



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
NÚCLEO DE PESQUISAS EM PLANTAS MEDICINAIS – NPPM
“Prof. Paulo Humberto Moreira Nunes”
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA
(NÍVEL MESTRADO)

Estudo do efeito antinociceptivo de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. (Rutaceae): Possível envolvimento dos sistemas opióide, serotoninérgico, vanilóide e glutamatérgico

SERGIO DA SILVA PEREIRA

TERESINA, 2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
NÚCLEO DE PESQUISAS EM PLANTAS MEDICINAIS – NPPM
“Prof. Paulo Humberto Moreira Nunes”
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA
(NÍVEL MESTRADO)

Estudo do efeito antinociceptivo de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. (Rutaceae): Possível envolvimento dos sistemas opióide, serotoninérgico, vanilóide e glutamatérgico

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, do Núcleo de Pesquisas em Plantas Mediciniais do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Piauí, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Farmacologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Fernanda Regina de Castro Almeida

TERESINA
2009

P436e Pereira, Sergio da Silva

Estudo do efeito antinociceptivo de *Zanthoxylum rhoifolium*. Lam (Rutaceae): Possível envolvimento dos sistemas opióide, serotoninérgico, vanilóide e glutamatérgico/Sergio da Silva Pereira. Teresina: 2009

122 fls.

Dissertação (Mestrado em Farmacologia) UFPI.

1. Antinociceptivo. 2. Glutamato. 3. Lupeol. 4. *Zanthoxylum rhoifolium*. I. Título. CDD-615.783

SERGIO DA SILVA PEREIRA

Estudo do efeito antinociceptivo de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. (Rutaceae): Possível envolvimento dos sistemas opióide, serotoninérgico, vanilóide e glutamatérgico

Dissertação aprovada em _____ de 2009.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Fernanda Regina de Castro Almeida
(Orientadora)
Universidade Federal do Piauí

Prof^a. Dr^a. Francisca Cléa Florenço de Sousa
Universidade Federal do Ceará

Prof^a. Dr^a. Salete Maria da Rocha Cipriano Brito
Universidade Federal do Piauí

“Eu creio em mim mesmo.

Creio nos que trabalham comigo,

Creio nos meus amigos e creio na minha família.

Creio que Deus me emprestará tudo que necessito para triunfar, contanto que eu me esforce para alcançar com meios lícitos e honestos.

Creio nas orações e nunca fecharei meus olhos para dormir, sem pedir antes a devida orientação a fim de ser paciente com os outros e tolerante com os que não acreditam no que eu acredito.

Creio que o triunfo é resultado de esforço inteligente, que não depende da sorte, da magia, de amigos, companheiros duvidosos ou de meu chefe.

Creio que tirarei da vida exatamente o que nela colocar. Serei cauteloso quando tratar os outros, como quero que eles sejam comigo. Não caluniarei aqueles que não gosto. Não diminuirei meu trabalho por ver que os outros o fazem. Prestarei o melhor serviço de que sou capaz, porque jurei a mim mesmo triunfar na vida, e sei que o triunfo é sempre resultado do esforço consciente e eficaz. Finalmente, perdoarei os que me ofendem, porque compreendo que às vezes ofendo os outros e necessito de perdão.”

Mahatma Gandhi

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

A Deus, que nos dá força para lutar pelos nossos sonhos, pela fé e determinação para concluir este trabalho.

Aos meus pais, Rita e José Joaquim, meu porto seguro, a meus irmãos (Sônia, Suzana, Suely, Sandra, Pretinha, Francisco, Joaquim) pelo incentivo, apoio sempre constante, aos meus sobrinhos pelo companheirismo.

Aos grandes Amigos, Adriano, Sara, Luciane, Celyane, Flávia Fracelli, Fernandinha C.B.C, Giuliano, Edvaldo, Henrique, Wellington, Renato, Karla pela amizade, apoio, pelos momentos de alegria, companheirismo.

Agradeço em especial à minha orientadora Prof^ª. Dr^ª. Fernanda Regina de Castro Almeida, pela inestimável orientação, principal responsável pelo meu crescimento científico. Agradeço pela confiança em mim depositada, pela amizade, apoio, rigidez, paciência e incentivo constantes, pelo exemplo de competência e dedicação.

À Prof^ª. Dr^ª. Mariana Helena Chaves, pela parceria e estímulo, aos colegas da Química (Jocélia, Everton, Buana, Isabella, Daniela) pela ajuda e amizade.

Aos meus amigos, Luciano, Rose, Kayo e Rosana que são os responsáveis diretos pela realização deste trabalho, agradeço pelo apoio, carinho e respeito que mantiveram por mim, além da amizade. Muito Obrigado!

A todos os colegas do mestrado (Daniel, Fernandinha, Hélio, Cristiano, Débora, Evaldo, Denise, Maurício, Joubert) pelo respeito, amizade e conhecimentos transmitidos.

Ao amigo Sr. Carlos, funcionário do Núcleo, pela cumplicidade e convívio, e a todas as pessoas do Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais pelos momentos de alegria.

A todos os professores da Pós-Graduação em Farmacologia da UFPI, pelo aprendizado (meu) e paciência (deles), pelos esclarecimentos, e conselhos.

RESUMO

Estudo do efeito antinociceptivo de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. (Rutaceae): Possível envolvimento dos sistemas opióide, serotoninérgico, vanilóide e glutamatérgico. Sergio da Silva Pereira. Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Regina de Castro Almeida. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia. Núcleo de Pesquisas em Plantas Mediciniais, Universidade Federal do Piauí, 2009.

A *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. (Rutaceae) é conhecida como mamica de cadela, utilizada popularmente para dores de dente e ouvido, antiofídica, antitumoral (casca). O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito antinociceptivo do extrato etanólico das cascas do caule desta espécie (EEtOHZr) e suas frações de partição (Hexânica-F.HEX, Acetato de Etila-F.AcOEt, Aquosa-F.AQ), assim como do lupeol, um triterpeno obtido de F.HEX, em modelos de dor aguda, além dos possíveis mecanismos de ação envolvidos. Camundongos Swiss machos e fêmeas (25-35 g; n=6-12 animais/grupo), foram utilizados na avaliação da toxicidade aguda e nos testes de nocicepção (Comitê de Ética Animal/UFPI, parecer N^o. 09/2008). Os animais não apresentaram toxicidade aguda ao receberem EEtOHZr (até 4 g/kg, p.o.), não sendo possível o cálculo da DL₅₀. No teste da formalina (2 %; 20 µL/i.pl.), quantificou-se o tempo que o animal lambia a pata estimulada durante 0-5 (fase A) e 15-30 min (fase B), após o tratamento com EEtOHZr, F.HEX, F.AcOEt ou salina (60 min antes, p.o.) e morfina-MOR (5 mg/kg, s.c.) 30 min antes. EEtOHZr, F.HEX e F.AcOEt (62,5-250 mg/kg) apresentaram efeito significativo e comparável à MOR. No teste da capsaicina (20 µL, 2 µg/pata) quantificou-se o tempo de lambadura da pata estimulada (5 min), após a administração de EEtOHZr, F.HEX, F.AcOEt, F.AQ, salina e MOR. EEtOHZr, F.HEX e F.AcOEt apresentaram efeito antinociceptivo significativo, ao contrário da F. AQ, que se mostrou inefetiva. Num outro método quantificou-se o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético (0,75 % i.p., 20 min), após o tratamento com EEtOHZr (250 e 500 mg/kg), salina e MOR. EEtOHZr não reduziu o número de contorções abdominais nas doses utilizadas. No teste do glutamato (20 µL, 10 µmol/pata), foi quantificado o tempo de lambadura da pata estimulada (15 min), após tratamento com EEtOHZr, F.HEX, F.AcOEt, F. AQ, lupeol, salina ou MK801 (0,03 mg/kg, i.p.). EEtOHZr, F.HEX, F.AcOEt e o lupeol diminuíram a resposta nociceptiva, enquanto que a F.AQ não apresentou efeito significativo. No estudo dos mecanismos envolvidos nos efeitos de F.HEX e lupeol no método do glutamato, o tratamento com naloxona (2 mg/kg, i.p.), 20 min antes de F.HEX (125 mg/kg), lupeol (12,5 mg/kg), salina ou MOR (5 mg/kg, s.c.), reverteu o efeito da F.HEX e lupeol; o mesmo ocorrendo após a Cetanserina (0,3 mg/Kg, i.p.) e L-arginina (600 mg/kg, i.p.), mas não com Pindolol (1 mg/Kg, i.p.) ou Ondansetrona (0,5 mg/Kg, i.p.). EEtOHZR (250 mg/kg p.o.) não alterou a locomoção dos animais no campo aberto ou rota rod, sugerindo inexistência de efeito depressor central e relaxante muscular. O lupeol é um dos principais constituintes da F.HEX com ação antinociceptiva, cujo efeito parece envolver os sistemas opióide e serotoninérgico (via 5-HT_{2A}), além da inibição da via L-arginina - óxido nítrico. Os resultados obtidos confirmam o uso popular da referida espécie.

Palavras Chave: *Zanthoxylum rhoifolium*, antinociceptivo, glutamato, lupeol.

ABSTRACT

Study of antinociceptive effect of *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. (Rutaceae): Possible involvement of opioid, serotonergic, vanilloid and glutamatergic systems. Sergio da Silva Pereira. Supervisor: Prof^a. Dr^a. Fernanda Regina de Castro Almeida. Master degree. Post-Graduate Program in Pharmacology. Medicinal Plants Research Center, Federal University of Piauí, 2009.

The *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. (Rutaceae) is known as “mamica de cadela”, popularly used for tooth and ear painful conditions, like antiofidic and antitumour (bark). The objective of this study was to investigate the antinociceptive effect of ethanolic extract from stem bark of this species (EEtOHZr), its fractions of partition (hexane-F.HEX, ethyl acetate-F.AcOEt, aqueous-F.AQ) and lupeol, a triterpene obtained from F. HEX in models of acute pain, in addition to the possible mechanisms of action involved. Male and female Swiss mice (25-35 g, n = 6-12 animals / group) were used in the evaluation of acute toxicity and nociception (Ethics Committee Animal/UFPI, N^o. 09/2008). The animals showed no acute toxicity to EEtOHZr (up to 4g/kg po), so it was not possible to calculate the LD50. In the formalin test (2%, 20 μ L/paw), the licking time of stimulated paw was quantified during 0-5 (phase A) and 15-30 min (phase B), after oral treatment with EEtOHZr, F. HEX, F. AcOEt or saline (60 min before) and morphine-MOR (5 mg/kg, s.c.) 30 min before. EEtOHZr, F. HEX and F. AcOEt (62,5-250 mg/kg) produced significant and MOR comparable antinociceptive effect. The testing of capsaicin (2 μ g/20 μ L/paw) was quantified by the licking time of stimulated paw during 5 min, after administration of EEtOHZr, F. HEX, F. AcOEt, F. AQ, saline and MOR. EEtOHZr, F. HEX and F. AcOEt showed significant antinociceptive effect, in contrast to F. AQ, which was ineffective. In another method, the number of acetic acid induced writhings (0.75% ip, 20 min) was quantified after treatment with EEtOHZr (250 and 500 mg/kg), saline or MOR. EEtOHZr did not reduce the number of acetic acid induced writhings in these doses. The licking time of glutamate stimulated paw (10 μ mol/20 μ L) was measured (15 min) after treatment with EEtOHZr, F. HEX, F. AcOEt, F. AQ, lupeol, saline or MK801 (0.03 mg/kg, i.p.). EEtOHZr, F. HEX, F. AcOEt and lupeol reduced the nociceptive response, while F. AQ had no significant effect. In the study of mechanisms involved in F. HEX and lupeol effects during glutamate induced nociception, treatment with naloxone (2 mg/kg, i.p.) 20 min before F. HEX (125 mg/kg), lupeol (12.5 mg/kg), saline or MOR (5 mg/kg, s.c.), reversed lupeol and F. HEX antinociceptive effect, the same occurred after ketanserin (0.3 mg/kg, i.p.) and L-arginine (600 mg/kg, i.p.), but not with pindolol (1 mg/kg, i.p.) or ondansetron (0.5 mg/kg, i.p.). EEtOHZR (250 mg/kg, p.o.) did not alter the locomotion of animals in open field or rota rod tests, suggesting lack of central depressant effect and muscle relaxation. Lupeol appears to be a major antinociceptive constituent from the F. HEX, and its effect seems to involve the activation of opioid and serotonergic (via 5-HT_{2A}) systems, and the inhibition of L-arginine - nitric oxide pathway. The results confirm the medicinal use of this plant.

Keywords: *Zanthoxylum rhoifolium*, antinociceptive, glutamate, lupeol.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE ABREVIATURAS

1. INTRODUÇÃO.....	24
1.1. Dor e Nocicepção.....	25
1.2. Neurotransmissão da dor.....	25
1.3. Mediação química da resposta nociceptiva.....	29
1.4. Modulação da informação nociceptiva.....	30
1.5. Farmacologia da dor.....	32
1.6. Produtos naturais.....	33
1.7. Plantas do gênero <i>Zanthoxylum</i>	36
1.8. <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> Lam. (Rutaceae).....	40
2. OBJETIVOS.....	44
2.1. Objetivo geral.....	45
2.2. Objetivos específicos.....	45
3. MATERIAL e MÉTODOS.....	46
3.1. Drogas e reagentes.....	47
3.2. Equipamentos.....	48
3.3. Obtenção do extrato bruto e frações de partição.....	48
3.4. Isolamento e purificação dos constituintes químicos.....	49
3.5. Avaliação Farmacológica.....	51
3.5.1. Animais.....	51
3.5.2. Toxicidade aguda em camundongos.....	51

3.5.3. Avaliação da atividade antinociceptiva.....	51
3.5.3.1.Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina (2%) em camundongos.....	51
3.5.3.2.Teste de contorções abdominais induzidas pela injeção de ácido acético em camundongos.....	52
3.5.3.3.Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina em camundongos.....	53
3.5.3.4.Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato em camundongos.....	53
3.5.4. Estudo dos possíveis mecanismos de ação antinociceptiva da fração Hexânica do EEtOHZR em camundongos.....	54
3.5.4.1.Participação do sistema opióide no efeito antinociceptivo da fração hexânica.....	54
3.5.4.2.Participação da via L-arginina-óxido nítrico no efeito antinociceptivo da fração hexânica e do lupeol.....	54
3.5.4.3.Participação do sistema serotoninérgico no efeito antinociceptivo da fração hexânica e do lupeol.....	54
3.5.5. Avaliação da atividade motora.....	55
3.5.5.1.Efeito sobre a performance motora no modelo do “Rota Rod”..	55
3.5.5.2.Avaliação da atividade motora espontânea de camundongos no modelo do campo aberto.....	55
3.6. Análise estatística.....	56

4. RESULTADOS.....	57
4.1. Toxicidade aguda em camundongos.....	58
4.2. Avaliação da atividade antinociceptiva.....	59
4.2.1. Nocicepção induzida por formalina em camundongos.....	59
4.2.2. Contorções induzidas por ácido acético em camundongos.....	60
4.2.3. Nocicepção induzida por capsaicina em camundongos.....	60
4.2.4. Nocicepção induzida por glutamato em camundongos.....	70
4.3.0. Estudo dos possíveis mecanismos de ação antinociceptiva da fração hexânica do EEtOHZr em camundongos.....	71
4.3.1. Participação do sistema opióide no efeito antinociceptivo da fração hexânica e do lupeol.....	71
4.3.2. Participação da via L-arginina-óxido nítrico no efeito antinociceptivo da fração hexânica e do lupeol.....	71
4.3.3. Participação do sistema serotoninérgico no efeito antinociceptivo da fração hexânica e do lupeol.....	85
4.4. Avaliação da atividade motora.....	85
4.4.1. Efeito sobre a performance motora de camundongos no modelo do “Rota Rod”.....	85
4.4.2. Avaliação da atividade exploratória de camundongos no modelo do campo aberto.....	85

5. DISCUSSÃO.....	92
6. CONCLUSÕES.....	103
7. REFERÊNCIAS.....	105
8. ANEXOS.....	120
8.1. Espectro de RMN ^1H do lupeol (CDCl_3 , 500 MHz).....	121
8.2. Espectro de RMN ^{13}C do lupeol (CDCl_3 , 125 MHz).....	122
8.3. Espectro de RMN ^{13}C do lupeol – DEPT 135° (CDCl_3 , 125 MHz)...	123

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01: Fotografia da espécie <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> Lam.....	41
FIGURA 02: Fotografia ilustrando o caule de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> Lam.....	41
FIGURA 03: Estrutura Molecular do Lupeol.....	43
FIGURA 04: Obtenção das frações do extrato etanólico de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> Lam. (Rutaceae).....	50
FIGURA 05: Efeito do extrato etanólico de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> (EEtOHZr) sobre a nocicepção induzida por formalina em camundongos.....	62
FIGURA 06: Efeito da fração hexânica (F. HEX) sobre a nocicepção induzida por formalina em camundongos.....	63
FIGURA 07: Efeito da fração acetato de etila (F. AcOEt) sobre a nocicepção induzida por formalina em camundongos.....	64
FIGURA 08: Efeito do extrato etanólico de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> (EEtOHZr) sobre a nocicepção induzida pelo ácido acético em camundongos	65
FIGURA 09: Efeito do extrato etanólico da <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> (EEtOHZr) sobre a nocicepção induzida pela capsaicina em camundongos.....	66
FIGURA 10: Efeito da fração hexânica (F. HEX) sobre a nocicepção induzida pela capsaicina em camundongos.....	67
FIGURA 11: Efeito da fração acetato de etila (F. AcOEt) sobre a nocicepção induzida pela capsaicina em camundongos.....	68
FIGURA 12: Efeito da fração aquosa (F. AQ) sobre a nocicepção induzida pela capsaicina em camundongos.....	69
FIGURA 13: Efeito do extrato etanólico de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i> (EEtOHZr) sobre a nocicepção induzida pelo glutamato em camundongos.....	72
FIGURA 14: Efeito da fração hexânica (F. HEX) sobre a nocicepção induzida pelo glutamato em camundongos.....	73
FIGURA 15: Efeito da fração acetato de etila (F. AcOEt) sobre a nocicepção induzida pelo glutamato em camundongos.....	74

FIGURA 16: Efeito da fração aquosa (F. AQ) sobre a nocicepção induzida pelo glutamato em camundongos.....	75
FIGURA 17: Efeito do lupeol sobre a nocicepção induzida pelo glutamato em camundongos.....	76
FIGURA 18: Efeito da fração hexânica (F. HEX) sobre a nocicepção induzida pelo glutamato associado com naloxona em camundongos.....	78
FIGURA 19: Efeito do lupeol sobre a nocicepção induzida pelo glutamato associado com naloxona em camundongos.....	80
FIGURA 20: Efeito da fração hexânica (F. HEX) sobre a nocicepção induzida pelo glutamato associado com L- arginina em camundongos.....	82
FIGURA 21: Efeito do lupeol sobre a nocicepção induzida pelo glutamato associado com L- arginina em camundongos.....	84
FIGURA 22: Efeito da fração hexânica (F. HEX) sobre a nocicepção induzida pelo glutamato associado com os antagonistas serotoninérgicos em camundongos.....	87
FIGURA 23: Efeito do lupeol sobre a nocicepção induzida pelo glutamato associado com associado com a centanserina em camundongos.....	89
FIGURA 24: Efeito do EEtOHZr sobre a performance motora em camundongos no teste do rota rod.....	90
FIGURA 25: Efeito do EEtOHZr sobre a frequência de locomoção em camundongos no teste de campo aberto.....	91

LISTA DE TABELAS

TABELA 01: Avaliação da toxicidade aguda do extrato etanólico (EEtOHZr) da casca de <i>Zanthoxylum rhoipholium</i> Lam. (Rutaceae) em camundongos	58
TABELA 02: Observação do efeito antinociceptivo da fração hexânica associado com naloxona no teste de glutamato em camundongos....	77
TABELA 03: Observação do efeito antinociceptivo do lupeol associado com naloxona no teste de glutamato em camundongos.....	79
TABELA 04: Observação do efeito antinociceptivo da fração hexânica associado com L- arginina no teste de glutamato em camundongos...	81
TABELA 05: Observação do efeito antinociceptivo do lupeol associado com L- arginina no teste de glutamato em camundongos.....	83
TABELA 06: Observação do efeito antinociceptivo da fração hexânica associado com os antagonistas serotoninérgicos no teste de glutamato em camundongos.....	86
TABELA 07: Observação do efeito antinociceptivo do lupeol associado com Cetanserina no teste de glutamato em camundongos.....	88

LISTA DE ABREVIATURAS

δ	Delta
κ	Kappa
μ	mi
μg	Microgramas
μL	Microlitros
μmol	Micromol
AcOEt	Acetato de etila
<i>ad libitum</i>	à vontade
AMPA	DL- α -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazole-propiónico
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
BK	Bradicinina
Ca⁺⁺	Cálcio
CGRP	Peptídio Relacionado ao Gene de Calcitonina
CENAUREMN	Centro Nordeste de Aplicação e uso da Ressonância Magnética Nuclear
DPPH	radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila
E. P. M.	Erro Padrão da Média
EEtOHZr	Extrato etanólico de <i>Zanthoxylum rhoifolium</i>
F. AcOEt	Fração acetato de etila
F. AQ	Fração aquosa

F. HEX	Fração hexânica
IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor
IL-1β	Interleucina-1beta
IL- 8	Interleucina- 8
i.p	Via intraperitoneal
K⁺	Potássio
L-NOARG	N ω -nitro-L-arginina
MeOH	Metanol
MOR	Morfina
Na⁺	Sódio
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
PGs	Prostaglandinas
PGE₂	Prostaglandina E ₂
PGF₂	Prostaglandina F ₂
p.o.	Via oral
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
r.p.m	Rotações por minuto

s.c.	Via subcutânea
SNC	Sistema Nervoso Central
SAMP	Sistema ascendente multissináptico propriespinal
SP	Substância P
SPCD	Sistema pós-sináptico da coluna dorsal
TNFα	Fator de necrose tumoral alfa
TRPV-1	Receptor vanilóide do tipo 1
TSC	Trato espinocervical
TSM	Trato espinomesencefálico
TSR	Trato espinorreticular
TST:	Trato espinotalâmico
WDR:	Wide dynamic range (neurônios de ampla faixa dinâmica)
5HT:	5-hidroxitriptamina (Serotonina)

INTRODUÇÃO

1- INTRODUÇÃO

1.1. Dor e Nocicepção

1.2. Neurotransmissão da dor

A dor é definida segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor, como uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a dano tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de tal lesão (TENG, 2003). No Brasil e em outros países, 10 a 50 % dos indivíduos procuram clínicas-gerais por causa da dor. A dor está presente em mais de 70 % dos pacientes que buscam os consultórios brasileiros por motivos diversos, sendo a razão de consultas médicas em um terço dos casos (ROCHA et al., 2007).

A dor é uma experiência singular influenciada por diversos elementos tais como emoção, cognição, memória e construção social. Embora seja conveniente falar da dor em termos anatômicos, fisiológicos e farmacológicos, deve-se considerar que muitos outros fatores estejam envolvidos (FARQUHAR-SMITH et al., 2007).

Do ponto de vista temporal a dor pode ser classificada em dois grupos: *dor aguda* (de curta duração, surge do trauma de tecidos moles ou da resposta inflamatória a esta lesão e desaparece com a resolução do processo patológico) e *dor crônica* (de longa duração, pode manifestar-se espontaneamente ou ser provocada por vários estímulos externos, sendo associada a processos patológicos crônicos) (ALMEIDA et al., 2004).

Alguns conceitos importantes para a compreensão dos mecanismos da fisiopatologia da dor incluem a alodínia, hiperalgesia e nocicepção (ZIMMERMANN, 2001; FARQUHAR-SMITH et al., 2007). A alodínia seria uma resposta dolorosa mediante um estímulo que normalmente não provoca dor, uma condição que podemos observar na dor neuropática ou neurogênica, um estado de natureza complexa que se origina devido a lesões de nervos periféricos ou do Sistema Nervoso Central. A hiperalgesia é conceituada como sendo o aumento da resposta dolorosa produzida por um estímulo nocivo.

Pode ser primária e secundária, sendo que a hiperalgesia primária está associada diretamente à região da lesão tecidual, e a hiperalgesia secundária é aquela que se estende para áreas adjacentes, normalmente ocorre na região que circunda a lesão tecidual. Finalmente, o termo nocicepção é utilizado para definir uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a uma lesão real ou potencial. Essa resposta por sua vez é composta por componentes bastante complexos que são transdução, transmissão e modulação de sinais neurais gerados a um estímulo nocivo externo.

Os processos fisiológicos associados com o reconhecimento da dor compreendem três mecanismos básicos: a **transdução**, que é a transformação de um estímulo nociceptivo (mecânico, térmico ou químico) em estímulo elétrico nas terminações sensoriais livres (nociceptores); **transmissão**, que é o movimento de atividade elétrica, desde as fibras A δ e C dos aferentes periféricos até os centros nervosos superiores; **modulação**, que é a diminuição ou modificação na transmissão da atividade elétrica pelos nociceptores; e a **percepção**, que envolve o processamento cognitivo dos aspectos sensorial-discriminativo e afetivo-motivacional do processo álgico e a respectiva resposta comportamental (LOIOLA, 2007).

As fibras A δ mielinizadas e as fibras C não-mielinizadas possuem a capacidade de transmitir estímulos dolorosos em diferentes velocidades. As fibras A δ , em função da presença da bainha de mielina, transmitem o estímulo nociceptivo de forma rápida, enquanto as fibras C conduzem o estímulo nociceptivo com baixa velocidade (ROCHA et al. 2007; JULIUS, BASBAUM, 2001).

As fibras C e algumas fibras A δ inervam os corpos celulares nas lâminas I e II, enquanto outras fibras A penetram mais profundamente no corno posterior (lâmina V e VI, como também na lâmina X). As fibras A β são fibras de maior calibre, mielinizadas e de rápida condutância, transmitem a informação de estímulos mecânicos inócuos para as lâminas profundas (III-IV), e as células nas lâminas I e V dão origem às principais vias de projeção do corno posterior ao tálamo (MILLAN, 2002).

As fibras sensoriais delgadas tendem a responder a estímulos nocivos propriamente ditos ou relacionados à nocicepção, dessa forma tais fibras são especialmente chamadas de nociceptores. A maioria dos nociceptores responde a estímulos mecânicos e térmicos nocivos, mas também responde a estímulos químicos, tais como a capsaicina, um produto natural obtido da pimenta vermelha, sendo então considerados polimodais. Em mamíferos, a exposição de nociceptores à capsaicina leva inicialmente à excitação neuronal, à percepção da dor e à liberação local de mediadores inflamatórios, via receptores vanilóides TRPV1, que são proteínas receptoras de potencial transitório, canais de cátions não-seletivos com permeabilidade variável ao Ca^{2+} , pertencentes à família de canais iônicos operados por voltagem. Esses receptores são também ativados por estímulo térmico nocivo ($>43^{\circ}\text{C}$) e ácidos, o que leva a efeitos adversos em tecidos inflamados ou isquêmicos (LEE et al., 2005). Com a exposição prolongada, os terminais tornam-se insensíveis à capsaicina, bem como a outros estímulos nocivos. Este fenômeno de dessensibilização do nociceptor fundamenta o uso paradoxal dessa substância como analgésico, no tratamento de condições dolorosas, desde neuropatias diabética e viral à artrite reumatóide (CATERINA et al., 1997).

Os neurônios de segunda ordem ou axônios de células de projeção, cujos corpos celulares na medula se encontram no corno posterior, vão ascender sob a forma de feixes ou tratos até o Sistema Nervoso Central, o que se denomina de sistema nociceptivo ascendente, que inclui um conjunto de seis tratos (ALMEIDA et al. 2004; KLAUMANN et al. 2008).

1. Trato espinotalâmico (TST): é basicamente composto por neurônios nociceptivos específicos e axônios de neurônios de largo espectro (“wide dynamic range”- WDR) das lâminas I e V – VII da medula espinhal, esses neurônios projetam-se no sentido contralateral até o tálamo, apresentam duas subdivisões, sendo a projeção lateral chamada de neoespinotalâmico e a projeção mediana, juntamente com o trato espinoreticular (TSR) e Trato espinomesencefálico (TSM), chamados de palioespinotalâmico, também denominado de sistema ascendente paramediano, é considerado a via nociceptiva mais importante (ALMEIDA et al. 2004; KLAUMANN et al. 2008).

2. Trato espinoreticular (TSR): é uma via que desempenha importante papel nos mecanismos da dor, compreende axônios de neurônios das lâminas VII e VIII que terminam na formação reticular (bulbar e pontina), para logo ascender até o tálamo, sendo que muitos deles ascendem sem cruzar a linha média. É considerada a via mais direta entre a medula e a formação reticular (ALMEIDA et al. 2004; KLAUMANN et al. 2008).

3. Trato espinomesencefálico (TSM): compreende axônios das lâminas I e IV e os neurônios parabraquiais que se projetam até a amígdala, um dos principais componentes do sistema límbico, o que sugere que o trato espinomesencefálico participa do componente afetivo da dor. Os tratos espinoreticular e espinomesencefálico fazem parte do sistema medial de condução de estímulos dolorosos (ALMEIDA et al., 2004; KLAUMANN et al., 2008).

4. Sistema pós-sináptico da coluna dorsal (SPCD): pode transmitir impulsos dolorosos apenas de forma eventual e alternativa, pois as lesões da coluna dorsal não alteram o limiar da dor, originam-se principalmente nas lâminas III e IV e sua destinação é, primeiramente, os núcleos da coluna dorsal (ALMEIDA et al. 2004; KLAUMANN et al. 2008).

5. Trato espinocervical (TSC): compreende axônios provenientes das lâminas III e IV, suas fibras fazem uma conexão sináptica no núcleo cervical lateral e no primeiro e segundo segmentos cervicais, para logo chegar ao tálamo através do trato cervicotálamico, normalmente esse sistema pouco participa do processo de condução de impulso doloroso em seres humanos (ALMEIDA et al. 2004; KLAUMANN et al. 2008).

6. Sistema ascendente multissináptico propioespinal (SAMP): acredita-se ter um importante papel no processo de condução nociceptiva, sobretudo de injúrias viscerais, tem sido demonstrado experimentalmente em ratos, sendo que, posteriormente, sugeriu-se que esse sistema poderia ter importante função na dor crônica (ALMEIDA et al. 2004; KLAUMANN et al. 2008).

1.3. Mediação química da resposta nociceptiva

A lesão do tecido e do neurônio resulta em sensibilização de nociceptores pela ação de substâncias químicas denominadas algogênicas, presentes no ambiente tissular, tais como acetilcolina, bradicinina (BK), histamina, leucotrienos, substância P (SP), fator de ativação plaquetário, radicais ácidos, íons potássio, prostaglandinas (PGs), tromboxanos, interleucinas, fator de necrose tumoral (TNF α), fator de crescimento nervoso (NGF), monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) e Peptídio Relacionado ao Gene de Calcitonina (CGRP) (ROCHA et al., 2007).

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório, mais importante e amplamente distribuído no Sistema Nervoso Central, onde participa de diversos eventos fisiológicos e patológicos. Seus receptores estão criticamente envolvidos na transmissão nociceptiva aferente primária, tanto no desenvolvimento quanto na manutenção da resposta nociceptiva (GAVIRAGHI, 2000; CARLTON, 2001). Neste sentido, as lesões periféricas induzem plasticidade em estruturas supraespinhais por meio de mecanismos que envolvem tipos específicos de receptores para o glutamato. Após a agressão tecidual há liberação de neurotransmissores, como a somatostatina, peptídeo geneticamente relacionado com a calcitonina, neurocinina-A, glutamato e aspartato. Essas substâncias estão relacionadas com a ativação de potenciais pós-sinápticos excitatórios e dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) e não-NMDA. Estímulos frequentes das fibras aferentes geram a somação dos potenciais de ação e conseqüente despolarização pós-sináptica cumulativa. Depois da ativação de receptores NMDA pelo glutamato, há remoção do íon magnésio do interior do receptor e o influxo de cálcio para a célula, o que resulta na amplificação e prolongamento da resposta ao impulso doloroso (ROCHA et al., 2007).

O óxido nítrico (NO) apresenta um papel dúbio no organismo, às vezes benéfico, outras vezes prejudicial. O aumento ou a redução da produção de óxido nítrico pode contribuir para o desenvolvimento de várias condições patológicas (asma, artrite reumatóide, lesões ateroscleróticas, tuberculose, Alzheimer e doenças cardiovasculares) (DUSSE et al., 2003), e a sua participação como mensageiro, está relacionada a efeitos antitrombótico,

antimicrobiano, antiparasitário, ou ainda encontra-se envolvido no processo inflamatório, choque séptico, síndrome de reperfusão após isquemia e neurotoxicidade, dentre outros (FLORA-FILHO; ZILBERSTEIN, 2000). Dessa forma, a compreensão do mecanismo pelo qual o NO atua no organismo tem implicação direta na prevenção e no tratamento de diversas patologias (Da SILVA, 2006).

A via L-arginina – óxido nítrico exerce uma importante função modulatória na nocicepção, principalmente em nível de sinapse neuronal. Após estímulo do neurônio, ocorre liberação de glutamato que vai se ligar aos receptores NMDA. Enquanto persistir esta união (glutamato/receptor NMDA), o Ca^{2+} é capaz de entrar no citoplasma do neurônio levando à ativação da enzima óxido nítrico sintase (NOS). Assim, o NO é liberado na pós-sinapse após estímulo pré-sináptico submáximo, funcionando como mensageiro retrógrado para a pré-sinapse e reiniciando todo o processo da modulação e transmissão da condução dolorosa (FLORA-FILHO; ZILBERSTEIN, 2000).

1.4. Modulação da informação nociceptiva

Os mecanismos descendentes acontecem em vários estágios do processo inibitório (inibição medular ou segmentar e controles descendentes superiores) e modulam a resposta nociceptiva por exercer suas ações em nociceptores presentes nas fibras primárias aferentes, bem como em neurônios intrínsecos do corno dorsal, como interneurônios excitatórios, interneurônios inibitórios e neurônios de projeção (MILLAN, 1999; MILLAN, 2002).

Melzack e Wall (1965) descreveram a teoria do controle do portão, que é outro mecanismo fundamental na modulação da transmissão nociceptiva na região da medula. De acordo com essa teoria, as fibras espessas ativariam os neurônios na substância gelatinosa, enquanto as fibras delgadas os inibiriam. Estes neurônios por sua vez, quando ativados, impediriam ou dificultariam, por meio de atuação pré-sináptica, a transmissão de impulsos mediados por ambas as fibras aferentes primárias, espessas e delgadas (DRUMMOND, 2000).

As principais substâncias que interferem na modulação da dor são a serotonina, noradrenalina, somatostatina e os peptídeos opióides endógenos.

Este último sistema pode ser ativado provocando analgesia, por intermédio de estimulações elétricas ou de fármacos analgésicos (TENG, 2003).

Outra substância que tem participação importante no mecanismo da nocicepção, e que atua no Sistema Nervoso Central e periférico é a serotonina (5-HT), pois atua em 14 receptores distribuídos em vários tecidos do corpo, exerce também um efeito neuromodulador na membrana pré-sináptica das fibras aferentes primárias nas lâminas I, II e V, reduzindo a liberação de glutamato através do receptor $5HT_{1A}$ e ativando interneurônios inibitórios da substância gelatinosa (lâmina II), liberando opióides endógenos. A serotonina através dos seus receptores $5-HT_2$ medeia a facilitação de longa duração das correntes pós-sinápticas excitatórias e liberação espontânea de transmissores excitatórios nas sinapses do corno dorsal medular, provavelmente por ativar a maquinaria excitotóxica (HORI et al., 1996). Apenas os receptores $5HT_{3A}$ não se ligam a proteína G, pois ativam canais de sódio, aumentando o influxo destes íons para a célula. Alguns antagonistas utilizados como ferramentas farmacológicas no estudo da participação serotoninérgica no mecanismo de ação antinociceptiva são a ondansetrona, antagonista do receptor $5HT_{3A}$, o pindolol, antagonista do receptor $5HT_{1A/1B}$ e dos β -adrenoreceptores e a cetanserina, antagonista $5HT_{2A}$ (SOMMER, 2004; OKUSE, 2007; PIETROVSK et al., 2006).

Os opióides endógenos atuam em receptores próprios que são denominados *mu* (μ), *kappa* (κ) e *delta* (δ), que regulam a transmissão nociceptiva. Os receptores *mu* e *delta* estão associados à elevação na condutância do potássio provocando hiperpolarização celular, o receptor *mu* é acoplado a adenilciclase, um sistema efetor da proteína G, o receptor *kappa* inibe os canais de cálcio dependentes de voltagem, conseqüentemente inibindo a transmissão da resposta dolorosa. Pesquisas posteriores revelaram a descoberta de três peptídeos ou famílias desses neuro-hormônios: 1) as encefalinas, que são largamente distribuídas pelo Sistema Nervoso Central, sobretudo no corno dorsal, na substância Periaquedutal e no núcleo *magnus* da rafe; 2) as dinorfinas/neo-endorfinas, são encontradas no hipotálamo, na formação reticular mesencefálica e no corno dorsal; 3) as beta-

endorfinas/corticotrofinas são amplamente distribuídas pelo Sistema Nervoso Central, particularmente no hipotálamo (DRUMMOND, 2000).

A substância P e a colecistocinina (CCK) são peptídeos não opióides que se destacam, por exercer um efeito dual no processamento das informações nociceptivas, a somatostatina e a calcitonina são outros peptídeos que não se ligam a receptores e cujos efeitos antinociceptivos ainda não estão esclarecidos, essas moléculas podem atuar devido à liberação de peptídeos opióides ou à competição com enzimas que degradam os mesmos, aumentando, assim a sua quantidade disponível nos referidos receptores (MILLAN, 1999, 2002; DRUMMOND, 2000).

1.5. Farmacologia da dor

O tratamento farmacológico da dor inclui principalmente dois grandes grupos de fármacos, os anti-inflamatórios não esteroidais e os opióides. O primeiro deles é um dos grupos mais utilizados na clínica, mas apesar disso, o uso de drogas clássicas ainda desencadeia efeitos colaterais limitantes, o que acarreta uma utilização muito restrita, principalmente para doenças inflamatórias crônicas. Como se acreditava que esses efeitos estavam principalmente correlacionados com a inibição da ciclooxigenase 1 (COX-1), a descoberta dos inibidores seletivos da ciclooxigenase 2 (COX-2) veio a torná-la uma molécula-alvo para o desenvolvimento de compostos com atividade anti-inflamatória e analgésica consideráveis, mas com toxicidade gastrointestinal reduzida. Apesar da revolução no emprego de anti-inflamatórios não esteroidais, os inibidores seletivos começaram também a mostrar efeitos colaterais, desta vez sobre o Sistema Cardiovascular, o que também tem limitado o seu uso nos últimos anos (MARNETT, 2009).

A habilidade dos opióides para controlar efetivamente e de forma segura a dor intensa aguda e a dor do câncer tem sido um dos argumentos para o emprego dessas drogas em pacientes com dor crônica, em confronto com as ideias de cuidado considerável ao se avaliar os riscos de adição. Por outro lado, existem pacientes mantidos com tratamento opióide que são refratários à

analgésia durante períodos de dor, ou mesmo durante um tratamento crônico. A maior questão é se a eficácia analgésica opióide pode ser mantida com o tempo, e são poucas as evidências apoiando tal eficácia. Os prováveis mecanismos para a falha da terapêutica opióide podem estar relacionados à tolerância ou à hiperalgesia induzidas por esses fármacos, e sua limitação reside também no aparecimento de efeitos colaterais consideráveis (BALLANTYNE, 2007).

Assim, é de suma importância a contínua realização de estudos que visem a elucidação de substâncias com potencial analgésico e sem o risco de toxicidade que os grupos ora empregados detêm. Dessa forma, uma das principais fontes de moléculas com propriedade antinociceptiva, de forma isolada ou em associação (preparações brutas-fitoterápicos), são os produtos naturais, tão abundantes em nosso país, e particularmente em nossa Região.

1.6. Produtos naturais

O uso de plantas no tratamento e na cura de enfermidades é uma das mais antigas práticas medicinais da humanidade. A utilização de produtos naturais como medicamento é baseada em crenças existentes há centenas de anos, antes mesmo do desenvolvimento da medicina científica, e prevalece até os dias atuais, fazendo parte da tradição de cada país, onde as pessoas passam seus conhecimentos de uma geração a outra e sua aceitação é fortemente condicionada pelos fatores culturais. Além da crença sobre o poder e cura, a fitoterapia evoluiu e sofisticou-se, o conhecimento sobre o poder curativo das plantas não pode ser mais considerado apenas como tradição,

mas como ciência que vem sendo estudada, aperfeiçoada e aplicada por diversas culturas, ao longo dos tempos (TOMAZZONI et al., 2006).

O uso de espécies vegetais na medicina popular com finalidades terapêuticas tem contribuído de forma relevante ao longo dos anos para a obtenção de vários fármacos, amplamente utilizados na clínica, como a emetina, vincristina, colchicina e rutina. A cada momento são relacionadas

novas moléculas na literatura, algumas detentoras de importantes ações farmacológicas, como a forskolina, o taxol e a artemisinina (MACIEL et al., 2002; VEIGA-JUNIOR et al., 2005; FOGLIO et al., 2008).

O consumo de medicamentos fitoterápicos aumentou pelo fato de que as populações estão questionando os perigos do uso abusivo e irracional de produtos farmacêuticos e procuram substituí-los por plantas medicinais. Além disso, registra-se a insatisfação da população com o sistema de saúde e a necessidade de poder controlar seu próprio corpo e recuperar sua saúde, assumindo as práticas de saúde para si ou para sua família (TOMAZZONI et al., 2006). Entretanto, é necessário extremo cuidado ao se empregar produtos naturais como drogas mais seguras, pois muitas vezes o fim medicinal é diferente daquele dos silvícolas, e sua toxicidade pode parecer trivial quando comparada com a dos medicamentos usados nos tratamentos convencionais, o que não é verdade. A toxicidade de plantas medicinais é um problema sério de saúde pública. Os efeitos adversos dos fitomedicamentos, possíveis adulterações e toxidez, bem como a interação com outras drogas ocorrem comumente (VEIGA-JUNIOR et al., 2005).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, cerca de 80 % da população deste planeta se utiliza de plantas medicinais para os cuidados de atenção à saúde. No Brasil, 20 % da população é responsável por 63 % do consumo dos medicamentos disponíveis; o restante encontra nos produtos de origem natural, especialmente nas plantas medicinais, a única fonte de recursos terapêuticos (GARCIA, 1995; FOGLIO et al., 2008). As pesquisas realizadas para avaliação do uso seguro de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil ainda são incipientes, assim como o controle da comercialização pelos órgãos oficiais em feiras livres, mercados públicos ou lojas de produtos naturais (VEIGA-JUNIOR et al., 2005).

A história das plantas medicinais no Brasil sofreu influência das culturas africana, indígena e européia. A contribuição dos escravos se deu por meio da utilização das plantas trazidas do continente africano para rituais religiosos e também por suas propriedades farmacológicas. Os índios utilizavam grande quantidade de plantas medicinais por intermédio dos pajés que tinham o conhecimento das ervas locais, passado de geração em geração. Os primeiros

européus se depararam com este conhecimento quando chegaram ao Brasil, o qual foi absorvido por aqueles que passaram a viver no país e a sentir a necessidade de viver do que a natureza lhes proporcionava, fatos que fizeram com que eles ampliassem seu contato com a flora medicinal brasileira e a utilizassem para satisfazer suas necessidades alimentares e medicamentosas (TOMAZZONI et al., 2006).

As plantas medicinais da flora brasileira nativa são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades terapêuticas, geralmente propagadas por usuários ou comerciantes. O Brasil tem a maior floresta equatorial e tropical do planeta, não podendo abdicar de sua vocação para o desenvolvimento de produtos naturais. Assim, esse imenso patrimônio genético, já escasso nos países desenvolvidos, tem atualmente valor estratégico para esse tipo de mercado (PINTO et al., 2002; CALIXTO, 2003).

Apesar do Brasil ser detentor de um terço da flora mundial e de um grande número de grupos de pesquisa contribuir significativamente para o desenvolvimento da química, taxonomia e farmacologia de produtos naturais e de outras áreas relacionadas, nosso país não tem uma atuação destacada no mercado mundial de fitoterápicos, ficando inclusive atrás de países tecnologicamente menos desenvolvidos (YUNES et al., 2001). Isso se deve ao fato de que no Brasil a maioria dos fitoterápicos fabricados pela indústria farmacêutica está fundamentada somente no uso popular, sem nenhuma comprovação pré-clínica ou clínica, não podendo ser competitivo no mercado nacional e muito menos internacional (YUNES et al., 2001).

Dessa forma, o grande desafio do país é desenvolver com sucesso um programa voltado para o desenvolvimento de medicamentos a partir da nossa biodiversidade, empregando tecnologia genuinamente nacional, o que o tornaria menos dependente do mercado internacional, evitando os constrangimentos de recorrer a tecnologias de baixa qualidade desenvolvidas em países com menos tradição científica e tecnológica que o nosso, permitindo assim que o Brasil ocupe um lugar de destaque no desenvolvimento de fitoterápicos no cenário internacional (CALIXTO, 2003).

1.7. Plantas do gênero *Zanthoxylum*

A família Rutaceae é constituída de 1600 espécies de 150 gêneros, largamente distribuída pelas regiões tropicais e temperadas do mundo todo, sendo mais abundante na América tropical, Sul da África e Austrália. No Brasil existem aproximadamente 200 espécies pertencentes ao gênero *Zanthoxylum*, sendo descrita a ocorrência de constituintes químicos como cumarinas, lignanas, flavonóides, alcalóides e alquilamidas insaturadas. Estas substâncias apresentam importantes propriedades farmacológicas tais como antitumoral, antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória, anti-helmíntica, analgésica e antiagregante plaquetária. (CORTEZ et al., 2006; SILVA; PAOLI, 2000; OLIVEIRA et al., 2002).

Os flavonóides compreendem um grande grupo fitoquímico, denominados compostos polifenóis de baixo peso molecular, amplamente distribuídos no reino vegetal como metabólitos secundários. Eles representam uma das mais importantes e interessantes classes de compostos biologicamente ativos (GARG et al 2001). Estudos têm demonstrado que várias espécies de *Zanthoxylum* têm como um de seus constituintes os flavonóides, dentre essas espécies estão a *Zanthoxylum avicennae* (casca), *Zanthoxylum cuspidatum* (casca)(GARG et al 2001), *Zanthoxylum piperitum* DC (folhas) (JEONG; SHIM, 2004), *Zanthoxylum nitidum* (Roxb.) DC (raiz) (LU et al 2006), e *Zanthoxylum rigidum* Humb. & Bonpl. ex Willd. (casca) (MOCELLINI et al 2009).

Os triterpenóides são produtos naturais que pertencem à classe dos terpenos. São moléculas constituídas por trinta átomos de carbono, seis unidades isoprenóides (com cinco átomos de carbono). A diversidade estrutural dos triterpenóides sempre atraiu a atenção para a avaliação das suas atividades biológicas. Embora essa classe de metabólitos secundários venha sendo utilizada com sucesso como agentes terapêuticos na medicina, seus usos ainda são bastante limitados, considerando os trabalhos recentes neste contexto, que indicam fortemente o seu potencial como droga (MAHATO; KUNDU,1994; MAHATO et al.,1992). Há um crescente interesse dos

pesquisadores na elucidação da atividade biológica de várias substâncias que tem propriedades analgésicas, e dentre estas podemos destacar esses terpenóides, que já estão bem estabelecidos na literatura (ANDRADE et al., 2007).

O lupeol é um constituinte pertencente à família dos triterpenóides pentacíclicos e representa um dos mais importantes produtos naturais biologicamente ativos. É encontrado na maioria das plantas tropicais, principalmente em hortaliças, ervas medicinais e frutas. Há um enorme interesse da comunidade científica por essa substância, por apresentar diversas propriedades medicinais e ter grandes possibilidades de futuramente vir a ser aproveitada na terapêutica (CECHINEL-FILHO; YUNES, 1998; SALEEM et al., 2004; SRINIVASAN et al., 2002).

Na literatura são relatadas várias espécies de plantas que contêm esse constituinte e que apresentam atividade antinociceptiva. Dentre elas, destacam-se: *Austroplenckia populnea* (Celastraceae) (casca) (ANDRADE et al., 2007), *Helicteres isora* (Sterculiaceae) (raiz) (VENKATESH et al., 2007), *Humirianthera ampla* Miers (Icacaceae) (raiz) (LUIZ et al., 2007), *Miconia rubinosa* (Melastomaceae) (partes aéreas) (SPESSOTO et al., 2003), como também espécies de *Zanthoxylum*, como a *Zanthoxylum riedelianum* (Rutaceae)(casca e folhas) (LIMA et al., 2007).

Mocellini et al (2009) realizaram o primeiro estudo fitoquímico das cascas das raízes do extrato hexânico de *Zanthoxylum rigidum*, submetido à cromatografia em coluna de sílica gel, que resultou no isolamento e na identificação do triterpeno lupeol, e da mistura dos esteróides campesterol, estigmasterol, sitosterol e do alcalóide *N*-metiltanina. Facundo et al (2005) realizaram os primeiros estudos fitoquímicos da raiz e das folhas da *Zanthoxylum ekmanii* (URB.) ALAIN, resultando no isolamento dos alcalóides skimianina, dictamina, tembamida e sesamina, e dos terpenóides lupeol e β -sitosterol.

Diversas espécies do gênero *Zanthoxylum* são utilizadas na medicina popular no tratamento de doenças cardiovasculares, têm ação relaxante muscular, antiespasmódica, analgésica, antifúngica, anti-hipertensiva, diurética, sudorífera, também utilizadas para combater a tuberculose, malária e como

antiparasitárias para *Ascaris lumbricoides*, *Taenia* sp., *Trichiuris trichiura* e *Shistosoma* sp., além de anti-inflamatórias para infecções de garganta. Entre as atividades descritas para óleos essenciais do gênero *Zanthoxylum* na literatura, destacam-se: repelente de mosquito contra *Aedes aegypti* e contra insetos, bem como larvicida, inseticida, antimalárica, anti-helmíntica, ictiotóxica e antimicrobiana (FACUNDO et al., 2005; SILVA et al., 2008; VIEIRA et al., 2008).

Várias espécies do gênero *Zanthoxylum* destacam-se por suas propriedades farmacológicas. Dentre elas podem ser citadas as atividades antinociceptiva e anti-inflamatória dos extratos das folhas de *Zanthoxylum chiloperone*, que foram avaliadas através dos modelos de contorções abdominais induzidas por ácido acético, teste da formalina, edema de pata e pleurisia induzidos por carragenina, usando os extratos etanólico, fração hexânica e acetato de etila. Os resultados mostraram que as doses testadas reduziram significativamente o número de contorções abdominais, o comportamento de nocicepção no teste da formalina, o edema de pata, o volume de exsudato e a migração leucocitária (VILLALBA et al., 2007).

Estudos preliminares também têm demonstrado que a *Zanthoxylum rhesta* Roxb. possui atividade antinociceptiva no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético e apresenta atividade no teste de episódios diarréicos induzidos por óleo de mamona em camundongos. Os resultados mostraram que o extrato metanólico da casca do caule é ativo em ambos os testes (RAHMAN et al., 2002).

Bastos et al (2001) mostraram que a cubebina, uma lignana isolada do extrato hexânico das folhas de *Zanthoxylum naranjillo*, mostra uma significativa atividade antiedematogênica no edema de pata induzido por carragenina em ratos, mas não apresenta significativa redução na migração das células induzida por carragenina para a cavidade peritoneal, nem no edema de pata induzido por dextrana e histamina nesses animais. Os resultados mostraram ainda uma significativa redução no edema de pata induzido por PGE₂ e no teste de contorções induzidas por ácido acético e por PGI₂ em camundongos.

Além disso, os extratos hidroalcoólicos 90 % das folhas, raiz e cascas do caule da *Zanthoxylum leprieurii* e *Zanthoxylum xanthoxyloides* foram

investigados quanto às suas propriedades antifúngicas contra nove fungos, pelo método de diluição em meios sólido e líquido. Os resultados indicaram que estes extratos inibem o crescimento *in vitro* da *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e de sete fungos filamentosos. Somente os extratos obtidos da raiz e das cascas do caule da *Zanthoxylum xanthoxyloides* mostraram atividade antifúngica nos germes estudados (NGONO NGANE et al., 2000).

De acordo com a literatura, a investigação da atividade antimicrobiana do óleo essencial dos frutos secos de *Zanthoxylum xanthoxyloides* mostrou uma extensa zona de inibição, sendo considerado um sistema antimicrobiano efetivo (NGASSOUM et al., 2003). Outras espécies como *Zanthoxylum fagara*, *Zanthoxylum elephantiasis*, e *Zanthoxylum martinicense* apresentaram atividade antifúngica, mas não antibacteriana (DIÉGUEZ-HURTADO et al., 2003).

Islam et al (2001) avaliaram as atividades antimicrobiana, antifúngica e citotóxica dos extratos metanólico, clorofórmico e em éter de petróleo, das folhas e cascas da *Zanthoxylum budrunga*, verificando que apenas o extrato clorofórmico da casca mostra potente atividade antibacteriana e antifúngica, enquanto o extrato metanólico da casca apresenta atividade citotóxica mais significativa. Os constituintes, álcool 3,5-Dimetoxi-4-geraniloxicinâmico, 8-metoxi-N-metilflindersina, xantilina e sesamina, isolados do extrato em éter de petróleo da casca do caule da *Zanthoxylum rhesta* foram avaliados quanto à sua atividade citotóxica. O extrato bruto e o composto 8-metoxi-N-metilflindersina mostraram ação citotóxica para as larvas de camarão de salmoura (AHSAN et al., 2000). Além disso, foi demonstrado que o óleo essencial de *Zanthoxylum limonella* apresenta atividade larvicida significativa contra espécies de mosquito de *Aedes aegypti* e *Anopheles dirus* (PITASAWAT et al., 2007).

Estudos recentes têm demonstrado o efeito antiparasitário de 6-cantinona, 5-metoxicantinona, óxido-N-cantinona e dos alcalóides totais da casca do caule de *Zanthoxylum chiloperone*, usando camundongos Balb/c infectados de forma aguda ou crônica com *Trypanosoma cruzi*. Os resultados indicam que a 6-cantinona exibe uma atividade tripanocida *in vivo* nesses modelos, além de atividade antifúngica. Este estudo sugere que o tratamento

oral com esse composto a longo termo é vantajoso comparado com a atual quimioterapia da Doença de Chagas, uma vez que tal substância apresentou baixa toxicidade (FERREIRA et al., 2007).

Recentemente, foram investigados os efeitos antioxidante e hepatoprotetor de uma glicoproteína isolada do fruto de *Zanthoxylum piperitum* DC. Os resultados mostram que a glicoproteína apresenta efeito de seqüestrar o DPPH, ânion superóxido e radicais hidroxila, sem apresentar efeito pró-oxidante, demonstrando também efeito inibitório da citotoxicidade induzida por hipoxantina/xantina oxidase ou glicose/glicose oxidase, de maneira dose-dependente. A administração da glicoproteína reduziu os níveis de lactato desidrogenase, alanina transaminase e ácido tiobarbitúrico, aumentou os níveis de óxido nítrico, e normalizou a atividade das enzimas antioxidantes hepáticas (superóxido dismutase, catalase e glutathione-peroxidase) no modelo de injúria hepática aguda induzida por tetracloreto de carbono em camundongos (LEE; LIM, 2008).

1.8. *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. (Rutaceae)

Zanthoxylum rhoifolium Lam. pertence a família Rutaceae, sendo conhecida na medicina popular como mamica de cadela, mamica de porca, teta de cadela, juva, juvevê, guarita, tambatarão, tamanqueira, tembetaru, tinguaciba e espinho de vintém. É uma árvore aculeada de 6-12 m de altura, de casca grossa, folhas compostas e flores polipétalas pequenas e esverdeadas. No Brasil, é encontrada principalmente na mata pluvial da encosta atlântica, nos estados de Minas Gerais e Rio de Janeiro, e no Nordeste, encontra-se nos estados do Piauí e Ceará (Figuras 01 e 02) (CRUZ, 1995; MOREIRA, 1996; SILVA; PAOLI, 2000; GONZAGA et al., 2003).

Em diversos países esta espécie apresenta várias ações terapêuticas. Na Guiana Francesa é utilizada tradicionalmente na medicina popular para tratar e prevenir o desenvolvimento de malária; na Bolívia, a casca e as folhas são cozidas e utilizadas como antipiréticas pelos índios; no Peru essa planta tem propriedades digestiva e tônica; e, em outros países como o Brasil, a espécie tem sido popularmente utilizada contra processos inflamatórios,

microbianos, cancerosos e no tratamento da malária. A *Zanthoxylum rhoifolium* tem sido comercializada como um componente de misturas de ervas em chás, vendidos em farmácias, supermercados e mercados populares (JULLIAN et al., 2006; Da SILVA et al., 2007 b). As Figuras 01 e 02 ilustram a espécie *Zanthoxylum rhoifolium*, que é utilizada popularmente como tônica, sua raiz é febrífuga, amarga, aromática de sabor picante, sendo indicada nos casos de fraqueza orgânica. A casca em cozimento tem propriedade de combater dores de dente e de ouvido, bem como picadas de cobras, pois se acredita ser um poderoso antiofídico e antitumoral, sendo também utilizada como remédio eficaz nas flatulências (CRUZ, 1995; De MOURA et al., 1997; GONZAGA et al., 2003).

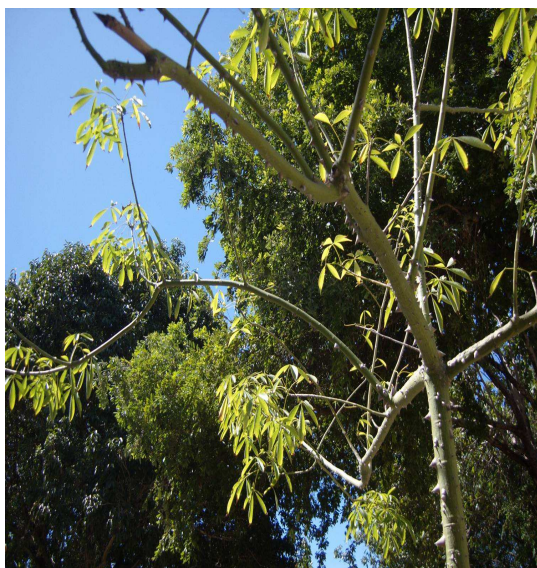


Figura 01- *Zanthoxylum rhoifolium* Lam.



Figura 02- Detalhe do caule de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam.

Fonte: fotos de Luciano da Silva Lopes

Em estudos preliminares foi feita a caracterização morfo-anatômica da semente de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. (Rutaceae) visando o conhecimento dos tegumentos, endosperma e embrião. As sementes são obovóides de coloração preta, medindo cerca de 3,0 mm de comprimento por 3,0 mm de largura, o endosperma é do tipo celular, contendo reserva protéica, o embrião é axial, oblíquo ao eixo da semente, aclorofilado, de coloração branca, dominante e os cotilédones possuem reserva protéica (SILVA; PAOLI, 2000).

De Moura et al (1997) identificaram um novo alcalóide benzofenantridínico isolado do extrato metanólico da casca de *Zanthoxylum*

rhoifolium, denominado zantoxilina e, simultaneamente, identificaram 3 componentes conhecidos, a diidronitidina, 6-oxinitidina e skimianina, determinados por método espectroscópico e análise elementar.

Estudos recentes mostraram que a fração alcaloídica da casca do caule da *Zanthoxylum rhoifolium* apresentou atividade antiplasmódica em bioensaios. O fracionamento do extrato produziu sete alcalóides benzofenantridínicos, a diidroavicina, diidronitidina, oxiavicina, oxinitidina, fagaridina, avicina e nitidina. A atividade antimalárica dos últimos cinco compostos foi avaliada, sendo a nitidina o mais potente, com $IC_{50} < 0,27$ M contra *Plasmodium falciparum*. Esses autores também evidenciaram que, o decocto das cascas do caule mostrava a presença de fagaridina, avicina e nitidina, o que justificaria o uso popular da espécie para esse fim (JULLIAN et al., 2006). Além disso, Bertani et al (2005) avaliaram o potencial de 35 remédios tradicionais antimaláricos utilizados na Guiana Francesa, através de um teste geral de atividade esquizonticida *in vitro* contra *Plasmodium falciparum* resistente a cloroquina. Algumas dessas espécies de plantas foram selecionadas para testes *in vivo*, dentre elas o extrato das cascas do caule da *Zanthoxylum rhoifolium*, que inibiu mais de 50 % do crescimento de *Plasmodium yoelii* em roedores com malária.

Da Silva et al (2007, a) avaliaram a atividade citotóxica do óleo essencial extraído das folhas de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. contra células tumorais HeLa (carcinoma cervical humano), A-549 (carcinoma de pulmão humano), HT-29 (adenocarcinoma de cólon humano), e células não tumorais, Vero (rim de macaco) e macrófagos de camundongos. Também foram testados alguns terpenos constituintes do óleo volátil (β -cariofileno, α -humuleno, α -pineno, mirceno e linalool), verificando sua participação na citotoxicidade apresentada pelo óleo. Os resultados mostraram que o óleo volátil é citotóxico apenas contra células tumorais, mas não apresenta citotoxicidade contra as células não tumorais. Esse mesmo grupo mostrou ainda que o óleo essencial extraído das folhas de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. e o β -cariofileno promovem aumento da sobrevivência de camundongos portadores do tumor ascítico de Erlich (4 dias com 20 mg/kg), o que não aconteceu com os terpenos α -humuleno, α -pineno e β -pineno. Enquanto que nos estudos *in vitro* o óleo essencial e o β -cariofileno apresentaram pouca atividade contra as células tumorais, o que os levou a crer que isso se deva a uma ação

imunomoduladora, relacionada ao fato do β -cariofileno realizar sinergismo com outros compostos presentes no óleo volátil das folhas de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam (DA SILVA et al., 2007, b).

A análise do extrato etanólico e frações de partição de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam, por meio de cromatografia em camada delgada de gel de sílica, usando reveladores específicos, sugeriu a presença de substância de natureza isoprênica (triterpenos e esteróides), sobretudo na fração hexânica, bem como de flavonóides e alcalóides na fração AcOET e fração aquosa. A presença de triterpenos na espécie foi confirmada pelo isolamento e identificação do lupeol (Figura 03) (CAMELO et al., 2005).

Com base na literatura referenciada acima, salientando a importância da investigação de novas substâncias para o tratamento da dor, e, ressaltando os usos populares, as atividades farmacológicas, assim como os constituintes isolados em várias espécies do gênero *Zanthoxylum* e na espécie em estudo, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o efeito antinociceptivo de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. em modelos animais de dor aguda, e possíveis mecanismos envolvidos, com o intuito de contribuir para o estudo farmacológico dessa espécie, comprovar seu uso popular como analgésico, além de demonstrar a existência de novas substâncias para o tratamento da dor.

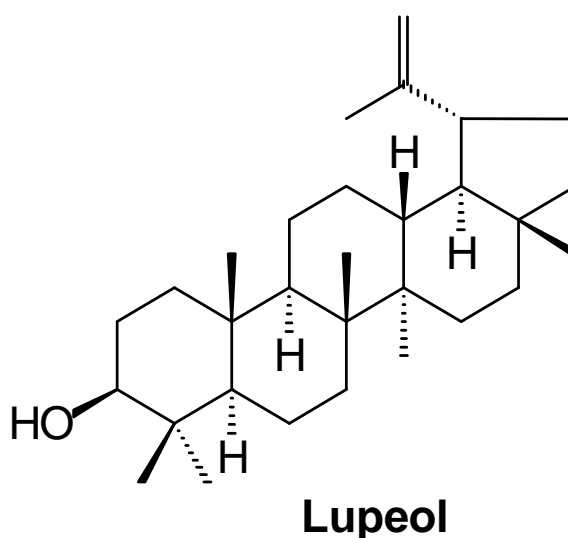


Figura 03 - Estrutura do lupeol obtido de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. (Rutaceae).

OBJETIVOS

2- OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral:

Avaliar o efeito antinociceptivo de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam (Rutaceae).

2.2. Objetivos Específicos:

2.2.1. Avaliar a toxicidade aguda do extrato etanólico das cascas do caule de *Zanthoxylum rhoifolium* em camundongos;

2.2.2. Investigar o efeito antinociceptivo do extrato etanólico, frações de partição (hexânica, acetato de etila e aquosa) e lupeol (principal constituinte da fração hexânica), obtidos da casca do caule de *Zanthoxylum rhoifolium*, em modelos de nocicepção química induzida por capsaicina, formalina, glutamato e ácido acético;

2.2.3. Investigar possíveis mecanismos envolvendo os sistemas opióide, glutamatérgico, serotoninérgico e a via L-arginina-óxido nítrico na ação antinociceptiva;

2.2.4. Averiguar a influência de um possível efeito depressor ou relaxante muscular do extrato etanólico da casca do caule de *Zanthoxylum rhoifolium* avaliados nos testes do campo aberto e Rota-Rod, sobre a atividade nociceptiva evidenciada.

MATERIAL E MÉTODOS

3- MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Drogas e Reagentes

Substância	Origem
Ácido acético glacial P.A.	VETEC-Brasil
Capsaicina	(Sigma,USA)
Cetanserina	(Sigma,USA)
Cloreto de sódio	(VETEC-Brasil)
Formaldeído	(Dinâmica,Brasil)
Glutamato	(Sigma,USA)
L-argenina	(Sigma,USA)
L-NOARG	(Sigma,USA)
MK 801	(Sigma,USA)
Naloxona	(Sigma,USA)
Ondansetrona	(Sigma,USA)
Pindolol	(Sigma,USA)
Sulfato de morfina (Dimorf)	(Cristália, Brasil)
Tween 80	(Sigma,USA)

3.2. Equipamentos

Equipamento	Origem
Balança digital para pesar animais	(Plenna,USA)
Balança analítica (Modelo-AR2140),	(OHAUS, USA)
Câmara de observação de acrílico espelhada	(NPPM-PI)
Campo aberto de acrílico	(NPPM-PI)
Rota Rod (Modelo RR–2002)	(Insight equipamentos,Brasil)

3.3. Obtenção do extrato bruto e frações de partição

Zanthoxylum rhoifolium Lam. (Rutaceae) foi coletada em janeiro de 2005, no município de Pedro II-PI, identificada por nossos colaboradores da área de botânica e um exemplar da exsicata (nº TEPB 13.870) foi depositado no Herbário Graziela Barroso da Universidade Federal do Piauí.

A obtenção do extrato etanólico bruto da *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. (Rutaceae) - (EEtOHZr) e a identificação, isolamento e purificação dos compostos, foi realizada pelo grupo de pesquisa coordenado pela Prof^a Dr^a. Mariana Helena Chaves do Departamento de Química do Centro de Ciências da Natureza da Universidade Federal do Piauí.

A técnica extrativa foi realizada utilizando-se o procedimento à temperatura ambiente, como a maceração, por meio do solvente orgânico etanol, seguido de partições com solventes em gradiente crescente de polaridade, tais como hexano e acetato de etila (Figura 04). As soluções extrativas foram concentradas através de evaporador rotativo sob pressão reduzida e liofilizadas.

3.4. Isolamento e purificação dos constituintes químicos

Foram empregados métodos cromatográficos usuais de isolamento, como a cromatografia em coluna e a cromatografia em camada delgada analítica para monitoramento das frações.

O extrato hexânico (2 g) foi cromatografado em coluna de gel de sílica eluída com hexano-ACOEt em ordem crescente de polaridade. Foram coletadas 50 frações de 100 mL, as quais foram concentradas em evaporador rotatório e reunidas em nove grupos de acordo com os fatores de retenção. O grupo S2 (1,1g) constituído pelas frações eluídas com hexano-ACOEt (95:5), após recristalização em MeOH, forneceu o lupeol (250 mg:kg, (12,5%)) (Figura 03)(CAMELO et al., 2005).

A caracterização estrutural do lupeol obtido pelos procedimentos cromatográficos foi feita utilizando-se métodos espectroscópicos como a Ressonância Magnética Nuclear (RMN). As análises de RMN foram realizadas no Centro Nordeste de Aplicação e uso da Ressonância Magnética Nuclear – CENAUREMN da Universidade Federal do Ceará (UFC). Os espectros de RMN do lupeol estão apresentados em anexo.

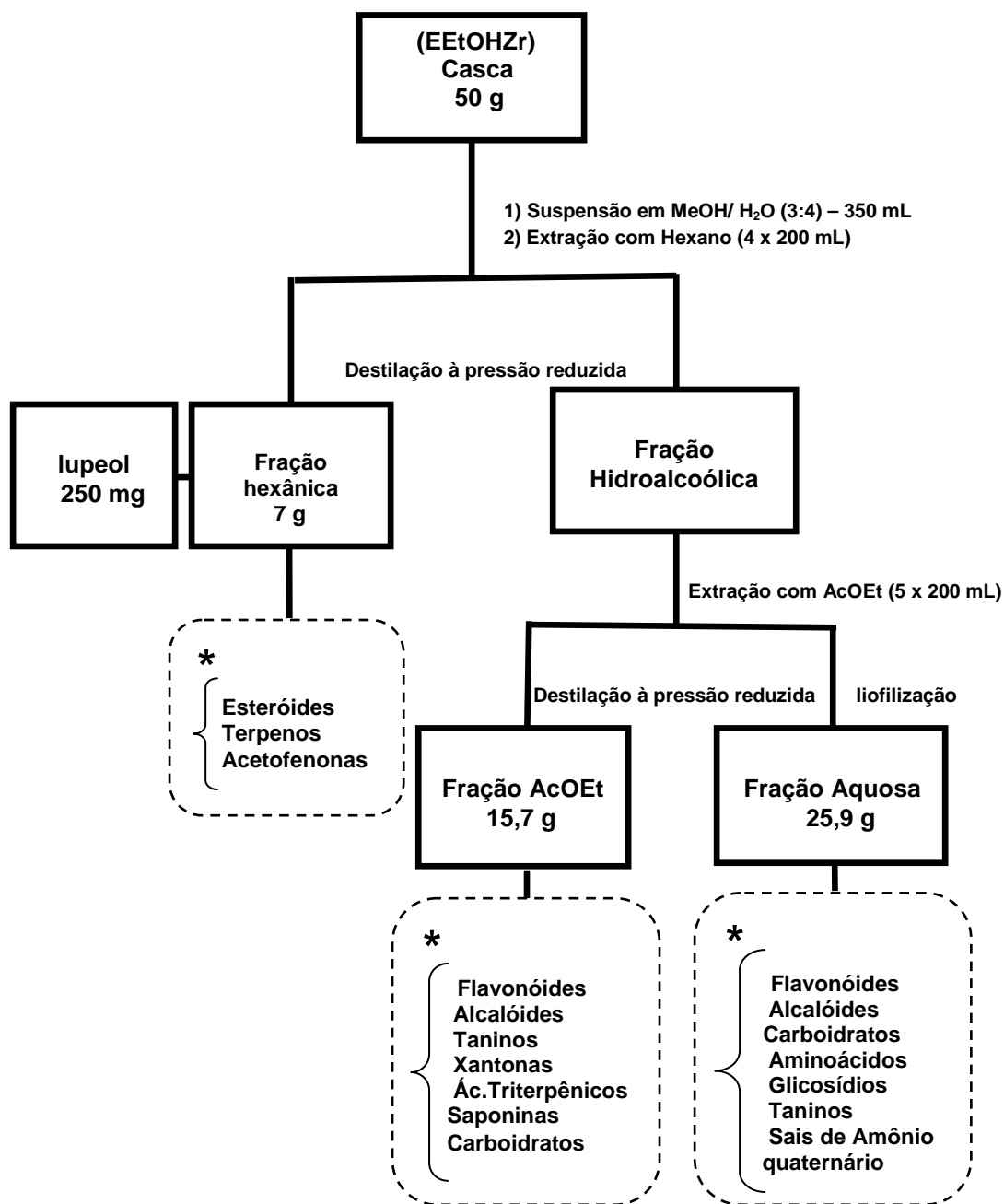


Figura 04- Obtenção das frações do extrato etanólico de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. (Rutaceae).

* Classes de constituintes químicos que poderiam estar presentes nas frações de partição (CECHINEL-FILHO; YUNES,1998, CHAVES, 1996).

3.5. AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA

3.5.1. Animais

Foram utilizados camundongos Swiss machos e fêmeas (25-35 g), provenientes do biotério do Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais (NPPM) da Universidade Federal do Piauí (UFPI).

Os animais foram acondicionados em caixas de polipropileno á temperatura de 24 ± 3 °C, no ciclo claro-escuro de 12 h e tratados com água e ração padrão *ad libitum*. Permaneceram no laboratório para adaptação por um período de 1 h antes da realização do experimento. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética da Universidade Federal do Piauí (Protocolo nº 09/2008).

3.5.2. Toxicidade aguda em camundongos

Para a determinação da toxicidade aguda do extrato, utilizaram-se camundongos Swiss, 25-35 g, divididos em grupos de 05 machos e 05 fêmeas cada, sendo mantidos em jejum de sólido durante 18 h. Os produtos testes foram solubilizados em Tween 80 e salina. Foram observados durante 72 h, quanto aos parâmetros: estado de alerta, sedação, ptose, dispnéia, micção, diarreia, convulsão, atividade motora espontânea, reflexo postural, piloereção, nocicepção, morte, dentre outros (MILLER; TAINTER, 1944; LITCHFIELD; WILCOXON, 1949).

3.5.3. Avaliação da atividade antinociceptiva

3.5.3.1. Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina (2%) em camundongos

Para investigar o possível efeito antinociceptivo do EEtOHZr, foi utilizado inicialmente o teste de nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina (2%). Este modelo permite avaliar dois tipos de dor, a primeira fase é de origem neurogênica que tem sido atribuída ao efeito direto e imediato do agente flogístico sobre fibras aferentes nociceptivas, enquanto que a segunda

fase representa um tipo de dor caracterizado pela liberação de mediadores inflamatórios (HUNSKAAR; HOLE, 1987; SILVA et al., 2006).

Os animais foram tratados por via oral com o EEtOHZr, nas doses de 125 e 250 mg/kg, com a fração hexânica (F.HEX) e acetato de etila (F.AcOEt) nas doses de 62,5 e 125 mg/kg e, decorrido o tempo de absorção de 60 minutos, receberam o estímulo. Logo após a injeção de 20 µL de formalina a 2% na região plantar da pata posterior direita, os animais foram colocados individualmente na câmara de observação, onde foi cronometrado o tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata que recebeu o estímulo, quantificado cumulativamente nos primeiros 5 minutos (primeira fase) e durante 15-30 minutos (segunda fase), como índice de nocicepção. Os animais controle receberam salina por via oral ou morfina (5 mg/kg, s.c.).

3.5.3.2. Teste de contorções abdominais induzidas pela injeção de ácido acético em camundongos

Este modelo é útil para avaliar a analgesia moderada produzida por compostos antiinflamatórios, consiste na indução da resposta nociceptiva através da administração intraperitoneal de ácido acético (0,75%) diluído em solução salina. A administração intraperitoneal de ácido acético induz contorções abdominais, as quais são caracterizadas por contração e rotação do abdômen do animal, seguidas pela extensão de uma ou das duas patas traseiras. Esta resposta nociceptiva se deve a uma sensibilização de nociceptores por prostaglandinas (COLLIER et al., 1968; BENTLEY, 1981; PIRES et al., 2004).

Grupos de animais foram tratados por via oral com o EEtOHZr (250 e 500 mg/kg), 1 h antes da injeção do ácido acético. O grupo controle recebeu o mesmo volume do veículo (salina, p.o.) utilizado para diluir o extrato. Após a administração do ácido acético, os animais foram colocados individualmente na câmara de observação durante 20 minutos. O número de contorções abdominais após o estímulo com ácido acético (0,75 % i.p.) foi quantificado cumulativamente. A atividade antinociceptiva do extrato pôde ser obtida através da comparação do número de contorções abdominais quantificadas entre os grupos controle e tratados com EEtOHZr ou morfina (2,5 mg/kg, s.c.).

3.5.3.3. Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina em camundongos

Esse modelo foi proposto por Sakurada et al., (1992) para o estudo de compostos que atuam sobre a dor de origem neurogênica. A injeção de capsaicina induz a estimulação das terminações nervosas nociceptivas e térmicas causando a liberação de vários neuropeptídeos envolvidos na transmissão da dor, incluindo principalmente as taquicininas (substância P, neurocinina A e neurocinina B) que atuam na ativação de fibras aferentes nociceptivas tipo C (SAKURADA et al., 1992; SAKURADA et al., 1996; SANTOS; CALIXTO, 1997).

Os animais foram colocados individualmente na câmara de observação, para um período de adaptação de 20 minutos. Após, esse período, cada animal recebeu por via intraplantar 20 µL de solução de capsaicina na pata posterior direita, era cronometrado o tempo que este permanecia lambendo ou mordendo a pata que recebeu o estímulo por 5 minutos, e considerado como índice de nocicepção. Grupos de animais foram tratados com EEtOHZr, F.HEX, F.AcOEt e aquosa (F.AQ), nas doses de 125, 250 e 500 mg/kg por via oral, 1 h antes da injeção da capsaicina. Os animais controle receberam salina por via oral ou morfina (5 mg/kg, s.c.).

3.5.3.4. Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato em camundongos

Com a finalidade de estudar o possível envolvimento do sistema glutamatérgico nos efeitos evidenciados, os animais foram tratados com EEtOHZr (125, 250 e 500 mg/kg), suas frações F.HEX, F.AcOEt e F.AQ (62,5, 125, 250 e 500 mg/kg) e Lupeol (6,25, 12,5 e 25 mg/kg) por via oral. Uma hora depois dos tratamentos, os animais receberam 20 µL de solução de glutamato (10 µmol/pata) dissolvido em salina, por via intraplantar na pata traseira direita. Os animais foram colocados individualmente na câmara de observação, e o tempo que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata que recebeu o estímulo foi cronometrado durante 15 minutos e considerado como um índice de nocicepção. Os animais controle receberam salina por via oral ou MK 801 (0,03 mg/kg .i.p.)(BEIRITH et al., 2002).

3.5.4. Estudo dos possíveis mecanismos de ação antinociceptiva da fração Hexânica do EEtOHZR e do lupeol em camundongos

3.5.4.1. Participação do sistema opióide no efeito antinociceptivo da fração hexânica e do lupeol

Com o objetivo de avaliar a influência do sistema opióide sobre o efeito antinociceptivo da F.HEX, grupos distintos de animais foram pré-tratados com o antagonista opióide não seletivo naloxona (2 mg/kg, i.p.), 20 min antes da administração de F.HEX (125 mg/kg, p.o.), lupeol (12,5 mg/kg, p.o.) ou morfina (5 mg/kg, s.c.), a qual foi utilizada como controle positivo (PIETROVSKI et al., 2006). Decorrida 1h após a administração da fração ou 30 minutos após a administração de morfina, injetou-se por via intraplantar 20 µl de solução de glutamato (10 µmol/pata) e avaliou-se a resposta nociceptiva.

3.5.4.2. Participação da via L-arginina-óxido nítrico no efeito antinociceptivo da fração hexânica e do lupeol

Para avaliarmos também a participação da via L-arginina - óxido nítrico no efeito antinociceptivo causado pela F.HEX e lupeol, os animais foram previamente tratados com o precursor do óxido nítrico, L-arginina (600 mg/kg, i.p.) e após 20 minutos cada grupo recebeu F.HEX (125 mg/kg, p.o.), lupeol (12,5 mg/kg, p.o.) e N^ω-nitro-L-arginina (L-NOARG, 75 mg/kg, i.p.), um inibidor da enzima óxido nítrico sintase (PIETROVSKI et al., 2006). Decorrida 1h após a administração da F.HEX e do lupeol e 30 min após o tratamento com L-NOARG, os animais foram avaliados quanto à nocicepção induzida pela injeção intraplantar de 20 µL de solução de glutamato (10 µmol/pata). Os animais controle foram tratados com salina por via oral.

3.5.4.3. Participação do sistema serotoninérgico no efeito antinociceptivo da fração hexânica e do lupeol

Para avaliarmos a participação do sistema serotoninérgico no efeito antinociceptivo causado pela F.HEX e lupeol, os animais foram previamente tratados com Cetanserina (0,3 mg/Kg i.p., antagonista 5HT_{2A}), Pindolol (1

mg/Kg i.p., antagonista 5HT_{1A/1B} e antagonista dos β -adrenoreceptores) e Ondansetrona (0,5 mg/Kg i.p., antagonista 5HT₃). Transcorridos 20 minutos após o último tratamento, os animais foram tratados com F.HEX (125 mg/kg, p.o.) ou lupeol (12,5 mg/kg, p.o.) e, após 1 h foi avaliada a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de 20 μ l de solução de glutamato (10 μ mol/pata). Os animais controle foram tratados com salina por via oral (PIETROVSKI et al., 2006).

3.5.5. Avaliação da atividade motora

3.5.5.1. Efeito sobre a performance motora no modelo do “Rota Rod”

Este método permite detectar a ocorrência de incoordenação motora, permitindo uma interpretação mais precisa dos resultados de atividade antinociceptiva (LAPA et al., 2003; DUHAM; MIYA, 1957). O Rota Rod é um aparelho que contém uma barra de 2,5 cm de altura de diâmetro, subdividida em 6 compartimentos com uma altura de 25 cm, girando a 12 r.p.m (Modelo RR – 2002, Insight equipamentos). Os animais foram pré-selecionados um dia antes do teste, em sessões de 1 minuto de duração, sendo escolhidos aqueles que permaneceram na barra giratória por esse período. No dia do experimento os animais foram tratados 1 h antes do teste com EEtOHZr (250 mg/kg p.o.), 30 minutos antes com o diazepam (4 mg/kg, i.p), registrando-se o tempo de permanência do animal na barra giratória por 1 minuto, com três reconduções no máximo, com o tempo de corte de 3 minutos de duração.

3.5.5.2. Avaliação da atividade motora espontânea de camundongos no modelo do campo aberto

Este método permite avaliar a atividade exploratória de camundongos. O campo aberto é uma caixa de acrílico com paredes transparentes e chão preto (30X30X15 cm), e a sua base é dividida em 9 quadrantes de diâmetros iguais. Um dia antes do experimento os camundongos foram colocados na arena para ambientação. Os animais foram tratados com EEtOHZr (250 mg/kg p.o.) e veículo 1 hora antes, e diazepam (4 mg/kg, i.p) 30 minutos antes de serem levados individualmente ao campo aberto e observados por um período de 5 minutos (ARCHER, 1973; SIEGEL, 1946; DUHAM; MIYA, 1957).

3.6. Análise estatística

Os dados foram analisados pelo programa Gráfico Prisma 3.0 e os resultados foram expressos como média \pm E.P.M dos valores. Para comparação múltipla dos dados paramétricos foi utilizada a análise de variância (One way e two way - ANOVA) seguida pelo Teste de Bonferroni. Quando necessário, os dados receberam algum outro tipo de tratamento estatístico complementar. A análise de significância foi considerada quando $p < 0,05$.

RESULTADOS

4- RESULTADOS

4.1. Toxicidade aguda em camundongos

O extrato bruto da casca de *Zanthoxylum rhoifolium* não apresentou toxicidade aguda, não sendo possível o cálculo da DL₅₀. Em relação aos parâmetros comportamentais observados nos animais machos e fêmeas, não se detectou nenhuma alteração significativa durante o período de 72 horas (Tabela 01).

Tabela 01: Avaliação da toxicidade aguda do extrato etanólico (EEtOHZr) da casca de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. (Rutaceae) em camundongos Swiss machos e fêmeas (20-35 g).

DOSE	N° ANIMAIS	PERÍODO DE OBSERVAÇÃO (Horas)								
		24 h			48 h			72 h		
		N (%)	D (%)	M (%)	N (%)	D (%)	M (%)	N (%)	D (%)	M (%)
0,5 g/kg	05 (m) 05 (f)	100	0	0	100	0	0	100	0	0
1,0 g/kg	05 (m) 05 (f)	100	0	0	100	0	0	100	0	0
2,0 g/kg	05 (m) 05 (f)	100	0	0	100	0	0	100	0	0

Legenda: Machos (m); Fêmeas (f); Normal (N); Deprimido (D); Morto (M).

4.2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA

4.2.1. Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina (2%) em camundongos

Os resultados apresentados na figura 05 mostram que o EEtOHZr na dose de 250 mg/kg por via oral, promoveu redução significativa do tempo que o animal permaneceu lambendo a pata nas duas fases do teste quando comparado com o veículo (1ª fase - EEtOHZr 250 mg/kg: $28,40 \pm 3,86$ e veículo: $54,27 \pm 3,62$)($p < 0,01$) (2ª fase – EEtOHZr 250 mg/kg: $18,66 \pm 6,90$ e veículo: $63,65 \pm 6,74$)($p < 0,001$), o que corresponde a uma inibição de 47,67 % na primeira fase e 70,69 % na segunda fase.

O EEtOHZr na dose de 125 mg/kg por via oral, promoveu redução significativa do tempo de lambedura da pata apenas na 2ª fase do teste, quando comparado com o veículo (1ª fase - EEtOHZr 125 mg/kg: $43,66 \pm 6,67$ e veículo: $54,27 \pm 3,62$) (2ª fase – EEtOHZr 125 mg/kg: $37,89 \pm 7,42$ e veículo: $63,65 \pm 6,74$)($p < 0,05$), correspondendo a uma inibição de 40,48 % na segunda fase.

A morfina (5 mg/kg s.c.), analgésico opióide utilizado como controle positivo nesse protocolo experimental, inibiu significativamente as duas fases de resposta (1ª fase: $16,35 \pm 2,98$; 2ª fase: $7,74 \pm 5,46$)($p < 0,001$) quando comparado com o veículo (1ª fase: $54,27 \pm 3,62$; 2ª fase: $63,65 \pm 6,74$).

Os dados apresentados na figura 06 demonstram que a fração hexânica na dose de 125 mg/kg p.o., foi efetiva nas duas fases de resposta comparada com o veículo (1ª fase – F.HEX 125 mg/kg: $27,83 \pm 4,03$ e veículo: $55,97 \pm 3,69$)($p < 0,01$), (2ª fase – F.HEX 125 mg/kg: $28,36 \pm 3,62$ e veículo: $65,36 \pm 7,52$)($p < 0,001$), o que corresponde a uma inibição de 50,28 % na primeira fase e de 56,61 % na segunda. A dose de 62,5 mg/kg apresentou resultado significativo apenas na segunda fase (1ª fase – F.HEX 62,5 mg/kg: $39,27 \pm 3,94$ e veículo: $55,97 \pm 3,69$) (2ª fase – F.HEX 62,5 mg/kg: $20,05 \pm 4,92$ e veículo: $65,36 \pm 7,52$)($p < 0,001$), levando a uma inibição de 69,31 % desta.

Os resultados que constam da figura 07 são pertinentes ao efeito da fração AcOEt nas doses de 62,5 e 125 mg/kg demonstrando atividade significativa na nocicepção da formalina, somente na segunda fase de resposta

do teste, comparado com o veículo (2ª fase – F. AcOEt 62,5 mg/kg: $40,84 \pm 4,12$ ($p < 0,01$); F. AcOEt 125 mg/kg: $14,27 \pm 1,97$ ($p < 0,001$) e veículo: $62,59 \pm 6,03$), apresentando uma inibição de 34,75 e 77,21 % da segunda fase, respectivamente. A primeira fase de resposta não foi inibida por nenhuma das doses utilizadas da fração em estudo (1ª fase – F. AcOEt 62,5 mg/kg: $42,51 \pm 2,98$; F. AcOEt 125 mg/kg: $40,83 \pm 2,52$ e veículo: $50,76 \pm 4,74$).

4.2.2. Teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos

De acordo com os dados apresentados na figura 08, constatou-se que EEtOHZr nas doses de 250 e 500 mg/kg por via oral, não apresentou efeito antinociceptivo significativo ($51,77 \pm 2,49$; $49,0 \pm 3,29$) em relação ao veículo ($56,83 \pm 4,09$). A morfina (2,5 mg/kg s.c.) diminuiu significativamente o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético ($5,71 \pm 1,47$) quando comparado com o veículo ($p < 0,001$).

4.2.3. Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina em camundongos

Os resultados apresentados na figura 09 mostram que o EEtOHZr na dose de 250 mg/kg por via oral apresentou redução significativa do tempo de lambida da pata do animal ($5,13 \pm 0,65$) após a administração da capsaicina em relação ao veículo ($18,80 \pm 1,85$) ($p < 0,001$). A morfina (5 mg/kg s.c.) reduziu o tempo de lambida da pata do animal ($2,44 \pm 0,66$) quando comparado com o veículo ($p < 0,001$). As doses de 125 e 500 mg/kg p.o. do EEtOHZr não apresentaram efeito antinociceptivo significativo ($17,59 \pm 1,34$; $20,37 \pm 2,76$).

Os resultados apresentados na figura 10 mostram o efeito da fração hexânica por via oral, nas doses de 125, 250 e 500 mg/kg no teste da capsaicina, onde apenas a dose de 500 mg/kg apresentou efeito antinociceptivo significativo no tempo de lambida da pata do animal ($9,86 \pm 2,03$) em relação ao veículo ($22,11 \pm 1,53$) ($p < 0,001$). Nas doses de 125 e 250 mg/kg a fração não apresentou atividade antinociceptiva significativa ($27,02 \pm$

3,94; $22,66 \pm 3,25$) quando comparado ao veículo, enquanto que a morfina apresentou um resultado semelhante ao descrito anteriormente.

Os resultados mostrados na figura 11 apresentam o efeito da fração AcOEt por via oral, nas doses de 125, 250 e 500 mg/kg no teste da capsaicina. A fração mostrou-se efetiva nas doses de 250 e 500 mg/kg ($10,76 \pm 1,61$; $9,94 \pm 1,25$), apresentando redução significativa do tempo de lambida da pata do animal em relação ao veículo ($18,28 \pm 1,52$) ($p < 0,01$). A dose de 125 mg/kg por via oral não apresentou efeito antinociceptivo significativo ($18,78 \pm 3,24$), enquanto que a morfina apresentou efeito significativo, conforme descrição anterior.

Os resultados mostrados na figura 12 demonstram que a fração aquosa nas doses de 125, 250 e 500 mg/kg por via oral, não diminuiu significativamente o tempo de lambida da pata do animal ($19,80 \pm 3,31$; $23,01 \pm 2,45$; $22,76 \pm 3,68$) em relação ao veículo ($21,24 \pm 1,48$). A morfina (5 mg/kg s.c.) significativamente reduziu o tempo de lambida da pata do animal após a administração de capsaicina ($2,63 \pm 0,70$) quando comparado com o veículo ($21,24 \pm 1,48$) ($p < 0,001$).

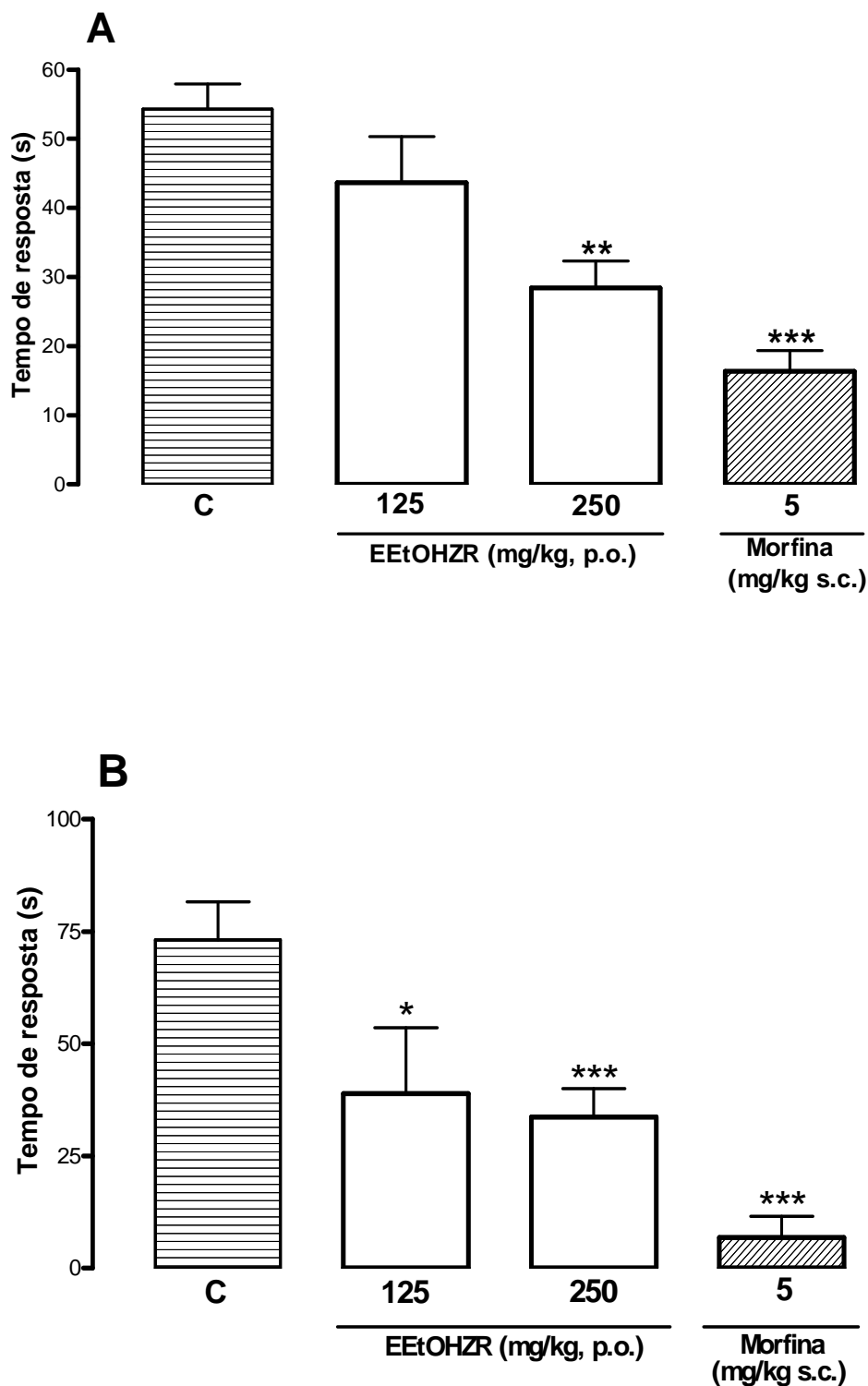


FIGURA 05: Efeito do extrato etanólico de *Zanthoxylum rhoifolium* (EEtOHZr) na primeira fase (A) e na segunda fase (B) da nocicepção induzida por formalina 2 % (20 μ L/pata) em camundongos Swiss machos. Cada grupo representa a média do tempo de reação de 6 a 12 animais tratados com veículo (C), EEtOHZr (125 e 250 mg/Kg p.o.) ou morfina (5 mg/Kg s.c.) 60 e 30 min antes do estímulo (* p <0,05, ** p <0,01, *** p <0,001, comparado ao veículo (C)) (ANOVA duas vias, Teste de Bonferroni).

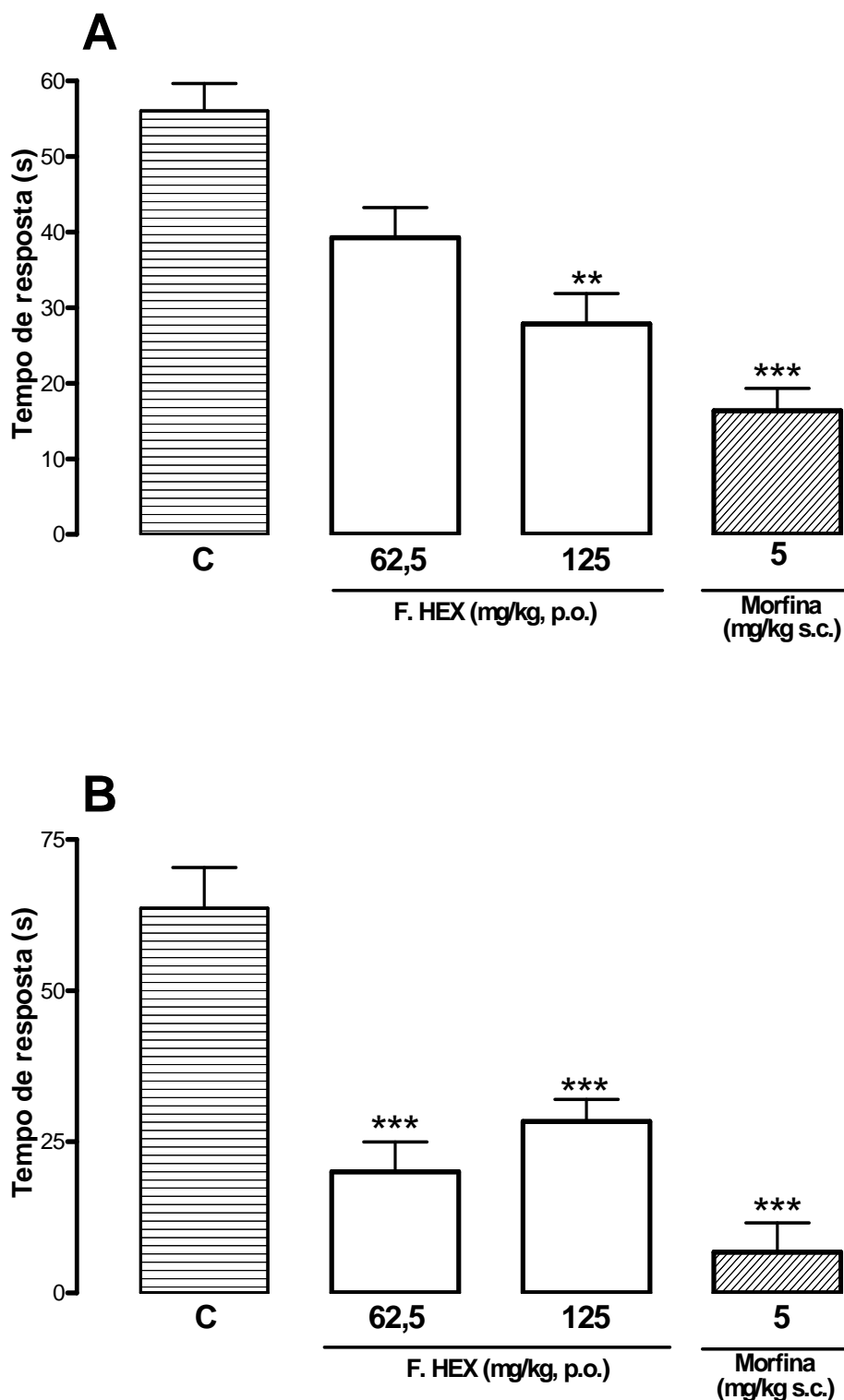


FIGURA 06: Efeito da fração hexânica (F. HEX) na primeira fase (A) e na segunda fase (B) da nocicepção induzida por formalina 2 % (20 μ L/pata) em camundongos Swiss machos. Cada grupo representa a média do tempo de reação de 6 a 12 animais tratados com veículo (C), F. HEX (62,5 e 125 mg/Kg p.o.) ou morfina (5 mg/Kg s.c.) 60 e 30 min antes do estímulo (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, comparado a (C)) (ANOVA duas vias, Teste de Bonferroni).

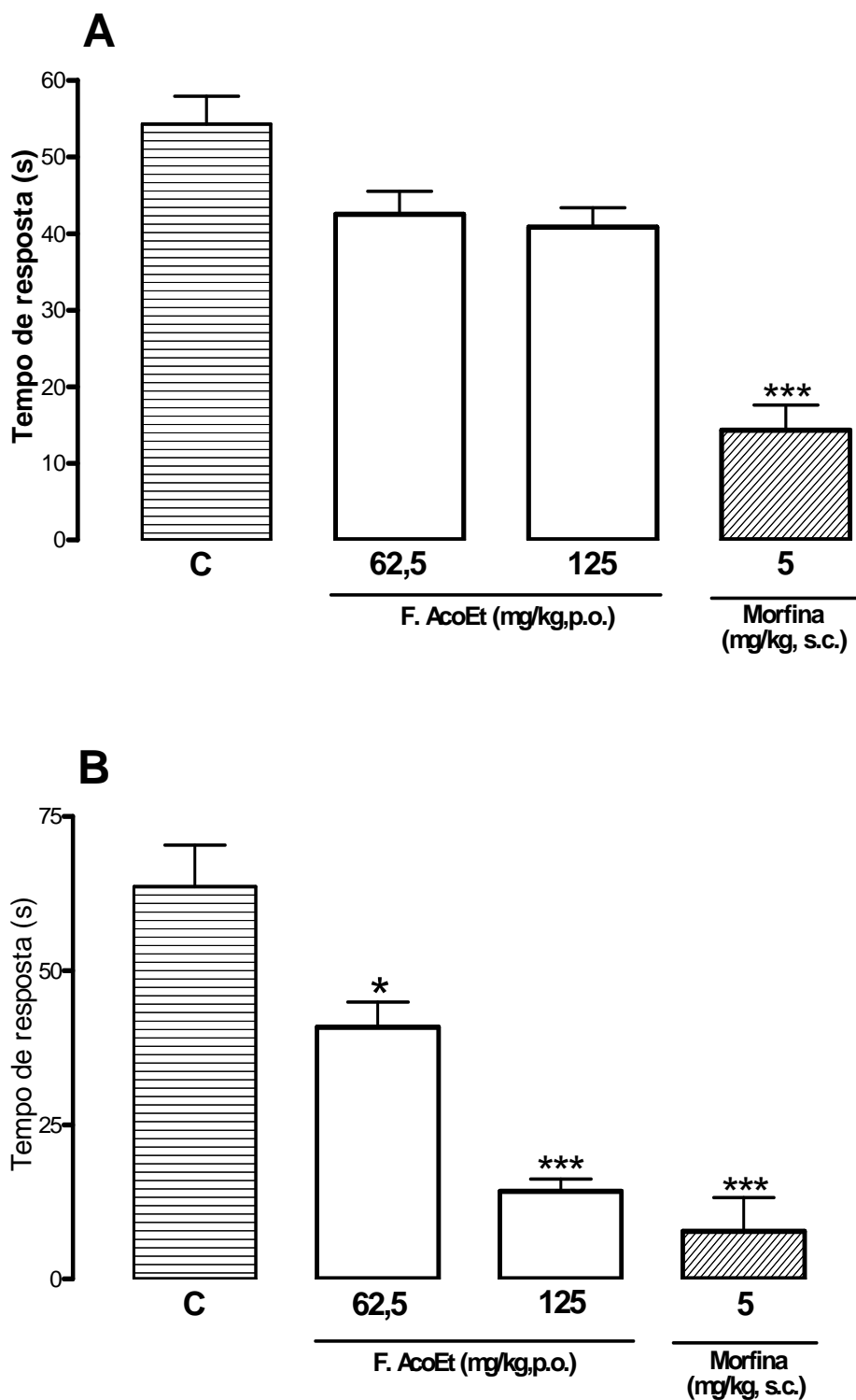


FIGURA 07: Efeito da fração acetato de etila (F. AcOEt) na primeira fase (A) e na segunda fase (B) da nociceção induzida por formalina 2 % (20 μ L/pata) em camundongos Swiss machos. Cada grupo representa a média do tempo de reação de 6 a 12 animais tratados com veículo (C), F. AcOEt (62,5 e 125 mg/Kg p.o.) ou morfina (5 mg/Kg s.c.) 60 e 30 min antes do estímulo (* p <0,05, *** p <0,001, comparado a (C)) (ANOVA duas vias, Teste de Bonferroni).

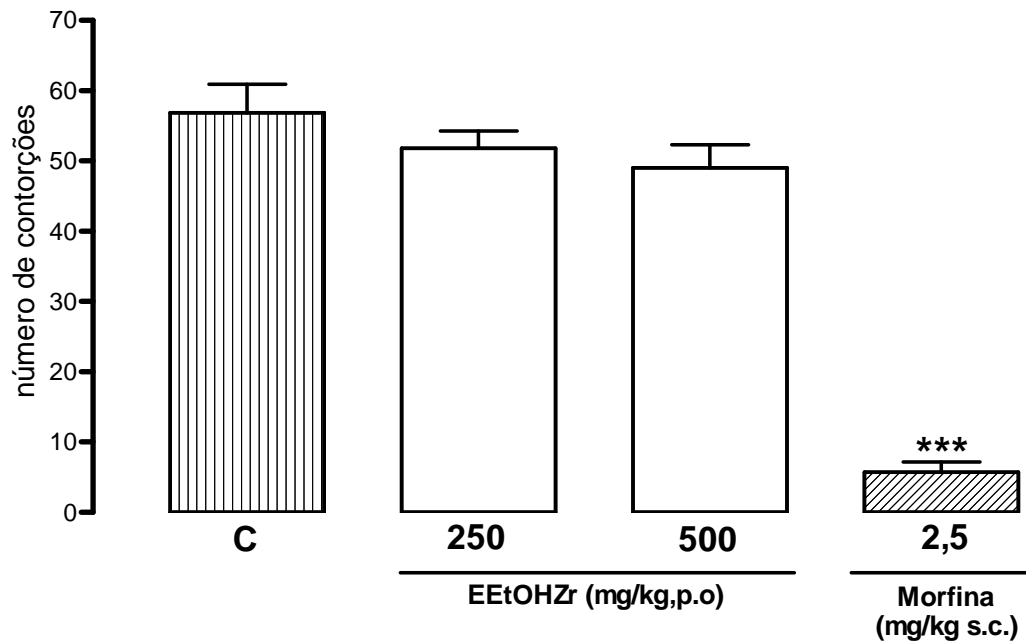


FIGURA 08: Efeito do extrato etanólico de *Zanthoxylum rhoifolium* (EEtOHZr) sobre a nocicepção induzida pelo ácido acético (0,75% i.p.) em camundongos Swiss machos (25-35 g). Cada grupo representa a média do tempo de reação de 6 a 12 animais tratados com EEtOHZr (250 e 500 mg/kg p.o.), Morfina (2,5 mg/kg s.c.) e veículo (C), 30 e 60 min antes do estímulo (** $p < 0,001$, comparado ao veículo (C)) (ANOVA uma via, Teste de Bonferroni).

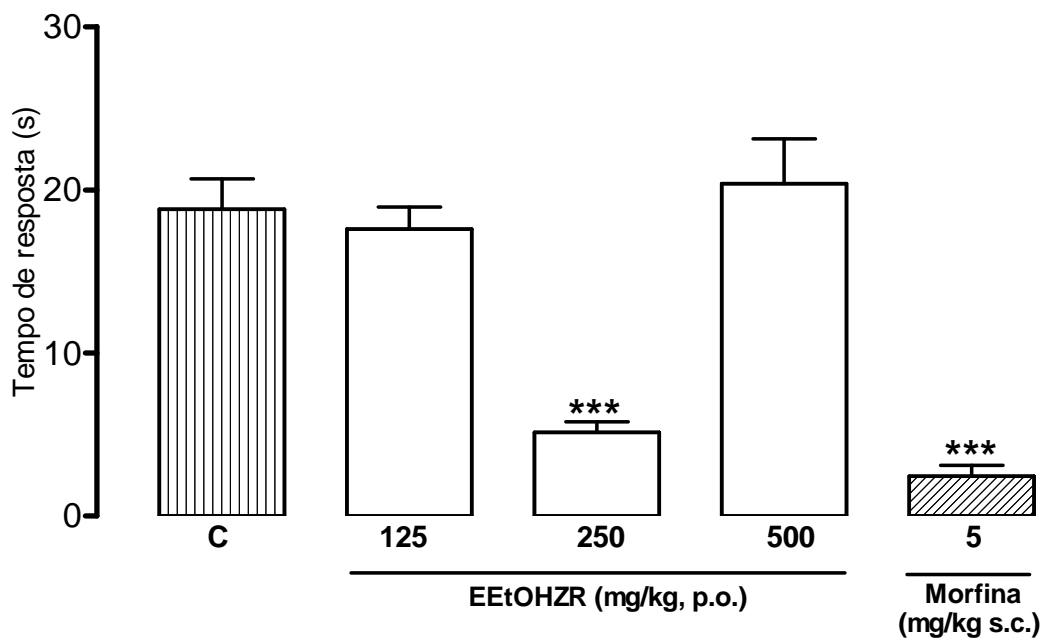


FIGURA 09: Efeito do extrato etanólico da *Zanthoxylum rhoifolium* (EEtOHZr) sobre a nocicepção induzida pela capsaicina (20 μ L, 2 μ g/pata) em camundongos Swiss machos (25-35 g). Cada grupo representa a média do tempo de reação de 6 a 12 animais tratados com EEtOHZr (125, 250 e 500 mg/kg p.o.), Morfina (5 mg/kg s.c.) e veículo (C), 60 e 30 min antes do estímulo (***) $p < 0,001$, comparado a (C) (ANOVA uma via, Teste de Bonferroni).

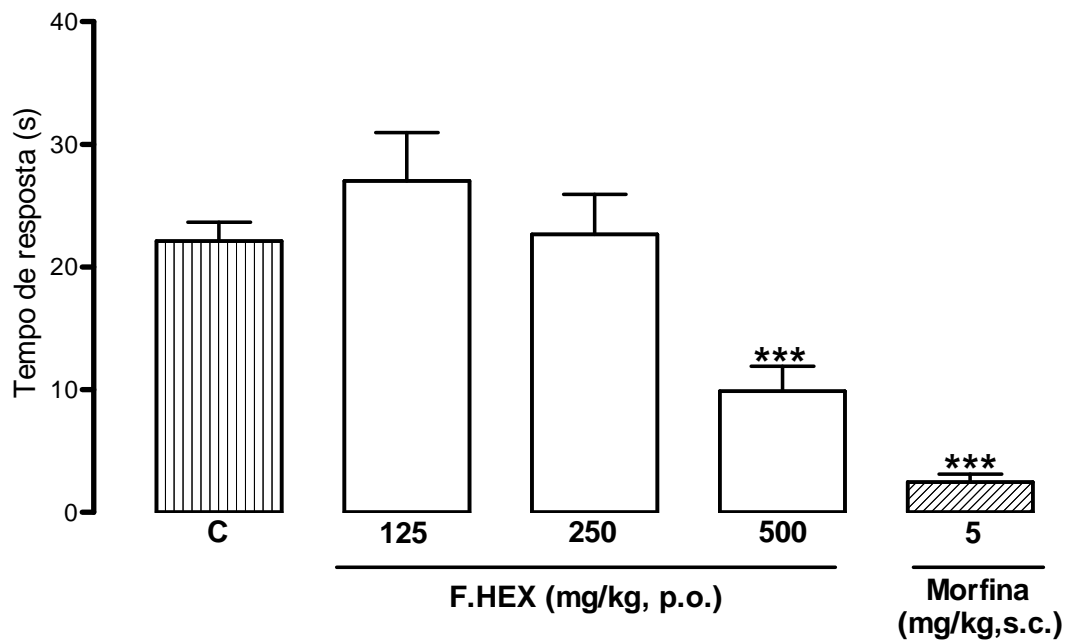


FIGURA 10: Efeito da fração hexânica (F. HEX) sobre a nocicepção induzida pela capsaicina (20 μ L, 2 μ g/pata) em camundongos Swiss machos (25-35 g). Cada grupo representa a média do tempo de reação de 6 a 12 animais tratados com F. HEX (125, 250 e 500 mg/kg p.o.), Morfina (5 mg/kg s.c.) e veículo (C), 60 e 30 min antes do estímulo (***) $p < 0,001$, comparado a (C)) (ANOVA uma via, Teste de Bonferroni).

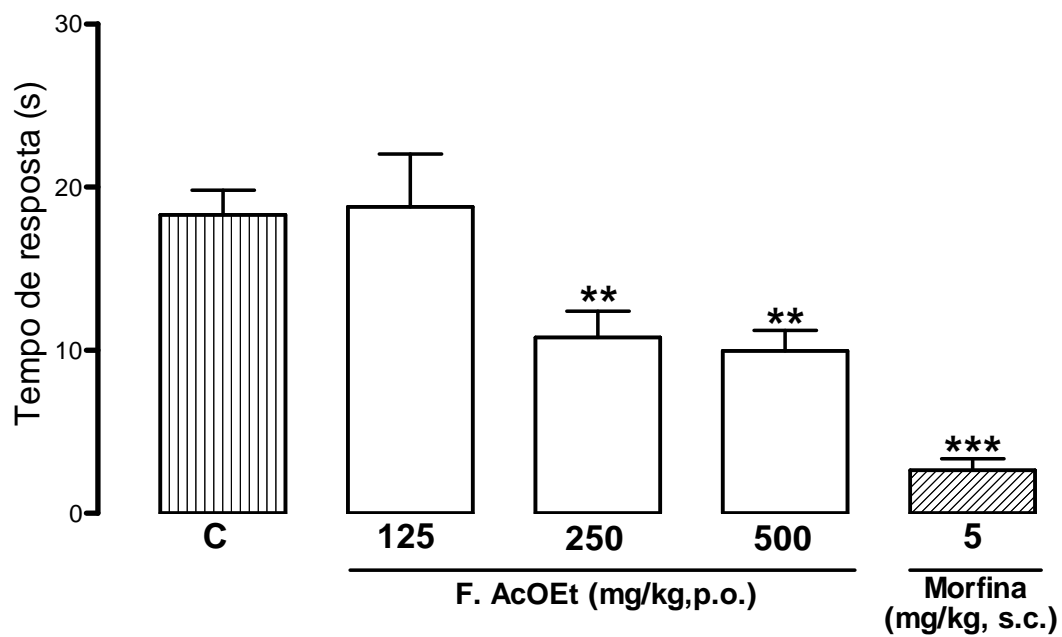


FIGURA 11: Efeito da fração acetato de etila (F. AcOEt) sobre a nocicepção induzida pela capsaicina (20 μ L, 2 μ g/pata) em camundongos Swiss machos (25-35 g). Cada grupo representa a média do tempo de reação de 6 a 12 animais tratados com F. AcOEt (125, 250 e 500 mg/kg p.o.), Morfina (5 mg/kg s.c.) e veículo (C), 60 e 30 min antes do estímulo (** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, comparado a (C)) (ANOVA uma via, Teste de Bonferroni).

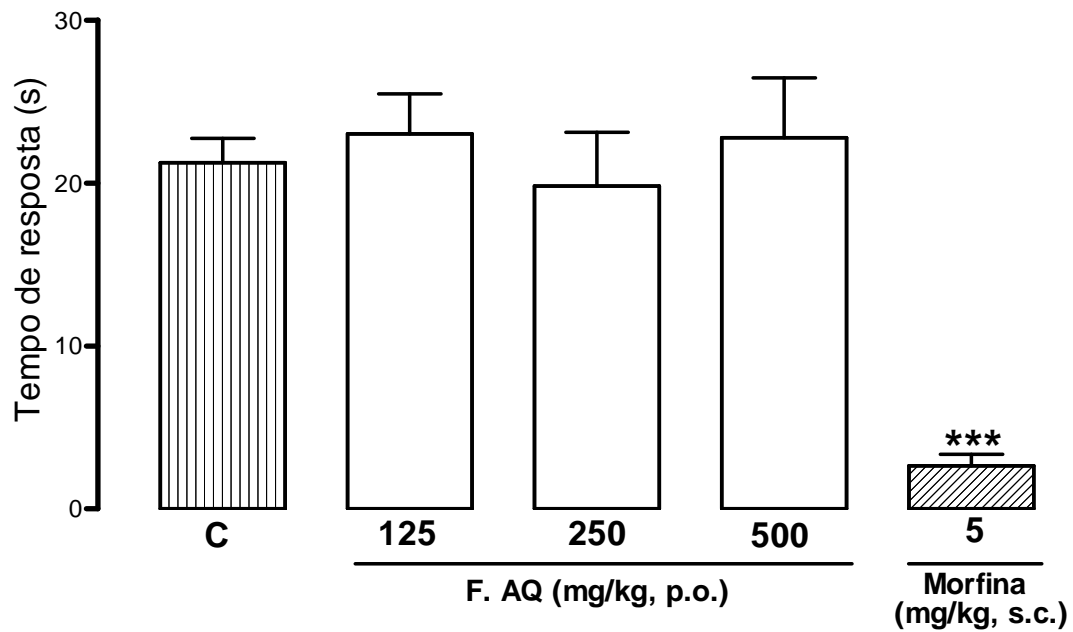


FIGURA 12: Efeito da fração aquosa (F. AQ) sobre a nocicepção induzida pela capsaicina (20 μ L, 2 μ g/pata) em camundongos Swiss machos (25-35 g). Cada grupo representa a média do tempo de reação de 6 a 12 animais tratados com F. AQ (125, 250 e 500 mg/kg p.o.), Morfina (5 mg/kg s.c.) e veículo (C), 60 e 30 min antes do estímulo (** $p < 0,001$, comparado a (C)) (ANOVA uma via, Teste de Bonferroni).

4.2.4. Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato em camundongos

A figura 13 mostra que o EEtOHZr na dose de 250 mg/kg por via oral apresentou redução significativa do tempo de lambadura da pata dos animais ($24,81 \pm 4,21$) após a administração de glutamato, em relação ao veículo ($83,85 \pm 6,12$) ($p < 0,001$). O MK 801 (0,03 mg/kg i.p.) reduziu significativamente o tempo de lambadura da pata estimulada com glutamato ($20,63 \pm 4,53$) quando comparado com o veículo. O extrato nas doses de 125 e 500 mg/kg por via oral não apresentou efeito antinociceptivo significativo ($68,79 \pm 6,65$; $66,67 \pm 8,09$).

Os dados da figura 14 mostram que a fração hexânica (125, 250 e 500 mg/kg p.o.) apresentou efeito antinociceptivo significativo, as doses (62,5, 125 e 250 mg/kg p.o.) apresentaram efeito dose-dependente, visto através da redução no tempo de lambadura da pata dos animais após a administração de glutamato ($41,52 \pm 8,79$; $8,41 \pm 2,94$; $15,22 \pm 2,92$) em relação ao veículo ($82,16 \pm 5,66$) ($p < 0,001$), respectivamente. A dose de 62,5 mg/kg não apresentou atividade antinociceptiva significativa ($72,71 \pm 6,91$), quando comparada ao veículo. O controle positivo com MK 801 funcionou como descrito anteriormente.

Os resultados da figura 15 demonstram que a fração AcOEt nas doses de 125, 250 e 500 mg/kg por via oral foi efetiva em reduzir significativamente ($37,86 \pm 2,38$; $42,45 \pm 6,13$ e $42,71 \pm 5,05$) o tempo de lambadura da pata dos animais após a administração de glutamato, em relação ao veículo ($86,66 \pm 6,26$) ($p < 0,001$). A dose de 62,5 mg/kg por via oral não apresentou efeito antinociceptivo significativo ($76,54 \pm 6,43$). O controle positivo com MK 801 funcionou como descrito anteriormente.

Os resultados apresentados na figura 16 mostram que a fração aquosa nas doses de 125, 250 e 500 mg/kg por via oral, não diminuiu significativamente o tempo de lambadura da pata dos animais após a administração de glutamato ($52,95 \pm 7,75$; $55,89 \pm 12,74$; $53,92 \pm 9,08$) em relação ao veículo ($85,77 \pm 6,74$).

A figura 17 apresenta o efeito antinociceptivo do lupeol nas doses de 12,5 e 25 mg/kg por via oral ($33,05 \pm 3,87$; $36,05 \pm 4,71$), frente à nocicepção induzida pela administração intraplantar de glutamato, em relação ao veículo ($76,76 \pm 4,72$) ($p < 0,001$). A dose de 6,25 mg/kg p.o. não apresentou efeito antinociceptivo significativo nesse teste ($68,23 \pm 7,84$), enquanto que o MK-801 funcionou como descrito.

4.3.0. Estudo dos possíveis mecanismos de ação antinociceptiva da fração hexânica do EEtOHZr em camundongos

4.3.1. Participação do sistema opióide no efeito antinociceptivo da fração hexânica e do lupeol

Os resultados presentes nas tabelas 02 e 03 e figuras 18 e 19, mostram que o pré-tratamento dos animais com naloxona (2 mg/kg, i.p.) interferiu com a antinocicepção causada pela fração hexânica do EEtOHZr (125 mg/kg, p.o.) e do lupeol (12,5 mg/kg, p.o.) no teste de nocicepção induzida pelo glutamato, revertendo a ação antinociceptiva evidenciada pela morfina (5 mg/kg, s.c.) conforme esperado.

4.3.2. Participação da via L-arginina-óxido nítrico no efeito antinociceptivo da fração hexânica e do lupeol

As tabelas 04 e 05 e as figuras 20 e 21 demonstram que o pré-tratamento dos animais com L-Arginina (substrato da enzima óxido nítrico sintase, 600 mg/kg, i.p.), reverteu de forma significativa a atividade antinociceptiva da fração hexânica do EEtOHZr (125 mg/kg, p.o.) e do lupeol (12,5 mg/kg, p.o.), quando avaliada na nocicepção induzida pelo glutamato, o que também foi evidenciado frente à administração da L-NOARG (inibidor da enzima óxido nítrico sintase, 75 mg/kg, i.p.).

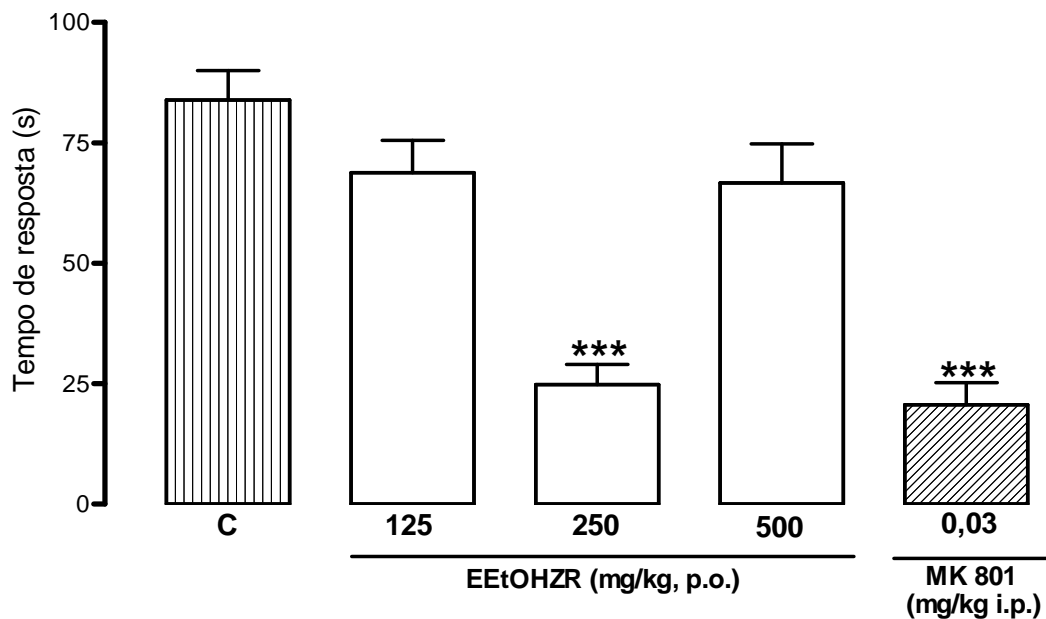


FIGURA 13: Efeito do extrato etanólico de *Zanthoxylum rhoifolium* (EEtOHZr) sobre a nocicepção induzida pelo glutamato (20 μ L, 10 μ mol/pata) em camundongos Swiss machos (25-35 g). Cada grupo representa a média do tempo de reação de 6 a 12 animais tratados com do EEtOHZr (125, 250 e 500 mg/kg p.o.), MK 801 (0,03 mg/kg i.p.) e veículo (C), 60 e 20 min antes do estímulo (***) $p < 0,001$, comparado a (C))(ANOVA uma via, Teste de Bonferroni).

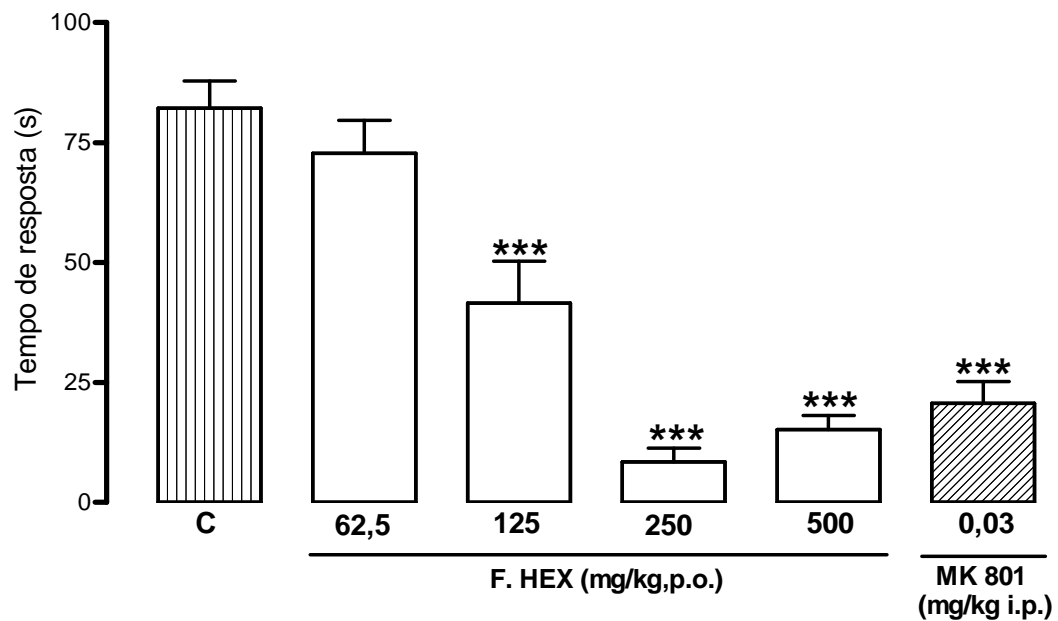


FIGURA 14: Efeito da fração hexânica (F. HEX) sobre a nocicepção induzida pelo glutamato (20 μ L, 10 μ mol/pata) em camundongos Swiss machos (25-35 g). Cada grupo representa a média do tempo de reação de 6 a 12 animais tratados com F. HEX (62,5, 125, 250 e 500 mg/kg p.o.), MK 801 (0,03 mg/kg i.p.) e veículo (C), 60 e 20 min antes do estímulo (** p <0,001, comparado a (C))(ANOVA uma via, Teste de Bonferroni).

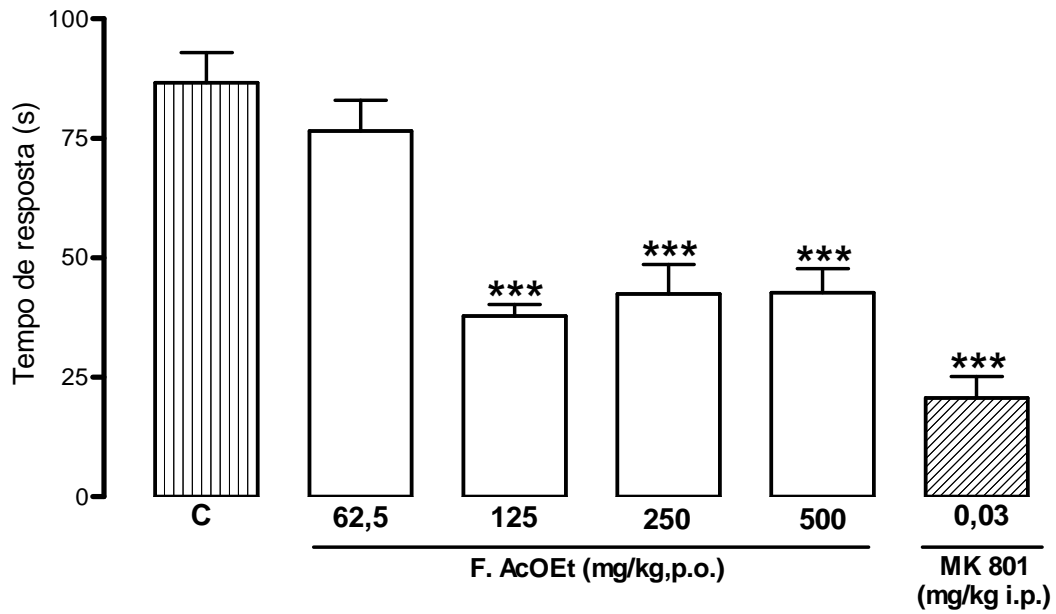


FIGURA 15: Efeito da fração acetato de etila (F. AcOEt) sobre a nocicepção induzida pelo glutamato (20 μ L, 10 μ mol/pata) em camundongos Swiss machos (25-35 g). Cada grupo representa a média do tempo de reação de 6 a 12 animais tratados com F. AcOET (62,5, 125, 250 e 500 mg/kg p.o.), MK 801 (0,03 mg/kg i.p.) e veículo (C), 60 e 20 min antes do estímulo (**p<0,01, comparado a (C)) (ANOVA uma via, Teste de Bonferroni).

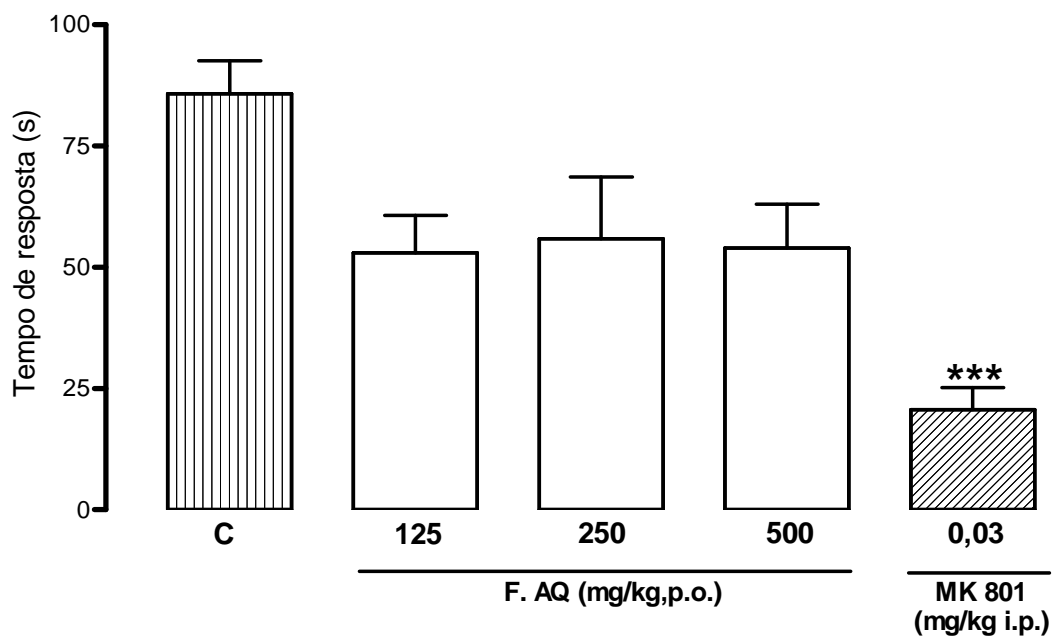


FIGURA 16: Efeito da fração aquosa (F. AQ) sobre a nocicepção induzida pelo glutamato (20 μ L, 10 μ mol/pata) em camundongos Swiss machos (25-35 g). Cada grupo representa a média do tempo de reação de 6 a 12 animais tratados com F. AQ (125, 250 e 500 mg/kg p.o.), MK 801 (0,03 mg/kg .i.p.) e veículo (C), 60 e 20 min antes do estímulo (** p <0,001, comparado a (C))(ANOVA uma via, Teste de Bonferroni).

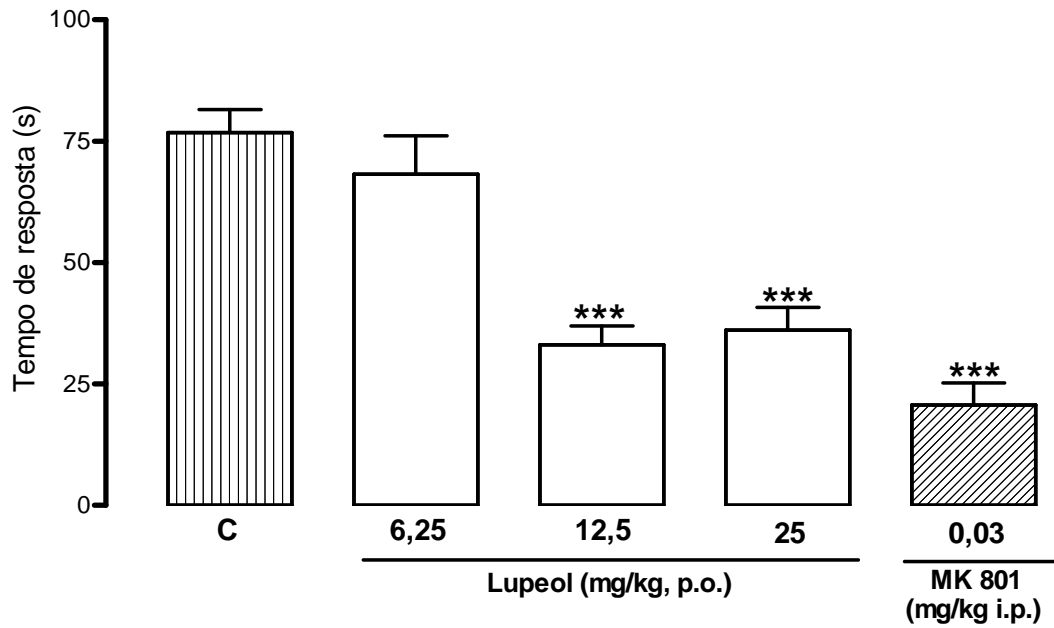


FIGURA 17: Efeito do lupeol sobre a nociceção induzida pelo glutamato (20 μ L, 10 μ mol/pata) em camundongos Swiss machos (25-35 g). Cada grupo representa a média do tempo de reação de 6 a 12 animais tratados com Lupeol (6,25, 12,5, 25 mg/kg p.o.), MK 801 (0,03 mg/kg i.p.) e veículo (C), 60 e 20 min antes do estímulo (**p < 0,01, comparado a (C)) (ANOVA uma via, Teste de Bonferroni).

Tabela 02 – Investigação do envolvimento do sistema opióide no efeito antinociceptivo da fração hexânica no teste de glutamato em camundongos.

Grupo	Dose mg/Kg, via	Tempo de resposta (s)	inibição(%) x Veículo
Veículo	-----, p.o.	92,09 ± 7,73	-----
Naloxona	2, i.p.	74,11 ± 8,01	19,52
Morfina	5, s.c.	9,02 ± 2,11***	90,20
Naloxona + Morfina	2/5, i.p./s.c	75,15 ± 11,64^a	1,40
F. HEX.	125, p.o.	38,43 ± 5,68***	58,27
Naloxona + F. HEX.	2/125 i.p./p.o.	61,37 ± 2,52^b	17,19

1) Valores representam média ± E.P.M. do tempo de resposta; 2) n= 6 a 12 animais por grupo (**p<0,001, comparado ao veículo; ^ap<0,001, comparado à Morfina; ^bp<0,05, comparado a F. HEX.; ANOVA uma via, seguida pelo Teste de Bonferroni).

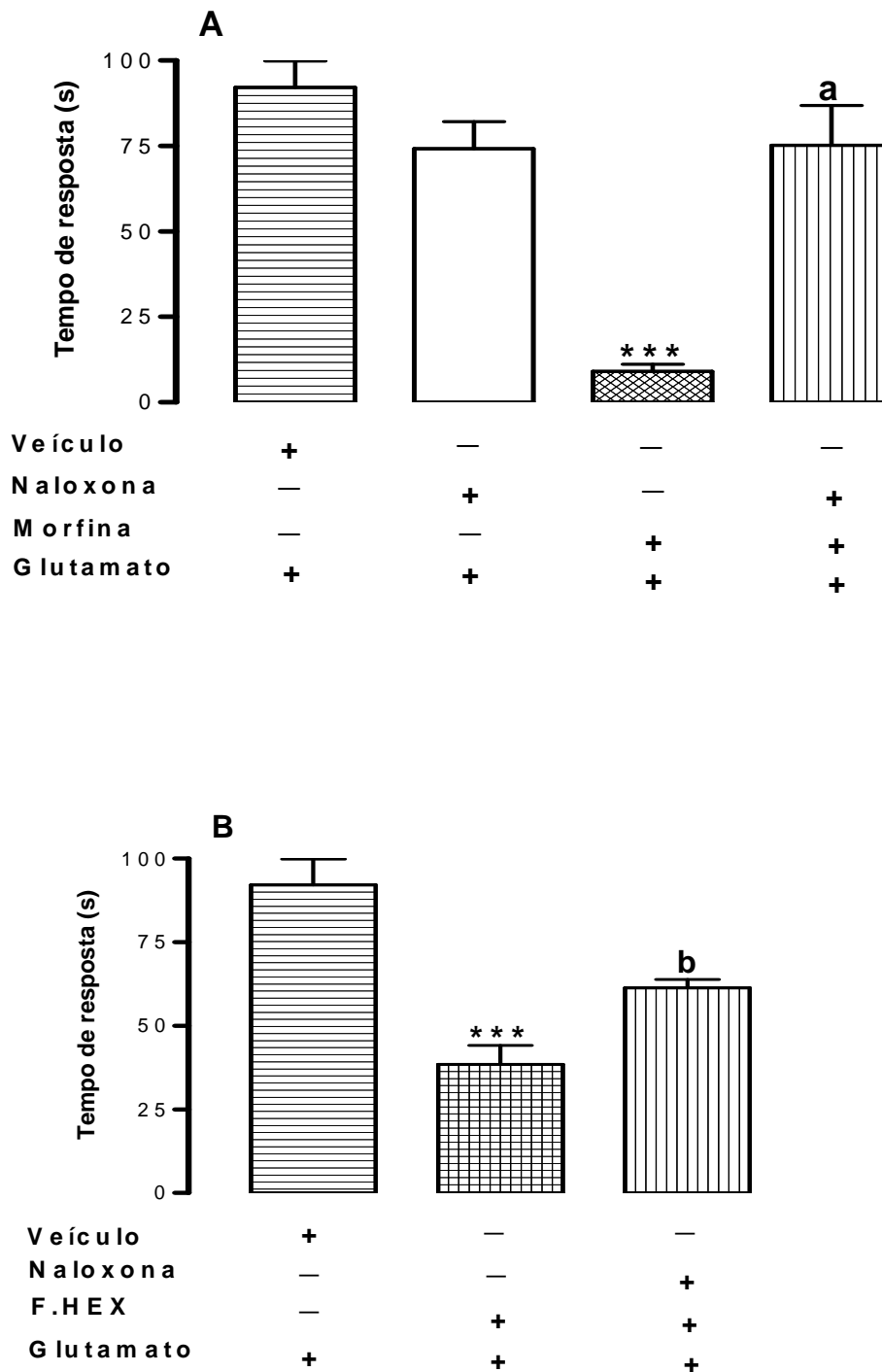


FIGURA 18: Investigação do envolvimento do sistema opióide no efeito antinociceptivo da fração hexânica (F. HEX) na nocicepção induzida pelo glutamato (20 μ L, 10 μ mol/pata) em camundongos Swiss machos (25-35 g). Cada grupo representa a média do tempo de reação de 6 a 12 animais tratados com F. HEX (125 mg/kg p.o.), naloxona (2 mg/kg i.p.), Morfina (5 mg/kg s.c.) e veículo, 60 e 20 min antes do estímulo (***) $p < 0,001$, comparado ao veículo; ^a $p < 0,001$, comparado com o grupo morfina; ^b $p < 0,05$, comparado com a F. HEX)(ANOVA uma via, Teste de Bonferroni).

Tabela 03 – Investigação do envolvimento do sistema opióide no efeito antinociceptivo do lupeol no teste de glutamato em camundongos.

Grupo	Dose mg/kg, via	Tempo de resposta (s)	Inibição(%) x Veículo
Veículo	-----, p.o.	94,72 ± 7,97	-----
Naloxona	2, i.p.	74,11 ± 8,01	21,75
Morfina	5, s.c.	9,02 ± 2,11^{***}	90,20
Naloxona + Morfina	2/5, i.p./s.c	75,15 ± 11,64^a	1,40
lupeol	12,5, p.o.	41,13 ± 7,09^{***}	56,58
Naloxona + lupeol	2/12,5 i.p./p.o.	73,02 ± 12,75^b	1,47

1) Valores representam média ± E.P.M. do tempo de resposta; 2) n= 6 a 12 animais por grupo (^{***}p<0,001, comparado ao veículo; ^ap<0,001, comparado à Morfina; ^bp<0,05, comparado ao lupeol; ANOVA uma via, seguida pelo Teste de Bonferroni).

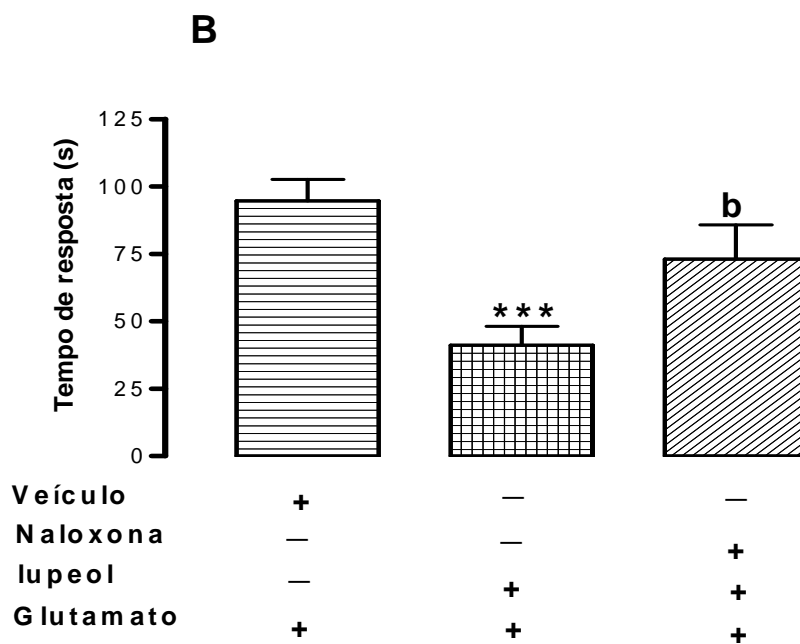
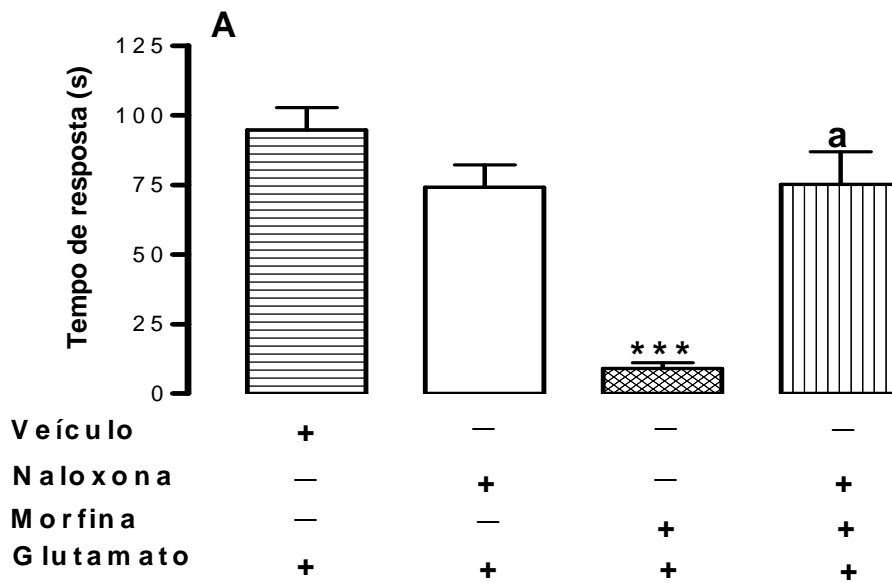


FIGURA 19: Investigação do envolvimento do sistema opióide no efeito antinociceptivo do lupeol na nocicepção induzida pelo glutamato (20 μ L, 10 μ mol/pata) em camundongos Swiss machos (25-35 g). Cada grupo representa a média do tempo de reação de 6 a 12 animais tratados com Lupeol (12,5 mg/kg p.o.), naloxona (2 mg/kg i.p.), morfina (5 mg/kg s.c.) e veículo, 60 e 20 min antes do estímulo (**p<0,001, comparado ao veículo; ^ap<0,001, comparado com o grupo morfina; ^bp<0,05, comparado com o lupeol)(ANOVA uma via, Teste de Bonferroni).

Tabela 04 – Investigação do envolvimento da via L-arginina-óxido nítrico no efeito antinociceptivo da fração hexânica no teste de glutamato em camundongos.

Grupo	Dose mg/kg, via	Tempo de resposta (s)	Inibição(%) X Veículo
Veículo	-----, p.o.	83,42 ± 7,46	-----
L- Arginina	600, i.p.	81,16 ± 4,53	2,70
L- NOARG	75, i.p	17,52 ± 3,71***	78,41
L- NOARG + L- Arginina	75/600 i.p.	77,06 ± 6,65 ^a	5,05
F. HEX	125, p.o.	41,52 ± 8,79***	50,23
L- Arginina + F. HEX.	600/125 i.p./p.o.	86,17 ± 5,91 ^b	6,17

1) Valores representam média ± E.P.M. do tempo de resposta; 2) n= 6 a 12 animais por grupo (**p<0,001, comparado ao veículo; ^ap<0,001, comparado a L-NOARG; ^bp<0,001, comparado a F. HEX.; ANOVA uma via, seguida pelo Teste de Bonferroni).

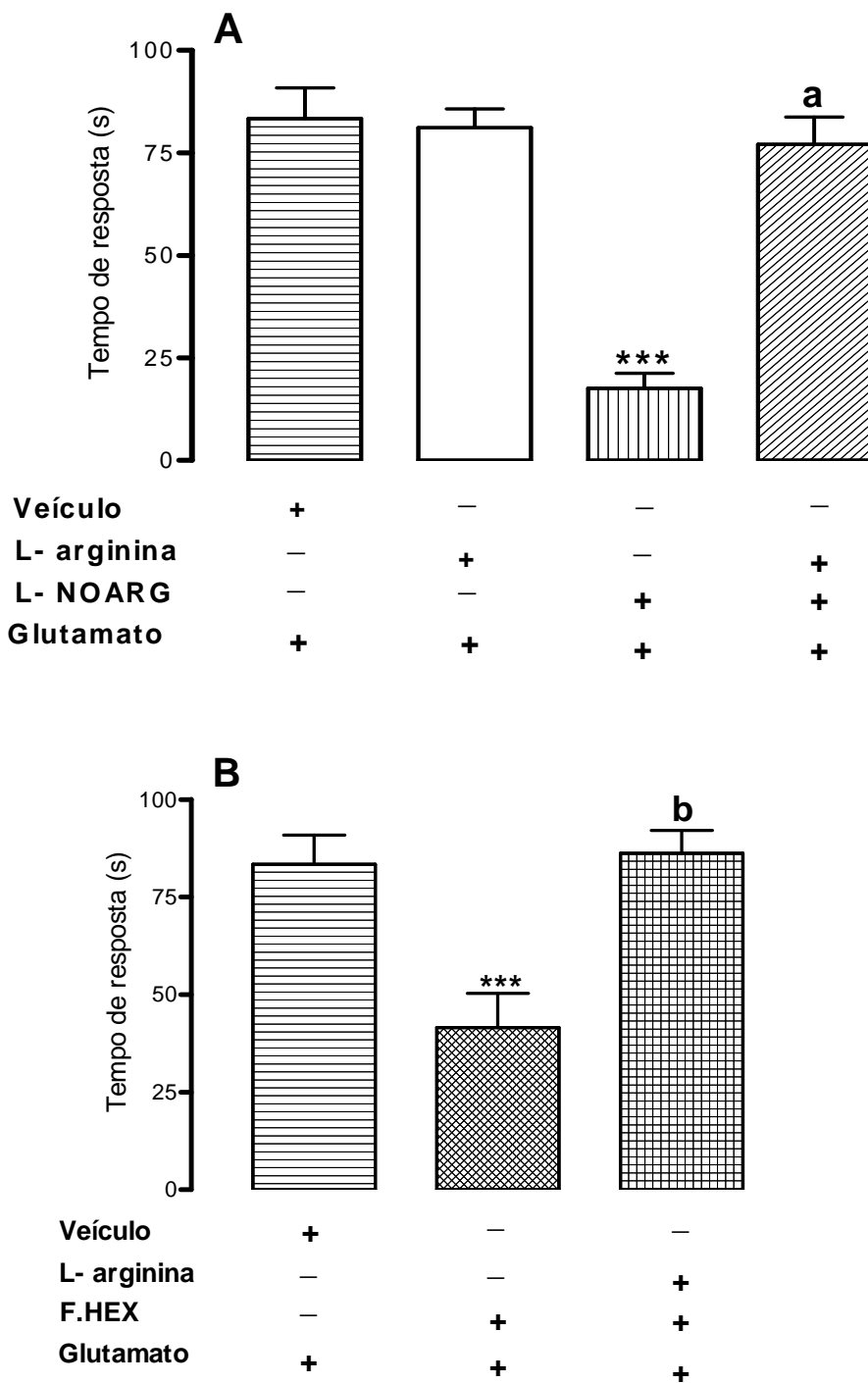


FIGURA 20: Investigação do envolvimento da via L-arginina-óxido nítrico no efeito antinociceptivo da fração hexânica (F. HEX) na nocicepção induzida pelo glutamato (20 μ L, 10 μ mol/pata) em camundongos Swiss machos (25-35 g). Cada grupo representa a média do tempo de reação de 6 a 12 animais tratados com F. HEX (125 mg/kg p.o.), L- Arginina (600 mg/kg i.p.), L-NOARG (75 mg/kg i.p.) ou veículos, 60 e 20 min antes do estímulo (** p <0,001, comparado ao veículo; ^a p <0,001, comparado com o grupo L-NOARG e ^b p <0,001, comparado com a F. HEX)(ANOVA uma via, Teste de Bonferroni).

Tabela 05 – Investigação do envolvimento da via L-arginina-óxido nítrico no efeito antinociceptivo do lupeol no teste de glutamato em camundongos.

Grupo	Dose mg/kg, via	Tempo de resposta (s)	Inibição(%) X Veículo
Veículo	-----, p.o.	81,68 ± 6,69	-----
L- Arginina	600, i.p.	81,16 ± 4,53	0,64
L- NOARG	75, i.p.	17,52 ± 3,71^{***}	78,55
L- NOARG + L- Arginina	75/600 i.p.	73,68 ± 6,67^a	9,79
Lupeol	12,5, p.o.	33,05 ± 3,87^{***}	59,53
L- Arginina + lupeol	600/12,5 i.p./p.o.	79,45 ± 9,84^b	2,73

1) Valores representam média ± E.P.M. do tempo de resposta; 2) n= 6 a 12 animais por grupo (^{***}p<0,001, comparado ao veículo; ^ap<0,001, comparado a L-NOARG; ^bp<0,001, comparado ao lupeol; ANOVA uma via, seguida pelo Teste de Bonferroni).

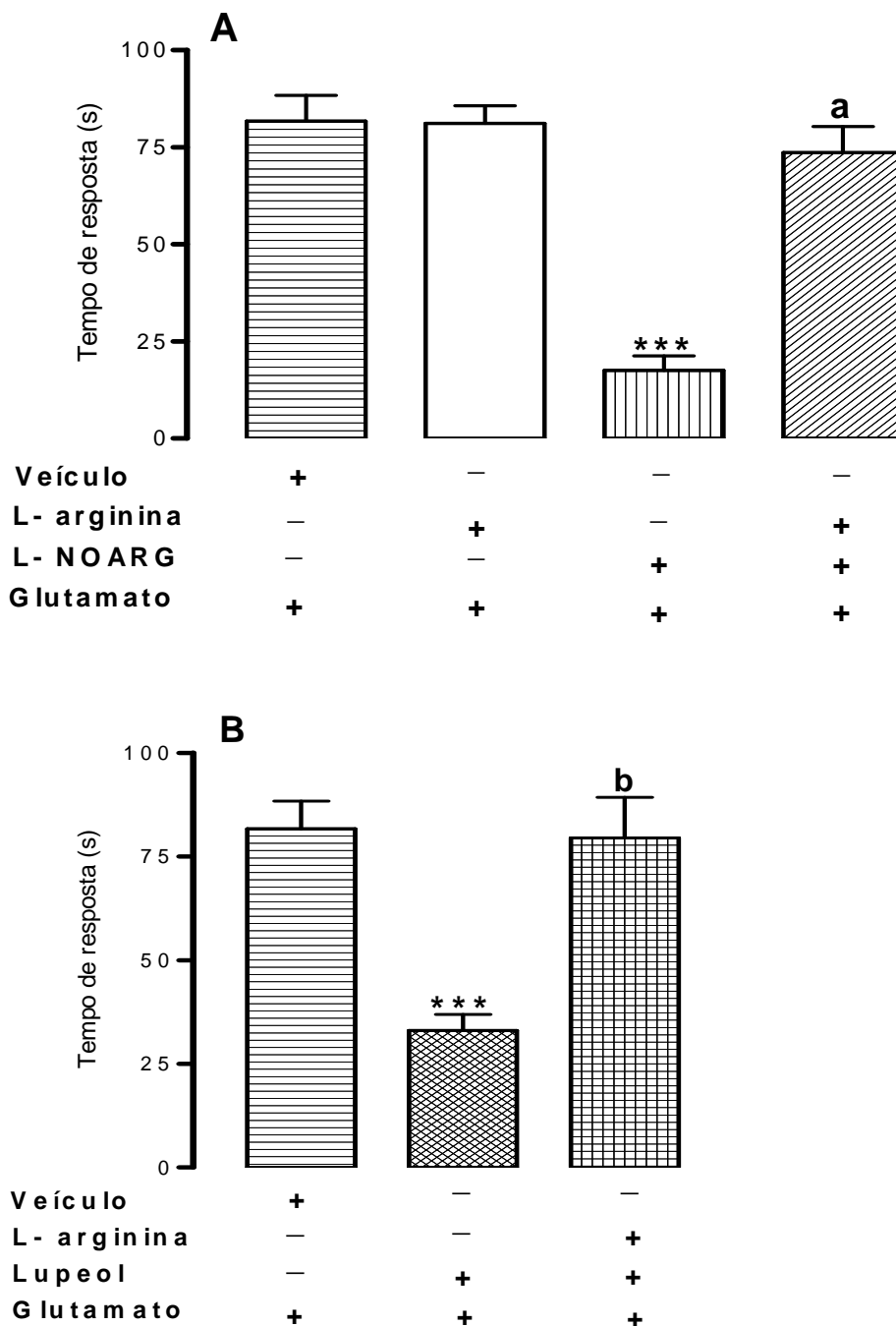


FIGURA 21: Investigação do envolvimento da via L-arginina-óxido nítrico no efeito antinociceptivo do lupeol na nocicepção induzida pelo glutamato (20 μ L, 10 μ mol/pata) em camundongos Swiss machos (25-35 g). Cada grupo representa a média do tempo de reação de 8 a 12 animais tratados com Lupeol (12,5 mg/kg p.o.), L- Arginina (600 mg/kg i.p.), L-NOARG (75 mg/kg i.p.), veículos, 60 e 20 min antes do estímulo (** $p < 0,001$, comparado ao veículo; ^a $p < 0,001$, comparado com o grupo L-NOARG e ^b $p < 0,001$, comparado com o Lupeol)(ANOVA uma via, Teste de Bonferroni).

4.3.3. Participação do sistema serotoninérgico no efeito antinociceptivo da fração hexânica e do lupeol

Os resultados das tabelas 06 e 07 e figuras 22 e 23 mostram que o pré-tratamento dos animais com cetanserina (0,3 mg/kg i.p., antagonista 5HT_{2A}) reverteu a ação antinociceptiva da fração hexânica (125 mg/kg, p.o.) e do lupeol (12,5 mg/kg, p.o.) na nocicepção induzida pelo glutamato, o que não foi evidenciado com o tratamento com pindolol (1 mg/kg i.p., antagonista 5HT_{1A/1B} e antagonista dos β -adrenoreceptores) ou ondansetrona (0,5 mg/kg i.p., antagonista 5HT₃).

4.4. Avaliação da atividade motora

4.4.1. Efeito sobre a performance motora no modelo do “Rota Rod”

Os resultados apresentados na figura 24 mostram que o tratamento com EEtOHZr (250 mg/kg p.o.) não alterou significativamente o tempo de permanência dos animais na barra giratória no teste de Rota Rod por um período de 1 minuto ($57,19 \pm 2,33$), enquanto que o Diazepam (4 mg/kg i.p.) reduziu de forma significativa o tempo de permanência dos animais na barra giratória ($15,71 \pm 5,19$) quando comparado com o veículo ($56,32 \pm 2,11$) ($p < 0,001$).

4.4.2. Avaliação da atividade exploratória de camundongos no modelo do campo aberto

No teste do campo aberto, o EEtOHZr (250 mg/kg p.o.) não alterou o número de quadrantes invadidos ($75,42 \pm 6,99$) em relação ao veículo ($71,42 \pm 8,94$), enquanto que o Diazepam (4 mg/kg i.p.) reduziu de maneira significativa ($15,71 \pm 5,19$) ($p < 0,001$) o número de quadrantes invadidos (Figura 25).

Tabela 06 – Investigação do envolvimento do sistema serotoninérgico no efeito antinociceptivo da fração hexânica no teste de glutamato em camundongos.

Grupo	Dose mg/Kg, via	Tempo de resposta (s)	Inibição(%) x Veículo
Veículo	-----, p.o.	81,18 ± 5,97	-----
Pindolol	1, i.p.	77,03 ± 5,97	5,11
Cetanserina	0,3, i.p.	66,12 ± 5,30	18,55
Ondansetrona	0,5 , i.p.	59,85 ± 8,31	26,27
F. HEX	125, p.o.	41,52 ± 8,79***	48,85
Pindolol + F.HEX	1/125, i.p./p.o.	35,33 ± 7,68	14,91
Cetanserina + F. HEX.	0,3/125 i.p./p.o.	73,63 ± 6,42^a	77,33
Ondansetrona + F. HEX.	0,5/125 i.p./p.o.	51,02 ± 9,62	22,88

1) Valores representam média ± E.P.M. do tempo de resposta; 2) n= 6 a 12 animais por grupo (**p<0,001, comparado ao veículo; ^ap<0,001, comparado a F.HEX.; ANOVA uma via, seguida pelo Teste de Bonferroni).

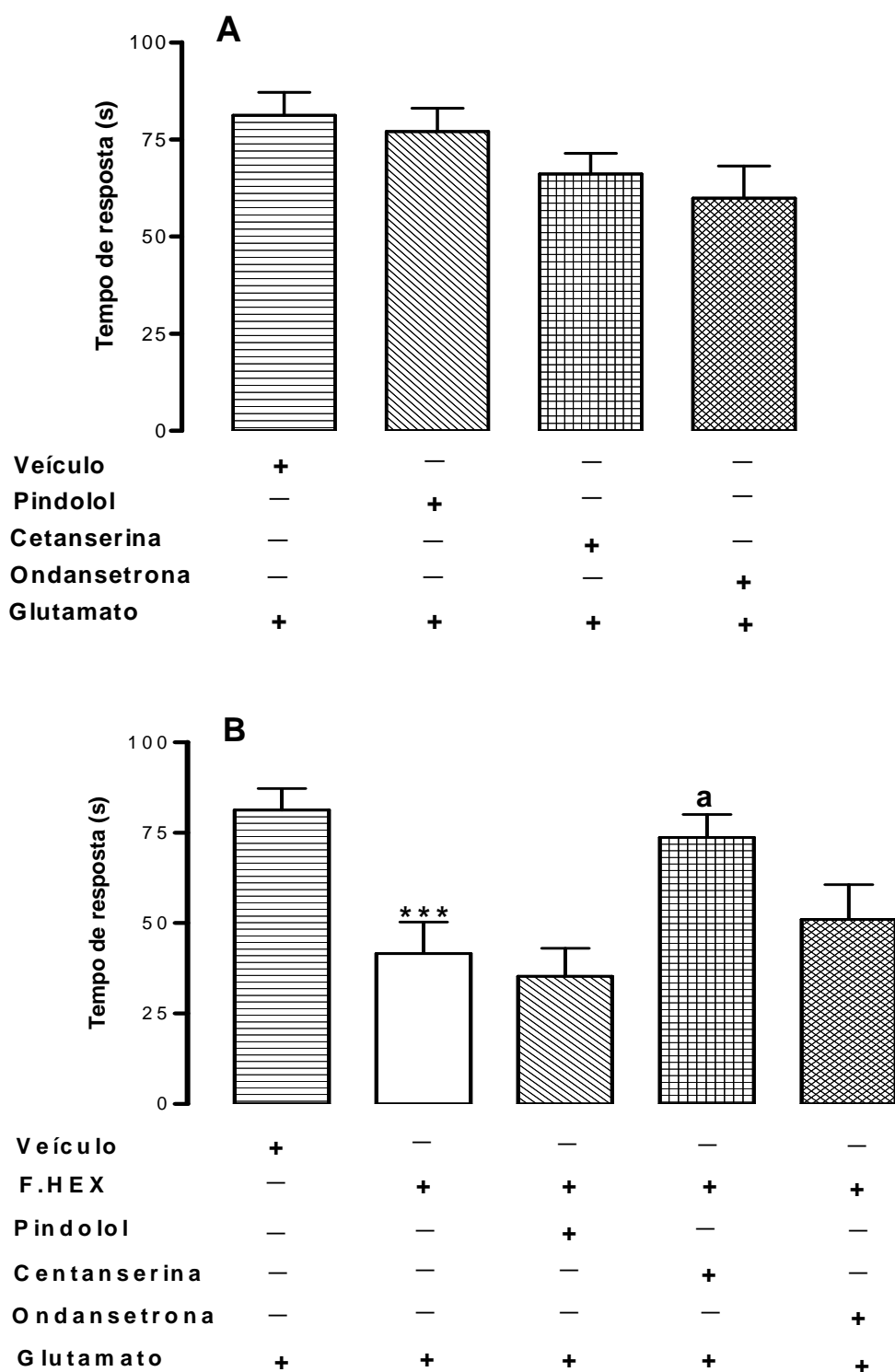


FIGURA 22: Investigação do envolvimento do sistema serotoninérgico no efeito antinociceptivo da fração hexânica (F. HEX) sobre a nocicepção induzida pelo glutamato (20 μ L, 10 μ mol/pata) em camundongos Swiss machos (25-35 g). Cada grupo representa a média do tempo de reação de 6 a 12 animais tratados com F. HEX (125 mg/kg p.o.), cetanserina (0,3 mg/kg i.p.), pindolol (1 mg/kg i.p.), ondansetrona (0,5 mg/kg i.p.), veículos, 60 e 20 min antes do estímulo (**p<0,001, comparado ao veículo; ^ap<0,001, comparado com F. HEX)(ANOVA uma via, Teste de Bonferroni).

Tabela 07 – Investigação do envolvimento do sistema serotoninérgico no efeito antinociceptivo do lupeol no teste de glutamato em camundongos.

Grupo	Dose mg/kg, via	Tempo de resposta (s)	Inibição(%) x Veículo
Veículo	-----, p.o.	82,06 ± 5,70	-----
Cetanserina	0,3, i.p.	66,12 ± 5,30	19,42
Lupeol	12,5, p.o.	33,05 ± 3,87^{***}	59,72
Cetanserina + lupeol	0,3/125 i.p./p.o.	88,07 ± 15,17^a	100

1) Valores representam média ± E.P.M. do tempo de resposta; 2) n= 6 a 12 animais por grupo (^{***}p<0,001, comparado ao veículo; ^ap<0,001, comparado ao lupeol; ANOVA uma via, seguida pelo Teste de Bonferroni).

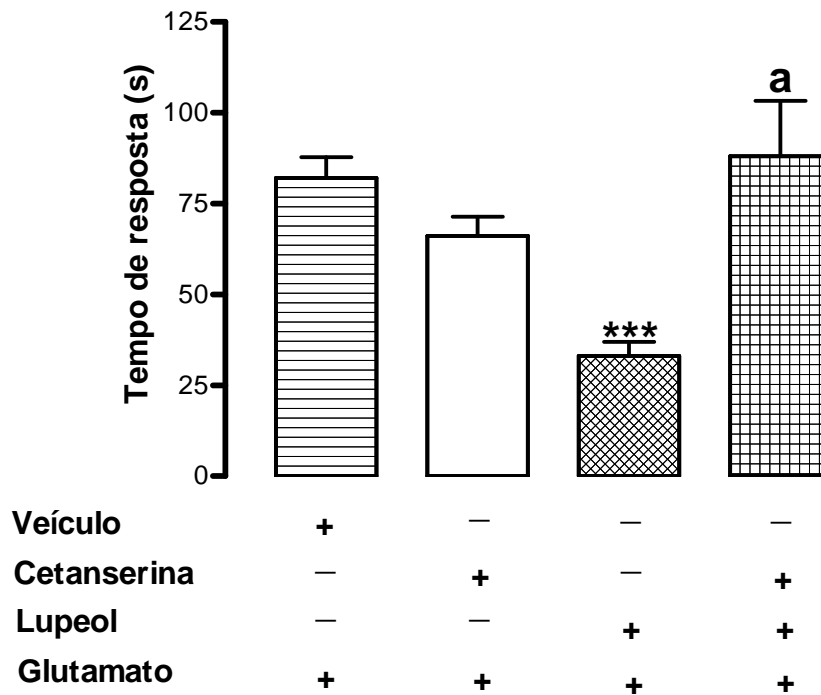


FIGURA 23: Investigação do envolvimento do sistema serotoninérgico no efeito antinociceptivo do lupeol na nocicepção induzida pelo glutamato (20 μ L, 10 μ mol/pata) em camundongos Swiss machos (25-35 g). Cada grupo representa a média do tempo de reação de 6 a 12 animais tratados com lupeol (12,5 mg/kg p.o.), cetanserina (0,3 mg/kg i.p.), veículos, 60 e 20 min antes do estímulo (** p <0,001, comparado ao veículo; ^a p <0,001, comparado com o lupeol)(ANOVA uma via, Teste de Bonferroni).

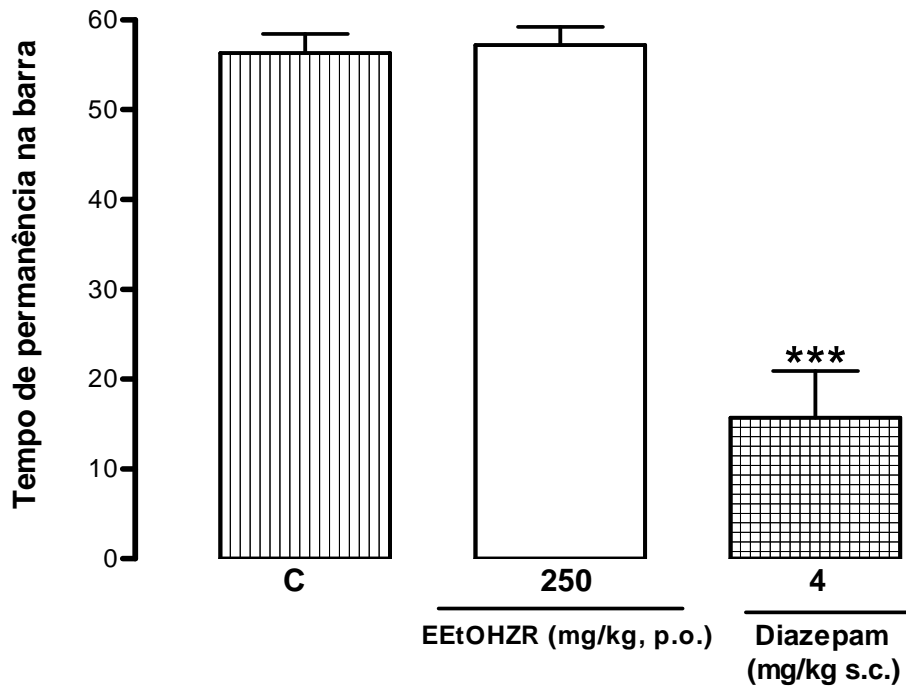


FIGURA 24: Efeito do EEtOHZr sobre a performance motora de camundongos Swiss machos (25-35 g) na barra giratória. Cada grupo representa a média do tempo de reação de 6 a 12 animais tratados com EEtOHZr (250 mg/kg p.o.), veículo (C) e diazepam (4 mg/kg s.c.), 60 e 30 min antes do estímulo (**p<0,01, comparado a (C))(ANOVA uma via, Teste de Bonferroni).

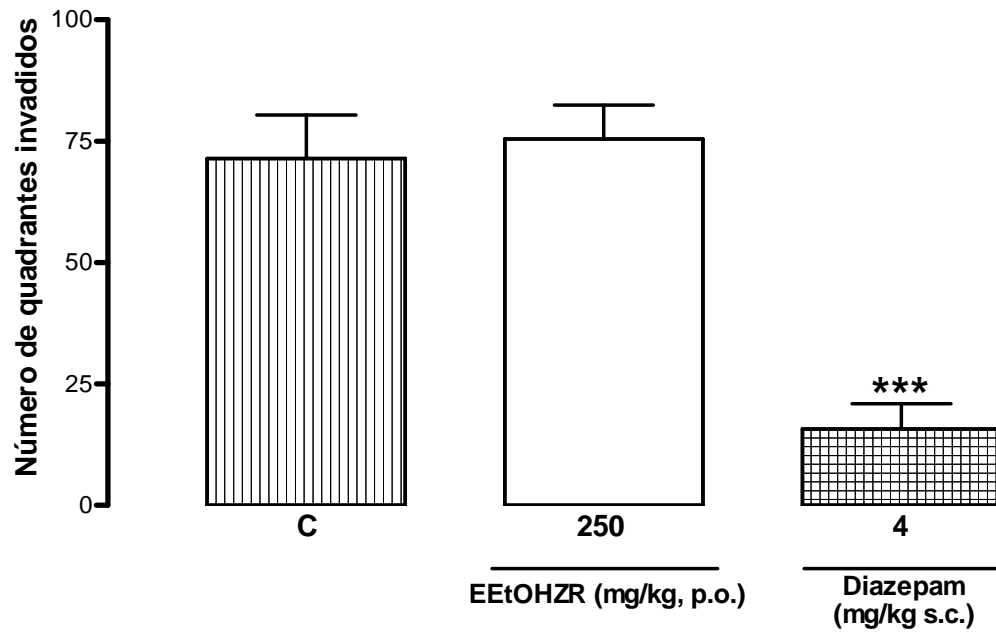


FIGURA 25: Efeito do EEtOHZR sobre a frequência de locomoção espontânea de camundongos Swiss machos (25-35 g). Cada grupo representa a média do tempo de reação de 6 a 12 animais tratados com EEtOHZR (250 mg/kg p.o.), veículo (C) e diazepam (4 mg/kg s.c.), 60 e 30 min antes do estímulo (** $p < 0,001$, comparado a (C)) (ANOVA uma via, Teste de Bonferroni).

DISCUSSÃO

5- DISCUSSÃO

Zanthoxylum rhoifolium Lam. (Rutaceae) é conhecida na literatura popular como mamica de cadela. No Brasil é amplamente distribuída e no Nordeste, encontra-se nos estados do Piauí e Ceará, mas também em outras regiões do país, sendo utilizada pela população no tratamento de dores de dente e de ouvido (CRUZ, 1995; MOREIRA, 1996; SILVA; PAOLI, 2000). Apesar de sua utilização na medicina popular para os mais variados fins, não há relatos na literatura de estudos que comprovem a sua utilização como analgésica.

Neste trabalho procurou-se investigar a atividade farmacológica de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. em modelos experimentais de nocicepção, assim como a toxicidade aguda e alguns mecanismos envolvidos na ação antinociceptiva. Desta forma o presente estudo buscou comprovar de certa forma alguns dos seus usos populares, como também contribuir para o estudo farmacológico dessa espécie, utilizando extrato etanólico de suas cascas e frações de partição obtidas com solventes de diferentes polaridades, evoluindo até a detecção de alguns dos seus constituintes químicos majoritários.

Os modelos experimentais utilizados para avaliar a atividade antinociceptiva foram modelos de dor aguda em camundongos: nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina (SAKURADA et al., 1992; SAKURADA et al., 1996; SANTOS; CALIXTO, 1997), formalina (HUNSKAAR; HOLE, 1987) ou glutamato (BEIRITH et al., 2002) e contorções abdominais induzidas pela injeção de ácido acético (COLLIER et al., 1968; BENTLEY, 1981; PIRES et al., 2004).

Neste sentido, os resultados obtidos no presente estudo, baseando-se nas indicações populares, mostram, pela primeira vez, que o extrato etanólico da casca do caule de *Zanthoxylum rhoifolium* e suas frações, assim como o lupeol (principal constituinte identificado), apresentam atividade antinociceptiva quando administrados por via oral, em diferentes modelos de nocicepção química em camundongos.

Os resultados obtidos não mostraram sinais de toxicidade aguda no extrato bruto da casca de *Zanthoxylum rhoifolium* (EEtOHZr), não sendo possível o cálculo da dose letal 50 % até a dose de 2 g/kg (Tabela 01). Em relação aos parâmetros comportamentais observados, não se detectou nenhuma alteração como piloereção, ptose, dispnéia, convulsão e nem alterações na micção, diarreia ou atividade motora espontânea, permanecendo os animais em estado normal durante o período de 72 horas de observação (MILLER; TAINTER, 1944; LITCHFIELD; WILCOXON, 1949).

O teste de formalina permite o aparecimento de uma gama de respostas motoras bem caracterizadas, cuja quantificação permite que se avalie a intensidade da resposta nociceptiva (DUBUISSON; DENNIS, 1977). Tal resposta já foi avaliada através do tempo despendido pelo animal em comportamentos assumidamente relacionados à dor, através de uma escala arbitrária de quatro pontos, mas inúmeras variações foram propostas para este método de medida, a maioria das quais preconiza o uso de apenas um parâmetro de avaliação da resposta. O tempo, contado em segundos, em que o animal permanece lambendo ou mordendo a pata estimulada (“licking time”), tem sido frequentemente usado como índice de nocicepção (HUNSKAAR; HOLE, 1987; LAPA et al., 2003).

Este modelo permite evidenciar duas fases da sensibilidade dolorosa: a primeira fase, onde a dor neurogênica (aguda) é causada pela ativação direta das terminações nervosas nociceptivas, após a administração intraplantar do agente álgico, promovendo estimulação direta de fibras aferentes nociceptivas tipo C, que liberam neuropeptídeos, como a substância P entre outros. A segunda fase seria caracterizada como dor de origem inflamatória que está relacionada à liberação de mediadores químicos como a histamina, serotonina, bradicinina, aminoácidos excitatórios e prostaglandinas (HUNSKAAR HOLE, 1987; TJØLSEN et al., 1992; CORRÊA; CALIXTO, 1993; LAPA et al., 2003).

Os resultados do presente trabalho mostram que no modelo de formalina, o EEtOHZr na dose de 250 mg/kg promoveu redução significativa em ambas as fases do teste, o que corresponde a uma inibição de 47,67 % na primeira fase e 70,69 % na segunda fase. Na dose de 125 mg/kg o EEtOHZr foi efetivo apenas na segunda fase, quando comparado com o

grupo controle, levando a uma inibição de 40,48 %. Assim, pode-se sugerir que seus constituintes ativos atuem possivelmente devido à alteração da ação de mediadores liberados durante a resposta inflamatória posterior. De acordo com a literatura, várias espécies vegetais têm ação antinociceptiva no presente teste, sugerindo que tal ação possa se dever ao efeito anti-inflamatório de vários constituintes ativos, como triterpenos e flavonóides (BARROS et al., 2006; LUIZ et al., 2007; MALEKI-DIZAJI et al., 2007).

Durante a etapa seguinte do trabalho, foram testadas as frações HEX e AcOEt nas doses de 62,5 e 125 mg/kg p.o.. Na dose de 125 mg/kg, a fração HEX foi efetiva nas duas fases de resposta, demonstrando uma inibição de 50,28 % na primeira e 56,61 % na segunda, enquanto que a dose de 62,5 mg/kg apresentou efeito significativo apenas na segunda fase, levando a uma inibição de 69,31 %. A fração AcOEt não mostrou efeito significativo na primeira fase da resposta nas doses avaliadas mas, as doses de 62,5 e 125 mg/kg mostraram inibição da segunda fase, de 37,75 e 77,21 %, respectivamente. Esses resultados nos levam a crer que os triterpenos presentes na fração HEX venham a demonstrar efeito na nocicepção direta como também frente a mediadores inflamatórios posteriormente liberados durante a resposta a formalina. Há relatos na literatura que esses constituintes apresentam efeito em ambas as fases neste modelo de dor (OTUKI et al., 2001; PIETROVSKI et al., 2006). Por outro lado, a fração AcOEt possui constituintes como os flavonóides, que apresentam prioritariamente inibição da ação de substâncias como histamina, serotonina, bradicinina e prostaglandinas liberados, responsáveis pela resposta inflamatória observada, o que pode ser reforçado pelo efeito de flavonóides como a quercetina e o kaempferol, presentes na fração AcOEt do extrato hidroalcoólico das folhas de *Danae racemosa* (Asparaginaceae), capazes de inibir tanto a primeira como a segunda fase de resposta no teste da formalina (MALEKI-DIZAJI et al., 2007; WILLAIN-FILHO et al., 2008), e pelo isolamento de flavonóides da casca de outras espécies de *Zanthoxylum* (GARG et al 2001).

Esses resultados mostraram que o extrato etanólico e suas frações HEX e AcOEt foram capazes de inibir de forma significativa ambas as fases, tanto a inicial quanto a tardia da resposta à formalina, fornecendo indícios de

que esta planta possui um importante efeito antinociceptivo e provável ação anti-inflamatória.

Embora seja um modelo pouco específico, o teste de contorções abdominais em camundongos utilizado neste trabalho é de ampla utilização na pesquisa de drogas analgésicas com ação anti-inflamatória, por ser simples e de fácil observação. O ácido acético é um estímulo conveniente para um teste de triagem, por produzir uma resposta cuja intensidade depende da interação de vários eventos, neurotransmissores e neuromoduladores que determinam a nocicepção. Assim, este modelo é sensível a substâncias analgésicas de ação central ou periférica, dotadas dos mais variados mecanismos de ação (LAPA et al., 2003).

A administração intraperitoneal de ácido acético, um agente irritante para a membrana serosa, provoca comportamentos estereotipados que são caracterizados por contorções abdominais, movimentos do corpo inteiro (particularmente das patas traseiras), redução da atividade motora e da coordenação motora (LE BARS et al., 2001).

No teste de contorções abdominais constatou-se que EEtOHZr nas doses 250 e 500 mg/kg p.o., não apresentou efeito antinociceptivo significativo, embora a morfina (2,5 mg/kg s.c.) tenha diminuído o número de contorções abdominais em relação ao veículo. A nocicepção provocada pelo ácido acético envolve a estimulação direta de fibras nociceptivas tipo C, ocorrendo a produção principalmente de PGE₂ e PGF₂ no fluido peritoneal, e depende da liberação de citocinas como IL-1 β , TNF α e IL-8, de macrófagos e basófilos localizados na cavidade abdominal. Dessa forma, como o EEtOHZr não apresentou efeito antinociceptivo nesse teste, houve um paradoxo entre essa resposta e aquela obtida no teste da formalina, havendo maior sensibilidade deste último em relação à atividade antinociceptiva/anti-inflamatória dos seus constituintes ativos, o que necessita de investigação posterior (FAROUK et al., 2008, LUCENA et al., 2007).

Dando continuidade ao estudo, utilizou-se EEtOHZr e frações acetato de etila, hexânica, e aquosa, na nocicepção neurogênica induzida pela injeção intraplantar de capsaicina, que é um alcalóide extraído da pimenta vermelha, e que estimula terminações nervosas nociceptivas e térmicas causando dor

intensa (BINOTTI et al., 2003; SAKURADA et al., 1992; SANTOS; CALIXTO, 1997). A capsaicina age através dos receptores vanilóides (TRPV-1) no sistema nervoso periférico, abrindo um canal catiônico não seletivo, que permite o influxo de cátions, principalmente Ca^{++} e Na^+ , causando despolarização e o início de potenciais de ação. Esses receptores (TRPV-1) podem ser ativados em temperaturas acima de 43 °C, uma temperatura semelhante àquela que provoca a dor (BINOTTI et al., 2003; OKUSE, 2007; PALAZZO et al., 2008).

Estudos demonstram que a capsaicina provoca a despolarização de células ganglionares da raiz dorsal, associadas às fibras demielinizadas do tipo C e provavelmente também às fibras mielinizadas A δ , sem afetar outros neurônios sensitivos. A capsaicina determina a liberação de vários neuropeptídeos, principalmente as taquicininas (substância P, neurocinina A e neurocinina B) que atuam na transmissão da sensação de dor na via nociceptiva e de processos inflamatórios (BINOTTI et al., 2003; SAKURADA et al., 1992; SAKURADA et al., 1996; SANTOS; CALIXTO, 1997).

Desta forma, utilizando o modelo de nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina, pode-se observar que apenas a dose de 250 mg/kg por via oral do EEtOHZr foi capaz de inibir a nocicepção neurogênica causada pela capsaicina. As doses de 125 mg/kg e 500 mg/kg não mostraram efeito, e segundo a literatura, esse fenômeno pode ocorrer quando a maior dose atingiu níveis de concentração excessivos ou tóxicos (CALABRESE; BALDWIN, 2001).

Em seguida foram testadas as doses 125, 250 e 500 mg/kg por via oral das frações HEX, AcOEt e AQ. A primeira apresentou efeito antinociceptivo significativo em relação ao veículo apenas na dose de 500 mg/kg, a segunda mostrou-se eficaz nas doses de 250 e 500 mg/kg, enquanto que a última não apresentou efeito em nenhuma das doses estudadas. Uma vez que a capsaicina causa dor neurogênica que envolve a ativação, via receptor vanilóide (TRPV 1), de fibras aferentes nociceptivas tipo C (CATERINA et al., 1997), pode-se sugerir que os princípios ativos presentes nas frações estudadas inibem a liberação ou ação de substâncias que atuem via TRPV1, ou agem diretamente nesse receptor (SZALLASI; BLUMBERG, 1993; SANTOS; CALIXTO, 1997; SAKURADA et al., 1996, 2003).

Está bem descrito na literatura que o glutamato é um neurotransmissor excitatório encontrado em maior concentração no Sistema Nervoso Central (SNC), estando seus receptores localizados na coluna dorsal, originados de fibras aferentes primárias nociceptivas (GAVIRAGHI, 2000; CARLTON, 2001). Os receptores de glutamato são classificados funcionalmente como receptores ionotrópicos de três tipos e foram identificados como N-metil-D-aspartato (NMDA), cainato e ácido DL- α -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazole-propionico (AMPA), diretamente acoplados a canais iônicos ativados por ligantes, que medeiam a ação sináptica rápida. Os receptores metabotrópicos são acoplados à proteína G, ligados a sistemas de segundos mensageiros intracelulares, presentes tanto na membrana pré quanto pós-sináptica, participam na modulação da transmissão sináptica, desempenhando função importante na transdução de sinal do glutamato (GAVIRAGHI, 2000; ROSA et al., 2005; ARAÚJO et al., 2006).

Esses receptores agem individualmente ou em combinações durante a transmissão excitatória, e, além de mediar a transmissão sináptica normal, eles participam na modificação das conexões sinápticas durante o desenvolvimento. A ativação desses receptores abre os canais iônicos permeáveis a Na^+ , K^+ e Ca^{++} . A captação do glutamato é dirigida por um cotransporte de sódio acoplado a um contratransporte de potássio, além disso, durante o ciclo de transporte pode ocorrer movimento de íons hidrogênio, que leva a mudança de pH. Esses canais cátions-seletivos são compostos de subunidades e, para cada tipo de receptor, há vários subtipos que diferem na composição das subunidades e nas propriedades funcionais (ARAÚJO et al., 2006).

Os resultados obtidos no presente estudo mostraram que apenas a dose de 250 mg/kg do EEtOHZr inibiu o tempo de lambida da pata do animal induzida por glutamato em relação ao veículo, permanecendo as doses de 125 e 500 mg/kg p.o. inefetivas. Esta resposta parece envolver a ativação de receptores periféricos, principalmente NMDA, com a subsequente liberação de óxido nítrico (BEIRITH et al., 2002; ARAÚJO et al., 2006), demonstrando um caráter de hormese, provavelmente porque a dose mais elevada já começa a sair do limite farmacológico para o toxicológico (CALABRESE et al., 2001).

As frações HEX e AcOEt diminuíram a resposta nociceptiva induzida pelo glutamato nas maiores doses estudadas (125, 250 e 500 mg/kg p.o.), sendo ineficazes na menor dose utilizada (62,5 mg/kg p.o.). Por outro lado a fração AQ foi ineficaz nesse teste em todas as doses avaliadas (125, 250 e 500 mg/kg p.o.). Essas frações (62,5, 125 e 250 mg/kg) demonstraram efeito dose dependente, sugerindo que seus constituintes ativos possam inibir a ativação ou a ação de substâncias que atuem na ativação de receptores NMDA presentes nas fibras nociceptivas (ARAÚJO et al., 2006), e tal interação estaria interferindo com a liberação do óxido nítrico e outros mediadores envolvidos (BEIRITH et al., 2002), o que foi confirmado quando a L-arginina reverteu o efeito antinociceptivo da F.HEX (Figura 21).

O lupeol mostrou-se efetivo nas doses de (12,5 e 25 mg/kg p.o.) frente à nocicepção induzida pelo glutamato. Assim, o lupeol, que é o principal constituinte da fração hexânica, pode ser o responsável pela atividade observada com esta, o que sugere sua participação de forma direta ou indireta na ativação dos receptores glutamatérgicos. Alguns trabalhos têm demonstrado que o lupeol apresenta efeito anti-inflamatório (FERNÁNDEZ et al., 2001a,b; GEETHA; VARALAKSHMI, 2001; LIMA et al., 2007), mas não antinociceptivo, o que vem de encontro aos resultados apresentados no presente trabalho, provavelmente porque naquele estudo o lupeol não apresentou atividade antinociceptiva por via oral em ratos Wistar, nos modelos de placa quente e contorções abdominais (GEETHA; VARALAKSHMI, 2001).

Numa outra etapa do presente trabalho, investigou-se possíveis mecanismos que pudessem estar envolvidos na atividade antinociceptiva da fração hexânica do EEtOHZr, bem como do seu principal constituinte ativo, o lupeol, na nocicepção induzida por glutamato.

Os receptores opióides estão localizados na periferia, medula espinhal e estruturas supra-espinhais, esses receptores são denominados μ , κ e δ , todos eles estão acoplados a proteína G e medeiam os principais efeitos farmacológicos da morfina, inclusive analgesia, que é principalmente mediada pelo receptor μ , ou seja, bloqueando a transmissão periférica e central da via nociceptiva aferente e por isso, os agonistas desses receptores tornam-se tão eficientes no tratamento da dor (SAWYNOK, 2003).

Neste trabalho demonstrou-se que a administração da naloxona reverteu parcialmente o efeito antinociceptivo da fração HEX, assim como do seu principal constituinte, o lupeol. Este resultado sugere que a antinocicepção provocada pela fração hexânica possa ter um envolvimento parcial do sistema opióide, juntamente com a participação de outras vias modulatórias, e que o lupeol pode ser o principal responsável por esta ação, atuando por mecanismos centrais ou periféricos. Existem relatos na literatura sugerindo a participação do sistema opióide no efeito de constituintes como triterpenos e diterpenos, provavelmente em nível de receptores opióides (PIETROVSKI et al., 2006; LUIZ et al., 2007; CHATURVEDI et al., 2008).

O sistema serotoninérgico é uma das vias que exercem um papel importante na modulação da nocicepção, razão pela qual também foi avaliada a sua participação na antinocicepção da fração hexânica e do lupeol. A serotonina tem sido associada ao longo do tempo, com o processamento e modulação da dor no Sistema Nervoso Central (SNC) e periférico. É liberada das plaquetas e células mastocitárias após a lesão no nervo, sendo o efeito algésico ou analgésico dependente do sítio de ação e do subtipo de receptor ativado. Existem vários receptores para serotonina e estudos mostram que os receptores 5HT_{1A}, 5HT₂ e 5HT₃ estão presentes nas fibras aferentes tipo C. A serotonina atua em combinação com outros mediadores inflamatórios e pode, ectopicamente, estimular e sensibilizar as fibras aferentes, contribuindo para uma sensibilização periférica e hiperalgesia inflamatória e conseqüentemente lesão do nervo (SOMMER, 2004).

Os resultados da presente investigação mostraram que o tratamento com pindolol, antagonista 5HT_{1A/1B} e antagonista dos β -adrenoreceptores, e com ondansetrona, antagonista 5HT₃, não alterou de maneira significativa a ação antinociceptiva causada pela fração hexânica na nocicepção induzida pelo glutamato. Por outro lado, a cetanserina, antagonista 5HT_{2A}, reverteu completamente a ação antinociceptiva da fração hexânica e do lupeol nesse método, sugerindo a participação desse subtipo de receptor serotoninérgico na resposta evidenciada. Como o lupeol é o principal constituinte ativo dessa fração, talvez seja o responsável majoritário pelo efeito observado, e possa estar agindo por uma ação direta nos receptores serotoninérgicos, ou indireta,

via liberação de serotonina endógena (SOMMER, 2004; PIETROVSKI et al., 2006).

Nossos dados demonstram que a via L-arginina-óxido nítrico parece estar envolvida no efeito antinociceptivo da fração hexânica do EEtOHZr e do seu constituinte majoritário lupeol, uma vez que a L-arginina foi capaz de reverter o efeito antinociceptivo de ambos na nocicepção induzida pelo glutamato. Ainda foi possível constatar, como descrito na literatura, que a L-N^G-nitro-arginina (L-NOARG - inibidor da óxido nítrico sintase), reduziu significativamente a resposta neuronal após a estimulação química. Este efeito da L-NOARG foi totalmente revertido pela injeção de L-arginina, substrato da enzima óxido nítrico sintase (NOS) (BEIRITH et al., 2002; PIETROVSKI et al., 2006; LUIZ et al., 2007).

Os métodos que permitem estudar a resposta nociceptiva envolvendo um comportamento motor, seja o reflexo de retirada da cauda ou o ato de levantar ou lambe a pata estimulada, podem sofrer a interferência de drogas que promovam relaxamento muscular ou sedação, levando à incoordenação motora, fazendo com que as respostas não sejam necessariamente analgésicas. Para avaliar uma possível interferência desses efeitos na ação antinociceptiva evidenciada, os animais foram submetidos aos testes do campo aberto e Rota Rod após o tratamento com EEtOHZr. O teste de Rota Rod é um método que detecta a incoordenação motora pela ação relaxante muscular, permitindo com segurança que descartemos um resultado falso-positivo para o efeito antinociceptivo, enquanto que o campo aberto irá evidenciar um possível efeito depressor central, pela diminuição da atividade motora espontânea (LAPA et al., 2003; DUHAM; MIYA, 1957).

De acordo com os resultados obtidos, verificou-se que o EEtOHZr não alterou o tempo de permanência dos animais na barra giratória no teste do Rota Rod, como também não reduziu o número de quadrantes invadidos no teste do campo aberto, sugerindo que o extrato não apresenta ação relaxante muscular nem depressora central na maior dose efetiva nos modelos de nocicepção.

Em síntese, os resultados apresentados neste trabalho confirmam alguns dos usos populares de *Zanthoxylum rhoifolium* e contribuem para o

conhecimento farmacológico desta espécie, indicando que o extrato etanólico das cascas do caule e frações de partição deste (hexânica, acetato de etila), apresentam importante efeito antinociceptivo em modelos de nocicepção química induzida por capsaicina, formalina e glutamato em camundongos. O lupeol, principal constituinte ativo da fração hexânica, parece ser o principal responsável pelos efeitos observados.

Os presentes resultados também sugerem que o sistema opióide medeia parte da ação antinociceptiva observada, assim como o sistema serotoninérgico via receptores 5-HT₂, e que existe alteração da transmissão glutamatérgica e vanilóide nesse efeito.

Neste contexto, os resultados obtidos nesse estudo fornecem uma base farmacológica para a utilização popular da *Zanthoxylum rhoifolium* como analgésica, e suas preparações ativas demonstram potencial terapêutico para o desenvolvimento de fitoterápicos e/ou fitofármacos com tal propriedade.

CONCLUSÕES

6- CONCLUSÕES

Os resultados do presente estudo nos permitem concluir que:

1- O extrato etanólico da casca do caule de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam, não apresenta toxicidade aguda por via oral, tendo em vista que não foi possível o cálculo da DL₅₀ em camundongos;

2- O EEtOHZr e as frações HEX e AcOEt exercem efeito antinociceptivo frente à nocicepção química induzida por capsaicina, formalina e glutamato, mas não por ácido acético;

3- A ação antinociceptiva evidenciada com a fração HEX e lupeol parece envolver a mediação do sistema opióide;

4- A ação antinociceptiva demonstrada com a fração HEX e lupeol envolve a participação do sistema serotoninérgico via receptores 5-HT_{2A} e da via L-arginina-óxido nítrico;

5- A ação antinociceptiva da fração HEX e lupeol frente à capsaicina se deve possivelmente à inibição da liberação ou da ação de substâncias que atuem na ativação do receptor vanilóide (TRPV 1) nas fibras aferentes primárias;

6- A ação antinociceptiva da fração HEX e lupeol frente ao glutamato envolve a inibição da liberação ou da ação de substâncias que atuem na ativação dos receptores glutamatérgicos, possivelmente ionotrópicos;

7- O EEtOHZr não manifestou ação relaxante muscular ou depressora central, indicando que esses efeitos não contribuíram para a atividade antinociceptiva evidenciada no presente estudo.

REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

ALMEIDA, T. F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Research**, v.1000, p. 40–56, 2004.

ANDRADE, S. F.; CARDOSO, L. G. V.; CARVALHO, J. C. T.; BASTOS, J. K. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of extract, fractions and populnic acid from bark wood of *Austroplenckia populnea*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 109, p. 464–471, 2007.

ARAÚJO, A, M.; MONTENEGRO, F. C.; MAFRA, R, A.; ALVES, A. R. A.; OLIVEIRA, F, A.; CRUZ, J. A. Principais Sistemas de Neurotransmissão. *In*: OLIVEIRA, R, N. **Psicofarmacologia - Fundamentos Práticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, Cap. 02, p. 22-45, 2006.

ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. **Animal Behavior**, v. 21 (2), p. 205-235, 1973.

ASHAN, M.; ZAMAN, T. A.; HASAN, C. M.; ITO, C.; ISLAM, S. K. N. Constituents and cytotoxicity of *Zanthoxylum rhesta* stem bark. **Fitoterapia**, v. 71 p. 697-700, 2000.

BALLANTYNE, J. C. Opioid Analgesia: Perspectives on right use and Utility, **Pain Physician**, v. 10, p. 479-491, 2007.

BARROS, I. M. C.; LOPES, L. D. G.; BORGES, M. O . R.; BORGES, A. C. R.; RIBEIRO, M. N. S.; FREIRE. S. M. F. Anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of *Pluchea quitoc* (DC.) ethanolic extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, p. 317–320, 2006.

BASTOS, J. K.; CARVALHO, J. C.T.; SOUZA, G. H. B.; PEDRAZZI, A, H. P.; SARTI, S. J. Anti-inflammatory activity of cubebin, a lignan from the leaves of

Zanthoxylum naranjillo Griseb. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 75, p. 279-282, 2001.

BEIRITH, A.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. **Brain Research**, v. 924, p. 219-228, 2002.

BENTLEY, G. A.; NEWTON, S. H.; STARR, J. Evidence for an action of morphine and enkephelin on sensory nerve endings in the mouse peritoneum. **European Journal Pharmacology**, v. 73, p. 325-333, 1981.

BERTANI, S.; BOURDY, G.; LANDAU, I.; ROBINSON, J.C.; ESTERRE, P.; DEHARO, E. Evaluation of Guiana traditional antimalarial remedies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, p. 45-54, 2005.

BINOTTI, R. S.; MELO, A. M. T.; OLIVEIRA, C. H.; De NUCCI, G. Pimenta-vermelha (*Capsicum frutescens* – SOLANACEAE). **Jornal Brasileiro de Fitomedicina**, v. 1, p. 6-11, 2003.

CALABRESE, E. J.; BALDWIN, L. A. Hormesis: U-shaped dose responses and their centrality in toxicology. **Trends in pharmacological Sciences**, v. 22, nº6, p. 285-291, 2001.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Biodiversidade/Artigos**, p. 37-39, 2003.

CAMELO, F. B.; SOUSA, C. M. M.; GONZAGA, W. A.; CHAVES, M. H. Estudo químico e farmacológico de *Zanthoxylum rhoifolium*. **XIV Seminário de iniciação científica da UFPI**, p.353 – 354, 2005.

CARLTON, S.; M. Peripheral excitatory amino acids. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 1, p. 52-56, 2001.

CATERINA, M. J.; SCHUMACHER, M. A.; TOMINAGA, M.; ROSEN, T. A.; LEVINE, J. D.; JULIUS, D. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, v. 389, p. 816-824, 1997.

CECHINEL-FILHO, Y. & YUNES, R. A. Estratégias para obtenção de farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, n.21(1), p. 99-105. 1998.

COLLIER, H. O. J.; 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 Chemotherapy**, v. 32, p. 295-310, 1968.

CORTEZ, L. E. R.; CORTEZ, D. A. G.; FERREIRA, A. G.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F. G. F.; FERNANDES, J. B. Constituintes químicos de *Almeidea coerulea* (Nees & Mart.) A. St.-Hil. Rutaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p. 164-169, 2006.

CORRÊA, C. R.; CALIXTO, J. B. Evidence for participation of B1 and B2 kinin receptor in formalin-induced nociceptive response in mouse. **British Journal of Pharmacology**, v. 110, n. 3, p. 193-198, 1993.

CHAVES, M. H. **Estudo químico da *Porcelia macrocarpa* (WARM.) R. E. FRIES (ANNONACEAE)**. São Paulo, Dissertação (Doutorado em Química)- Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

CRUZ, G. L. **Dicionário de Planta úteis do Brasil**, Bertrand Brasil, 5 ed. Rio de Janeiro, p. 436, 1995.

Da SILVA, W. C. Óxido Nítrico e seu caráter dúbio. **Sapiência – informativo científico da Fapepi**, n.7, ano III, 2006.

Da SILVA, S. L.; FIGUEIREDO, P. M. S.; YANO, T. Chemotherapeutic potential of the volatile oils from *Zanthoxylum rhoifolium* Lam leaves. **European Journal of Pharmacology**, v. 576, p.180–188, 2007b.

Da SILVA, S. L.; FIGUEREIDO, P. M. S.; YANO, T. Cytotoxic evaluation of essential oil from *Zanthoxylum rhoifolium* Lam leaves. **Acta Amazônica**, v. 37, n. 2, p. 281-285, 2007a.

De MOURA, N. F.; RIBEIRO, H. B.; MACHADO, E. C. S.; ETHUR, E. M.; ZANATTA, N.; MOREL, A. Benzophenanthridine Alkaloids from *Zanthoxylum rhoifolium*. **Phytochemistry**, v. 46, n. 8, p. 1443-1446, 1997.

DIÉGUEZ-HURTADO, R; GARRIDO-GARRIDO, G.; PRIETO-GONZÁLEZ, S.; IZNAGA, Y.; GONZÁLEZ, L.; MOLINA TORRES, J.; CURINI, M.; EPIFANO, F.; MARCOTULLIO, M.C. Antifungal activity of some Cuban *Zanthoxylum* species. **Fitoterapia**, v. 74, p. 384-386, 2003.

DUBUISSON D, DENNIS S. G. The formalin test: A quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain**, v. 4, p. 161 –74, 1977.

DUHAM, N, W., MIYA, T. S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **Journal of the American Pharmaceutical Association**, v. 46 p. 208-210, 1957.

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.

DRUMMOND, J. P. F. Neurofisiologia. In: Drummond, J.P. F. **Dor Aguda-Fisiopatologia, Clínica e Terapêutica**. Curitiba: Editora Atheneu, cap. 01, p.01-25, 2000.

FACUNDO, A. V.; SILVEIRA, A. S. P.; FILHO, R. B.; PINTO, A. C.; REZENDE, C. M. Constituintes Químicos de *Zanthoxylum ekmanii* (URB.) ALAIN. **Química Nova**, v. 28, p. 224-225, 2005.

FAROUK, L.; LAROUBI, A.; ABOUFATIMA, R.; BENHARREF, A.; CHAIT, A. Evaluation of the analgesic effect of alkaloid extract of *Peganum harmala* L.: Possible mechanisms involved. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 115, p. 449 – 454, 2008.

FARQUHAR-SMITH, W. P. Anatomy, physiology and pharmacology of pain. **Anaesthesia & Intensive Care Medicine**, v. 9, n.1, p.3-7, 2007.

FERNÁNDEZ, A.; ÁLVAREZ, A.; M. GARCÍA, D.; SÁENZ, M. T. Anti-inflammatory effect of *Pimenta racemosa* var. *ozua* and isolation of the triterpene lupeol. **IL Farmaco**, v. 56, p. 335–338, 2001a.

FERNÁNDEZ, M. A.; DE LAS HERAS B.; GARCÍA M. D.; SÁENZ M. T.; VILLAR A. New insights into the mechanism of action of the anti-inflammatory triterpene lupeol. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 53, N. 11, p. 1533-1539, 2001b.

FERREIRA, M. E.; NAKAYAMA, H.; ARIAS, A. R.; SCHININI, A.; BILBAO, N. V.; SERNA, E.; LAGOUTTE, D.; SORIANO-AGATÓN, F.; POUPON, E.; HOCQUEMILLER, R.; FOURNET, A. Effects of canthin-6-one alkaloids from *Zanthoxylum chiloperone* on *Trypanosoma cruzi* – infected mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.109, p. 258-263, 2007.

FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; SOUSA, I. M. O.; RODRIGUES, A. F. 2006. **Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: Um modelo multidisciplinar**. Disponível em < http://www.multiciencia.unicamp.br/artigos-_07/a_04_7.pdf> Acesso em: 07 abr. 2008.

FLORA-FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 46, n. 3, p. 265-271, 2000.

GARCIA, E, S. Biodiversidade, Biotecnologia e Saúde. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 11, p. 495-500, 1995.

GARG, A.; GARG, S.; ZANEVELD, L. J. D.; SINGLA, A. K. Chemistry and Pharmacology of The Citrus Bioflavonoid Hesperidin. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 655–669, 2001.

GAVIRAGHI, G. Excitatory amino acid receptors. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 74, p. 219-220, 2000.

GEETHA, T.; VARALAKSHMI, P. Anti-inflammatory activity of lupeol and lupeol linoleate in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, p. 77–80, 2001.

GONZAGA, W. A.; WEBER, A. D.; GIACOMELLI, S. R.; SIMIONATTO, E.; DALCOL, I. I.; DESSOY, E. C. M.; MOREL, A. F. Composition and antibacterial alkaloids from *Zanthoxylum rhoifolium*. **Planta Medica**, v. 69, n.8, p. 773-775, 2003.

HORI, Y.; ENDO, K.; TAKAHASHI, T. Long-lasting synaptic facilitation induced by serotonin in superficial dorsal horn neurones of the rat spinal cord. **Journal of Physiology**, v. 492 (3), p. 867-876, 1996.

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

ISLAM, A.; SAYEED, A.; BHUIYAN, M. S. A.; MOSADDIK, M. A.; ISLAM, M. A. U.; ASTAQ MONDAL KHAN, G. R. M. Antimicrobial activity and cytotoxicity of *Zanthoxylum Budrunga*. **Fitoterapia**, v. 72, p. 428-430, 2001.

JEONG, C. H.; SHIM, K. Tyrosinase Inhibitor Isolated from the Leaves of *Zanthoxylum piperitum*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 68, n.9, p. 1984-1987, 2004.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, n. 13, p. 203-210, 2001.

JULLIAN, V.; BOURDY G.; GEORGES, S.; MAUREL, S.; SAUVIAN, M. Validation of use a traditional antimalarial remedy from French Guiana *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106: p. 348-352, 2006.

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.

LAPA, A. J.; SOUCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; CASTRO, M. S. A.; LIMA, T. C. M. Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais/**Sociedade Brasileira de Plantas Mediciniais**. Gráfica metrópole, Florianópolis, p. 64-66, 2003.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S.W. Animals models of nociception. **Pharmacology Reviews**, v. 53, n. 4, p. 597-652, 2001.

LEE, S.; LIM, K. Glycoprotein de *Zanthoxylum piperitum* DC has a hepatoprotective effect via anti-oxidative character *in vivo* and *in vitro*. **Toxicology in Vitro**, v. 22, p. 376-385, 2008.

LEE, Y.; LEE, C.; OH, U. Painful Channels in Sensory Neurons. **Molecules and Cells**, v. 20, N° 3, p. 315-324, 2005.

LIMA, L. M.; PERAZZO, F.F.; TAVARES, J. C. C.; BASTOS, J. K. Anti-inflammatory and analgesic activities of the ethanolic extracts from *Zanthoxylum riedelianum* (Rutaceae) leaves and stem bark. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 59, n. 8, p. 1151-1158, 2007.

LITCHFIELD, L. T. J. R., WILCOXON, F. A simplified method of evaluation dose-effect experiments. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 19, p. 388-397, 1949.

LOIOLA, L. O. Fisiologia da Dor. **Monografia (curso de especialização lato sensu em clínica médica e cirúrgica de pequenos animais)**, Universidade Castelo Branco -Instituto Qualittas, Goiânia, 2007.

LU, Y.; ZHANG, C.; BUCHELI, P.; WEI, D. *Citrus* Flavonoids in Fruit and Traditional Chinese Medicinal Food Ingredients in China. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 61, p. 57–65, 2006.

LUCENA, G. M. R. S.; GADOTTI, V. M., MAFFI, L. C.; SILVA, G. S.; AZEVEDO, M. S.; SANTOS, A. R. S. Antinociceptive and anti-inflammatory properties from the bulbs of *Cipura paludosa* Aubl. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, p. 19–25, 2007.

LUIZ, A. P.; MOURA, J. D.; MEOTTI, F. C.; GUGINSKI, G.; GUIMARÃES, C. L. S.; AZEVEDO, M. S.; RODRIGUES, A. L. S.; SANTOS, A. R. S. Antinociceptive action of ethanolic extract obtained from roots of *Humirianthera ampla* Miers. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 114, p. 355–363, 2007.

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

MAHATO, S. B.; NANDY, A.; K.; ROY, G. Triterpenoids. **Phytochemistry**, v.31, n. 7, p. 2199-2249, 1992.

MAHATO, S. B.; KUNDU, A. P. ¹³CMR spectra of pentacyclic triterpenoids – A compilation and some salient features. **Phytochemistry**, v.37, n.6, p. 1517-1575, 1994.

MALEKI-DIZAJI, N.; FATHIAZAD, F.; GARJANI, A. Antinociceptive Properties of Extracts and Two Flavonoids Isolated from Leaves of *Danae racemosa*. **Archives Pharmacol Research**, v. 30, N. 12, p. 1536-1542, 2007.

MARNETT, J. L. The COXIB Experience: A Look in the Rearview Mirror. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 49, p. 265-290, 2009.

MELZACK, R.; WALL, P. D. Pain mechanisms: a new theory. **Science**, v. 150, p. 71-979, 1965.

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

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

MILLER, L. C.; TAINTER, M. L. Estimation of the LD₅₀ and its error by means of logarithmic probit graph paper. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 57, p. 261-262, 1944.

MOCCELINI, S. K.; DA SILVA, V. C.; NDIAYE, E. A.; SOUSA JR, P. T. Estudo fitoquímico das cascas das raízes de *Zanthoxylum rigidum* Humb. & Bonpl. ex Willd (Rutaceae). **Química Nova**, v. 32, N.1, p. 131-133, 2009.

MOREIRA, F. **Plantas que Curam: Cuide da sua saúde através da natureza**. São Paulo: Ed. Hemus editora LTDA, 5^a ed., p. 183, 1996.

NGASSOUM, M. B.; ESSIA-NGANG, J. J.; TATSADJIEU, L. N.; JIROVETZ, L.; BUCHBAUER, G.; ADJOU DJI, O. Antimicrobial study of essential of *Ocimum gratissimum* leaves and *Zanthoxylum xanthoxyloides* fruits from Cameroon. **Fitoterapia**, v. 74, p. 284-287, 2003.

NGONO NGANE, A.; BIYITI, L.; AMVAM ZOLLO, P.; H.; BOUCHET, Ph. Evaluation of antifungal activity of extracts of two Cameroonioian Rutaceae: *Zanthoxylum lepreurii* Guill. et Perr. and *Zanthoxylum xanthoxyloides* Waterm. **Journal Ethnopharmacology**, v. 70, p. 335-342, 2000.

OKUSE, K. Pain Signaling Pathways: From cytokines to ion channels. **The international journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 490–496, 2007.

OLIVEIRA, E. L.; FREITAS, P. C.; GUEDES, M. L. S.; VELOZO, E. S. Estudo fitoquímico de *zanthoxylum stelligerum* (Turcz). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 12, supl., p. 29-30, 2002.

OTUKI, M. F.; LIMA, F. V.; MALHEIROS, A.; CECHINEL-FILHO, V.; MONACHE, F. D.; YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Evaluation of the antinociceptive action caused by ether fraction and a triterpene isolated from resin of *Protium kleinii*. **Life Sciences**, v. 69, p. 2225–2236, 2001.

PALAZZO, E.; ROSSI, F.; MAIONE, S. Role of TRPV1 receptors in descending modulation of pain. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 286, p. 79-83, 2008.

PIETROVSKI, E. F.; ROSA, K. A.; FACUNDO, V. A.; RIOS, K.; MARQUES, M. C. A.; SANTOS, A. R. S. Antinociceptive properties of the ethanolic extract and of the triterpene 3β , 6β , 16β -trihidroxilup-20(29)-ene obtained from the flowers of *Combretum leprosum* in mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 83, p. 90–99, 2006.

PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos Naturais: Atualidade, Desafios e Perspectivas. **Química Nova**, v. 25, p. 45-61, 2002.

PIRES, P. A.; MALVAR, D. do C.; BLANCO, L. das C.; VIGNOLI, T.; CUNHA, A. F. da; VIEIRA, E.; DANTAS, T. N. de C.; MACIEL, M. A. M.; CÔRTEZ, W. da S. e VANDERLINDE, F. A. Estudo das atividades analgésicas do extrato metanólico da *Capsicum frutescens* – Solanaceae (Pimenta malagueta). **Revista Universidade Rural: Série Ciências da Vida**, Seropédica, v. 24, p. 129-134, 2004.

PITASAWAT, B.; CHAMPAKAEW, D.; CHOOCHOTE, W.; JITPAKDI, A.; CHAITHONG, U.; KANJANAPOTHI, D.; RATTANACHANPICHAI, E.; TIPPAWANGKOSOL, P.; RIYONG, D.; TUETUN, B.; CHAIYASIT, D. Aromatic plant-derived essential oil: An alternative larvicide for mosquito control. **Fitoterapia**, v. 78, p. 205-210, 2007.

CHATURVEDI, K. P.; BHUI, K.; SHUKLA, Y. Lupeol: Connotations for chemoprevention. **Cancer Letters**, v. 263, p. 1-13, 2008.

RAHMAN, M. T.; ALIMUZZAMAN, M.; AHMAD, S.; ASAD CHOWDHURY, A. Antinociceptive and antidiarrhoeal activity of *Zanthoxylum rhetsa*. **Fitoterapia**, v. 73, p. 340-342, 2002.

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 Anestesiologia**, v. 57, n.1, p. 94-105, 2007.

ROSA, K. A.; GADOTTI, V. M.; ROSA, A. O.; RODRIGUES, A. L. S.; CALIXTO, J. B.; SANTOS, A. R. S. Evidence for the involvement of glutamatergic system in the antinociceptive effect of ascorbic acid. **Neuroscience Letters**, v. 381, p. 185–188, 2005.

SAKURADA, T.; KATSUMATA, K.; TANNO, K.; SAKURADA, S.; KISARA, K. The capsaicin test in mice for evaluating tachykinin antagonists in the spinal cord. **Neuropharmacology**, v. 31, p. 1279-1285, 1992.

SAKURADA, T.; SUGIYAMA, A.; SAKURADA, C.; TANNO, K.; SAKURADA, S.; KISARA, K.; HARA, A.; ABIKO, Y. Involvement of nitric-oxide in spinally mediated capsaicin- and glutamate-induced behavioral responses in the mouse. **Neurochemistry International**, v. 29, n. 3, p. 271-278, 1996.

SAKURADA T, MATSUMURA T, MORIYAMA T, SAKURADA C, UENO S, SAKURADA S. Differential effects of intraplantar capsaizepine and ruthenium red on capsaicin-induced desensitization in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 75, p. 115–21, 2003.

SALEEM, M.; AFAQ, F.; ADHAMI, V. M.; MUKHTAR, HASAN. Lupeol modulates NF- κ B and PI3K/Akt pathways and inhibits skin cancer in CD-1 mice. **Oncogene**, v. 23, p. 5203–5214, 2004.

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

SAWYNOK, J. Topical and peripherally acting analgesics. **Pharmacology Reviews**, v. 55, n. 1, p. 1-20, 2003.

SIEGEL, P.S. A simple electronic device for the measurement of gross bodily activity of small animals. **Journal Psychology**, v. 21, p. 227-236, 1946.

SILVA, A. B. L.; DIAS, K. S.; MARQUES, M. S.; MENEZES, I. A. C.; SANTOS, T. C.; MELLO, I. C. M.; LISBOA, A. C. C. D.; CAVALCANTI, S. C. H.; MARÇAL, R. M.; ANTONIOLLI, A.R. Avaliação do efeito antinociceptivo e da toxicidade aguda do extrato aquoso da *Hyptis fruticosa* Salmz. ex Benth. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 475-479, 2006.

SILVA, C. V.; DETONI, C. B.; VELOZO, E. S. Alcalóides e outros metabólitos do caule e frutos de *Zanthoxylum tingoassuiba* A. St. Hil. **Química Nova**, v. 31, n. 8, p. 2.052-2.055, 2008.

SILVA, L. L.; PAOLI, A. A. S. Caracterização Morfo – Anatômica da semente de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. – Rutaceae. **Revista Brasileira de Sementes**, v. 22, n. 2, p. 250-256, 2000.

SOMMER, C. Serotonin in Pain and Analgesia - Actions in the Periphery. **Molecular Neurobiology**, v. 30, p. 117-125, 2004.

SPESSOTO, M. A.; FERREIRA, D. S.; CROTTI, A. E. M.; SILVA, M. L. A.; CUNHA, W. R. Evaluation of the analgesic activity of extracts of *Miconia rubiginosa* (Melastomataceae). **Phytomedicine**, v. 10, p. 606–609, 2003.

SRINIVASAN, T.; SRIVASTAVA, G. K.; PATHAK, A.; BATRA, S.; RAJ, K.; SINGH, K.; PURI, S. K.; KUNDU, B. Solid-phase synthesis and bioevaluation of lupeol-based libraries as antimalarial agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 12, p. 2803–2806, 2002.

SZALLASI, A.; BLUMBERG, P. M. Mechanisms and therapeutic potential of vanilloids (capsaicin-like molecules). **Advances in Pharmacology**, v. 24, p. 123–55, 1993.

TOMAZZONI, M. I.; NEGRELLE, R. R. B.; CENTA, M. L. Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica. **Texto & Contexto Enfermagem**, v.15, n.1, p. 115-121, 2006.

TJØLSEN, A.; BERGE, O. G.; HUNSKAAR, S.; ROSLAND, J.H.; HOLE, K. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, v. 51, n.1, p. 5-17, 1992.

TENG, J.; MEKHAIL, N. Neuropathic Pain: Mechanisms and Treatment Options. **Pain Practice**, v. 3, p. 8–21, 2003.

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

VENKATESH, S.; LAXMI, K. S.; REDDY, B. M.; RAMESH, M. Antinociceptive activity of *Helicteres isora*. **Fitoterapia**, v. 78, p. 146–148, 2007.

VIEIRA, M. G. S.; FREITAS, J. V. B.; NETO, M. N. L.; GRAMOSA, N. V. CONSTITUINTES QUÍMICOS VOLÁTEIS DAS FOLHAS E GALHOS DE *Zanthoxylum syncarpum* Tull. **Química Nova**, v. 10, p. 1-3, 2008.

VILLALBA, M. A.; CARMO, M.; LEITE, M. N.; SOUSA, O. V. Atividades farmacológicas dos extratos de *Zanthoxylum chiloperone* (Rutaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n. 2, p. 236-241, 2007.

WILLAIN-FILHO, A.; FILHO, V. C.; OLINGER, L.; SOUZA, M. M. Quercetin: Further Investigation of its Antinociceptive Properties and Mechanisms of Action. **Archives Pharmacal Research**, v. 31, n. 6, p. 713-721, 2008.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL- FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: A necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v. 24, N. 1, p.147-152, 2001.

ZIMMERMANN, M. Pathobiology of neurophatic pain. **European journal of Pharmacology**, v. 429, p. 23–37, 2001.

ANEXOS

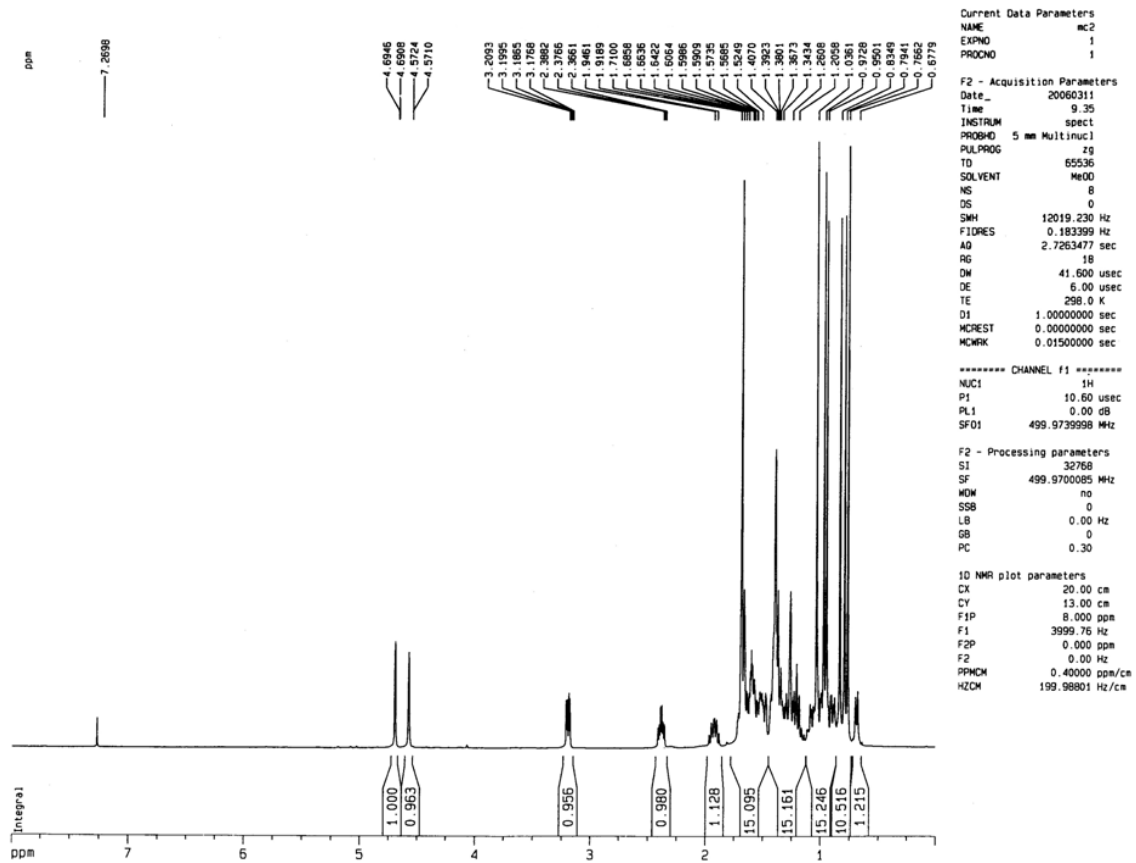


FIGURA 26: Espectro de RMN ^1H do lupeol (CDCl_3 , 500 MHz)

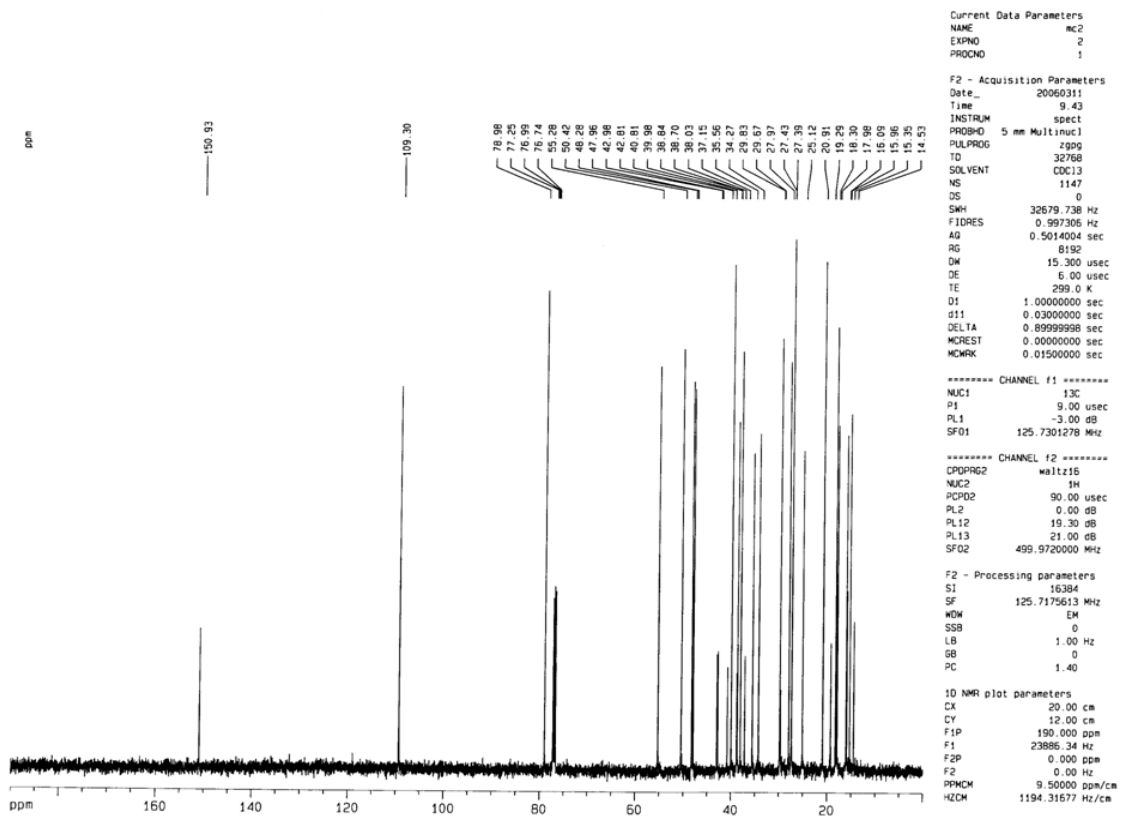


FIGURA 27: Espectro de RMN ^{13}C do lupeol (CDCl_3 , 125 MHz)

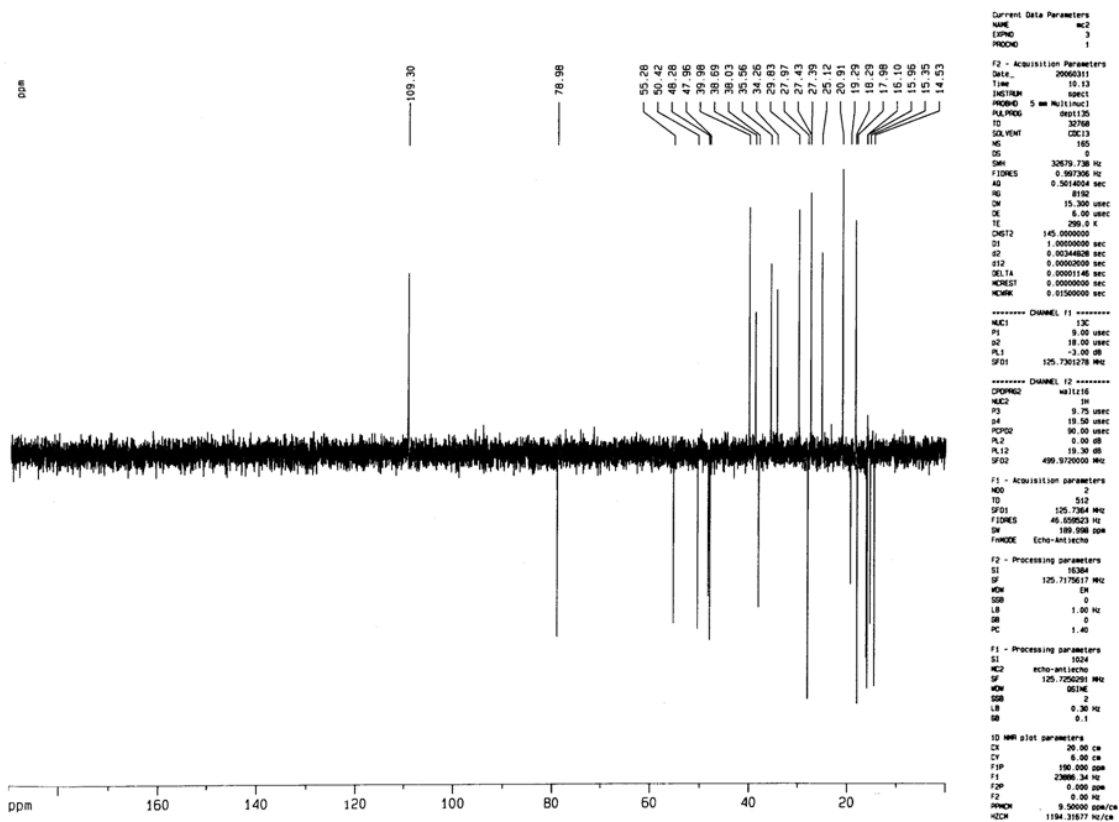


Figura 28: Espectro de RMN ^{13}C do lupeol – DEPT 135° (CDCl_3 , 125 MHz)

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)