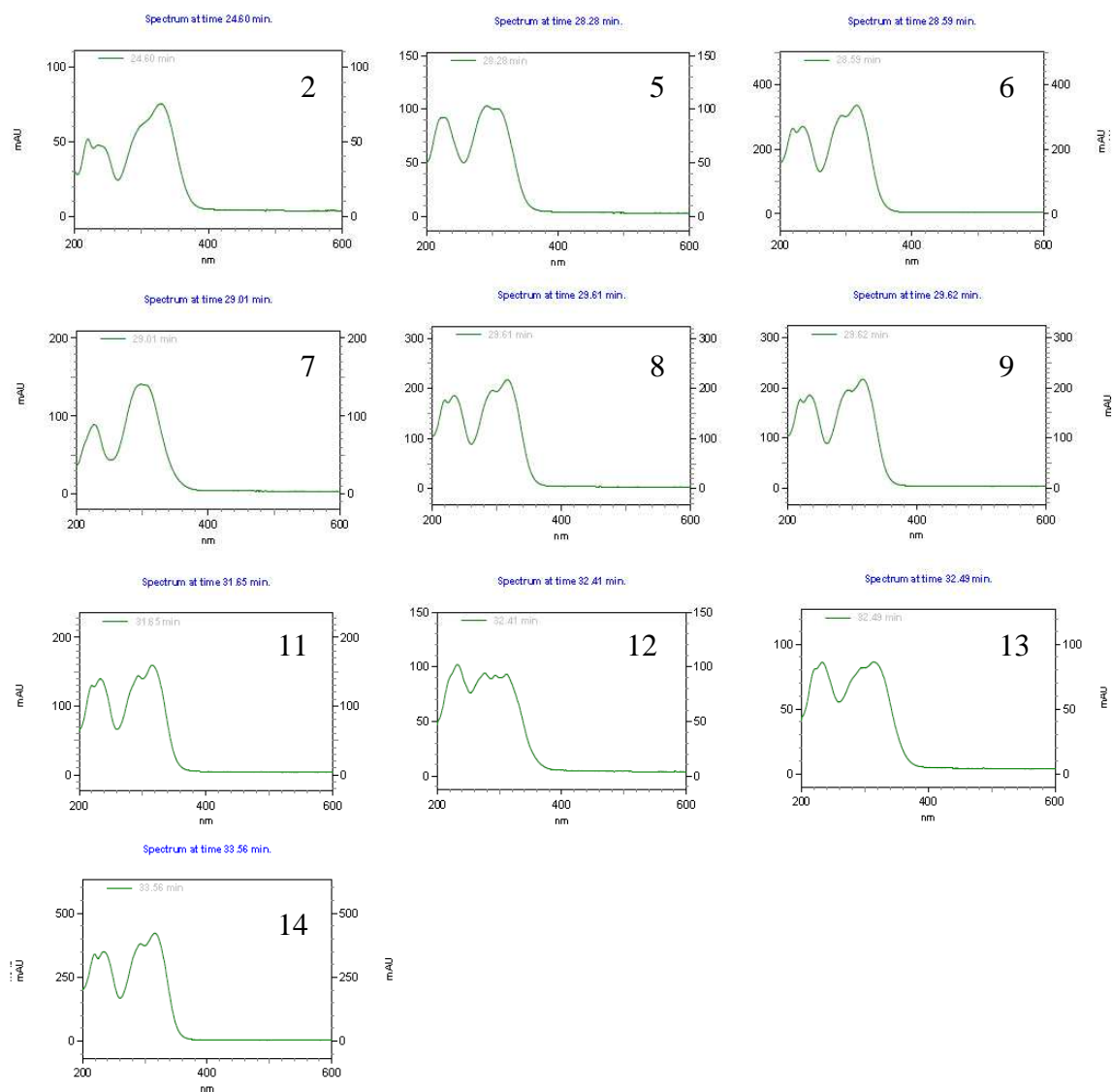


Figura 14: Espectros de ultravioleta referente às substâncias majoritárias detectadas no perfil cromatográfico da fração em acetato de etila 100% do extrato bruto metanólico de *Echinodorus grandiflorus* a 335 nm.

5.3 Avaliação farmacológica da fração em acetato de etila 100% obtida do extrato bruto metanólico de rizomas de *E. grandiflorus*

Com base na análise química dos extratos brutos etanólicos e do extrato bruto metanólico de rizomas de *E. grandiflorus* desenvolveu-se o biomonitoramento a partir da FAc, obtida a partir do extrato bruto metanólico de rizomas da planta, que apresentou os ácidos fenólicos derivados do ácido hidroxicinâmico.

5.3.1. Avaliação farmacológica *in vivo*

5.3.1.2 Atividade Antinociceptiva

5.3.1.2.1 Teste de Contorções Abdominais

Após uma hora do tratamento com a FAc (25, 50 e 100 mg/Kg peso) o ácido acético foi aplicado e número de contorções abdominais foi contabilizado entre o 10° e o 30° minuto. FAc reduziu o número de contorções abdominais nas três doses testadas, sendo que na dose de 25mg houve a redução de 18,75% ($p < 0,01$), o mesmo ocorreu com a dose de 50 mg e na dose de 100 mg a redução foi de 17,18% ($p < 0,01$). O ácido acetilsalicílico (AAS), utilizado como controle positivo foi mais efetivo, reduzindo 65,23% com $p < 0,001$ (Tabela 3)

Tabela 3: Efeito analgésico da fração em acetato de etila 100% (FAc) de *Echinodorus grandiflorus* sobre o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético.

Grupos	Dose (mg/kg)	Nº de contorções	Inibição (%)
Controle	Salina	64,00±2,56	-
	25	52,00±2,93**	18,75
FAc	50	52,00±2,47*	18,75
	100	53,00±3,05**	17,18
AAS	200	22,25±2,18***	65,23

N = 8. *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001 após análise de variância seguido do teste Student-Newman-Keuls.

No teste de contorções abdominais, FAc nas doses testadas demonstrou possuir ação analgésica, uma vez que houve diminuição

significativa do número de contorções quando comparadas ao controle negativo (Tabela 3). Segundo Lapa *et al.* (2003), a utilização do ácido acético como agente indutor torna o teste de contorções apenas responsável por uma triagem de substâncias com ação analgésica. Isso se deve à ação inespecífica do agente indutor uma vez que ativa vários eventos de neurotransmissão e neuromodulação que determinarão a nocicepção. Dessa forma, o modelo será sensível tanto à substâncias de ação central quanto às de ação periférica dotadas dos mais variados mecanismos de ação.

5.3.1.2.2 Teste da Formalina

Durante a primeira fase do teste de formalina, que é caracterizada pela presença de dor neurogênica, tanto FAc em todas as concentrações quanto indometacina não apresentaram capacidade de diminuir o tempo de lambida de pata. Somente a morfina foi capaz de reduzir de maneira significativa, com $p < 0,001$, atingindo 74,54% de inibição (Tabela 4).

Tabela 4: Teste de tempo de lambida da pata induzida por formalina 2,5%, primeira fase, após administração de 25, 50 e 100 mg/kg, por via oral, da fração em acetato de etila 100% (FAc) de *Echinodorus grandiflorus*

Grupos	Dose (mg/kg)	Tempo (s)	Inibição (%)
Controle	Salina	75,62±2,50	-
	25	73,75±2,82	2,47
FAc	50	73,12±2,60	3,31
	100	72,62±2,21	3,97
Morfina	5	19,25±2,08***	74,54
Indometacina	10	72,12±2,18	4,63

.(n = 8). ***Significativo após análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Student Newman-Keuls ($p < 0,001$).

Na segunda fase do teste, onde a nocicepção se relaciona à dor do tipo inflamatória, FAc nas doses de 50 mg/kg peso reduziu o tempo de lambida em 12,02% ($p < 0,05$) e a dose de 100 mg/Kg reduziu em 26,48% com $p < 0,001$. A indometacina reduziu o tempo de lambida em 67,42% e a morfina em 71,68% ambos com $p < 0,001$.

Tabela 5: Teste de tempo de lambida da pata induzida por formalina 2,5%, segunda fase, após administração de 25, 50 e 100 mg/kg, por via oral, da fração em acetato de etila 100% (FAc) de *Echinodorus grandiflorus*.

Grupos	Dose (mg/kg)	Tempo (s)	Inibição (%)
Controle	Salina	82,12±2,15	-
	25	79,25±3,56	3,49
FAc	50	72,25±2,37*	12,02
	100	60,37±2,24***	26,48
Morfina	5	23,25±1,67***	71,68
Indometacina	10	26,75±2,46***	67,42

(n = 8). Após análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Student Newman-Keuls *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001.

O teste de Formalina é composto por duas fases distintas, a primeira onde se verifica nocicepção, devido a mecanismos relacionados ao sistema nervoso central e a segunda fase caracterizada pela dor relativa ao desenvolvimento de um processo inflamatório local (Shibata *et al.*, 1989). Na primeira fase do teste, FAc nas doses testadas não apresentou diminuição no tempo de lambida de pata (Tabela 4), na segunda fase do teste, a dose de 25 mg/Kg peso não diminuiu o tempo de lambida. Entretanto, as doses de 50 mg/Kg peso ($p < 0,05$) e 100 mg/Kg peso ($p < 0,001$) demonstraram diminuição do tempo de lambida dependente da dose (Tabela 5). Esse resultado sugere que FAc não possui ação central, já que foi incapaz, nas doses testadas, de diminuir o tempo de lambida de pata na fase do teste onde a dor é neurogênica. Contudo, a redução do quesito testado na segunda fase demonstra a ação anti-inflamatória da fração, já que esta fase é caracterizada pela dor gerada a partir da produção de mediadores inflamatórios.

5.3.1.2.3 Teste da Placa Quente

Para confirmar a ausência de ação central visualizada durante a primeira fase do Teste de Formalina foi realizado o Teste da Placa Quente, onde segundo Lapa *et al.* (2003) a resposta a placa quente decorre de uma resposta operante de integração central. O teste foi realizado avaliando-se os tempos 0, 30, 60 e 90 min após a administração da FAc nas doses de 100, 50 e 25 mg/Kg peso (Tabela 6) e não foi observado aumento no tempo de latência para o desenvolvimento de uma resposta nociceptiva ao estímulo térmico. Esse resultado reforça os dados observados na primeira fase do teste de Formalina

indicando que a FAc, nas doses testadas, não apresenta ação analgésica central.

A morfina, utilizada como controle positivo, não mostrou ação no tempo zero porém, em 30, 60 e 90 minutos causou um aumento significativo ($p < 0,001$) no tempo de resposta ao estímulo térmico.

Tabela 6: Tempo de latência ao estímulo térmico nociceptivo após a administração oral da fração em acetato de etila 100% (FAc) de *Echinodorus grandiflorus*.

Grupo	Dose (mg/Kg)	Tempo após a administração da droga			
		0 min	30 min	60 min	90 min
Controle	Salina	5,90±0,50	6,12±0,42	6,21±0,31	6,23±0,37
	25	6,06±0,48	5,92±0,34	6,26±0,38	6,25±0,34
FAc	50	6,28±0,51	6,14±0,31	6,30±0,28	6,27±0,34
	100	5,98±0,44	6,13±0,39	6,32±0,34	6,36±0,30
Morfina	5	6,17±0,42	8,91±0,29***	11,73±0,69***	14,72±0,53***

Os valores apresentados para cada tratamento e em cada período estão expressos em segundos \pm seu respectivo erro padrão. *** $p < 0,001$

5.3.2. Avaliação da Atividade Anti-inflamatória

A investigação da ação anti-inflamatória observada através dos dados relativos a segunda fase do teste de Formalina foi avaliada através dos testes de Edema de Pata e Pleurisia ambos induzidos por carragenina. Segundo Dutra *et al.* (2006) a carragenina é um agente inflamatório por induzir a produção de prostaglandinas e o desenvolvimento de edema

5.3.2.1 Teste de Edema de Pata Induzido por Carragenina

O Teste de Edema de Pata induzido por carragenina em ratos demonstrou que FAc foi capaz de reduzir o edema de maneira significativa em todas as dosagens testadas durante as quatro horas, com exceção da dosagem de 25 mg/Kg peso na primeira hora de teste.

Tabela 7: Efeitos da fração em acetato de etila 100% (FAC) de *Echinodorus grandiflorus* sobre o edema de pata induzido por carragenina.

Grupos	Dose (mg/kg)	Volume deslocado (mL)			
		1 h	2 h	3 h	4 h
Controle	Salina	0,49±0,04	0,37±0,02	0,39±0,03	0,30±0,03
	25	0,39±0,06	0,24±0,03**	0,28±0,03*	0,27±0,04*
FAC	50	0,31±0,03*	0,25±0,01**	0,23±0,02**	0,23±0,01*
	100	0,28±0,02**	0,20±0,02***	0,22±0,04**	0,18±0,01*
Indometacina	10	0,30±0,03*	0,21±0,04***	0,21±0,03**	0,21±0,03*

(n = 6). Indometacina (10 mg/kg) foi o fármaco de referência. Significativo após análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Student Newman-Keuls (* p < 0,05; ** p<0,01 e *** p< 0,001).

Neste teste foram avaliados o volume deslocado pela pata edemaciada em comparação com a pata sem edema nas 1^a, 2^a, 3^a e 4^a horas após a administração de FAC, nas mesmas doses testadas anteriormente (Tabela 7). Apenas a dose de 25 mg/Kg peso não foi capaz de reduzir o edema na primeira hora de avaliação, nos demais tempos de teste, a FAC provocou inibição de maneira significativa do processo de edemaciamento dependente da dose, como também apresentou ação comparável com a Indometacina, controle positivo, na dose de 100 mg/Kg peso na 2^a hora de teste, nas doses de 50 e 100 mg/Kg peso na 3^a hora e em todas as doses testadas na 4^a hora analisada.

O fato de FAC diminuir de forma muito significativa o edema no teste de Edema de Pata Induzido por carragenina indica que essa fração, nas doses testadas, possui ação anti-inflamatória promissora. O edema causado pela carragenina é devido ao aumento da permeabilidade celular, evento característico de reações inflamatórias, relacionado nas primeiras horas à liberação de histamina, bradicinina, serotonina, PAF, substância P e prostaglandinas (DI ROSA *et al.*, 1971; POSADAS *et al.*, 2004). A partir da quarta hora ocorre o aumento da expressão de iNOs e COX, com aumento na formação de radicais livres, NO e prostaglandinas (POSADAS *et al.*, 2004) sendo que para alguns autores as prostaglandinas seriam as responsáveis pela manutenção do edema nesse momento (DI ROSA e WILLOGHBY, 1971; TEIXEIRA *et al.*, 1993).

Segundo Lapa *et al.* (2003), se for observado ação no modelo de contorções abdominais, na segunda fase do teste de formalina e no teste de edema de pata induzida por carragenina, pode-se inferir que a droga testada

possui ação sobre a produção de prostaglandinas inibindo, por exemplo, a COX. Isso ocorre porque as prostaglandinas estão envolvidas tanto no processo de dor inflamatória, por causarem hiperalgesia, quanto no processo de formação do edema, visto que as próprias prostaglandinas são um fator de potenciação do edema. É possível, portanto, que a FAc, assim como observado no EBMRE (DUTRA *et al.*, 2006), esteja modulando a biossíntese de prostaglandinas.

5.3.2.2 Teste de Pleurisia Induzida por Carragenina

Considerando que FAc demonstrou possuir ação anti-inflamatória inibindo a formação de edema, o teste de pleurisia induzida por carragenina foi desenvolvido para avaliar se esta mesma fração era capaz de inibir o processo de migração de leucócitos. Esse processo é fundamental no desenvolvimento da inflamação. Nele, os macrófagos estimulados por mediadores inflamatórios, gerados durante a lesão, produzem citocinas como TNF- α e IL-1, que por sua vez induzem às células do endotélio a expressar moléculas de adesão, primeiro as selectinas que são responsáveis por uma adesão frouxa, seguida de integrinas que promovem uma adesão forte com produção de quimiocinas que ativam e estimulam a migração dos neutrófilos, monócitos e linfócitos T para o local da inflamação (CRUVINEL *et al.*, 2010). A utilização do modelo de pleurisia induzida por carragenina permite que seja quantificado o volume do exsudato, assim como o número de leucócitos que migraram para a cavidade peritoneal (LAPA *et al.*, 2003).

FAc na dose de 25 mg/Kg peso reduziu o volume do exsudato ($P < 0,05$) e as doses de 50 e 100 mg/Kg peso reduziram de maneira muito mais significativa ($P < 0,001$) o volume do mesmo, tendo uma ação semelhante a da indometacina. Ao se analisar o número de leucócitos totais, verificou-se que a dose de 25 mg/Kg peso não apresentou ação, mas em contrapartida, as doses de 50 e 100 mg/Kg peso tiveram ação relevante ($P < 0,001$), atividade essa muito semelhante a da indometacina (Tabela 8). Pelos dados, observa-se, que FAc é capaz de atuar sobre a migração leucocitária de forma dependente da dose. Esse resultado confirma a ação anti-inflamatória demonstrada por FAc no teste de edema de pata.

Tabela 8: Efeitos da fração em acetato de etila 100% (FAc) de *Echinodorus grandiflorus* (FAc) sobre o volume e no número de leucócitos totais do exsudato da pleurisia induzida por carragenina.

Grupos	Dose (mg/kg)	Volume do exsudato (mL)	Leucócitos totais (x 10 ³ células/mm ³)
Controle	Salina	0,67±0,06	15,65±0,41
	25	0,50±0,06*	14,87±0,66
FAc	50	0,37±0,04***	12,17±0,40***
	100	0,35±0,04***	11,78±0,72***
Indometacina	10	0,27±0,03***	7,30±0,19***

(n = 6). Indometacina (10 mg/kg) foi o fármaco de referência. Significativo após análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Student Newman-Keuls (* p < 0,05; ** p < 0,01 e *** p < 0,001).

A atividade anti-inflamatória verificada justifica a continuação do biomonitoramento para a determinação de marcador(es) químico(s) de extratos provenientes de *E. grandiflorus*, visto que a FAc apresentou atividade anti-inflamatória mais significativa do que o extrato bruto metanólico testado anteriormente por Dutra *et al.* (2006) (Tabelas 9 e 10). As tabelas demonstram que a dose de 100 mg/Kg peso da FAc possui ação anti-inflamatória apresentando 40% de inibição do edema de pata na última hora de teste, enquanto que o EBMRE, nessa mesma dose, foi capaz de inibir apenas 16,67% quando avaliado na mesma fase do teste. Quanto ao teste de pleurisia a menor dose do EBMRE, 100 mg/Kg peso, não foi capaz de reduzir de maneira significativa tanto o volume do exsudato quanto o número total de leucócitos, entretanto quando avaliada essa mesma dosagem de FAc observa-se que a mesma diminui de maneira significativa (p < 0,001) os dois parâmetros analisados, tendo sua ação semelhante a da indometacina.

Tabela 9: Comparação entre os dados obtidos por Dutra *et al.* (2006) no teste de edema de pata a partir do extrato bruto metanólico de rizomas de *E. grandiflorus* e o resultado obtido nesta pesquisa.

(Dutra <i>et al.</i> , 2006)				Volume deslocado (mL)				
Grupos	Dose (mg/kg)	Volume do Edema (mL)		Dose (mg/kg)	1 h	2 h	3 h	4 h
		Média±EP	Inibição (%)					
Controle	-	0,90±0,04	-	Salina	0,49±0,04	0,37±0,02	0,39±0,03	0,30±0,03
	100	0,75±0,04*	16,67	25	0,39±0,06	0,24±0,03**	0,28±0,03*	0,27±0,04*
Extrato/Fac	200	0,57±0,03*	36,67	50	0,31±0,03*	0,25±0,01**	0,23±0,02**	0,23±0,01*
	400	0,45±0,04*	50,00	100	0,28±0,02**	0,20±0,02***	0,22±0,04**	0,18±0,01*
Indometacina	10	0,40±0,03*	55,56	10	0,30±0,03*	0,21±0,04***	0,21±0,03**	0,21±0,03*

Significativo após análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Student Newman-Keuls (* p < 0,05; **p<0,01 e ***p< 0,001).

Tabela 10: Comparação entre os dados obtidos por Dutra *et al.* (2006) no teste de pleurisia a partir do extrato bruto metanólico de rizomas de *E. grandiflorus* e o resultado obtido nesta pesquisa.

(Dutra <i>et al.</i> , 2006)						
Grupos	Dose (mg/kg)	Volume do exsudato (mL)	Leucócitos totais (x 10 ³ células/mm ³)	Dose (mg/kg)	Volume do exsudato (mL)	Leucócitos totais (x 10 ³ células/mm ³)
Controle	-	1,95±0,04	25,52±0,25	Salina	0,67±0,06	15,65±0,41
	100	1,80±0,07	25,18±0,26	25	0,50±0,06*	14,87±0,66
Extrato/ Fac	200	1,77±0,07	21,86±0,33*	50	0,37±0,04***	12,17±0,40***
	400	1,47±0,06*	19,68±0,22*	100	0,35±0,04***	11,78±0,72***
Indometacina	10	1,17±0,09*	12,14±0,22*	10	0,27±0,03***	7,30±0,19***

Significativo após análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Student Newman-Keuls (* p < 0,05; **p<0,01 e ***p< 0,001).

5.4 Relação entre a constituição química e a ação farmacológica da mistura de DAH

Os resultados *in vivo* são pertinentes com a composição FAc como pode ser observado pelas ações anteriormente descritas para DAH (ORBAN *et al.*, 2000; NARDINI *et al.*, 2000; HOSODA *et al.*, 2002; SHIN *et al.*, 2004; DELAZAR *et al.*, 2004; MOLNAR *et al.*, 2005; COTELLE, 2005; KHAN *et al.*, 2007; SOUSA, 2008; MA *et al.*, 2010; CHAO & LIN, 2011; HUANG *et al.*, 2011).

Com base nestes resultados, justifica-se a utilização de rizomas, visto que a fração testada apresenta uma mistura de DAH qualitativa e quantitativamente diferentes da mistura destes constituintes encontradas nas folhas de *E. grandiflorus* por Pimenta (2002).

Não foi possível a determinação de marcador(es) químico(s), porém os resultados encontrados são relevantes para o controle de qualidade da espécie em estudo. Destacam-se, para rizomas, também os ácidos fenólicos derivados do ácido hidroxicinâmico, citados na Farmacopeia Brasileira (2010) como teor referente a qualidade de extratos obtidos de folhas.

5.5. Avaliação farmacológica *in vitro*

5.5.1 Determinação da Produção de NO

O NO é um importante mediador inflamatório, o teste de determinação da produção de NO foi realizado para verificar se ação anti-inflamatória de FAc, verificada nos testes *in vivo*, estavam envolvidas com a inibição da produção desse mediador. As demais frações foram testadas quanto a produção de NO como uma maneira de avaliar se as mesmas apresentavam potencial anti-inflamatório. O teste de determinação da produção de NO foi realizado pelo doseamento da concentração de nitrito através da Reação de Griess. Neste caso, o melhor resultado foi desenvolvido pela fração em hexano 9:1 acetato de etila, que inibiu de maneira significativa ($p < 0,05$) nas concentrações de 1000 e 100 $\mu\text{g/mL}$. FAc, assim como a fração residual aquosa, demonstraram atividade significativa ($p < 0,05$) apenas na concentração de 1000 $\mu\text{g/mL}$ (Tabela 11). Esses dados demonstram que as frações testadas tem ação na inibição da produção de NO através de L-arginina, o que reforça os dados encontrados nas pesquisas *in vivo* e demonstra o potencial das demais frações.

Tabela 11: Avaliação dos efeitos das frações obtidas por partição líquido-líquido de extrato metanólico bruto de *E. grandiflorus* na inibição da produção de Óxido Nítrico por células Macrófagos J774A.1 através do método de Griess.

Frações	Inibição de NO (%) ^a		
	1000 ^b	100	10
Hexano 9 : 1Acetato de Etila	100,00±2,34*	56,90±10,75*	-
Acetato de Etila	91,83±4,41*	-	-
Fração Residual Aquosa	44,77±7,98*	-	-

^a O percentual de inibição foi calculado em relação à média dos poços estimulados (LPS and IFN- γ) sem tratamento. Os resultados foram calculados usando a formula $100 - ((\bar{x}_1 - A) / (\bar{x}_2 - A)) * 100$, considerando que \bar{x}_1 e \bar{x}_2 são as médias da concentração de NO (μM) nos poços contendo as frações do extrato e nos poços estimulados sem tratamento, respectivamente. "a" Concentração basal de NO no sobrenadante das células não estimuladas sem tratamento.

^b Concentração da fração do extrato ($\mu\text{g/mL}$).

* $p < 0,05$ em relação às células estimuladas sem tratamento.

- Não significativo em relação às células estimuladas sem tratamento.

Ao longo do desenvolvimento do presente trabalho, algumas limitações forçaram a priorização tanto da análise química quanto dos testes farmacológicos. Desta forma, priorizou-se a fração com mistura de DAH, que após confirmada por CLAE-UV, foi testada farmacologicamente. No entanto, a partir dos resultados apresentados na Tabela 11 observa-se a necessidade da análise química e avaliação farmacológica também das demais frações semi-purificadas obtidas do extrato bruto metanólico de rizoma de *E. grandiflorus*.

5.5.2 Avaliação da Citotoxicidade

Para avaliação da citotoxicidade das frações testadas na inibição da produção de NO, foi realizado o teste de MTT, onde o brometo de 3-metil-[4-5-dimetiltiazol-2-il]-2,5 difeniltetrazólio sofre redução apenas em células metabolicamente ativas através das desidrogenases mitocondriais formando um cristal de cor roxa (REILLY *et al.*, 1998). Através deste método verificou-se que as frações não demonstraram ação citotóxica nas concentrações avaliadas e, assim como as células que não receberam nenhum tratamento, controle negativo, apresentaram 100% de viabilidade celular. Estes resultados demonstram que a diminuição da produção de NO verificada no teste anterior não foi devido a redução na viabilidade das células. A ausência de citotoxicidade corrobora com a utilização farmacológica das frações testadas (Tabela 12).

Tabela 12: Avaliação dos efeitos das frações obtidas por partição líquido-líquido a partir do extrato bruto metanólico de rizoma de *Echinodorus grandiflorus* sobre a viabilidade celular.

Frações	Viabilidade celular		
	1000 ^b	100	10
Hexano 9 : 1 Acetato de Etila	100%	100%	100%
Acetato de Etila	100%	100%	100%
Fração Residual Aquosa	100%	100%	100%

^b Concentração da fração do extrato ($\mu\text{g/mL}$).

5.6 Perfil químico das frações testadas *in vitro*

O processo de fracionamento por partição líquido-líquido mostrou-se efetivo, uma vez que o extrato bruto metanólico de rizomas de *E. grandiflorus* exibiu uma mistura de substâncias, com destaque para os ácidos fenólicos derivados do ácido hidroxicinâmico (DAH) e as frações do extrato metanólico apresentaram substâncias distintas quando avaliadas por CLAE-UV (Figura 15 e 16). Excetuando-se um DAH que encontra-se majoritário nos cromatogramas do EBMRE e nas frações FAc e FRA, e como segundo majoritário na FHAc (Figura 16)

A FRA é constituída de uma mistura de substâncias mais polares, destacando-se principalmente flavonoides e DAH. Os flavonoides já foram verificados em extratos de folhas tanto em Pimenta (2002) quanto em Schnitzler e colaboradores (2004), porém são distintos destes por apresentarem diferentes tempos de retenção.

A FAc concentrou a mistura de DAH, aumentando tanto qualitativamente quanto quantitativamente a detecção dessas substâncias, quando comparada ao extrato bruto e às demais frações. Essa fração também apresentou a presença de flavonoides entre seus constituintes.

A composição química da FRA e da FAc corroboram os resultados visualizados quanto à capacidade dessas frações em inibirem a produção de NO. Há descrições na literatura tanto da capacidade dos flavonoides (SILVÁN *et al.*, 1996; NIJVELDT *et al.*, 2001; YOON & BAEK 2005; BIESALSKI, 2007; SANTANGELO *et al.*, 2007; CAZAROLLI *et al.*, 2008; BOOTS *et al.*, 2008)

quanto dos DAH (SHIN *et al.* 2004; HUANG *et al.* 2011) em inibirem a óxido nítrico sintase.

O fato de FAc só apresentar inibição da produção de NO na maior concentração testada, por um lado confirma os resultados obtidos nos testes *in vivo* realizados com FAc, porém sugerem que a ação anti-inflamatória não esteja relacionada somente a inibição da óxido nítrico sintase.

A FHAc apresenta duas substâncias majoritárias distintas dos DAH, a primeira com tempo de retenção de 0,98 min. (Figura 15 - D) e a outra com tempo de retenção de 24.... (Figura 16 – D) Entretanto, foi detectada uma mistura de DAH, relativamente mais apolar, diferente das demais frações. A ação promissora apresentada pela FHAc no teste de determinação da produção de NO pode estar relacionada à substância majoritária encontrada, uma vez que tal substância foi detectada apenas nesta fração (Figura 16).

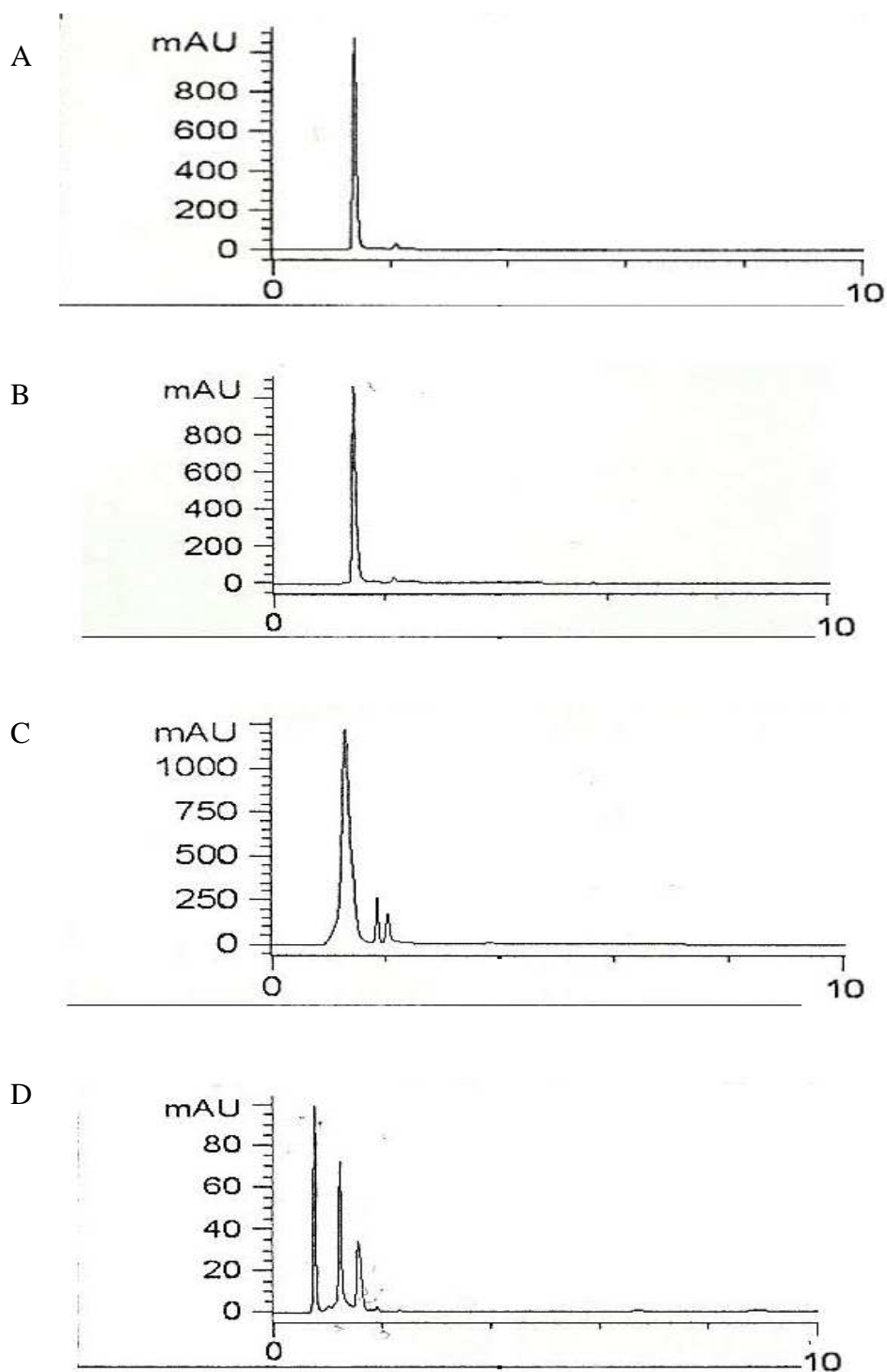


Figura 15: Comparação entre os cromatogramas a 335nm do extrato bruto metanólico de rizomas de *Echinodorus grandiflorus* – A, e as frações obtidas por partição líquido-líquido (v/v) do extrato bruto: B – fração residual aquosa; C – fração em acetato de etila 100% e D – fração em hexano 9:1 acetato de etila nos tempos de retenção entre 0 e 10 minutos de corrida.

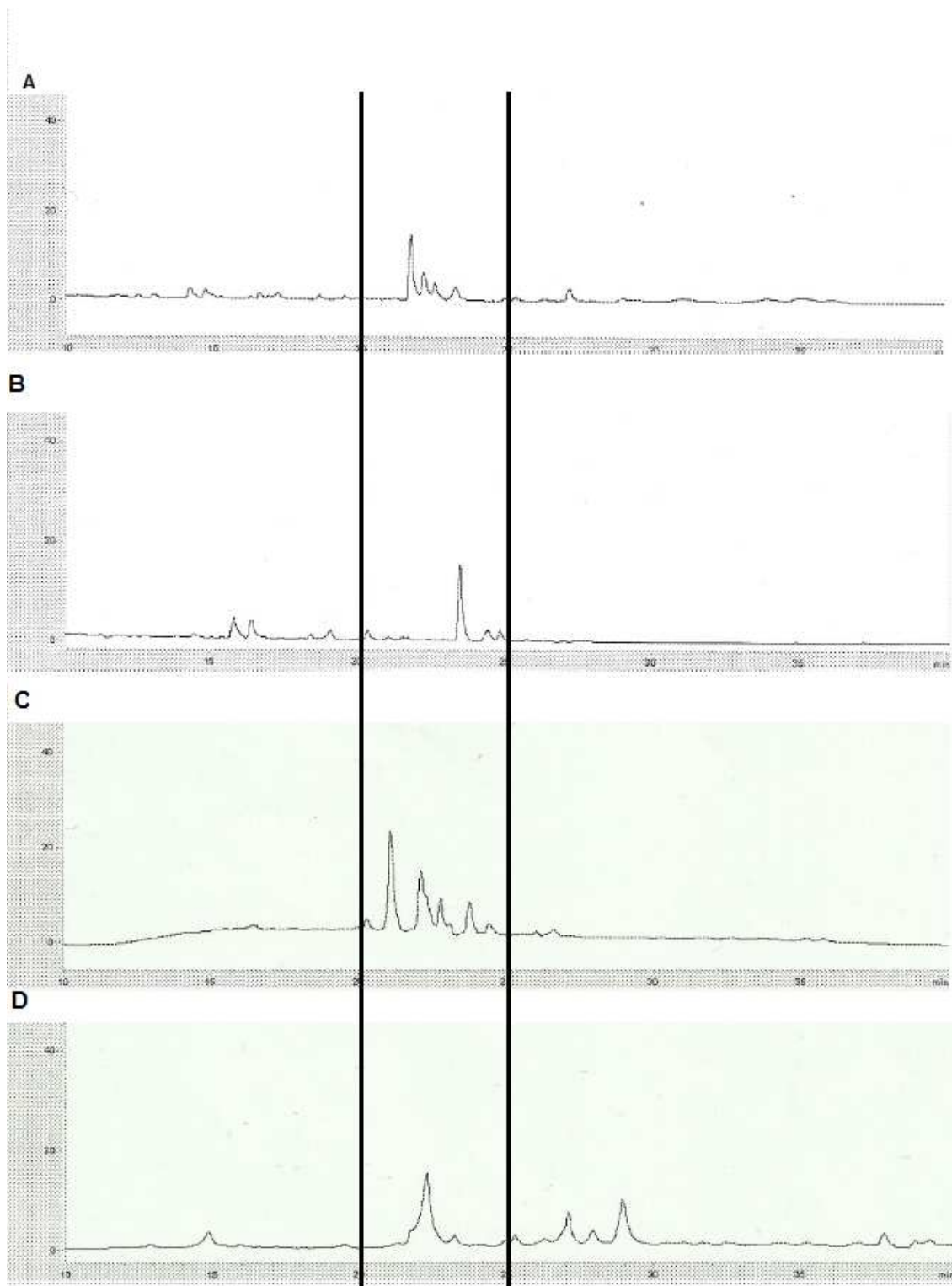


Figura 16: Comparação entre os cromatogramas a 335nm do extrato bruto metanólico de rizomas de *Echinodorus grandiflorus* – A, e as frações obtidas por partição líquido-líquido (v/v) do extrato bruto: B – fração residual aquosa; C – fração em acetato de etila 100% e D – fração em hexano 9:1 acetato de etila nos tempos de retenção entre 10 e 40 minutos de corrida.

6. CONCLUSÕES

Os extratos etanólicos e metanólico brutos de rizomas de *E. grandiflorus* são constituídos principalmente de uma mistura de DAH, com maior produção dos constituintes na primavera e no verão.

Os extratos de folhas e de rizomas apresentam constituições químicas diferentes.

A fração em acetato de etila 100%, obtida por partição líquido-líquido do extrato bruto metanólico de rizomas de *E. grandiflorus*, apresenta uma mistura complexa de DAH.

A fração acetato de etila 100% apresentou ação anti-inflamatória, porém não demonstrou ação analgésica central.

A fração em hexano 9:1 acetato de etila apresentou ação anti-inflamatória promissora ao inibir de forma significativa a produção de óxido nítrico por macrófagos J774A.1.

As frações semi-purificadas obtidas por partição líquido-líquido do extrato bruto metanólico de rizomas de *E. grandiflorus* não apresentaram ação citotóxica nas concentrações avaliadas em macrófagos J774A.1.

7. REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. *Imunologia celular e molecular*. 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 576 p.

ALLER, M. A.; ARIAS, J. L.; SANCHEZ-PATÁN, F.; ARIAS, J. The inflammatory response: An efficient way of life. *Medical Science Monitor*, v. 12, p. 225-234, 2006.

ALON, R.; FUHLBRIGGE, R. C.; FINGER, E. B.; SPRINGER, T. A. Interactions through L-selectin between leukocytes and adherent leukocytes nucleate rolling adhesions on selectins and VCAM-1 in shear flow. *The Journal of Cell Biology*, v. 135, p. 849-865, 1996.

AMERSHAM BIOSCIENCES. Gel Filtration - Principles and Methods, Amersham Biosciences, 2002.

ÂNGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.

BARRETO, R. L.; CORREIA, C. R. D. Óxido nítrico: propriedades e potenciais usos terapêuticos. *Química Nova*, v. 28, n. 6, p. 1046-1054, 2005.

BELMONTE C.; CERVERO, F. Neurobiology of nociceptors. *Oxford University Press*, 1996.

BERTOLINI, A.; OTTANI A.; SANDRINI, M. Selective COX-2 inhibitors and dual acting anti-inflammatory drugs: critical remarks. *Current Medicinal Chemistry*, v.9, n.10, p.1033-1043, 2002.

BETTEGA, P. V. C., CZLUSNIAK, G. R., PIVA, R., NAMBA, E. L., RIBAS, C. R. GRÉGIO, A. M., ROSA, E. A. R. Phytotherapy: from greenhouses to drugstore's bench. *Archives of Oral Research*, v. 7, n. 1, p. 89-97, 2011.

BEVILAQUA, G. A. P.; NEDEL, J. L. Dormência e longevidade de sementes de chapéu-de-couro (*Echinodorus grandiflorus* Mich.) – Alismataceae. *Revista Brasileira de Sementes*, v. 22, n. 1, p. 225-231, 2000.

BIESALSKI, H. K. Polyphenols and inflammation: basic interactions. *Current Opinion in Clinical Nutrition Metabolic Care*, v. 10, n. 6, p. 724-728, 2007.

BILATE, A. M. B. Inflamação, citocinas, proteínas de fase aguda e implicações terapêuticas. *Temas de Reumatologia Clínica*, v. 8, n. 2, p. 47-51, 2007.

BLIXT, A.; JONSSON, P.; BRAIDE, U. Microscopic studies on the influence of erythrocyte concentration on the post-junctional radial distribution of leukocytes at small venular junctions. *International Journal of Microcirculation: Clinical and Experimental*, v. 4, p. 141-158, 1985.

BOGDAN, C. Nitric oxid and the immune response. *Nature Immunology*, v. 2, n. 10, p. 907-916, 2001.

BOOTS, A. W.; HAENEN, G. R. M. M.; BAST, A. Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. *European Journal Pharmacology*, v. 13, n. 585 (2-3), p. 325-337, 2008.

BRACA, A.; POLITI, M.; SANOGO, R.; SANOU, H.; MORELLI, I.; PIZZA, C.; DE TOMMASI, N. Chemical composition and antioxidant activity of phenolic compounds from wild and cultivated *Sclerocarya birrea* (Anacardiaceae) leaves. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 51, p. 6689-6695, 2003.

BRASIL. Resolução – RDC nº 10, de 10 de Março de 2010. Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e dá outras providências. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, Seção 1, p. 52.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2006. p. 60.

BROOKS, P. M.; DAY, R. O. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs – differences and similarities. *The New England Journal of Medicine*, v. 324, p.1716-1725, 1991.

BRUGIOLO, A. S. S.; ALVES, C. C.; GOUVEIA, A. C.; DIAS, A. T.; RODRIGUES, M. F.; PACIFICO, L. G. AARESTRUP, B. J. V.; MACHADO, M. A.; DOMINGUES, R.; TEIXEIRA, H. C.; GAMEIRO, J.; FERREIRA, A. P. Effects of aqueous extract of *Echinodorus grandiflorus* on the immune response in ovalbumin-induced pulmonary allergy. *Annals of allergy, asthma e immunology*, v. 106, n. 6, p. 481-488, 2011.

BRUGIOLO, S. S. S.; PETERS, V. M.; PIMENTA, D. S.; AARESTRUP, B. J. V.; BRUGIOLO, A. S. S.; RIBEIRO, D. M.; GUERRA, M. O. Reproductive toxicity of *Echinodorus grandiflorus* in pregnant rats. *The Journal of toxicological sciences*, v. 35, n. 6, p. 911-22, 2010.

BRUNTON, L. L; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. *Goodman e Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica*. 10 ed. Rio de Janeiro: Mc Graw-Hill, 2005. 1647 p.

BUSNARDO, T. C. P. M. *Estudo da propriedade antiinflamatória do extrato de Coronopus didymus através de modelos farmacológicos específicos*. Itajaí: Univali. 2007. 100 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Mestrado em Ciências Farmacêuticas do Centro de Ciências da Saúde, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2007.

CANELA, J. P. F. Elaboração de uma biblioteca para a caracterização de flavonoides e ácidos fenólicos de *Phyllanthus* spp., no sistema HPLC-DAD. Monografia de vocação científica – avançado. Laboratório de Produtos Naturais, Programa de vocação científica/FIOCRUZ, 1999.

CARDOSO, G. L. C.; PEREIRA, N.A.; LAINETTI, R. Avaliação das atividades antinociceptiva, antiinflamatória e diurética de chapéu-de-couro (*Echinodorus grandiflorus*, [Cham. e Schl.] Mitch., Alismataceae). *Revista Brasileira de Farmácia*, v. 84, n. 1, p. 5-7, 2003.

CARLOS, T. M.; HARLAN, J. M. Membrane proteins involved in phagocyte adherence to endothelium. *Immunological Reviews*, v. 114, p. 5-28, 1990.

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

CARVALHO, W. A.; LEMÔNICA, L. Mecanismos celulares e moleculares da dor inflamatória. Modulação periférica e avanços terapêuticos. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, v. 48, p. 137-158, 1998.

CAZAROLLI, L. H.; ZANATTA, L.; ALBERTON, E. H.; FIGUEIREDO, M. S. R. B.; FOLADOR, P; DAMAZIO, R. G.; PIZZOLATTI, M. G.; SILVA, F. R. M. B. Flavonoids: prospective drug candidates. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, v. 8, p. 1429–1440, 2008.

CHAO, W. W.; LIN, B. F. Bioactivities of major constituents isolated from *Angelica sinensis* (Danggui). *Chinese medicine*, v. 6, p. 1-7, 2011.

CHIEN, S. Rheology in the microcirculation in normal and flow states. *Advances in Shock Research*, v. 8, p. 71-80, 1982.

CHUN, O. K.; KIM, D. O.; SMITH, N.; SCHROEDER, D.; HAN, J. T.; LEE, C. Y. Daily consumption of phenolics and total antioxidant capacity from fruit and vegetables in the American diet. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 85, n. 10, p. 1715-1724, 2005.

CIRINO, G.; FIORUCCI, S.; SESSA, W. C. Endothelial nitric oxide synthase: the Cinderella of inflammation? *Trends in Pharmacological Sciences*, v. 24, n. 2, p. 91-95, 2003.

COLEMAN, J. W. Nitric oxide in immunity and inflammation. *International Immunopharmacology*, v. 1, n. 8, p. 1397-1406, 2001.

COLLIER, H. O.; DINNEEN, L. C.; JOHNSON, C. A; SCHNEIDER, C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy*, v. 32, n. 2, p. 295-310, 1968.

COOK-MILLS, J. M.; DEEM, T. L. Active participation of endothelial cells in inflammation. *Journal of Leukocyte Biology*, v. 1, n. 9, p. 5771-5775, 2008.

COSTA, M.; TANAKA, C. M. A; IMAMURA, P. M.; MARSAIOLI, A. J. Isolation and synthesis of a new clerodane from *Echinodorus grandiflorus*. *Phytochemistry*, v. 50, n. 1, p. 117-122, 1999.

COTELLE, P. Acid-Treatment of arylpropanoid and arylethanoid derivatives - Access to natural and synthetic biologically active polyphenols. *Studies in Natural Products Chemistry Elsevier*, v. 30, p. 213-231, 2005.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. *Patologia Estrutural e Funcional*. 7 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

CROFT K. D. The chemistry and biological effects of flavonoids and phenolic acids. *Annals of the New York Academic Sciences*, v. 854, p. 435-442, 1998.

CRUVINEL, W. M.; JÚNIOR, D. M.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S.; SILVA, N. P.; ANDRADE, L. E. C. Sistema Imunitário – Parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. *Revista Brasileira de Reumatologia*, v. 50, n. 4, p. 434-461, 2010.

CUENCA, J.; MARTIN-SANZ, P.; ALVAREZ-BARRIENTOS, A. M.; BOSCA, L.; GOREN, N. Infiltration of inflammatory cells plays an important role in matrix metalloproteinase expression and activation in the heart during sepsis. *American Journal of Pathology*, v. 169, n. 5, p. 1567-1576, 2006.

DELAZAR, A.; MOHAMMAD SHOEB, M.; KUMARASAMY, Y.; BYRES, M.; NAHAR, L.; MASOUD MODARRESI, M.; SARKER, S. D. Two bioactive ferulic acid derivatives from *Eremostachys glabra*. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 12, n. 2, p. 49-53, 2004.

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

DEWICK, P. M. Medicinal natural products: a biosynthetic approach. 3 ed. New York: John Wiley & Sons LTDA, 2008, 546 p.

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

DI ROSA, M.; WILLOUGHBY, D. A. Screens for anti-inflammatory drugs. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 23, p. 297-298, 1971.

DI STASI, L. C.; OLIVEIRA, G. P. CARVALHAES, M. A; QUEIROZ, M. Jr.; TIEN, O. S.; KAKINAMI, S. H.; REIS, M. S. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. *Fitoterapia*, v. 73, n. 1, p. 69-91, 2002.

DIAMOND, M. S.; STAUNTON, D. E.; MARLIN, S. D.; SPRINGER, T. A. Binding of the integrin Mac-1 (CD11b/CD18) to the third immunoglobulin-like domain of ICAM-1 (CD 54) and its regulation by glycosylation. *Cell*, v. 65, n. 6, p. 961-971, 1991.

DICKENSON, A.H. Central acute pain mechanisms. *Annals of Medicine*, v. 27, p. 223-227, 1995.

DIP, E. C.; PEREIRA, N. A.; FERNANDES, P. D. Ability of eugenol to reduce tongue edema induced by *Dieffenbachia picta* shott in mice. *Toxicon*, v. 43, p. 729-735, 2004.

DURÁN, R.M.; PADILLA, B. Actividad antioxidante de los compuestos fenólicos. *Grasas y Aceites*, v.44, n. 2, p. 101-106, 1993.

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

DUTRA, R. C.; TAVARES, C. Z.; FERRAZ, S. O.; SOUSA, O. V.; PIMENTA, D. S. Investigação das atividades analgésica e antiinflamatória do extrato metanólico dos rizomas de *Echinodorus grandiflorus*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 16, n. 4, p. 469-474, 2006.

ELDER, D. J. E.; PARASKEVA, C. COX-2 inhibitors for colorectal cancer. *Nature Medicine*, v. 4, n. 4, p. 392-393, 1998.

EDDY, N. B.; LEIMBACH, D. Synthetic analgesics. II. Dithienylbutenyl and dithienylbutylamines. *Journal Pharmacology Experimental Therapeutics*, v. 107, p. 385-393, 1953.

FALCÃO, H. S.; LIMA, I. O.; SANTOS, V. L.; DANTAS, H. F.; DINIZ, M. F. F. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; BATISTA, L. M. Review of the plants with anti-inflammatory activity studied in Brazil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 15, n. 4, p. 381-391, 2005.

Pharmacopoeia dos Estados Unidos do Brasil. 1926. 1ª ed. São Paulo: Companhia Editora Nacional.

Farmacopeia Brasileira. 2. ed. São Paulo: Siqueira, 1959.

Farmacopeia Brasileira, volume 2. 5ª Ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Anvisa, 2010, 808 p.

FERREIRA, M. B. Moléculas de adesão e alergia. *Revista Portuguesa de Imunoalergologia*, v. 11, p. 210-283, 2003.

FLEMING, I.; BUSSE, R. Signal transduction of eNOS activation. *Cardiovascular Research*, v. 43, n. 3, p. 532-541, 1999.

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

FRANCO, G.C.N.; MORETTI, D.; CAVALCANTE, P.F.C.; LOPES, L.C. Uma análise crítica sobre viabilidade do uso dos inibidores seletivos de COX II em odontologia. *Revista de Odontologia da Universidade Cidade de São Paulo*, v.18, n.1, p.75-81, 2006.

FRIEDL, H. P.; TILL, G. O.; TRENTZ, O.; WARD, P. A. Roles of histamine complement and xanthine oxidase in thermal injury of skin. *American Journal of Pathology*, v. 135, p. 203-217, 1989.

FUJIWARA, K. Platelet endothelial cell adhesion molecule-1 and mechanotransduction in vascular endothelial cell. *Journal of Internal Medicine*, v. 259, n. 4, p. 373-380, 2006.

GADDI, A.; CICERO, A. F. G.; PEDRO, E. J. Clinical perspectives of anti-inflammatory therapy in the elderly: the lipoxigenase (LOX)/cyclooxygenase (COX) inhibition concept. *Archives of Gerontology and Geriatrics*, v. 38, n. 3, p. 201-212, 2004.

GARCIA, E. D. F.; OLIVEIRA, M. A.; GODIN, A. M.; FERREIRA, W. C.; BASTOS, L. F.; COELHO, M. M.; BRAGA, F. C. Antiedematogenic activity and phytochemical composition of preparations from *Echinodorus grandiflorus* leaves. *Phytomedicine*, v. 18, n. 1, p. 80-86, 2010.

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

GRACE, P. A. Ischemia-reperfusion injury. *British Journal of Surgery*, v. 81, p 637- 647, 1994.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSK, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J.S.; TANNEMBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*, v. 126, p. 131-138, 1982.

GRIFFITH, O. W.; STUEHR, D. J. Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism. *Annual Review of Physiology*, v. 57, p. 707-736, 1995.

GUALILO, O.; EIRAS, S.; LAGO, F.; DIÉGUEZ, C.; CASANUEVA, F. F. Elevated serum leptin concentrations induced by experimental acute inflammation. *Life Sciences*, v. 67, p. 2433-2441, 2003.

GOODMAN, L. A.; GILMAN, A. As bases farmacológicas da terapêutica. 10. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2005.

HARRISON, S.; GEPPETTI, P. Substance P. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, v. 33, p. 555-576, 2001.

HEBA, G.; KRZEMINSKI, T.; PORC, M.; GRZYB, J.; DEMBINSKA-KIEC, A. Relation between expression of TNF alpha, iNOS, VEGF mRNA and development of heart failure after experimental myocardial infarction in rats. *Journal of Physiology and Pharmacology*, v. 52, n. 1, p. 39-52, 2001.

HEBEDA, C. B. *Inibição in vivo das óxido nítrico sintases: efeitos sobre a expressão de moléculas de adesão e secreção de mediadores inflamatórios*. 2008. 189 p. Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Análises Clínicas e Toxicológicas Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo. 2008.

HEIT, B.; COLARUSSO, P.; KUBES, P. Fundamentally different roles for LFA-1, Masc-1 and alpha 4-integrin in neutrophil chemotaxis. *Journal of Cell Science*, v. 15, p. 5205-5220, 2005.

HENSEN, P. M. Dampening inflammation. *Nature Immunology*, v. 6, p. 1179-1181, 2005.

HERCHMAN, H. R. Prostaglandin synthase 2. *Biochimica et Biophysica. Acta*, v. 1299, p. 125-140, 1996.

HIGGS, G. A.; MONCADA, S.; VANE, J. R. Eicosanoids in inflammation. *Annals of Clinical Research*, v. 16, p. 287-299, 1984.

HIGGS, G.A.; EAKINS, K.E.; MUGRIDGE, K.G.; MONCADA, S.; VANE, J.R. The effects on non-steroid anti-inflammatory drugs on leukocyte migration in carrageenin-induced inflammation. *European Journal Pharmacology*, v.66, p.81-86, 1980.

HILARIO, M. O. E.; TERRERI, M. T.; LEN, C. A. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: cyclooxygenase 2 inhibitors. *Jornal de Pediatria*, v. 82, n. 5, p. 206-212, 2006.

HOLZER, P.; HOLZER-PETSCHKE, U. Tachykinins in the gut. Part II. Roles in neural excitation, secretion, and inflammation. *Pharmacology and Therapeutics*, v. 73, n. 3, p. 219, 263, 1997.

HOSODA A.; OZAKI, Y.; KASHIWADA, A.; MUTOH, M.; WAKABAYASHI, K.; MIZUNO, K.; NOMURA, E.; TANIGUCHI, H. Syntheses of ferulic acid derivatives and their suppressive effects on cyclooxygenase-2 promoter activity. *Bioorganical and Medicinal Chemistry*, v. 10, n. 4, p. 1189-1196, 2002.

HUANG, F.; DENG, H. M.; ZHU, M. M.; XIAO, F.; YANG, L.; ZHANG, Z. J.; XIAO, Y.; NIE, H. Inhibitory effect of ferulic acid on inflammatory response in microglia induced by lipopolysaccharides. *Zoological Research*, v. 32, n. 3, p. 311-316, 2011.

HUME, D. A. The mononuclear phagocyte system. *Current Opinion in Immunology*, v. 18, p. 49-53, 2006.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain*, v. 30, n. 1, p. 103-14, 1987.

IBRAHIM, R. K. Phenylpropanoid Metabolism. Encyclopedia of Life Sciences, Concordia University, Montreal, Canada. Published online: Abril, 2001.

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

JAKUS, Z.; FODOR, S.; ABRAM, C. L.; LOWELL, C. A.; MÓCSAI, A. Immunoreceptor-like signaling by beta 2 and beta 3 integrins. *Trends in Cell Biology*, v. 17, n. 10, p. 493-501, 2007.

JIANG, D.; LIANG, J.; NOBLE, P. W. Hyaluronan in tissue injury and repair. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, v. 23, p. 372-378, 2003.

JOAQUIM, W. M. *Desenvolvimento de mudas adventícias de chapéu de couro (Echinodorus grandiflorus (Cham. E Schldl.) Micheli) em função do sombreamento e níveis de água do solo*. 2000. 110 p. Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho/ Botucatu – Ciências Biológicas (Botânica). 2000.

JUNG, T. M.; DAILEY, M. O. Rapid modulation of homing receptors (gp90MEL-14) induced by activators of protein kinase C. Receptor shedding due to accelerated proteolytic cleavage at the cell surface. *Journal of Immunology*, v. 144, n. 8, p. 3130-3136, 1990.

JUNG, U.; LEY, K. Mice lacking two or all three selectins demonstrate overlapping and distinct functions for each selectin. *Journal of Immunology*, v. 162, n. 11, p. 6755-6762, 1999.

KENNEDY, D. O.; WIGHTMAN, E. L. Herbal Extracts And Phytochemicals: Plant Secondary Metabolites and The Enhancement Of Human Brain Function. *Advances in Nutrition*, v. 2, p. 32-50, 2011.

KFFURI, C. W. *Etnobotânica de Plantas Medicinais no município de Senador Firmino (Minas Gerais)*. 2008. 101 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) – Programa de Pós-graduação em Fitotecnia, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2008.

KHAN, M.; ELANGO, C.; ANSARI, M. A; SINGH, I.; SINGH, A. K. Caffeic acid phenethyl ester reduces neurovascular inflammation and protects rat brain following transient focal cerebral ischemia. *Journal of Neurochemistry*, v. 102, n. 2, p. 365-77, 2007.

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

KUBES, P.; GRISHAM, M. B.; BARROWMAN, J. A.; GAGINELLA, T.; GRANGER, D. N. Leukocyte-induced vascular protein leakage in cat mesentery. *American Journal of Physiology*, v.261, n. 6, p. 1872-1879, 1991.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; ÁSTER, J. C. *Robins & Cotran - Patologia - Bases Patológicas das Doenças*. 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

KUMMER, C.L.; COELHO, T.C.R.B. Anti-inflamatórios não esteróides inibidores da ciclooxigenase II (COX II): aspectos atuais. *Revista Brasileira de Anestesiologia*, v.5, n.4, 2002.

LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M. T.; CASTRO, M. S. A.; LIMA, T. C. M. Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais. *Sociedade Brasileira de Plantas Medicinais*, p. 119, 2003.

LAU, C. W.; CHEN, Z. Y.; WONG, C. M.; YAO, X. H, Z.; HUANG, Y. Attenuated endothelium-mediated relaxation by acteoside in rat aorta: Role of endothelial [Ca²⁺]_i and nitric oxide/cyclic GMP pathway. *Life Sciences*, v. 75, p. 1149-1157, 2004.

LEES, P. Pharmacology of drugs used to treat osteoarthritis in veterinary practice. *Inflammopharmacology*, v.11, p.385-399, 2003.

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

LEHTONEN, S. An integrative approach to species delimitation in *Echinodorus* (Alismataceae) and the description of two new species. *Kew Bulletin*, v. 63, p. 525-563, 2008.

LEHTONEN, S.; MYLLYS, L. Cladistic analysis of *Echinodorus* (Alismataceae): simultaneous analysis of molecular and morphological data. *Cladistics*, v. 24, n. 2, p. 218-239, 2008.

LESSA, M. A. ARAÚJO, C. V. KAPLAN, M. A. et al. Antihypertensive effects of crude extracts from leaves of *Echinodorus grandiflorus*. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, v. 22, n. 2, p. 161-168, 2008.

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

LIU, R. H. Potencial synergy of phytochemicals in câncer prevention: mechanism of action. *The American Society for Nutritional Sciences*, v. 134, p. 3479-3485, 2004.

LÔBO, K. M. S.; ATHAYDE, A. C. R.; SILVA, A. M. A.; RODRIGUES, F. F. G.; LÔBO, I. S.; BEZERRA, D. A. C.; COSTA, J. G. M. Avaliação da atividade antibacteriana e prospecção fitoquímica de *Solanum paniculatum* Lam. e *Operculina hamiltonii* (G. Don) D. F. Austin & Staples, do semiárido paraibano. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v.12, n.2, p.227-233, 2010.

LOPES, J. M. C. Fisiopatologia da Dor. Biblioteca da Dor. Permanyer, Portugal, 2003.

LORENZI, H. *Plantas daninhas do Brasil: terrestres, aquáticas, parasitas, tóxicas e medicinais*. 2.ed. Nova Odessa: Plantarum, 1991, 440 p.

LORENZI, H., MATOS, F.J.A. *Plantas Mediciniais no Brasil. Nativas e exóticas*. 2 ed. Nova Odessa: Plantarum, 2008. 543 p.

LORENZON, P.; VECILE, E.; NARDON, E.; FERRERO, E.; HARLAN, J. M., TEDESCO, F.; DOBRINA, A. Endothelial cell E- and P-selectin and vascular cell adhesion molecule-1 function as signaling receptors. *Journal of Cell Biology*, v.142, n. 5, p. 1382-1391, 1998.

LUGNIER, C.; KERAVALIS, T.; ECKLY-MICHEL, A. Cross talk between NO and cyclic nucleotide phosphodiesterases in the modulation of signal transduction in blood vessel. *Journal of Physiology and Pharmacology*, v. 50, p. 639-652, 1999.

LUTZKY, V. P.; CARNEVALE, R. P.; ALVAREZ, M. J.; MAFFIA, P. C.; ZITTERMANN, S. I.; PODHAJECER, O.L.; ISSEKUTZ, A. C.; CHULUYAN, H.E. Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31) recycles and induces cell growth inhibition on human tumor cell lines. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 98, n. 5, p. 1334-1350, 2006.

MA, Z. C.; HONG, Q. ; WANG, Y. G. ; TAN, H. L. ; XIAO, C. R. ; LIANG, Q. D. ; CAI, S. H. ; GAO, Y. Ferulic acid attenuates adhesion molecule expression in gamma-radiated human umbilical vascular endothelial cells. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, v. 33, n. 5, p. 752-758, 2010.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; JUNIOR, V. F. V.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MAGALHÃES, A. C. *Etnobotânica, saberes locais e agricultura no contexto de uma floresta urbana: Maciço da Pedra Branca, RJ*. 2010. 92 f. Dissertação (Mestrado em Geografia) - Programa de Pós-graduação em Geografia. Pontifícia Universidade Católica, Rio de Janeiro, 2010.

MAIMONE, T. J.; BARAN, P. S. Modern synthetic efforts toward biologically active terpenes. *Nature Chemical Biology*. V. 3, p 396 – 407, 2007.

MANACH, C.; WILLIAMSON, G.; MORAND, C.; SCALBERT, A.; RÉMÉSY, C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. Review of 97

bioavailability studies. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 81 (suppl.), p. 230-242, 2005.

MANS, D. e HARTMANN, R. Echinodol: a new cembrene derivate from *Echinodorus grandiflorus*. *Planta Médica*, v. 59, n. 5, p. 465-466, 1993.

MARZOCCO, S.; DI PAOLA, R.; SERRAINO, I.; SORRENTINO, R.; MELI, R.; MATTACERASO, G.; CUZZOCREA, S.; PINTO, A.; AUTORE, G. Effect of methylguanidine in carrageenan-induced acute inflammation in the rats. *European Journal Pharmacology*, v. 484, n. 2, p. 341-350, 2004.

MATOS, F. J. A. In: Brasil. Ministério da 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 Central de Medicamentos / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. – Brasília : Ministério da Saúde, 2006. 148 p. – (Série B. Textos Básicos de Saúde)

MATOS, F. J. A. Introdução a fitoquímica experimental. 2.ed. Fortaleza: Edições UFC, 1997. 141 p.

MELOS, J. L. R.; SILVA, L. B.; PERES, M. T. L. P.; MAPELI, A. M.; FACCENDA, O.; ANJOS, H. H.; TORRES, T. G.; TIVIROLI, A. L. B., ALMEIDA, F. G. N.; FLAUZINO, N. S.; TIBANA, L. A.; HESS, S. C.; HONDA, N. K. Constituintes químicos e avaliação do potencial alelopático de *Adiantum tetraphyllum* Humb. & Bonpl. Ex. Willd (Pteridaceae). *Química. Nova*, v.30, n.2, p. 292-297, 2007.

MENDELL IM – Phisyological properties of unmyelinated fiber protection to the spinal cord. *Experimental Neurology*, v. 16, p. 316-332, 1996.

MERSKEY H.e Bogduk N. Classification of chronic pain. IASP Press, 1994

MIKAMI, T.; MIYASAKA, K. Effects of several anti-inflammatory drugs on the various parameters involved in the inflammatory response in rat carrageenin induced pleurisy. *European Journal of Pharmacology*, v.95, p.1-12, 1983.

MIRA, N. V. M. ; BARROS, R. M. C.; SCHIOCCHET, M. A. ; NOLDIN, J. A. ; LANFER-MARQUEZ, U. M. Extração, análise e distribuição dos ácidos fenólicos em genótipos pigmentados e não pigmentados de arroz (*Oryza sativa* L.). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v. 28, n. 4, p. 994-1002, 2008.

MITCHELL, R. N.; KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. Inflamação aguda e crônica. In: Robbins & Cotran: fundamentos de patologia. 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2006. p.29-54.

MOLNAR, V.; GARAI, J. Plant-derived anti-inflammatory compounds affect MIF tautomerase activity. *International Immunopharmacology*, v. 5, n. 5, p. 849-856, 2005.

MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacological Reviews*, v. 43, p. 3-35, 2004.

MONTANHA, J. A.; SCHENKEL, E. P.; CARDOSO-TAKETA, A. T.; DRESCH, A. P.; LANGELOH, A.; DALLEGRAVE, E. Chemical and anti-ulcer evaluation of *Jodina rhombifolia* (Hook. & Arn.) Reissek extracts. *Revista Brasileira farmacognosia*, v.19, n.1a, p. 29-32, 2009.

MORITA, I. Distinct functions of COX-1 and COX-2. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*, v. 68, p. 165-175, 2002.

MOURA, H. V.; POMERANTZEFF, P. M. A.; GOMES, W. J. Síndrome da resposta inflamatória sistêmica na circulação extracorpórea: papel das interleucinas. *Revista Brasileira de Cirurgia Cardiovascular*, v. 16, n. 4, p. 375-387, 2001.

NAGATA, M.; SEDGWICK, J.B.; KITA, H; BUSSE, W. W. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor augments ICAM-1 and VCAM-1 activation of eosinophil function. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, v. 19, p. 158-166, 1998.

NARDINI, M.; SCACCINI, C.; PACKER, L.; VIRGILI, F. In vitro inhibition of the activity of phosphorylase kinase, protein kinase C and protein kinase A by caffeic acid and a procyanidin-rich pine bark (*Pinus maritima*) extract. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1474, n. 2, p. 219-225, 2000.

NIJVELDT, R. J.; NOOD, E.; HOORN, D. E. C.; BOELEN, P. G.; NORREN, K.; LEEUWEN, P. A. M. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications¹ ² ³. *The American Journal of Clinical Nutrition*. v. 74, p. 418, 2001.

NIU, X. F.; SMITH, C. W.; KUBES, P. intracellular oxidative stress induced by nitric oxide synthesis inhibition increases endothelial cell adhesion to neutrophils. *Circulation Research*, v. 74, n. 6, p. 1133-1140, 1994.

OKAYAMA, Y.; KAWAKAMI, T. Development, Migration, and Survival of Mast Cells. *Immunological Research*, v. 34, n. 2, p. 97-115, 2006.

OLIVEIRA, M. J. R.; SIMÕES, M. J. S.; SASSI, C. R. R. Fitoterapia no Sistema de Saúde Pública (SUS) no Estado de São Paulo, Brasil. *Revista Brasileira Plantas Mediciniais*, v. 8, n. 2, p. 39-41, 2006.

ORBAN, Z.; MITSIADES, N.; BURKE, J. R. T. R.; TSOKOS, M.; CHROUSOS, G. P. Caffeic Acid Phenethyl Ester Induces Leukocyte Apoptosis, Modulates Nuclear Factor-Kappa B and Suppresses Acute Inflammation. *Neuroimmunomodulation*, v. 7, p. 99-105, 2000.

OSADEB, P. O.; OKOYE, F. B. C. Anti-inflammatory effects of crude methanolic extract and fractions of *Alchornea cordifolia* leaves. *Journal of ethnopharmacology*, v. 89, p. 19-24, 2003.

PANIZZA, S. Plantas que curam: cheiro de mato. 19 ed. São Paulo: IBRASA – Biblioteca Saúde. 1997. 279p.

PARRISH, W.; ULLOA, L. High-mobility group box-1 isoforms as potential therapeutic targets in sepsis. *Methods Molecular Biology*, v. 361, p. 145-162, 2007.

PEREIRA, F. D.; PINTO, J. E. B. P.; CARDOSO, M. G.; LAMEIRA, O. A. Propagação in vitro de chapéu-de-couro (*Echinodorus* cf. *scaber* RATAJ), uma planta medicinal. *Ciência e agrotecnologia*, v.24 (Edição Especial), p.74-80, 2000.

PERRY, M. A.; GRANGER, D. N. Role of CD11/CD18 in shear rate-dependent leukocyte-endothelial cell interactions in cat mesenteric venules. *Journal of Clinical Investigation*, v. 87, p. 1798-1804, 1991.

PETRUZZELLI, L.; TAKAMI, M.; HUMES, H. D. Structure and function of cell adhesion molecules. *American Journal of Medicine*, v. 106, n. 4, p. 467-476, 1999.

PIMENTA, D. S. *Echinodorus grandiflorus* (Cham. e Schltld.) Micheli *Echinodorus macrophyllus* (Kunth) Micheli. In: AMARAL; A. C. F.; SIMÕES, E. V., FERREIRA, J. L. P. (coord.). *Coletânea Científica de Plantas de Uso Medicinal* 1ª ed. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2005. p. 81-102.

PIMENTA, D. S. *Contribuição a Ecologia, Cultivo e Validação do uso de Echinodorus grandiflorus (Cham. & Schltld.) Micheli (Chapéu de Couro)*. 2002. 176 p. Tese (Doutorado em Biologia Celular e Molecular) - Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2002.

PIMENTA, D. S.; FIGUEIREDO, M. R.; KAPLAN, M. A. C. Essential oil from two populations of *Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schltld.) Micheli (Chapéu de couro). *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 78, n. 4, p. 623-628, 2006.

PIMENTA, D. S.; AMARAL, A. C. F.; FIGUEIREDO, M. R.; KAPLAN, M. A. C. Padronização de *Echinodorus grandiflorus* (Cham. E Schltld.) Micheli. (chapéu de couro) II – Análise por CLAE –UV de extratos aquosos e etanólicos de folhas coletadas sazonalmente. In: XVII SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 2002, Cuiabá, MT. Resumo no XVII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, Cuiabá/MT, 2002.

PINELI, L. L. O. *Qualidade e potencial antioxidante in vitro de morangos in natura e submetidos a processamentos*. 2009. Tese de Doutorado - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2009.

PIZZIOLO, V. R. BRASILEIRO, B. G. OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J. Plantas com possível atividade hipolipidêmica: uma revisão bibliográfica de livros editados no Brasil entre 1998 e 2008. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, p. 98-109, 2011.

POBER, J.; COTRAN, R. S. What can be learned from the expression of endothelial adhesion molecules in tissues? *Laboratory Investigation*, v. 64, n. 3, p. 301-305, 1991.

POSADAS, I.; BUCCI, M.; ROVIEZZO, F.; ROSSI, A.; PARENTE, L.; SAUTEBIN, L.; CIRINO, G. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. *British Journal of Pharmacology*, v. 142, p. 331-338, 2004.

RAMPART, M. Neutrophil-endothelial cell interactions. In: Brain, S. D. The Handbook of Immunopharmacology. Immunopharmacology of Microcirculation. Ed., San Diego, Academic Press, p 77- 107, 1994.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; MOORE, P.K. *Farmacologia*. 6 Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

REILLY, T. P.; BELLEVUE, F. H.; WOSTER, P. M. Comparison of the in vitro cytotoxicity of hydroxylamine metabolites of sulfamethoxazole and dapsone. *Biochemical Pharmacology*, v. 55. p. 803-810, 1998.

REN, D.; SUN, R.; WANG, S. Role of inducible nitric oxide synthase expressed by alveolar macrophages in high mobility group box 1 – induced acute lung injury. *Inflammation Research*. v. 55, n. 5, p. 207-215, 2006.

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

ROCK, K. L.; KONO, H. The inflammatory response to cell death. *Annual Review of Pathology*, v. 3, p 99-126, 2008.

RODRIGUES, I. M. C.; SOUZA FILHO, A. P. S.; FERREIRA, F. A.; DEMUNER, A. J. Prospecção química de compostos produzidos por *Senna alata* com atividade alelopática. *Planta Daninha*, v. 28, n. 1, p. 1-12, 2010.

ROSEN, S. D. Cell surface lectins in the immune system. *Seminars in Immunology*, v. 5, p. 237-247, 1993.

ROTH, J.; RUMMEL, C.; BARTH, S.W.; GERSTBERGER, R.; HÜBSCHLE, T. Molecular aspects of fever and hyperthermia. *Immunology And Allergy Clinics of North America*, v.29, p.229-245, 2009.

ROTHLEIN, R.; MAINOLFI, E. A.; CZAJKOWSKI, M.; MARLIN, S. D. A form of circulating ICAM-1 in human serum. *Journal of Immunology*, v. 147, p. 3788-3793, 1991.

SALVEMINI, D.; ISCHIROPOULOS, H.; CUZZOCREA, S. Roles of nitric oxide and superoxide in inflammation. *Methods in Molecular Biology*, v. 225, p. 291-303, 2003.

SALVEMINI, D.; WANG, Z.; WYATT, P. S.; BOURDON, D. M.; MARINO, M. H.; MANNING, P. T.; CURRIE, M. G. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. *British Journal of Pharmacology*, v. 118, p. 829-838, 1996.

SANTANGELO, C.; VARI, R.; SCAZZOCCHIO, B.; DI BENEDETTO, R.; FILESI, C.; MASELLA, R. Polyphenols, intracellular signalling and inflammation. *Ann Ist Super Sanita Journal*, v.43, n. 4, p. 394-405, 2007.

SANTOS, M. R. A., LIMA, M. R. Levantamento dos recursos vegetais utilizados como fitoterápicos no município de Cujubim, Rondônia, Brasil. *Saber Científico*, v. 1, n. 1, p. 58-74, 2008.

SANZ, M. J.; HICKEY, M. J.; JOHNSTON, B.; MCCAFFERTY, D. M.; RAHARJO, E.; HUANG, P. L.; KUBES, P. Neuronal nitric oxide synthase (NOS) regulates leukocyte-endothelial cell interactions in endothelial NOS deficient mice. *British Journal of Pharmacology*, v. 134, n. 2, p. 305-312, 2001.

SCHINITZLER, M.; PETEREIT, F.; NAHRSTEDT, A.; Trans-Aconit acid, glucosylflavones and hydroxycinnamoyltartaric acids from the leaves of *Echinodorus grandiflorus* ssp. *aureus*, a Brazilian medicinal plant. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 17, n. 2, p. 149-157, 2007.

SCHNITZLER, M.; PETERIT, F.; NAHRSTEDT, A. Flavon-C-glycosides and Tartaric Acid derivatives from the Brazilian Medicinal Plant *Echinodorus grandiflorus* ssp. *aureus*. In: DPhG JAHRESTAGUNG AND JOINT MEETING, 2004, Munster.

SECCO, D. D.; PARON, J. A.; DE OLIVEIR, S. H.; FERREIRA, S. H.; SILVA, J. S.; CUNHA, F. D. E. Q. Neutrophil migration in inflammation: nitric oxide inhibits rolling, adhesion and induces apoptosis. *Nitric Oxide: Biology and chemistry*, v. 9, n.3, p 153-164, 2004.

SEDIVEC, M. J. ; OVELMEN-LEVITT, J. ; KARP, R.; MENDEL, L. M. Increase in nociceptive input to spinocervical tract neurons following chronic partial deafferentation. *Journal of Neuroscience*, v.3, p.1511-1519, 1983.

SERHAN, C. N. Resolution phase of inflammation: novel endogenous anti-inflammatory and proresolving lipid mediators and pathways. *Annual Review of Immunology*, v. 25, p. 101-137, 2007.

SHIBATA, M.; OHKUBO, T.; TAKAHASHI, H.; INOKI R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. *Pain*, v. 38, p. 347-352, 1989.

SHIN, K.; KIM, I.; PARK, Y.; HA, J.; CHOI, J.; PARK, H.; LEE, Y.; LEE, K. Anti-inflammatory effect of caffeic acid methyl ester and its mode of action through the inhibition of prostaglandin E2, nitric oxide and tumor necrosis factor- α production. *Biochemical Pharmacology*, v. 68, n. 12, p. 2327-2336, 2004.

SHINJI, H.; SEKI, K.; TAJIMA, A.; UCHIDA, A.; MASUDA, S. Fibronectin bound to the surface of *Staphylococcus aureus* induces association of very late antigen 5 and intracellular signaling factors with macrophage cytoskeleton. *Infection and Immunity*, v. 71, n. 1, p. 140-146, 2003.

SILVA, A. G.; BRANDAO, A. B.; CACCIARI, R. S.; SOARES, W. H.. Avanços na elucidação dos mecanismos de ação de *Cimicifuga racemosa* (L.) Nutt. nos sintomas do climatério. *Revista brasileira de plantas medicinais*, v. 11, n. 4, p. 455-464, 2009.

SILVA, M. D. da; DREVECK, S.; ZENI, A. L. B. Estudo etnobotânico de plantas medicinais utilizadas pela população rural no entorno do Parque Nacional da Serra do Itajaí – Indaial. *Revista Saúde e Ambiente / Health and Environment Journal*, v. 10, n. 2, 2009.

SILVÁN, A. M.; ABAD, M. J.; BERMEJO, P.; SOLLHUBER, M.; VILLAR, A. Antiinflammatory activity of coumarins from *Santolina oblongifolia*. *Journal of Natural Products*, v. 59, n. 12, p. 1183-1185, 1996.

SILVEIRA, M.; YOSHIDA, W. B. Isquemia e reperfusão em músculo esquelético: mecanismo de lesão e perspectivas de tratamento. *Jornal Vasculiar Brasileiro*, v. 3, n. 4, p. 367-378, 2004.

SOARES, S.E. Ácidos Fenólicos como antioxidantes. *Review of Nutrition*, v.15, n.1, p.71-81, 2002.

SOMMER, C. Serotonin in pain and analgesia: actions in the periphery. *Molecular neurobiology*, v. 30, p. 117-125, 2004.

SOBRATTEE, M. A.; NEERGHEEN, V. S.; LUXIMON-RAMMA, A.; ARUOMA, O. I.; BAHORUN, T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mutation research: Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, v. 579, n. 1-2, p. 200-213, 2005.

SOUSA, J. B. A. S. P. *Actividade Biológica de derivados do Ácido Cafeico: Efeito antioxidante e anti-inflamatório*. 2008. 78 f. Dissertação (Mestrado em Controlo de Qualidade) – Especialização em Águas e Alimentos, Faculdade de Farmácia. Universidade do Porto, Porto, 2008.

SOUZA, G. C. DE; HAAS, A. P. S.; POSER, G. L. VON; SCHAPOVAL, E. E. S.; ELISABETSKY, E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in

the south of Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 90, n. 1, p. 135-143, 2004.

SPERANDIO, M. Selectins and glycosyltransferases in leukocyte Rolling in vivo. *FEBS Journal*, v. 273, n. 29, p. 4377-4389, 2006.

SPLETTSTOESSER, W. D.; SCHUFF-WERNER, P. Oxidative stress in phagocytes the enemy within. *Microscopy Research and Technique*, v. 57, p. 441-455, 2002.

STAUNTON, D. E.; DUSTIN, M. L.; ERICKSON, H. P.; SPRINGER, T. A. The arrangement of the immunoglobulin-like domains of ICAM-1 and the binding sites for LFA-1 and rhinovirus. *Cell*, v. 61, n. 2, p. 243-254, 1990.

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

SUEMATSU, M.; TAMATANI, T.; DELANO, F. A.; MIYASAKA, M.; FORREST, M.; SUZUKI, H.; SCHMID-SCHONBEIN, G. W. Microvascular oxidative stress preceding leukocyte activation elicited by *in vivo* oxide suppression. *American Journal of Physiology*, v. 266, n. 6, p. 2410-2415, 1994.

SUFKA, K. J.; SCHOMBURG, F. M.; GIORDANO, J. Receptor mediation of 5-HT-induced inflammation and nociception in rats. *Pharmacology Biochemistry & Behavior*, v. 41, p. 53-56, 1991.

TABERNERO, A.; SCHNEIDER, F.; POTENZA, M. A. Cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in omental arteries harvested from patients with severe liver diseases: Imuno-localization and influence on vascular tone. *Intensive Care Medicine*, v. 29, p. 262-270, 2003.

TAMBELI, C. H.; OLIVEIRA, M. C. G.; CLEMENTE, J. T.; PELEGRINI-DASILVA, A.; PARADA, C. A. A Novel mechanism involved in 5-hydroxytryptamin-induced nociception: the indirect activation of primary afferents. *Neuroscience*, v. 141, p.1517-1524, 2006.

TANAKA, C. M. A. (2000). Constituintes químicos de cinco espécies de *Echinodorus* e avaliação do beta pineno como substrato para obtenção de quirons mais elaborados. Universidade Estadual de Campinas.

TANAKA, C. M. A.; SARRAGIOTTO, M. H.; ZUKERMAN-SCHPECTOR, J.;MARSAIOLI, A. J. Cembrane from *Echinodorus grandiflorus*. *Phytochemistry*, v. 44, n. 8, p. 1547-1549, 1997.

TANG, D. G.; CHEN, Y. Q.;NEWMAN, P. J.; SHI, L.; GAO, X.; DIGLIO, C. A.; HONN, K. V.; Identification of PECAM-1 in solid tumor cells and its potential involvement in tumor cell adhesion to endothelium. *Journal of Biological Chemistry*, v. 268, n. 30, p. 22883-22894, 1993.

TEIXEIRA, M. J. *A lesão do trato de Lissauer e do corno posterior da substância cinzenta da medula espinal e a estimulação elétrica do sistema nervoso central para o tratamento da dor por desferentação*. 1990. 256 p. Tese (Doutorado) - São Paulo Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 1990.

TEIXEIRA, M.M.; WILLIAMS, T. J.; HELLEWELL, P. G. E-type prostaglandins enhance local edema formation and neutrophil accumulation but suppress eosinophil accumulation in guinea pig skin. *British Journal of Pharmacology*, v. 110, p. 416-422, 1993.

TEIXEIRA, M. J. Fisiopatologia da nocicepção e da supressão da dor. *JBA, Curitiba*, v.1, n.4, p.329-334, 2001.

TESKE, M., TRENTINI, A. M. *Herbarium: Compêndio de fitoterapia*. 4ª Edição. Curitiba: Herbarium, 2001.

TIBIRIÇÁ, E.; ALMEIDA, A.; CAILLEAUX, S. ; PIMENTA, D. S.; KAPLAN, M. A. C.; LESSA, M. A.; FIGUEIREDO, M. R. Pharmacological mechanisms involved in the vasodilator effects of extracts from *Echinodorus grandiflorus*. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 111, n. 1, p. 50-55, 2007.

TOKUNAGA, A.; SAIKA, M.; SENBA, E. 5-HT_{2A} receptor subtype is involved in the thermal hyperalgesic mechanism of serotonin in the periphery. *Pain*, v. 76, p. 349-355, 1998.

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

VALLANCE, B. A.; DIJKSTRA, G.; QIU, B.; VAN DER WAAIJ, L. A.; VAN GOOR, H.; JANSEN, P. L.; MASHIMO, H.; COLLINS, S. M. Relative contributions of NOS isoforms during experimental colitis: endothelial-derived NOS maintains mucosal integrity. *American Journal Physiology: Gastrointest Liver Physiol*, v. 287, n. 4, p. 865-874, 2004.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C. O gênero *copaifera L.*. *Química Nova*, v.25, n.2, p. 273-286, 2002.

VINEGAR, R.; TRUAX, J.F.; SELOH, J.L. Some quantitative temporal characteristics of carrageenin-induced pleurisy in the rats. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, v.143, p.711-714, 1973.

WAGNER, H.; WIESENAUER, M. *Fitoterapia: fitofármacos, farmacologia e aplicações clínicas*. 2. ed. São Paulo: Pharmabooks, 2006.

WALTERS, E. T. Injury-related behavior and neuronal plasticity: An evolutionary perspective on sensitization, hyperalgesia and analgesia. *International Review of Neurobiology*, v. 36, p. 325-427, 1994.

WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. B. C. Princípios gerais no tratamento da inflamação. In: FUCHS, F. D.; WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. B.C. Farmacologia clínica. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. cap 22. p 294-295.

WEST, N. E. J.; QIAN, H. S.; GUZIK, T. J., et al. Nitric oxide synthase (nNOS) gene transfer modifies venous bypass graft remodeling: effects on vascular smooth muscle cell differentiation and superoxide production. *Circulation*, v. 104, p 1526-1532, 2001.

WIEDLE, G.; DUNON, D.; IMHOF, B. A. Current concepts in lymphocyte homing and recirculation. *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, v. 38, n. 1, p. 1-31, 2001.

WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, n. 111, p. 544-547, 1962.

WRIGHT A. Recent concepts in the neurophysiology of pain. *Manual Therapy* , v. 4, p. 196-202, 1999.

XIE, Q. W.; KASHIWABARA, Y.; NATHAN, C. Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 269, p. 4705-4708, 1994.

YANG, L.; FROIO, R. M.; SCIUTO, T. E.; DVORAK, A. M.; ALON, R.; LUSCINSKAS, F. W. ICAM-1 regulates neutrophil adhesion and transcellular migration of TNF-alpha-activated vascular endothelium under flow. *Blood*. v. 15, p. 584-592, 2005.

YANG, W.; SHIMAOKA, M.; CHEN, J.; SPRINGER, T. A. Activation of integrin beta-subunit I-like domains by one-turn C-terminal alpha-helix deletions. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 24, p. 2333-2338, 2004.

Yoon, J. H.; Baek, S.J. Molecular Targets of Dietary Polyphenols with anti-inflammatory Properties. *Yonsei Medical Journal*, v. 46, n. 5, p. 585-596, 2005.

YOSHIDA, W. B. Radicais livres na síndrome da isquemia e reperfusão. *Angiologia e Cirurgia Vacular*, v. 12, p. 82-95, 1996.

ZERAIK, M. L.; PEREIRA, C. A. M.; ZUIN, V. G.; YARIWAKE, J. H. Maracujá: um alimento funcional? *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 20, n.3, p. 459-471, 2010.

8. ANEXOS

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PRO-REITORIA DE PESQUISA
Comissão de Ética na Experimentação Animal

CERTIFICADO

Certificamos que o Protocolo nº. 042/2011 – CEEA sobre “ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS DOS EXTRATOS DE ECHINODORUS GRANDIFLORUS EM RATOS”; projeto de pesquisa sob a responsabilidade de DANIEL SALES PIMENTA E LUCIANA MOREIRA CHEDIER, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO de ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 01/11/2011.

CERTIFICATE

We certify that the protocol nº 042/2011 - CEEA about “ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS DOS EXTRATOS DE ECHINODORUS GRANDIFLORUS EM RATOS” – DANIEL SALES PIMENTA E LUCIANA MOREIRA CHEDIER, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH (CEEA) in 01/11/2011.

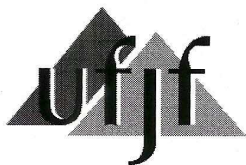
Juiz de Fora, 09 de novembro de 2011.



Presidente/CEEA



Secretário/CEEA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
PRO-REITORIA DE PESQUISA
Comissão de Ética na Experimentação Animal

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o Protocolo nº. 043/2011 – CEEA sobre “ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS DOS EXTRATOS DE ECHINODORUS GRANDIFLORUS EM CAMUNDONGOS”; projeto de pesquisa sob a responsabilidade de DANIEL SALES PIMENTA E LUCIANA MOREIRA CHEDIER, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal, adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), e foi aprovado pela COMISSÃO de ÉTICA NA EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (CEEA) da PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF, em reunião realizada em 01/11/2011.

C E R T I F I C A T E

We certify that the protocol nº 043/2011 - CEEA about “ATIVIDADES FARMACOLÓGICAS DOS EXTRATOS DE ECHINODORUS GRANDIFLORUS EM CAMUNDONGOS” – DANIEL SALES PIMENTA E LUCIANA MOREIRA CHEDIER, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Research adopted by Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA) and was approved by the PRÓ-REITORIA DE PESQUISA/UFJF – ETHICAL COMMITTEE FOR ANIMAL RESEARCH (CEEA) in 01/11/2011.

Juiz de Fora, 09 de novembro de 2011.

Presidente/CEEA

Secretário/CEEA