

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

**PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS DAS CASCAS DE *Himatanthus drasticus*  
(Mart.) Plumel EM MODELOS DE ANALGESIA, INFLAMAÇÃO E CICATRIZAÇÃO  
EM CAMUNDONGOS**

São Luís  
2012

**DENÍLSON AMORIM VIEIRA**

**PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS DAS CASCAS DE *Himatanthus drasticus*  
(Mart.) Plumel EM MODELOS DE ANALGESIA, INFLAMAÇÃO E CICATRIZAÇÃO  
EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Mestrado em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre.

Orientador: Prof. Dr. Antônio Marcus de Andrade Paes.

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria do Socorro de S. Cartágenes.

São Luís  
2012

Vieira, Denilson Amorim

Estudo das Propriedades Farmacológicas das Cascas de *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel em Modelos de Analgesia, Inflamação e Cicatrização em Camundongos/ Denilson Amorim Vieira. - 2012

49 f.

Orientador: Antonio Marcus de Andrade Paes.

Co – orientadora: Maria do Socorro de Sousa Cartágenes

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Maranhão, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2012.

1. *Himatanthus drasticus* – Extrato 2. Janaúba 3. Triterpenos 4. Anti-inflamatória

5. Antinociceptiva 6. Antioxidante 7. Cicatrizante. I. Título

CDU 615.451.1

Denilson Amorim Vieira

Propriedades Farmacológicas das Cascas de *Himatanthus drásticus* (Mart.) Plumel em Modelos de Analgesia, Inflamação e Cicatrização em Camundongos

A Comissão Julgadora da Defesa do Trabalho Final de Mestrado em Ciências da Saúde, em sessão pública realizada no dia \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_, considerou o candidato:

( ) APROVADO

( ) REPROVADO

***Membros Titulares***

---

Prof. Dr. Evaldo Salomão Monteiro  
Universidade Estadual do Maranhão

---

Prof<sup>a</sup>Dr<sup>a</sup> Ana Paula Silva de Azevedo dos Santos  
Universidade Federal do Maranhão

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sônia Maria Farias Freire  
Universidade Federal do Maranhão

---

Prof. Dr. Antonio Marcus de Andrade Paes  
Universidade Federal do Maranhão  
Orientador

***Membros Suplentes***

---

Prof. Dr. Márcio Antonio Rodrigues Araújo  
Centro de Ensino Universitário do Maranhão

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lucilene Amorim Silva  
Universidade Federal do Maranhão

*Ao Senhor meu Deus, pois só tu me sondas e me conheces. Sabes quando me assento e quando me levanto (Salmos:139).*

*À minha família, o meu bem mais precioso. Minha fonte de amor e carinho. Meu refúgio e minha morada. Agradeço por me ensinar a cultivar a educação e a buscar sempre o meu melhor.*

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus, razão da existência de tudo.

Ao Professor Dr. Antônio Carlos Romão Borges, pela oportunidade de ingresso no mestrado em Ciências da Saúde e conseqüentemente, desenvolvimento deste trabalho.

À Professora Dr<sup>a</sup>. Maria do Socorro Cartágenes, um presente de Deus no desenvolvimento deste trabalho; obrigado pelas orientações, paciência, incentivo e palavras de força e carinho. Agradeço muito pelos seus ensinamentos.

Ao Professor Dr. Antonio Marcus de Andrade Paes, pesquisador inigualável, que mesmo com todas as suas responsabilidades me orientou e me ensinou os caminhos da pesquisa, sendo o grande responsável pelo meu amadurecimento científico.

À Professora Dr<sup>a</sup>. Sônia Freire, pelos ensinamentos e principalmente por suas palavras sábias.

À Professora Dr<sup>a</sup>. Marilene de Oliveira Borges pelo seu intenso trabalho para o crescimento do Laboratório de Pesquisa e Pós-Graduação em Farmacologia.

À Professora Selma do Nascimento, pela suas frequentes contribuições.

Ao professor Adelson pelas conversas de incentivo e por suas importantes sugestões.

Ao mestrando Vinicyus Teles, pela amizade e participação nos ensaios farmacológicos.

Ao aluno de iniciação científica Wermerson Assunção Barroso, pela sua importante participação e pela sua grande amizade.

Às alunas de graduação Mariana Barreto e Mona Gisele, pela intensa dedicação na finalização dos resultados.

Àos amigos de mestrado pela companhia e aprendizado.

À “dona” Rosa e “dona” Joana pelos carinhos nas horas mais necessárias.

Aos professores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências da saúde e do Laboratório de Pesquisa e Pós-Graduação em Farmacologia da UFMA.

## RESUMO

*Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel é popularmente conhecida nas regiões Norte e Nordeste do Brasil como janaúba, janaguba, tiborna, jasmim-manga, pau-de-leite entre outras denominações. Na prática popular, esta espécie é usada como anti-inflamatória, antitumoral, analgésica e vermífuga. O presente estudo investigou os efeitos analgésico, anti-inflamatório, cicatrizante e antioxidante do extrato hidroalcoólico das cascas do caule da *Himatanthus drasticus* (EHA) coletadas no município de São Bento - MA. Quando administrado nas doses de 0,5; 0,75 e 1,0 g/kg (v.o.), o EHA reduziu de forma dependente de dose a formação de edema e a migração leucocitária em camundongos machos, submetidos a injeção intraplantar de carragenina 1%. De forma similar, o EHA reduziu o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético 1%, evidenciando a atividade antinociceptiva. Entretanto, o EHA não promoveu qualquer efeito sobre a percepção central da dor. Em consonância com estes efeitos, o EHA também mostrou significativa atividade cicatrizante, uma vez que, acelerou o tempo de contração da ferida induzida por excisão de pele nos camundongos. Finalmente, a avaliação da atividade antioxidante *in vitro* do EHA foi sugestiva de que a mistura fenólica presente no extrato é capaz de sequestrar o radical DPPH<sup>•</sup> em velocidade semelhante a antioxidantes clássicos como o  $\alpha$ -tocoferol. Sendo assim, este estudo mostra que o EHA das cascas da *Himatanthus drasticus* possui importante ação analgésica, anti-inflamatória, cicatrizante e antioxidante. Ademais, este estudo contribui para a validação do uso popular da espécie e abre perspectivas para novas investigações.

Palavras-chave: *Himatanthus drasticus*, janaúba, anti-inflamatória, anti-nociceptiva, cicatrizante, antioxidante.

## ABSTRACT

*Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel is popularly known in the North and Northeast Regions of Brazil as janaúba, janaguba, tiborna, jasmim-manga and pau-de-leite, as well. Brazilian traditional medicine knowledge attributes to the species anti-inflammatory, analgesic, antitumoral and dewormer properties. Thus, the present study sought to investigate the anti-inflammatory, analgesic and wound-healing effects of the hidroalcoholic extract (HAE) made from *Himatanthus dratiscus* stem bark, which were collected in São Bento (MA) Brazil. Oral administration of HAE (0.5, 0.75 and 1.0 g/kg) reduced in a dose-dependent manner both oedema's formation and leukocyte migration in mice submitted to intraplantar injection of 1% carragenin. Similarly, HAE also reduced the number of contortions in the acetic acid-induced writhing test. However, HAE had no effect on pain's central perception. Corroborating these data, HAE showed significant wound-healing effect since it accelerated the wound contraction time in the mice. Finally, assessment of in vitro antioxidant activity of HAE suggested that phenolic compounds found in the extract is able to scavenger DPPH<sup>\*</sup> radical as fast as well-known antioxidants like  $\alpha$ -tocopherol. Therefore, this study shows that HAE promotes relevant analgesic, anti-inflammatory, wound-healing and antioxidant activity. Moreover, this study contributes to validation of popular use of the species as well as open up new perspectives for future investigations

Key words: *Himatanthus drasticus*, janaúba, anti-inflamatory, antinociceptive, wound-healing and antioxidant.

## SUMÁRIO

RESUMO	
ABSTRACT	p.
<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>10</b>
<b>1.1 Mecanismos Fisiopatológicos de Resposta à Agressão e Lesão</b>	<b>10</b>
1.1.1 <i>Mecanismos fisiopatológicos da dor</i>	10
1.1.2 <i>Mecanismos fisiopatológicos da inflamação</i>	12
1.1.3 <i>Mecanismos fisiopatológicos do reparo tecidual</i>	16
<b>1.2 Impacto Sócio-econômico e Perfil Farmacológico das Doenças Inflamatórias</b>	<b>18</b>
<b>1.3 Uso de Plantas Medicinais como Alternativa Terapêutica</b>	<b>20</b>
<b>1.4 Potencial Terapêutico da espécie <i>Himatanthus drasticus</i> (Mart) Plumel</b>	<b>22</b>
1.4.1 <i>Taxonomia e Características Botânico-geográficas</i>	22
1.4.2 <i>Composição Química e Propriedades Farmacológicas do Gênero Himatanthus</i>	25
1.4.3 <i>Composição Química e Propriedades Farmacológicas da Espécie Himatanthus drasticus (Mart.) Plumel</i>	26
<b>1.5 Justificativa do Estudo</b>	<b>27</b>
<b>2. OBJETIVOS</b>	<b>28</b>
2.1 <b>Objetivo Geral</b>	28
2.2 <b>Objetivos Específicos</b>	28
<b>3. ARTIGO CIENTÍFICO</b>	<b>29</b>
<b>4. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>39</b>
Referências	41
Anexo	49

# **1 INTRODUÇÃO**

## **1.1 Mecanismos Fisiopatológicos de Resposta à Agressão e Lesão.**

### *1.1.1 Mecanismos fisiopatológicos da dor.*

Segundo a Associação Internacional de Estudos da Dor (IASP), a dor é uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a um dano presente ou potencial, ou descrita em termos de tal dano. Esta definição avança na direção de que a dor é uma experiência única e individual, modificada pelo conhecimento prévio de um dano que pode ser existente ou presumido (MERSKEY, BOGDUK, 1994). Assim, por ser uma experiência subjetiva, pessoal e de difícil definição, o seu significado e suas manifestações somente podem ser entendidas com base nos substratos neurais que medeiam funções sensoriais e afetivas (BASBAUM, JESSEL, 2000).

Os mecanismos fisiológicos da dor envolvem processos tais como a nocicepção e a percepção. A nocicepção resulta da ativação de subpopulações de neurônios sensoriais primários específicos, os nociceptores, que transmitem a informação nociceptiva para o cordão espinhal, de onde é transmitida até ao córtex. A percepção corresponde à integração funcional dos sinais da via da dor, modulado por condições psicológicas, motivacionais e emocionais (RIEDEL, NEECK, 2001; VERRI *et al.*, 2006). Baseado nestes conceitos, o termo dor seria mais bem aplicado aos seres humanos do que aos outros animais, pelo fato de envolver um componente emocional. Mesmo assim tornou-se uma convenção o uso do termo “dor” para pacientes humanos e não humanos (HELLEBREKERS, 2002; LUNA, 2006).

A exposição da pele ou outro órgão a estímulos potencialmente nocivos induz a uma sensação desagradável, que informa o indivíduo sobre perigo real ou potencial a sua integridade física. A informação processada pode ser diferenciada como dor patológica ou fisiológica (FANTONI, MASTROCINQUE, 2002; ALMEIDA *et al.*, 2006).

A dor patológica é o resultado de um processo inflamatório crônico, como artrite e câncer, ou de lesão aguda como traumatismo e cirurgia, e tem efeito protetor menos claro ao indivíduo e, sempre que possível, deve ser tratada (JUTKOWITZ, 2008). Já dor fisiológica é aquela que induz respostas protetoras, como o reflexo de retirada, com intuito de interromper a exposição ao estímulo nocivo. Este sinal é típico da dor aguda produzida por estímulos intensos na superfície da pele. A dor visceral e a dor somática profunda são causadas por estímulos inevitáveis e apresentam respostas adaptativas específicas, geralmente são subagudas e podem vir acompanhadas de respostas autonômicas ou comportamentais específicas (FANTONI, MASTROCINQUE, 2002; HELLEBREKERS, 2002).

O mecanismo de transmissão da dor é mediado por fibras nervosas aferentes do tipo C não-mielizadas, também conhecidas por nociceptores polimodais C, as quais apresentam baixa velocidade de condução. Além destas, há participação de fibras aferentes delicadas do tipo A-delta ( $A\delta$ ), que conduzem mais rapidamente embora respondam a estímulos periféricos semelhantes (RANG, DALE, RITTER, 2007). Neste processo temos ainda, importantes sistemas de modulação nociceptiva mediados por receptores NMDA (N-Metil-D-Aspartato) e opióides, distribuídos por toda extensão do sistema nervoso central. Há ainda, a participação de mediadores químicos que são aminoácidos inibitórios ou excitatórios e neuropeptídeos, produzidos, armazenados e liberados nas terminações nervosas aferentes e nos neurônios do corno dorsal (RYGH *et al.*, 2005).

Células lesadas e fibras aferentes primárias liberam uma série de mediadores químicos que tem efeitos diretos sobre a excitabilidade dos nociceptores, são as chamadas substância algésicas, que incluem  $H^+$ ,  $K^+$ , histamina, bradicinina e serotonina, substância P e o peptídeo relacionado com o gene da calcitonina –*CGRP* (RANG, DALE, RITTER, 2007; SOMMER, 2004). Estes mediadores também promovem vasodilatação com extravasamento de proteínas plasmáticas e o recrutamento de células inflamatórias. Mastócitos, macrófagos, linfócitos e plaquetas contribuem para a formação de um ambiente complexo, composto por mediadores inflamatórios, tais como os derivados do ácido araquidônico e as citocinas. Estes, promovem diminuição do limiar de excitabilidade

dos nociceptores, sendo por isso chamados de substâncias hiperalgésicas (GARRY et al., 2004; SCHAIBLE, 2007). Por sua vez, as citocinas podem ser do tipo pró-inflamatórias e induzir a hiperalgesia ou do tipo anti-inflamatórias que são capazes de inibir a produção daquelas pró-inflamatórias (VANNIER, MILLER, DINARELLO, 1992).

As propriedades antinociceptivas de uma substância podem ser avaliadas pela sua habilidade em aumentar o limiar de sensibilidade das terminações nervosas ao estímulo algico, ou então, de fazer com que os nociceptores não respondam a este estímulo (HUNZIKER, 1992). As pesquisas experimentais geralmente utilizam animais de laboratório. Embora estes animais não tenham a capacidade de comunicar a ocorrência de um processo doloroso, são capazes de exibir respostas fisiológicas comportamentais e motoras semelhantes às observadas em seres humanos. Essas manifestações comportamentais são analisadas e comparadas na presença de substâncias potencialmente analgésicas que interferem no mecanismo fisiológico da dor, permitindo identificar no animal modificações da resposta algica (LAPA et al., 2003).

### *1.1.2 Mecanismos fisiopatológicos da inflamação.*

As primeiras descrições de processos inflamatórios datam de 3.000 anos atrás e sua história se entrelaça com a observação das lesões na pele. A análise de textos cuneiformes mesopotâmicos mostra vários termos médicos que podem ser traduzidos como inflamação. *Ummu*, por exemplo, significa "a coisa quente" e era usado em um contexto que sugeria a existência de calor local ou geral. Entretanto, o primeiro documento a descrever os sinais clássicos da inflamação, quais sejam rubor, edema, calor e dor, é de autoria do enciclopedista romano *Aulus Cornelius Celsus*, o qual viveu entre 30 A.C e 38 D.C (MAJNO, 1975).

A inflamação é classicamente definida como uma resposta fisiológica à agressão tecidual e tem por objetivo combater os agentes nocivos, sejam de natureza infecciosa ou não, além de potencializar o reparo tecidual (FLOWER, PERRETTI, 2005). Atualmente, entende-se inflamação como uma resposta de adaptação ao mau funcionamento de tecidos ou desequilíbrio homeostático. Macroscopicamente, a área inflamada exibe características marcantes, tornando-se

avermelhada, edemaciada, quente e dolorosa, com interferência ou alteração da sua função. O resultado final pode ser a cura ou a evolução para inflamação crônica (CONTRAN, KUMAR, COLLINS, 2000).

Deste modo, as modificações fisiológicas associadas à inflamação podem ter durabilidades diferentes, o que favorece uma classificação da inflamação em aguda ou crônica. Quando as alterações e a resolução ocorrem em minutos ou até mesmo em dias, a inflamação é classificada como aguda. Neste caso, ocorre ativação de nociceptores, edema, migração celular e, em alguns casos, ativação da cascata da coagulação. No entanto, quando ocorrer o prolongamento do tempo da inflamação para semanas ou meses, a inflamação é classificada como crônica evidenciada pela presença de células mono e polimorfo nucleadas, destruição da estrutura e reparo tecidual decorrente da deposição de tecido conjuntivo no local da lesão (COLLINS, 1999; GERALDO, ALFENA, 2008).

A ativação das células de defesa nos tecidos lesados ou infectados promove a liberação de diversos mediadores, incluindo fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas, eicosanoides, aminas biogênicas e neuropeptídeos. Os mediadores inflamatórios podem ser sintetizados após estimulação celular ou estar presentes na forma de precursores armazenados em grânulos citoplasmáticos ou plasmáticos que são formados mediante ativação após atingir o sítio inflamatório (SPINOSA, GORNIK, BERNARDI, 2006; GILMAN *et al.*, 2006).

As reações inatas ocorrem localmente, no interior dos tecidos, podendo ser divididas em eventos vasculares e celulares. Os fenômenos vasculares caracterizam-se por alterações no calibre vascular, que provocam um aumento no fluxo sanguíneo (calor e rubor) e por alterações da permeabilidade vascular, conduzindo ao extravasamento de plasma para o interstício, com consequente formação de edema. A vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular com exsudação são provocados por mediadores, produzidos a partir do plasma e das células. Tais mediadores, agindo isoladamente, em conjunto, ou em sequência, amplificam a resposta inflamatória e influenciam sua evolução. Já nos eventos celulares, as células envolvidas estão normalmente presentes nos tecidos (mastócitos) ou têm acesso ao local a partir da circulação (plaquetas e leucócitos) (ABBAS, LICHTMAN, PILLAI, 2008).

A serotonina é uma amina vasoativa responsável pelo aumento da permeabilidade vascular (RYAN, MAJNO, 1977). A histamina é liberada durante a degranulação dos mastócitos promovida por diversos estímulos, incluindo a substância P, a interleucina-1 (IL-1) e fator de crescimento neuronal (NGF), desempenhando um papel central na hipersensibilidade imediata e nas respostas alérgicas (CARVALHO, LEMÔNICA, 1998; WHITE, 1999; BRUTON, LAZO, PARKER, 2006). Por sua vez, a bradicinina é um cininogênio vasoativo de alto peso molecular, sendo descrita como ativadora direta dos nociceptores e mediadora hiperalérgica (MYLLAN, 1999; ARAÚJO, 2007).

As células do sistema imunológico reconhecem a presença dos patógenos ou qualquer outro dano tecidual através de diversas proteínas que estão expostas em sua superfície (DEKKER, SEGAL, 2000; JASON *et al.*, 2001). Porém, para que ocorra a ativação dessas células é necessário que se estabeleça uma comunicação entre as mesmas. Quem desempenha esse papel de intermediador são as citocinas, as quais são parte integrante do processo inflamatório (HEINRICH *et al.*, 1998).

As citocinas são um grupo heterogêneo de proteínas de baixo peso molecular que iniciam sua ação através da ligação com receptores específicos, provocando alteração da síntese de RNA e de proteínas de diferentes células do organismo, podendo agir no local onde são produzidas, em células próximas ou serem lançadas na circulação, com efeitos à distância (SHEERAN, 1997). Entre elas encontramos as interleucinas (ILs), o fator de necrose tumoral (TNF) e o interferon (INF), nos seus vários subtipos. (TOWNSEND; MCKENZIE, 2000; XING, 2000).

O fator de crescimento plaquetário (PAF), favorece o aumento da adesão celular e ativa as células endoteliais por efeito direto ou através da formação de espécies reativas de oxigênio (ERO) ou dos eicosanóides, metabólitos do ácido araquidônico (SALLES *et al.*, 1999).

As EROs tem importância fundamental ao processo inflamatório devido à ativação e agregação de macrófagos, leucócitos polimorfonucleares e células endoteliais, ocorrendo infiltração tecidual e conseqüentemente aumento de consumo de oxigênio e produção de citocinas. Estes radicais livres podem ainda agir em sinergia com enzimas proteolíticas, e facilitar a degradação de componentes

importantes do tecido conjuntivo e também podem iniciar e modular a reação em cadeia das prostaglandinas amplificando a cascata que culmina na resposta inflamatória (BLAKE *et al.*, 1987).

Os eicosanóides são produtos do metabolismo do ácido araquidônico liberados após ativação celular por toxinas, complexos imunes, patógenos ou mediadores solúveis. Estes fatores produzem alterações na membrana celular e aumento de cálcio intracelular que resulta na translocação da fosfolipase A2 citosólica para as membranas nuclear e citoplasmática, culminando na liberação do ácido araquidônico dos fosfolípidios de membrana. O ácido araquidônico liberado pode ser metabolizado por diversas vias dando origem principalmente a prostaglandinas e leucotrienos (Golden, 2007). As prostaglandinas tem sua síntese iniciada com a adição do oxigênio molecular ao ácido araquidônico pelas ciclooxigenases, para formar o endoperóxido intermediário prostaglandina G2 (CARVALHO, RIOS, 2004). Os leucotrienos são importantes mediadores químicos em uma variedade de condições inflamatórias e alérgicas, podendo ser divididos em leucotrienos pró-inflamatórios (LTB<sub>4</sub>) e leucotrienos espasmogênicos (LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> e LTE<sub>4</sub>) (HAEGGSTRÖM, 2000).

O processo inflamatório promove uma série de mudanças não só nas células leucocitárias como nas células endoteliais ativadas por várias citocinas, como IL-1 e TNF. As células endoteliais expõem moléculas de adesão que conduzem os neutrófilos para a periferia dos vasos sanguíneos, este processo é de extrema importância para o recrutamento destas células ao sítio inflamatório (ABBAS, LICHTMAN, POBER, 2003). As células endoteliais são adaptadas a expressar altos níveis de moléculas de adesão, molécula 1 de adesão intercelular (ICAM-1) e molécula 1 de adesão da célula vascular (VCAM-1). A expressão dessas moléculas é resultado do processo de ativação do endotélio que ocorre em condições de lesão tecidual, na presença de subprodutos de microrganismos ou mediante contato com fatores provenientes da resposta inflamatória como componentes das cascatas do complemento, coagulação, citocinas (IL-1, TNF- $\alpha$ ) e mediadores como a histamina e o leucotrieno B<sub>4</sub> (NIGROVIC, 2005).

O contato das células com a parede endotelial aumenta a exposição dos leucócitos aos fatores quimiotáticos presentes no endotélio ativado ou às

quimiocinas que se difundem no sangue a partir do tecido lesado. Entre os fatores quimiotáticos destacam-se fragmentos de fibrina, colágeno, fatores solúveis plaquetários, mediadores dos mastócitos, subprodutos do complemento (C5a, C3a e C4a), resíduos do metabolismo bacteriano como os peptídeos n-formilados, entre outros. São também importantes as quimiocinas, grupo de citocinas secretadas por diferentes tipos celulares e responsáveis por direcionar as células para o foco inflamatório (ABBAS *et al.*, 2008).

Os neutrófilos são as primeiras células a deixar a vasculatura e migrar para o tecido, atraídos pelas quimiocinas. A capacidade fagocitária dos neutrófilos é estimulada por receptores “Toll-like”, que reconhecem padrões moleculares associados com patógenos (PAMPs) presentes na superfície dos microrganismos, receptores para opsoninas, receptores para Fc de IgG e receptores para C3b. O microrganismo ou partícula estranha fagocitada é mantido dentro de um vacúolo fagossômico que se funde com os lisossomos ricos em enzimas proteolíticas e oxidativas que conferem aos fagócitos sua capacidade microbicida. A fusão do fagossomo com o lisossomo resulta no fagolisossomo onde se dá a destruição do microrganismo. O NADPH oxidase dos fagócitos é composto por múltiplas subunidades enzimáticas cuja função é reduzir o oxigênio molecular a intermediários reativos do oxigênio as ERO, que são bastante tóxicos para bactérias (CYSTER, 1999).

### *1.1.3 Mecanismos fisiopatológicos de reparo tecidual*

Após a lesão tecidual ser iniciada, uma sucessão de eventos irá mediar a reparação e o restabelecimento da função tecidual. Estes eventos incluem as fases inflamatória, proliferativa, de contração, de remodelação e de maturação da cicatriz. (BALBACHAS, 1965). Na fase inflamatória são observadas todas as alterações já descritas no item anterior. Os macrófagos assumem um papel de suma importância no mecanismo de reparação tecidual, pois debridam o tecido através da fagocitose e da digestão de microrganismos patogênicos, limpando a área do tecido lesado (NEWMAN *et al.*, 1992).

A fase proliferativa é caracterizada por angiogênese e proliferação fibroblástica, com a conseqüente produção de fibras colágenas e acentuação do

mecanismo de epitelização do tecido de granulação (KOHN, 1992). A angiogênese é o processo pelo qual surgem novos vasos para refazer a circulação local, necessária para oxigenação e nutrição da ferida, diante da hipóxia e a diminuição do pH no centro da lesão. Esse evento tem como componente fundamental os macrófagos, que fazem uma interação com os tromboxanos e as prostaglandinas produzindo assim o fator angiogênico (quimiotático) que atrai as células meso e endoteliais (WITTE; BARBUL, 2002). As primeiras fibras de colágeno produzidas pelos fibroblastos surgem em quatro a cinco dias e o espaço da ferida é preenchido rapidamente por pequenos feixes orientados ao acaso, que aumentam gradativamente dando origem a uma estrutura densa e consistente que une firmemente os tecidos lesados (MAJNO, 1992).

Considerando a profundidade da área afetada e a perda tecidual, as feridas podem ser do tipo superficial, profunda e aberta. A lesão superficial atinge somente o epitélio sem comprometer a camada basal da epiderme, existindo epitelização por deslocamento das células sem resultar em cicatriz. A lesão profunda é constituída por uma ferida incisa limpa com perda inapreciável de tecido, mínima hemorragia, ausência de infecção e com bordas bem justapostas. Na lesão aberta, ocorre perda das substâncias de preenchimento dos tecidos superficiais, com bordas irregulares, havendo no espaço formação de uma massa de vasos e células que constituem o tecido de granulação com posterior conversão em tecido fibroso (WEISSMAN, 1992).

Em termos clínicos, a cicatriz pode ser classificada em primeira, segunda ou terceira intenção. A cicatriz de primeira intenção ocorre quando as bordas da ferida são apostas ou aproximadas, havendo perda mínima de tecido, ausência de infecção e edema mínimo. Quando as feridas cicatrizam-se por primeira intenção, a formação de tecido de granulação não é visível. Na cicatriz por segunda intenção ocorre perda excessiva de tecido e presença de infecção. O processo de reparo, neste caso, é mais complicado e demorado. Esse método de reparo é também denominado cicatrização por granulação, pois no abscesso formam-se brotos minúsculos chamados granulações. Já na por terceira intenção o processo de cicatrização assemelha-se ao de primeira e ao de segunda intenção. A ferida é deixada aberta por um determinado período, funcionando como cicatrização por

segunda intenção, sendo suturada posteriormente, como ferida de primeira intenção (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2000).

A remodelação é caracterizada por modificações no tecido conjuntivo, como aumento na resistência entre as fibras colágenas, ação das colagenases e diminuição da quantidade de água (SPRINGER, 1994). Nesta fase o tamanho da ferida é diminuído substancialmente, como resultado de células mediadoras de contração da matriz. Isto é primariamente causado pelos fibroblastos que se encontram no tecido de granulação e muitos dos quais se diferenciam em um fenótipo, que são referidos como miofibroblastos (O' LEARY *et al.*, 2002). Esta etapa ocorre durante um longo período produzindo um tecido com resistência tensil e fibras colágenas instáveis, diferentemente com o que obser-se em uma derme intacta (MONACO & LAWRENCE, 2003).

## **1.2 Impacto Sócio- econômico e Perfil Farmacoterapêutico das Doenças Inflamatórias**

Estudo do Intercontinental Marketing Services Health Inc. (IMS Health), no ano de 2010, aponta uma expansão sem precedentes no mercado “Pharmerging”. Este termo é a nova classificação adotada pelo IMS Health e busca definir os 17 mercados emergentes, entre eles o Brasil, de alto potencial em crescimento farmacêutico, no período de 2009 a 2013. É prevista uma expansão do faturamento farmacêutico da ordem de US\$ 90 bilhões e que permitirá um crescimento de 48% em 2013, acima dos 37% registrados em 2009. O mesmo estudo indica mudanças significativas no cenário econômico global e de saúde, incluindo aumento dos níveis de acesso e financiamento à saúde (IMS Health, 2010). Este cenário não é alcançado por uma camada significativa da sociedade Brasileira. Estudos do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) apontam que 15 – 20% da população não têm acesso aos medicamentos, sendo este dado relacionado ao fato de que 51% tem renda de até 4 salários mínimos (MAGALHÃES, BOECHAT, ANTUNES, 2008).

Para enfrentar esta situação, o Ministério da Saúde (MS) tem implementado políticas que visam o acesso gratuito, através do Sistema Único de Saúde (SUS),

aos produtos farmacêuticos constantes na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME) (MAGALHÃES, BOECHAT, ANTUNES, 2008). O acesso aos medicamentos essenciais é uma preocupação mundial, sendo que um dos fatores de divergência são os preços praticados por diferentes produtores nacionais e internacionais (NOBREGA (2007) comparou as diferenças de preços em 200 formas farmacêuticas de medicamentos essenciais no Brasil e na Suécia. Dentre os vários panoramas descritos, havia casos como a ciclofosfamida (200mg, injetável) cujo preço era 13 vezes maior no Brasil. De maneira semelhante, o paracetamol (200mg/mL, solução) e o alopurinol (100 mg, comprimido), tinham preços 8,9 e 9,1 vezes superior, respectivamente. Por outro lado, a amoxicilina (250 mg, comprimido), antimicrobiano largamente utilizados pela população, tinha preço 3,2 vezes menor no mercado Brasileiro.

Os anti-inflamatórios estão entre os agentes terapêuticos mais utilizados no mundo, porém apresentam algumas limitações com relação à sua potência, eficácia e efeitos adversos (FIORUCCI *et al.*, 2001).

Os anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) atuam inibindo as enzimas cicloxigenase-1 (COX-1) e cicloxigenase-2 (COX-2), que produzem prostaglandinas. As prostaglandinas produzidas pela COX-1 tem função de proteção tecidual em sítios renais e gastrintestinais, por exemplo, por isso os efeitos adversos relacionados a danos nesses tecidos. Enquanto isso, a COX-2 age em locais de inflamação, onde as prostaglandinas ajudam a promover a reação inflamatória (SMITH, *et al.*, 2004 ). Os AINEs seletivos de COX-2 inibem apenas esta isoforma da enzima, que atua no processo inflamatório e portanto não causam os mesmos efeitos adversos dos AINE não seletivos (SMITH, *et al.*, 2004). Porém, estes são medicamentos relativamente novos e seus efeitos adversos ainda não estão bem definidos, mas sabe-se que variam de lesão gástrica à ulceração, falência renal, asma e problemas cardiovascular (WANNMACHERL & BREDEMEIER, 2004).

Tentativas de desenvolver AINEs desprovidos da toxicidade clássica, principalmente lesão gastrointestinal, seguiram várias estratégias. Os AINEs foram associados com agentes gastroprotetores, como o misoprostol (análogo de PGE1), antagonistas do receptor H<sub>2</sub> da histamina e inibidores da bomba de prótons; estas associações têm a intenção de manter a síntese de muco gástrico diante da inibição

da síntese de prostaglandinas e diminuir a secreção ácida gástrica, respectivamente. Entretanto, a terapia combinada introduz outros problemas relacionados à farmacocinética, toxicidade, e adesão do paciente, podendo também propiciar o aparecimento de novos efeitos colaterais (BERTOLINI, 2001; RANG *et al.*, 2007).

Os antiinflamatórios esteroidais podem atuar na inibição indireta da fosfolipase A<sub>2</sub>, aumentando a expressão do gene que codifica a lipocortina, inibindo assim a síntese de fosfolipase A<sub>2</sub>. Dessa forma, não há liberação de ácido araquidônico, leucotrienos e nem de endoperóxidos. Atuam ainda na diminuição da liberação de histamina pelos mastócitos e basófilos, e supressão dos níveis de bradicinina e conseqüentemente dessensibilizando as terminações nervosas e diminuindo a dor (RANG *et al.*, 2007). Apresentam proeminentes efeitos adversos (devido à ação comum aos esteroides) como diminuição da capacidade fagocítica (os microrganismos são englobados, mas não são destruídos), imunossupressão e diminuição da deposição de fibrina e proliferação de fibroblastos, interferindo na coagulação e cicatrização (RANG *et al.*, 2007).

Já os recentes moduladores ou anti-citocinas (IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ ) são muito caros e a via de administração é subcutânea, pelo menos duas vezes por semana, o que diminui a adesão ao tratamento (CALIXTO *et al.*, 2004). Estes agentes biológicos medicamentosos são frutos de avanços em biotecnologia que permitiram a produção de anticorpos monoclonais terapêuticos, diferindo dos agentes terapêuticos clássicos por sua especificidade contra alvos terapêuticos definidos, por esse mesmo motivo, seu perfil de toxicidade difere do perfil tipicamente associado aos anti-inflamatórios tradicionais (MORENO *et al.*, 2006).

### **1.3 Uso de Plantas Medicinais como Alternativa Terapêutica**

O Brasil detém a maior biodiversidade de fauna e flora mundial com imenso potencial farmacológico para o desenvolvimento de novos medicamentos. Entretanto, menos de 1% dessas espécies tiveram suas propriedades avaliadas cientificamente com o fim de determinar o seu real potencial terapêutico. No Estado do Maranhão a diversidade da flora imprimiu à fitoterapia uma forte tradição popular

de uso para o tratamento de doenças ou condições patológicas (LIMA JUNIOR, DIMENSTEIN, 2006; MELO *et al.*, 2006).

O interesse popular tem induzido a adoção de diversas medidas por parte do MS no sentido de fortalecer a fitoterapia no SUS. Desde a década de 80, diversas resoluções, portarias e relatórios foram elaborados com ênfase na questão das plantas medicinais. As Conferências Nacionais de Saúde vêm contemplando deliberações para desenvolvimento de uma Política Nacional de Plantas Medicinais, Medicamentos Fitoterápicos e Assistência Farmacêutica e inserção destas plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos na atenção a saúde no SUS. Além disso, esta política pretende garantir o acesso seguro e o uso correto de plantas medicinais e fitoterápicos mediante o uso sustentável da biodiversidade e o desenvolvimento da indústria nacional. Para tanto, estabelece diretrizes para ações direcionadas à melhoria da qualidade de vida da população e do complexo produtivo na área de saúde (BRASIL, 2006).

Além das plantas medicinais e fitoterapia, a implementação da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS trouxe outras práticas como: medicina tradicional chinesa, acupuntura, homeopatia e termalismo social pro contexto do cuidado integral em saúde, com o objetivo de ampliar as opções terapêuticas aos usuários (BRASIL, 2006).

Na última década se observou um aumento significativo na publicação de trabalhos que descrevem importantes atividades biológicas, dentre elas a anti-inflamatória, exercidas por preparações de origem vegetal. Na maioria das vezes, estas preparações inibem diferentes vias metabólicas, maximizando os efeitos anti-inflamatórios e minimizando efeitos adversos. Isso se deve ao fato de haver uma mistura de substâncias que podem agir sinergicamente ou antagonicamente, através de diferentes mecanismos de ação. Assim, do ponto de vista inflamatório, um mesmo composto pode ter suas ações relacionadas à habilidade em inibir a síntese ou ação de citocinas, quimiocinas, moléculas de adesão, vias do ácido araquidônico ou NO, dentre vários outros possíveis mecanismos (CALIXTO *et al.*, 2004; SCHMITZ, BACHER, 2005, WERZ, 2007).

## 1.4 Potencial Terapêutico da Espécie *Himathantus drasticus* (Mart.) Plumel

### 1.4.1 Taxonomia e Características Botânico-geográficas

Segundo SPINA (2004), a espécie *Himathantus drasticus* (Mart.) Plumel apresenta a seguinte classificação taxonômica:

- Reino: Plantae
- Filo: Trachaeophyta
- Classe: Magnoliopsida
- Subclasse: Asteridae
- Ordem: Gentianales
- Família: Apocynaceae
- Gênero: *Himatanthus*
- Espécie: *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel

A família Apocynaceae abrange cerca de 400 gêneros. São plantas de hábitos variados, ervas, subarbustos, árvores e trepadeiras, na maioria latexcentes, que vivem tanto nos campos como nas matas. Várias substâncias têm sido isoladas a partir de suas espécies, como por exemplo reserpina, ajmalicina, serpentinina, alcalóides de *Rauvolfia*, cimarina, ouabaína, vimblastina e vincristina. Muitas destas substâncias são consideradas protótipos de classes farmacológicas e fazem parte da história da Farmacologia e da Terapêutica. A diversidade química desta família, devido a presença de alcaloides, triterpenóides e iridóides de comprovada eficácia terapêutica, aliada ao fato de que há várias de suas espécies cuja composição química ainda é desconhecida, tem gerado interesse sobre o estudo químico e avaliação de atividade farmacológica de diversas espécies desta família (DI STASI, HIRUMA-LIMA, 2002).

Além dos representantes com inúmeras atividades medicinais, a família Apocynaceae mostra-se uma importante fonte de recursos econômicos. A borracha pode ser obtida do látex de várias espécies e a madeira, de excelente qualidade, pode ser utilizada para confecções de móveis bem como muitos representantes são utilizados como decoradores de ambientes (RIZZINI, 1990).

O gênero *Himatanthus* foi descrito por J. A. Schultes em 1819, a partir de amostras coletadas no estado do Pará, as quais haviam sido trazidas por J. C. Von Hoffmannseg (DI STASI, HIRUMA-LIMA, 2002).

A classificação mais recente do gênero *Himatanthus* (SPINA, 2004), sinonimizou algumas espécies e estabeleceu em nove o número de espécies do gênero. Seis destas ocorrem na região Amazônica: *H. attenuatus* (Benth.) Woodson, *H. phagedaenicus* (Mart.) Woodson, *H. revolutus* (Huber) Spina & Kinoshita, *H. semilunatus* Markgr., *H. tarapotensis* Schum. ex Markgr. e *H. articulatus* (Vahl.) Woodson. Uma espécie, *H. obovatus* (Muell. Arg.) Woodson, ocorre em áreas de cerrado do Brasil e da Bolívia. Duas outras espécies, *H. bracteatus* (A. DC.) Woodson e *H. drasticus* (Mart.) Plumel. *H. drasticus* (Mart.) Plumel, são restritas à região nordeste do Brasil ocorrendo em vegetação de cerrado e caatinga. Além disso, *H. fallax* foi considerada sinônimo de *H. drasticus*; *H. lancifolius* e *H. speciosus* são sinônimos de *H. bracteatus*, *H. sucuuba* sinônimo de *H. articulatus* e *H. stenophyllus* sinônimo de *H. revolutus*. Por outro lado, *H. bracteatus* var. *revolutus* foi elevada ao nível específico como *H. revolutus* (Huber) Spina & Kinoshita. Uma análise das espécies *H. phagedaenicus* e *H. bracteatus* mostrou que estes nomes como usualmente aplicados são incorretos e que a espécie previamente conhecida por *H. phagedaenicus* deveria ser denominada *H. bracteatus* e vice-versa (SPINA, 2004).

*Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel (Figura 1) é uma espécie vegetal muito comum nos estados do norte e nordeste de Brasil como Pará, Maranhão, Piauí, Ceará e Bahia, conhecida popularmente como janaúba, janaguba, tiborna, pau de leite, jasmim manga, raivosa, sucuba ou sucuuba, ocorrendo também em países como Guianas e Suriname, onde é conhecida por carterpillar e frangipani respectivamente (PLUMEL, 1991).



Figura 1. Ilustração da espécie *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel. Fonte: De Melo, Eugênio Arantes 2011

A espécie *Himatanthus drasticus* apresenta-se como árvores de até 7 m de altura, ocorrendo principalmente no interior da mata. Perenifolia e heliófita, é densamente folheada na extremidade dos ramos. Apresenta tronco com crescimento simpodial, com um ou mais ramos laterais em expansão na sua porção distal, dos quais um é re-orientado para a porção vertical para se tornar uma nova unidade de tronco, esta forma de crescimento é denominada “Modelo de Koriba” (HALLÉ et al 1978; BELL, 1991 *apud* SPINA, 2004). As cascas do caule (Figura 2C) apresentam fragmentos de forma quase plana, encurvando-se na extremidade. Sua superfície externa tem coloração acastanhada com fissuras longitudinais, enquanto a interna, castanho-esbranquiçada, é finamente estriada no sentido do comprimento. A superfície de fratura transversal é nítida, escura externamente e clara na região interna (SPINA, 2004). A casca exsuda um látex branco bastante utilizado na medicina popular, principalmente pelos habitantes da região norte e nordeste do Brasil (LUCETTI *et al.*, 2010).

As folhas de *Himatanthus drasticus* caracterizam-se por serem obovadas e coriáceas. Seu limbo de base atenuada apresenta-se de pequena dimensão, seu ápice pode ser obtuso ou arredondado com margem inteira e plana. A face adaxial apresenta cor verde-escura, com nervura central desenvolvida e proeminente de

onde partem, em ângulo levemente agudo, nervuras secundárias paralelas amarelas e retas que se unem a 1-2 mm da margem, formando um arco. A face abaxial, de coloração verde-amarelada e consistência coriácea, possui nervuras secundárias destacadas, sendo a nervura central ainda mais proeminente nesta face. O pecíolo é curto, canaliculado em cima e convexo arredondado na parte de baixo (SPINA, 2004).



Figura 2. Ilustrações das folhas (A), flores (B) e cascas do caule (C) da espécie *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel. Fonte: De Melo, Eugênio Arantes 2011

As flores são vistosas, brancas e de odor suave. Apresentam cálice com 5 sépalas desenvolvidas, de diferentes tamanhos, ovais a lanceoladas. Corola perfeitamente gamopétala, infundibuliforme ou hipocrateriforme de tubo longo. Androceu formado por cinco estames epipétalos, em geral de filetes curtos, alternos com os lobos da corola e opostos ao estigma. Ovário súpero bicarpelar e bilocular com muitos óvulos. Carpelos separados com um só estilete e um grande estigma em forma de carretel e em geral com dois apículos. Os frutos são folículos alongados, ligeiramente curvos, cilíndricos em sua parte mediana, lisos, apresentando finas estrias longitudinais, contendo sementes aladas, ocorrendo de fevereiro a outubro (SPINA, 2004).

#### 1.4.2 Composição Química e Propriedades Farmacológicas do Gênero *Himatanthus*

O látex e as cascas de diversas espécies do gênero *Himatanthus*, tais como *Himatanthus drasticus* e *Himatanthus sucuuba*, são ricos em triterpenos e alcalóides (Patočka, 2003). O lupeol, triterpeno pentacíclico pertencente à família do lupano, é

um metabólito importante e que pode estar relacionado à propriedade antiinflamatória e antinociceptiva do gênero (Silva, 1998). Foi demonstrado recentemente que o acetato de lupeol apresenta efeito antiinflamatório regulando a atividade do TNF-alfa e IL2 e esta propriedade muitas das vezes, acompanha a sua ação imunomoduladora e antitumoral (Patočka, 2003; Petronelli, 2009; Saleem, 2009). Além destas propriedades, foi demonstrado ainda efeitos gastroprotetores (Leite *et al.*, 2009). Na fração apolar das cascas de *Himatanthus articulata*, foram detectados, além do lupeol e seus derivados, outros terpenóides tais como estigmasterol e sinosterol (Barreto *et al.*, 1998), descritos como agentes citotóxicos contra várias linhagens de células (Asmah, 2006; Sacoman, 2008).

Participando ainda das atividades biológicas do gênero *Himatanthus*, temos os iridóides plumericina, isoplumericina e fulvoplumericina, recentemente estudados, revelaram efeito neuroprotetor, antiinflamatório, imunomodulador, hepatoprotetor e cardioprotetor (Tundis *et al.*, 2008). Estudos com extrato das cascas da *Himatanthus lancifolius*, demonstraram preliminarmente a presença dos alcalóides uleína e demetoxiaspidospermina (França *et al.*, 2000) com atividades gastroprotetora (Baggio *et al.*, 2005) e efeitos sobre a resposta em musculatura lisa vascular e não vascular (Rattman *et al.*, 2005). VILLEGAS *et al.* (1997) também evidenciaram a atividade farmacológica de *H. sucuuba*, mostrando efeito cicatrizante e atóxico significativo. GUERRA e PETERS (1991) sugeriram baixa toxicidade reprodutiva e teratogênica em ratas utilizando decocto de cascas de *Himatanthus sucuuba*, indicando que seu consumo é seguro para a espécie humana no tratamento de gastrites e hemorróidas.

#### 1.4.3 Composição Química e Propriedades Farmacológicas da espécie vegetal *Himatanthus drasticus*.

Os metabólitos mais frequentemente isolados da espécie vegetal *Himatanthus drasticus* são alcalóides e terpenóides dos tipos monoterpenóides (iridóides) e triterpenóides (lupeol e seus derivados), além de compostos fenólicos (SAFAIHY, 1997; PATOCKA, 2003; TUNDIS, 2008). Os triterpenos pentacíclicos tais como, cinamato de  $\alpha$  e  $\beta$ -amirina, cinamato de lupeol e acetato de lupeol são encontrados nas cascas e no látex da *Himatanthus drasticus*. Estudos realizados por Lucetti e *col.* (2010), utilizando vários modelos de inflamação em ratos, demonstraram um

potente efeito antiinflamatório do látex. Além disto, foram demonstradas ações analgésicas de proteínas do látex da *Himatanthus drasticus* utilizando modelos de contorções abdominais (Colares *et al.*, 2008) e foi demonstrado efeito citoprotetor em modelos de úlceras induzidas por etanol em camundongos (Leite *et al.*, 2009). Em trabalho recente, a caracterização os efeitos psicofarmacológicos do extrato bruto das cascas mostrou intensa atividade anticonvulsivante, neuroléptica e hipnosedativa, mesmo em pequenas doses (PINTO, 2012).

### **1.5 Justificativa do Estudo**

Apesar de dados da literatura a respeito do potencial farmacológico do acetato de lupeol e da presença deste triterpeno nas cascas do caule de *Himatanthus drasticus*, pouco tem-se investigado as propriedades terapêuticas desta parte da planta. Especialmente no Estado do Maranhão, o chá das cascas é usado popularmente contra doenças como artrite e úlceras estomacais, hemorroidas, anemia. Infusões, decocções e cataplasmas preparadas a partir da casca são usadas ainda como vermífugas e laxativas e também contra artrites, tumores, furúnculos, hérnias e inchaços de traumas mecânicos.

Assim, frente às potencialidades da espécie, nos dispusemos a investigar os efeitos do extrato hidroalcoólico das cascas de *Himatanthus drasticus* em modelos animais de analgesia, inflamação, cicatrização, bem como atribuir se estas propriedades estariam relacionadas a uma possível atividade antioxidante.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

- Avaliar as propriedades farmacológicas do extrato hidroalcoólico (EHA) das cascas do caule de *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel em modelos murinos experimentais de analgesia, inflamação e cicatrização em camundongos.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Avaliar os efeitos do EHA de *H. drasticus* em modelos experimentais de analgesia e anti-nocicepção tanto central quanto periférica em camundongos.
- Caracterizar os efeitos do EHA de *H. drasticus* sobre a formação de edema e migração leucocitária observadas no modelo de inflamação induzida por carragenina 1%.
- Descrever os efeitos do EHA de *H. drasticus* sobre o processo de retração da ferida observado durante a cicatrização.
- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* do EHA de *H. drasticus* e correlacioná-la com as propriedades farmacológicas observadas nos experimento *in vivo*.

### 3 ARTIGO CIENTÍFICO

O manuscrito a seguir será submetido ao periódico Natural Product Communications. O Fator de Impacto da revista é 1.242, segundo a última avaliação do Journal of Citation Reports (JCR, 2012). A formação do manuscrito segue as instruções para autores, as quais estão disponíveis em <http://www.naturalproduct.us> e encontram-se em anexo no final da dissertação. A formatação das referências bibliográficas foi realizada com o auxílio do *software* EndNote sobre formatação específica para este periódico.

## Avaliação *in vivo* dos efeitos analgésico, anti-inflamatório e cicatrizante das cascas de *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel. (ou Propriedades farmacológicas?)

Vieira DA<sup>a</sup>, Cartágenes MS<sup>a</sup> e Paes AM<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA, Brasil 65.085-580

\*Autor correspondente: marcuspaes@ufma.br

Received: January XX, 2012; Accepted: XX, 2012

*Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel (Apocynaceae) é popularmente conhecida como janaúba, sendo o látex e as cascas do caule da planta popularmente utilizados como anti-inflamatório, analgésico e anti-tumoral. A avaliação das atividades analgésica, anti-inflamatória e cicatrizante do extrato hidroalcoólico (EHA) das cascas de *Himatanthus drasticus* demonstrou que o EHA reduz as contorções abdominais induzidas por ácido acético, embora não interfira na percepção central da dor. O EHA inibiu a formação de edema e a migração leucocitária induzidas por carragenina 1%. Em consonância, o EHA também promoveu um importante efeito cicatrizante. Tais atividades podem estar associadas à forte presença de alcalóides e triterpenos frequentemente encontrados nessa espécie vegetal. A presença de compostos fenólicos, embora em menor proporção, parece contribuir para estas atividades, uma vez que, o EHA apresentou capacidade antioxidante quando avaliado em ensaio *in vitro* nas doses 0,5; 0,75 e 1,0 g/Kg.

**Palavras-chave:** *Himatanthus drasticus*, janaúba, anti-inflamatória, anti-nociceptiva, antioxidante, cicatrizante.

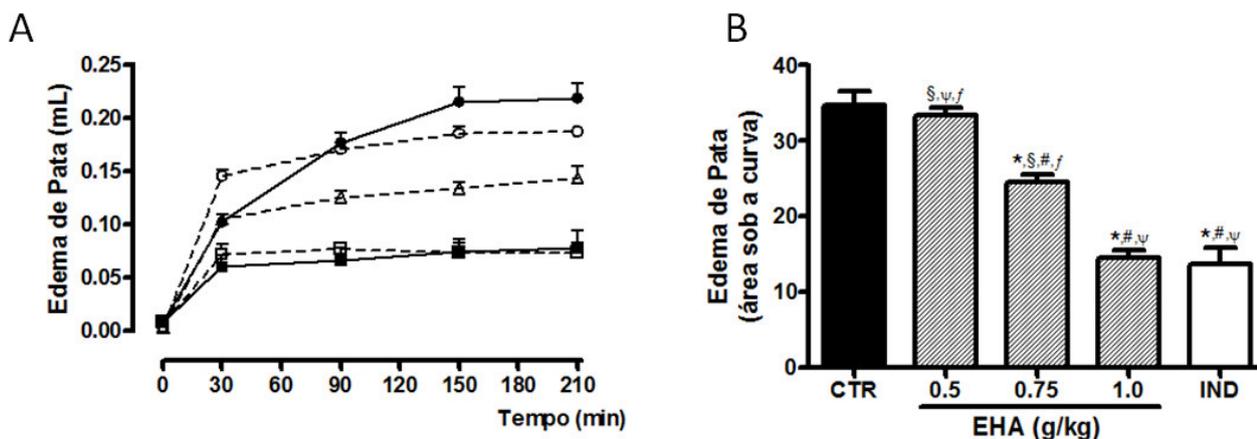
*Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel – (Apocynaceae) é uma planta de vasta ocorrência nas regiões Norte e Nordeste do Brasil onde é conhecida como janaúba, janaguba, tiborna, pau-de-leite, entre outras sinonímias [1]. O látex e as cascas do caule e raízes são amplamente utilizados na prática popular para o tratamento de tumores, inflamações e úlceras [2]. Embora os estudos sistematizados priorizem a caracterização dos constituintes e propriedades farmacológicas do látex, análises farmacognósticas qualitativas indicam forte presença de alcalóides e triterpenos, além da presença moderada de saponinas e cumarinas em outras parte da planta [3]. Vários estudos [3-6] tem investigado as potenciais atividades anti-inflamatória e anti-tumoral de espécies do gênero *Himatanthus*, especialmente as propriedades de triterpenos de esqueleto lupânico, tais como o lupeol, a betulina e o ácido betulínico [7-9]. Recentemente, foi demonstrado que o lupeol presente no látex é o principal responsável pela atividade anti – inflamatória da espécie *H. drasticus* [2]. Além deste, depsídeos, iridóides e alcalóides também são frequentemente encontrados nestas espécies e podem contribuir para as atividades biológicas propaladas [4].

No Estado do Maranhão, as cascas do caule de *H. drasticus* são a principal parte utilizada com fins terapêuticos. Entretanto, há escassez de estudos que corroborem sua aplicação popular. A recente descrição da presença de sais de lupeol nesta parte da planta [3] trouxe novas perspectivas e motivou o desenvolvimento deste estudo que teve como objetivo caracterizar os efeitos analgésico, anti-inflamatório e cicatrizante do extrato hidroalcoólico (EHA) das cascas de *H. drasticus*.

O EHA preparado a partir das cascas de *H. drasticus* apresentou coloração marrom – avermelhada e rendimento de 7,03%. A determinação da dose letal mediana (DL<sub>50</sub>) foi utilizada como parâmetro avaliador da toxicidade aguda e norteador das doses terapêuticas a serem utilizadas nos ensaios biológicos. A administração do EHA, em cinco doses crescentes (1,0 – 5,0 g/kg), por via oral, resultou em valor de DL<sub>50</sub> = 3,4 g/kg. Este resultado é semelhante ao descrito para outra espécie do gênero, *H. sucuuba* Wood, à qual fora atribuída baixa toxicidade [6]. A partir desta análise, as doses de 0,5; 0,75 e 1,0 g/kg foram determinadas como toxicologicamente seguras e utilizadas nos ensaios biológicos.

A atividade anti-inflamatória do EHA foi avaliada no teste de edema de pata induzido por injeção intraplantar de

carragenina a 1%. Conforme pode ser observado na Figura 1A, a administração oral do EHA reduziu a formação de



**Figura 1: Efeitos da administração oral do extrato hidroalcoólico das cascas de *H. drasticus* (Mart.) Plumel sobre o edema de pata induzido por carragenina 1%:** A administração oral do EHA [0,5 (○); 0,75 (△) e 1,0 (□) g/kg], indometacina [IND – 0,01 (■) g/kg] ou veículo (CTR – ●) 30 minutos antes da indução de edema por injeção intraplantar de carragenina 1% inibiu tanto a evolução do edema (A), quando o volume total de edema formado (B). Os pontos e barras verticais representam média ± EPM (n = 6). ANOVA (Newman-Keuls),  $p < 0,05$  \* vs. CTR, § vs. IND, # vs. EHA 0.5, w vs. EHA 0.75 e f vs. EHA 1.0.

edema de maneira dependente de dose. A análise da área sob a curva de evolução do edema (Figura 1B) mostrou que o EHA, nas doses de 0,75 e 1,0 g/kg, reduziu o volume total de edema em 29 e 58%, respectivamente, quando comparado ao grupo controle, atingindo resposta semelhante à obtida com indometacina na dose de 0,01g/kg.

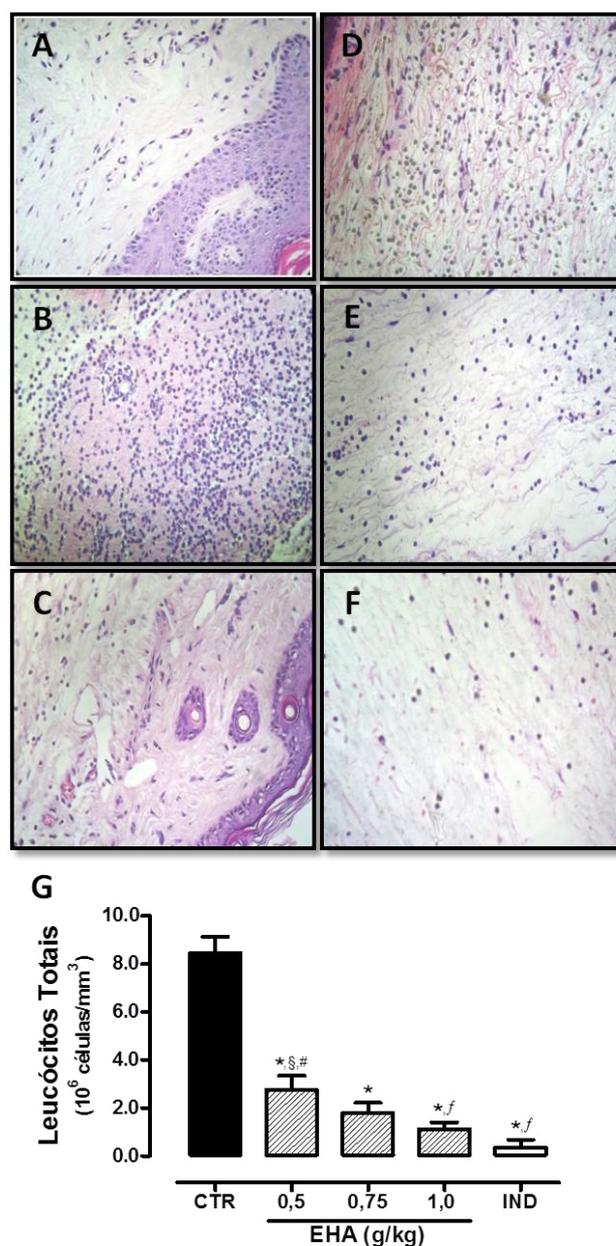
O modelo de resposta inflamatória induzida por carragenina apresenta edema e infiltração leucocitária induzidos por histamina e serotonina na fase inicial e por prostaglandinas e bradicinina na fase tardia. Drogas anti-inflamatórias não esteróides, tais como a indometacina, reduzem a resposta inflamatória total ao inibirem a geração de prostaglandinas e o consequente efeito quimiotático das mesmas [10, 11]. Na figura 1A, observa-se que a indometacina inibiu principalmente a segunda fase da resposta inflamatória, após 30 minutos da indução. Comportamento semelhante foi observado nos animais tratados com o EHA, sendo que, o grau de inibição apresentou efeito dependente de dose. Isto posto, é plausível supor que EHA exerça sua ação, principalmente, mediante a diminuição da infiltração leucocitária decorrente da menor geração de substâncias quimiotáticas.

Para avaliação da migração leucocitária, foram preparadas lâminas histológicas das patas dos animais injetados ou não com carragenina 1%. Como pode ser observado na Figura 2 (Painéis A – F), a administração de carragenina

induziu massiva migração leucocitária (Painel B vs. Painel A), a qual foi eficientemente inibida pela administração prévia de indometacina (Painel C). Em consonância com

os dados mostrados na figura 1, a administração prévia do EHA resultou em diminuição da migração leucocitária (Figura 2, Painéis D – F). Para confirmação dos dados histológicos, coletou-se o exsudado inflamatório plantar dos animais, o qual foi utilizado para contagem de leucócitos totais. Como mostrado na figura 2G, a administração prévia do EHA, nas doses de 0,5; 0,75 e 1,0 g/kg, reduziu a migração leucocitária, de forma dependente de dose, em 67; 79 e 87%, respectivamente.

O lupeol, triterpeno presente tanto no látex [2] quanto na casca do caule [3] de *H. drasticus*, tem atividade anti – inflamatória atribuída à inibição da produção de mediadores inflamatórios, especialmente fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) e interleucinas 1, 2 e 6 (IL-1, IL-2 e IL-6) [8, 12-14]. Considerando que a liberação de TNF- $\alpha$  por mastócitos é um dos mecanismos responsáveis pela maciça infiltração leucocitária induzida por carragenina [11], é possível sugerir que a atividade anti-inflamatória aqui observada seja resultante da ação do lupeol ou outro triterpeno de esqueleto lupânico presentes no EHA. Além disso, nosso estudo evidencia que os efeitos do EHA sobre a infiltração leucocitária e edematogênese (78% e 89%) foram mais pronunciados que os observados após a administração da fração hexânica do látex de *H. sucuuba* [15] e semelhantes ao do acetato de lupeol extraído do látex de *H. drasticus* [2]. Isto sugere que os efeitos observados neste trabalho decorram da ação sinérgica com outros metabólitos secundários presentes no EHA, os quais podem ter se perdido no processo de extração e fracionamento realizados por outros autores.



**Figura 2:** Efeitos da administração oral do extrato hidroalcoólico das cascas de *Himatanthus drasticus* (Mart) Plumel sobre a migração leucocitária induzida por carragenina 1%: Painéis A – F representam a análise histológica do tecido subplantar de camundongos (ampliados 100x) tratados com o extrato hidroalcoólico [EHA 0,5 (D); 0,75(E) e 1,0 (F) g/kg] ou indometacina [IND (C) 0,01 g/kg] 4 horas após a indução de edema por injeção subplantar de carragenina 1%. Painéis A e B representam tecido não inflamado e inflamado (CTR), respectivamente. Painel G demonstra a contagem total de leucócitos presentes no exsudato inflamatório. As barras verticais representam média  $\pm$  EPM (n = 6). ANOVA (Newman-Keuls),  $p < 0,05$ . \* vs. CTR, § vs. IND, # vs. EHA 1.0 e f vs. EHA 0.5.

Também foi avaliada a ação analgésica do EHA em modelos de analgesia periférica e central. Camundongos pré – tratados com EHA nas doses de 0,5; 0,75 e 1,0 g/kg

apresentaram redução de 22, 43 e 53%, respectivamente, do número total de contorções abdominais induzidas pela injeção intraperitoneal de solução de ácido acético 1%

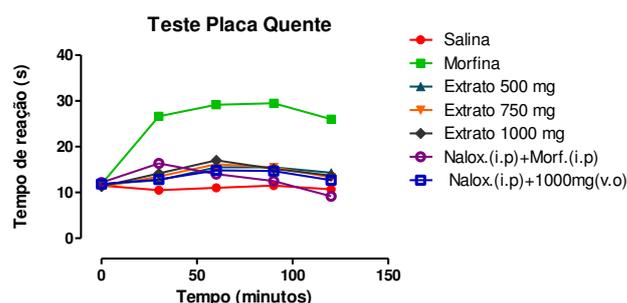
**Tabela 1:** Efeitos do extrato hidroalcoólico de *H. drasticus* (Mart.) Plumel e indometacina (IND) administrados por via oral sobre a inibição das contorções abdominais induzidas por ácido acético (1%, intraperitoneal).

Composto	Dose (g/kg)	% inibição em relação ao grupo controle(CTR)
Veículo (CTR)	-	-
IND	0,01	71,4 *
EHA	0,50	22,0 *.§.#.f
	0,75	43,6 *.§.f
	1,00	52,9 *.§

ANOVA (Newman Keuls)  $p < 0,05$  \**v.s.*CTR, §*v.s.*IND, #*v.s.*EHA 0,75 e *f**v.s.*EHA 1,0.

(Tabela 1). Entretanto, a avaliação da ação analgésica central através do teste da placa quente não demonstrou qualquer ação do EHA (dados não mostrados). Este grupo de dados reproduz achados anteriores de Colares *et al.* [3], nos quais o extrato etanólico das cascas do caule de *H. drasticus* apresentou efeito analgésico periférico, mas não central.

No teste da placa quente, após o pré-tratamento com as doses do extrato obtendo-se aumento de 26% (500mg), 26% (750mg) e 29% (1000mg) no tempo de reação dos animais, não foi observada diferenças significativas entre os grupos tratados com extrato e o grupo salina experimental. Considerando-se os grupos em que utilizou-se o antagonista naloxona, observou-se uma redução no tempo de reação com a dose de 1000mg e um bloqueio na ação do opióide morfina.

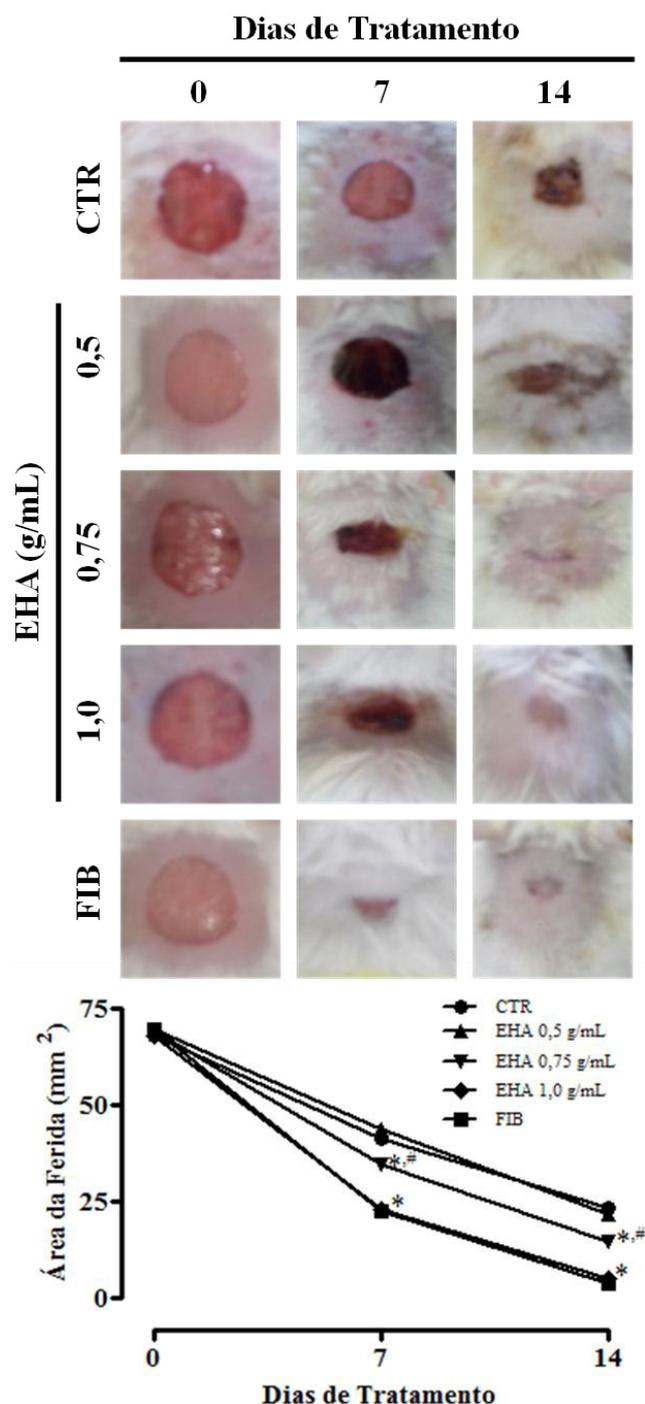


**Figura 3** Efeito do tratamento oral com EHHD sobre o tempo de reação no teste da placa quente em camundongos. Os camundongos foram tratados com EHHD (500; 750 e 1000 MG/ML) ou salina e submetidos a estes testes depois de 1h. O grupo controle positivo recebeu morfina (dose mg/kg) S.C. 15 minutos antes do teste) no teste de placa quente. Os pontos e barras verticais representam a média  $\pm$  erro padrão das médias de 6

experimentos. (\*) Significativamente diferente do valor médio obtido no grupo controle  $p < 0,05$  (ANOVA).

Estudos realizados em espécies vegetais do mesmo gênero mostraram atividade analgésica e antiinflamatória dos iridóides plumierídeo, isoplumierídeo e protopluméricina, além de triterpenóides presentes nas cascas e no látex [16, 17]. Por outro lado, a atividade analgésica do lupeol é controversa. Miranda *et al.* [15] mostraram que uma mistura de cinamatos de  $\alpha$ -amirina e lupeol extraídos do látex de *H. succuba* inibiu em 58% as contorções abdominais induzidas por ácido acético. Lucetti *et al.* [2], propuseram que a atividade anti-nociceptiva observada no teste da formalina se devia ao efeito do acetato de lupeol extraído do látex de *H. drasticus* sobre o sistema opióide. Enquanto isso, Kweifio-Okai *et al.* [18] não encontraram qualquer atividade analgésica ou antipirética para o lupeol, o que os fez sugerir que o mesmo agiria por um mecanismo diferente da inibição da ciclooxigenase-1.

Para melhor caracterizar os efeitos do EHA nos processos de inflamação e reparo, avaliamos sua ação sobre a velocidade de contração da ferida durante a cicatrização. Os dados mostrados na Figura 3 evidenciam que a aplicação tópica diária de 0,1 mL de EHA acelerou a contração da ferida de maneira dependente de dose. Após 7 dias da formação da ferida, os animais tratados com o EHA nas concentrações de 0,75 e 1,0 g/mL apresentaram redução de 50,1 e 66,2% na área da ferida, respectivamente, consideravelmente superior à dos CTR (38,8%). Este efeito se manteve após 14 dias quando o EHA, nas mesmas concentrações, havia promovido a contração da ferida em 78,6 e 92,3%, respectivamente, enquanto no grupo CTR a contração foi de 65,8%. Embora



**Figura 4:** Efeitos da administração tópica do extrato hidroalcoólico das cascas de *H. drasticus* (Mart) Plumel sobre a contração da ferida induzida por excisão de pele: Painel superior apresenta imagens ilustrativas do processo de contração de ferida induzida por excisão de pele em camundongos. Após excisão (dia 0), os animais foram tratados com aplicação tópica diária de 0,1 mL de EHA (0,5; 0,75 e 1,0 g/mL), Fibrase (FIB) ou veículo (CTR). Após 7 e 14 dias de tratamento, foram tomadas imagens das feridas e a análise da área da ferida ( $\text{mm}^2$ ) realizada através do software Image J. (Software livre, NIH, EUA) Painel inferior apresenta a quantificação e análise estatísticas das áreas em cada grupo. Os pontos e barras verticais representam média  $\pm$  EPM ( $n = 6$ ). ANOVA (Newman-Keuls),  $p < 0,001$ . \* vs. CTR, # vs. FIB.

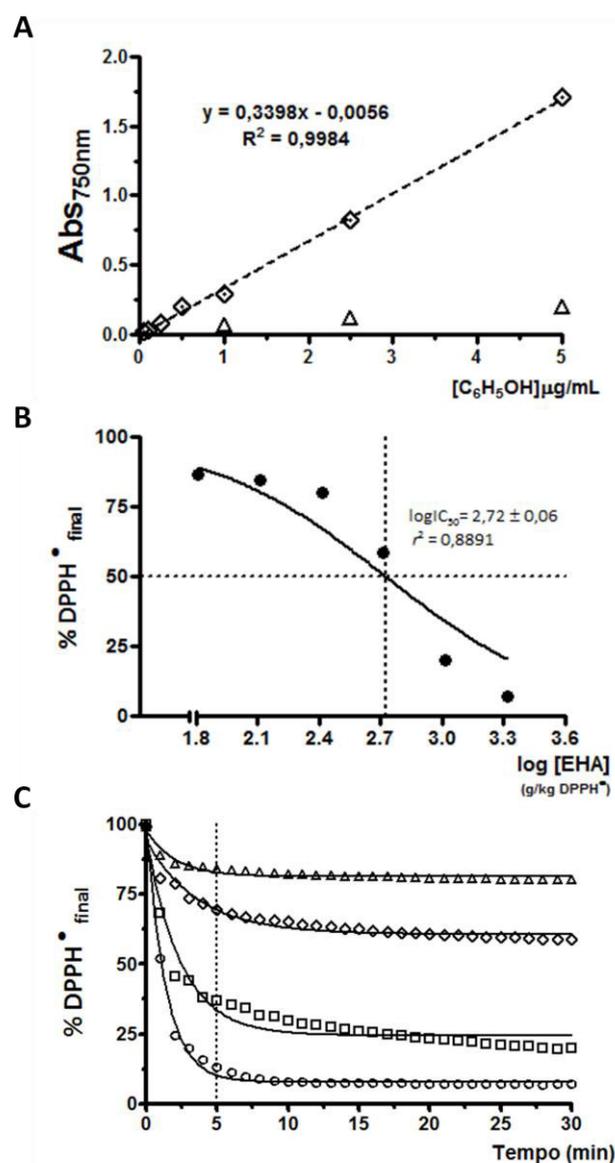
a aplicação do EHA na concentração de 0,5 g/mL não tenha promovido qualquer efeito acelerador da cicatrização, a aplicação de 1 g/mL promoveu efeito praticamente idêntico ao observado nos animais tratados com Fibrase®, uma droga cicatrizante padrão. Nossos dados corroboram os achados de Villegas *et al.* [19], os quais demonstraram que as cascas de *H. sucuuba* promovem efeito cicatrizante e indutor do aumento da permeabilidade capilar. Além disso, foi demonstrado que o lupeol presente na casca do caule de ambas as espécies bloqueia o sítio ativo da 3- $\beta$  glicogênio sintase quinase, enzima inibidora da cicatrização pela via das  $\beta$ -cateninas [20].

Várias espécies vegetais tem suas propriedades anti-inflamatórias atribuídas à capacidade antioxidante, ou seja, à capacidade de sequestrar espécies oxidantes produzidas por células inflamatórias antes que estas possam causar danos celulares ou teciduais [21]. Dentre as classes de metabólitos secundários, os compostos fenólicos são os que mais se destacam nesta atividade, embora haja um paradoxo entre as atividades encontradas em ensaios *in vitro* e as propriedades observadas *in vivo* [22].

Assim, para melhor caracterização dos possíveis mecanismos da atividade anti-inflamatória do EHA, realizou-se a avaliação da capacidade antioxidante do extrato. A quantidade total de compostos fenólicos no EHA foi de  $14,64 \pm 2,51$  EAG/100g EHA (Figura 4A). Quando avaliou-se a capacidade do EHA em sequestrar o radical DPPH<sup>•</sup>, a IC<sub>50</sub> foi igual a  $533,0 \pm 1,1$  g/kg de DPPH<sup>•</sup> (Figura 4B). Segundo Halliwell [23], uma mistura com boa atividade antioxidante deve regenerar o substrato ou prevenir significativamente sua oxidação em concentrações significativamente menores que aquela do substrato oxidável. O EHA apresentou proporção EHA:DPPH<sup>•</sup> de aproximadamente 1:2, sendo que, o ácido gálico, padrão desse experimento, apresentou proporção de 1:25.

Entretanto, Sánchez – Moreno e colaboradores [24], propuseram que a atividade antioxidante pode também ser inferida pelo tempo decorrido até que o sequestro do DPPH<sup>•</sup> atinja o platô. Se o tempo é inferior a 5 minutos é classificada como rápida, entre 5 e 30 minutos é intermediária e se maior que 30 minutos, o antioxidante é considerando de reação lenta. Os dados da Figura 4C deixam claro que os compostos fenólicos presentes no EHA apresentam capacidade de reação antioxidante intermediária, compatível com aquela de antioxidantes clássicos como o  $\alpha$ -tocoferol [24]. Assim, é possível sugerir que a atividade antioxidante do EHA contribui para a atividade anti-inflamatória aqui demonstrada. É

importante salientar ainda que esta atividade antioxidante não está relacionada ao lupeol, uma vez que, o acetato de



**Figura 5:** Avaliação *in vitro* da capacidade antioxidante do EHA das cascas de *H. drasticus* (Mart.) Plumel: A. Quantificação de fenóis totais (C<sub>6</sub>H<sub>5</sub>O) presente no EHA ( $\Delta$ ) obtida a partir da equação de regressão linear de curva padrão de ácido gálico ( $\diamond$ ). B. Determinação da IC<sub>50</sub> do EHA sobre o DPPH<sup>•</sup>, obtida por regressão não linear. Os pontos representam o percentual final de DPPH<sup>•</sup> após 30 minutos da adição de EHA em diferentes concentrações, expressas como log[EHA]. C. Cinética do sequestro do radical DPPH<sup>•</sup> por diferentes concentrações de EHA [260 ( $\Delta$ ), 520 ( $\diamond$ ), 1040 ( $\square$ ) e 2080 ( $\circ$ ) g/kg DPPH<sup>•</sup>]. Todos os procedimentos foram conduzidos em triplicata.

lupeol extraído de *H. drasticus* não apresentou qualquer efeito sequestrador do radical DPPH<sup>•</sup> [2], embora tenha suprimido a geração de radical superóxido por neutrófilos humanos estimulados com ácido araquidônico [25].

Vistos de forma integrada, os dados aqui apresentados reafirmam a indicação popular da espécie *Himatanthus*

*drasticus* (Mart.) Plumel como anti-inflamatório e cicatrizante, estendendo esta atividade às cascas do caule. Ao que se sabe, esta é a primeira vez que a atividade anti – inflamatória é demonstrada em extratos preparados desta parte da planta. Ademais, são sugestivos de que o EHA possui outros metabólicos secundários que contribuem para os efeitos descritos, uma vez que, estes efeitos foram potencialmente mais expressivos que outros obtidos com substâncias isoladas do látex de *H. drasticus*, em especial o lupeol.

## Experimental

**Material botânico e obtenção do extrato:** As cascas do caule da espécie vegetal *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel foram coletadas em março de 2010 no município de São Bento – MA, Brasil ( 02° 41'45" N; 44° 49'17") e identificadas no Laboratório de Botânica da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), onde se encontram catalogadas sob registro #01032. O pó das cascas secas foi submetido a maceração com etanol 70% (1:3) por 72 h e a troca do solvente a cada 24 h. Os extratos foram reunidos, filtrados e concentrados em evaporador rotativo à vácuo, sob baixa pressão e temperatura de 55°C. Alíquotas do extrato hidroalcoólico (EHA) final foram utilizadas para determinação do peso seco e do rendimento percentual da extração.

**Animais:** Foram utilizados camundongos machos, espécie *Mus musculus*, variação Swiss (n= 6, ± 90 dias, 30 g), provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Maranhão (UFMA). Os animais foram mantidos em gaiolas de polietileno, em ambiente com temperatura controlada (22 + 2°C) com água e ração *ad libitum* e sob ciclo claro/escuro de 12hs. Para utilização dos animais obteve-se previamente a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMA (23115-006060/2010-18).

**Determinação da Dose Letal Mediana (DL<sub>50</sub>):** Seguiu-se o protocolo descrito por Almeida [24]. Foram separados 6 grupos (n=6 / grupo), classificados da seguinte forma: Grupo controle (salina a 0,9%, v.o. e i.p.) e Grupos experimentais de *H. drasticus* (1,0g, 2,0g, 3,0, 4,0g e 5,0 g/kg, v.o. e i.p.). Após o tratamento, pelas vias de administração oral (v.o) e intraperitoneal (i.p), os animais foram postos em gaiolas para observação e após 24 horas foi contabilizada a porcentagem de animais mortos por dose, para posterior determinação da dose necessária para causar 50% de mortalidade dos animais tratados.

**Determinação do teor de fenóis totais:** O teor de fenóis totais foi determinado mediante adaptação dos métodos descritos por Pueyo & Calvo [26] e Berker *et al.* [27]. As amostras do EHA foram misturadas a etanol 96% em volume igual a 100 – x µL, onde x é o volume em µL da amostra. A seguir, adicionou-se 630 µL de H<sub>2</sub>O deionizada, 20µL HCl 1N, 150µL de K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>], 50µL de dodecil sulfato de sódio(SDS) 1% e 50 µL de FeCl<sub>3</sub>•6H<sub>2</sub>O obtendo-se um volume final de 1 mL. As misturas foram agitadas em vortex e deixadas em repouso em temperatura ambiente por 30 minutos antes da leitura em 750 nm. O branco foi determinado como a mistura acima sem adição de extrato ou antioxidante padrão. Uma

solução estoque de ácido gálico (AG) foi preparada na concentração de 1mg/ml em metanol. A partir da solução estoque foram tomadas alíquotas de modo a obterem-se concentrações finais de 0,5; 1,0; 2,0; 4,0 e 8,0 µg/ml. Todas as análises foram realizadas em quadruplicata. As concentrações de fenóis totais e a capacidade antioxidante total (CAT) dos extratos foram determinadas por derivação da equação de regressão linear obtida para o padrão ácido gálico.

**Determinação da atividade antioxidante in vitro.** A atividade antioxidante foi avaliada pelo método fotocolorimétrico do radical livre estável DPPH• (2,2-difenil-1-picril 1-hidrazil) descrito por Sánchez-Moreno et al [24], com alterações. A uma cuveta foi adicionada 1,9 ml de solução metanólica de DPPH• (25µg/mL), preparada no momento do experimento e mantida em frasco âmbar. A seguir foram tomadas leituras da absorbância em 515 nm, a cada minuto por 5 minutos para verificação da estabilidade da solução. Em seguida, foram adicionadas alíquotas de 100µL do EHA em concentração suficiente para se obter concentração final variável de 1 – 100 µg/mL. As absorbâncias continuaram a serem medidas a cada minuto até que fosse observada a estabilização da leitura, sendo o tempo mínimo de 20 minutos adotado como controle. Foi utilizado metanol como branco. A capacidade inibitória do EHA foi calculada a partir de uma curva de calibração do DPPH• construída nas concentrações de 10, 20, 30, 40, 50 e 60 µM, utilizando metanol para as diluições. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

**Edema de pata induzido por carragenina 1%:** Os animais em jejum de 12 horas foram divididos em 5 grupos (n=6) e tratados por via oral com EHA nas doses 0,5; 0,75 e 1,0g/kg, indometacina 0,01g/kg ou com veículo (solução salina). Após 30 minutos, em todos os animais, foram injetados na região subplantar 0,3mL de solução salina na pata traseira direita e igual volume da carragenina (1%) na pata traseira esquerda. O volume das patas foi determinado e avaliado em função do tempo (min.) por meio de pletismômetro. O edema foi relatado como a diferença entre os volumes das patas direita e esquerda [28].

**Análise histológica da migração leucocitária em edema induzido por carragenina 1%.** Amostras tecidual das patas dos camundongos foram colhidas na terceira hora de indução do edema e fixadas em solução de formalina 10%. As peças cirúrgicas foram desidratadas em álcool, emblocadas em parafina, seccionadas e coradas em hematoxilina e eosina (HE), sendo os resultados avaliados com base na infiltração leucocitária no tecido edemaciado.

**Determinação do número de células leucocitárias do líquido intersticial colhido por punção da pata edemaciada.**

Após a administração de carragenina 1% na pata esquerda do animal, por volta da terceira hora de indução do edema, foi coletado o líquido intersticial da região edemaciada da pata para posterior contagem global de leucócitos em câmara de Neubauer.

**Teste de contorções abdominais:** O EHA (0,5; 0,75 e 1,0 g/kg) foi administrado, por via oral (v.o.), em camundongos (n=5). Após 1 h de tratamento, 0,1ml/10g de ácido acético 0,1% foram administrados intraperitonealmente e o nº de contorções abdominais foi contado entre 10 e 20 min após esse procedimento. O grupo controle recebeu (0,1mL/10g) salina (v.o.). Indometacina (0,01g/kg, v.o.) foi o controle positivo do teste e serviu para validar o método [29].

**Teste da placa quente:** Os animais, divididos em grupos (n=6) de acordo com o tratamento a ser recebido previamente em; grupos experimentais, utilizando-se o EHA (v.o) nas doses de 0,5; 0,75 e 1,0g, grupo salina(0,1mL/10g v.o), grupo morfina (7,5mg/kg i.p) e grupo naloxona (5mg/kg i.p), foram colocados sobre uma placa de alumínio aquecida ( $\pm 50^{\circ}\text{C}$ ) e observou-se o comportamento dos animais ao estímulo térmico nociceptivo, caracterizado pela troca rápida do apoio dos pés, lambar ou levantar uma das patas quando colocadas sobre uma superfície aquecida (placa quente). Os resultados foram avaliados pela medida da latência ou do tempo decorrido desde o momento em que o animal é colocado sobre a placa até o aparecimento da resposta motora, durante os intervalos de 30, 60, 90, 120 e 150

minutos. Para evitar possíveis lesões nos animais, foi considerado um tempo de permanência na placa de no máximo 30 segundos.

**Teste de cicatrização:** Animais anestesiados foram colocados em decúbito dorsal em prancha cirúrgica e submetidos a tricotomia manual do dorso e feita a incisão cirúrgica com retirada de um fragmento de 1cm de diâmetro da pele, utilizando um “punch” metálico, de forma a expor somente a fáscia muscular dorsal subjacente. Os animais foram acondicionados em gaiolas plásticas individuais forradas com maravalha, sendo realizada a primeira aplicação tópica de 0,1mL do EHA (0,5; 0,75 e 1,0 g/mL), fibrase® (FIB) ou veículo (CTR). Após a lesão e aos 7 e 14 dias de tratamento, as feridas foram fotografadas utilizando-se câmera fotográfica digital acoplada a um tripé com distância padronizada de 15cm. As imagens foram analisadas com o software Image J (NIH, EUA) para cálculo da área de lesão.

**Análise estatística:** Os resultados foram comparados estatisticamente por meio do teste *t* de Student ou da análise de variância (one-way ANOVA) seguido pelo teste de Newman-Keuls, para um nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

## Referências

1. Amaro, M.S., et al., *Morfologia de frutos, sementes e de plântulas de janaguba (Himatanthus drasticus (Mart.) Plumel. - Apocynaceae)*. Revista Brasileira de Sementes, 2006. **28**: p. 63-71.
2. Lucetti, D.L., et al., *Anti-inflammatory effects and possible mechanism of action of lupeol acetate isolated from Himatanthus drasticus (Mart.) Plumel*. Journal of inflammation, 2010. **7**: p. 60.
3. Colares, A.V., et al., *Phytochemical and biological preliminary study of Himatanthus drasticus (Mart.) Plumel (Janaguba)*. Pharmacognosy Magazine, 2008. **4**(14): p. 73-77.
4. Silva, J.R.d.A., et al., *Ésteres triterpênicos de Himatanthus sucuuba (Spruce) Woodson*. Química Nova, 1998. **21**: p. 702-704.
5. Rattmann, Y.D., et al., *Effects of alkaloids of Himatanthus lancifolius (Muell. Arg.) Woodson, Apocynaceae, on smooth muscle responsiveness*. Journal of ethnopharmacology, 2005. **100**(3): p. 268-75.
6. Guerra, M.O. and V.M. Peters, *Screening for reproductive toxicity in rats for a decoction of Himatanthus sucuuba stem bark*. Journal of ethnopharmacology, 1991. **34**(2-3): p. 195-9.
7. Hill, R.A. and J.D. Connolly, *Triterpenoids*. Natural Product Reports, 2011. **28**(6): p. 1087-1117.
8. Saleem, M., *Lupeol, a novel anti-inflammatory and anti-cancer dietary triterpene*. Cancer letters, 2009. **285**(2): p. 109-15.
9. Saleem, M., et al., *Lupeol inhibits proliferation of human prostate cancer cells by targeting beta-catenin signaling*. Carcinogenesis, 2009. **30**(5): p. 808-17.
10. Winter, C.A., E.A. Risley, and G.W. Nuss, *Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs*. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine, 1962. **111**: p. 544-7.
11. Romano, M., et al., *Carrageenan-induced acute inflammation in the mouse air pouch synovial model. Role of tumour necrosis factor*. Mediators of Inflammation, 1997. **6**(1): p. 32-38.
12. Fernandez, M.A., et al., *New insights into the mechanism of action of the anti-inflammatory triterpene lupeol*. The Journal of pharmacy and pharmacology, 2001. **53**(11): p. 1533-9.
13. Ashalatha, K., et al., *Anti inflammatory potential of Decalepis hamiltonii (Wight and Arn) as evidenced by down regulation of pro inflammatory cytokines-TNF-alpha and IL-2*. Journal of ethnopharmacology, 2010. **130**(1): p. 167-70.
14. Ahmad, S.F., et al., *Downregulation of pro-inflammatory cytokines by lupeol measured using cytometric bead array immunoassay*. Phytotherapy research : PTR, 2010. **24**(1): p. 9-13.
15. de Miranda, A.L., et al., *Anti-inflammatory and analgesic activities of the latex containing triterpenes from Himatanthus sucuuba*. Planta medica, 2000. **66**(3): p. 284-6.
16. Silva, J.R.A.P., R. A. B., et al., *Composição e atividade antiinflamatória e analgésica do látex de Himatanthus sucuuba (Spruce) Woodson (Apocynaceae)*, 1998, XV SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL: Águas de Lindóia - SP. p. 1190

17. Amaral, A.C.F. and R.M. Kuster, *Phytochemical comparison by HPLC and CG/MS between two species of genus Himatanthus.*, 2004, *III International Symposium Breeding Research on Medicinal and Aromatic Plants & II Latin American Symposium on the Production of Medicinal and Aromatic Plants and Condiments (ISMAP)*: Campinas - SP. p. A05-40.
18. Kweifio-Okai, G., et al., *Antiarthritic mechanisms of lupeol triterpenes.* Drug Development Research, 1995. **36**(1): p. 20-24.
19. Villegas, L.F., et al., *Evaluation of the wound-healing activity of selected traditional medicinal plants from Peru.* J Ethnopharmacol, 1997. **55**(3): p. 193-200.
20. Harish, B.G., et al., *Wound healing activity and docking of glycogen-synthase-kinase-3- $\beta$ -protein with isolated triterpenoid lupeol in rats.* Phytomedicine, 2008. **15**(9): p. 763-767.
21. Kaplan, M., et al., *Use of herbal preparations in the treatment of oxidant-mediated inflammatory disorders.* Complementary Therapies in Medicine, 2007. **15**(3): p. 207-216.
22. Halliwell, B., J. Rafter, and A. Jenner, *Health promotion by flavonoids, tocopherols, tocotrienols, and other phenols: direct or indirect effects? Antioxidant or not?* The American Journal of Clinical Nutrition, 2005. **81**(1): p. 268S-276S.
23. Halliwell, B., *The antioxidant paradox: less paradoxical now?* British journal of clinical pharmacology, 2012.
24. Sánchez-Moreno, C., J.A. Larrauri, and F. Saura-Calixto, *A procedure to measure the antiradical efficiency of polyphenols.* Journal of the Science of Food and Agriculture, 1998. **76**(2): p. 270-276.
25. Yamashita, K., et al., *Effect of three triterpenoids, lupeol, betulin, and betulinic acid on the stimulus-induced superoxide generation and tyrosyl phosphorylation of proteins in human neutrophils.* Clinica chimica acta; international journal of clinical chemistry, 2002. **325**(1-2): p. 91-6.
26. Pueyo, I.U. and M.I. Calvo, *Assay conditions and validation of a new UV spectrophotometric method using microplates for the determination of polyphenol content.* Fitoterapia, 2009. **80**(8): p. 465-7.
27. Berker, K.I., et al., *Total Antioxidant Capacity Assay Using Optimized Ferricyanide/Prussian Blue Method.* Food Analytical Methods, 2010. **3**(3): p. 154-168.
28. Winter, C.A., E.A. Riskey, and G.W. Nuss, *Carrageenin-Induced Edema in Hind Paw of Rat as an Assay for Antiinflammatory Drugs.* Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 1962. **111**(3): p. 544-&.
29. Koster, R., M. Anderson, and E.J. Debeer, *Acetic Acid for Analgesic Screening.* Federation Proceedings, 1959. **18**(1): p. 412-412.

#### **4 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A análise conjunta dos dados apresentados fornece um avanço importante no conhecimento das propriedades farmacológicas da espécie *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel, especialmente das cascas do caule. Apesar de ter seu uso vastamente propalado na população, esta parte da planta tem recebido pouca atenção de estudos sistematizados.

Foi mostrado que o tratamento com o EHA promove significativo efeito analgésico, o qual parece estar mais relacionado com a inibição da ativação dos nociceptores periféricos, uma vez que, não houve efeito sobre a percepção central da dor. Quando avaliada a atividade anti-inflamatória, observou-se que o EHA diminui a formação de edema numa ação provavelmente relacionada à diminuição da migração de leucócitos para o foco da inflamação. Os mecanismos pelos quais o EHA promoveu estes efeitos também parecem concorrer para a atividade cicatrizante. Embora não se tenha avaliado características histológicas do tecido cicatricial, o EHA acelerou a retração da ferida de maneira similar à observada com o uso de um fármaco cicatrizante padrão.

A avaliação destas atividades em animais tratados com o látex de *H. drasticus* tem sugerido que estes efeitos são decorrentes, principalmente, da ação de triterpenos e alcalóides. Embora este trabalho não tenha se aprofundado em questões fitoquímicas, especialmente com relação à caracterização e identificação destes metabólitos, a avaliação da atividade antioxidante do EHA mostrou que a despeito da baixa presença de compostos fenólicos, o extrato apresenta significativa atividade sequestradora do radical DPPH<sup>•</sup>.

Este trabalho é pioneiro ao abordar tais atividades farmacológicas para esta parte da planta e abre uma frente importante de investigação. Entretanto, para a plena validação do uso popular a espécie é essencial que estes estudos sejam aprofundados, especialmente no que diz respeito ao isolamento e identificação dos princípios ativos responsáveis por estas atividades. Uma abordagem essencial é a comparação com a eficiência terapêutica de compostos já isolados em outras partes da planta, tais como os sais de lupeol, além do aprofundamento do estudo da

atividade antioxidante, de modo a caracterizar os efeitos sobre a imobilização de outros tipos radicalares e/ou geração de radicais. Não obstante, a realização de análises toxicológicas mais específicas é essencial tanto à validação do uso popular quanto ao embasamento de estudos que prevejam a obtenção de produtos fitoterápicos ou correlatos.

Sendo assim, a análise do conjunto de dados aqui apresentados demonstra que este trabalho não apenas atingiu os objetivos propostos, como também passa a constituir obra de referência, uma vez que, ao que se sabe, esta é a primeira vez que este conjunto de propriedades farmacológicas é descrito para extrato preparado a partir das cascas do caule de *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. **Imunologia celular e molecular** 4ª edição, Ed. Revinter, p. 274-283, Rio de Janeiro, 2003.
- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. (Trad. Farias, A. S.); **Imunologia Celular e Molecular**, 6ª ed., Elsevier: Rio de Janeiro, 2008.
- ALMEIDA, T. P.; MAIA, J. Z.; FISCHER, C. D. B.; PINTO, V. M.; PULZ, R. S.; RODRIGUES, P. R. C. Classificação dos processos dolorosos em medicina veterinária. **Veterinária em Foco**, v. 3, n. 2, p. 107-118, 2006.
- AMARO, M. S. *et al.* Morfologia de frutos, sementes e de plântulas de janaguba (*Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel. - Apocynaceae). **Revista Brasileira de Sementes**, v.28, n. 01, p. 63-71, 2006.
- ARAÚJO, F. L. O. De. Estudo dos efeitos antinociceptivos e antiinflamatórios de (Ometil)-N-benzoil tiramina (riparina I) de *Aniba riparia* (NEES) MEZ (Lauraceae) em camundongos. **Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia**, Fortaleza, 2007.
- ASMAH, E. SUSI, M.A. ABDAH, I. PATIMAH, Y.Y.H. TAUFIQ, A.B. FADZELLY Anticarcinogenic properties of strobilanthes crispus extracts and its compounds in vitro. **International Journal Cancer Research**, 2 (2006), pp. 47–49
- BAGGIO, C. H.; OTOFUJI, G. M.; SOUZA, W. M.; SANTOS, C. A. M.; TORRES, L. M.; RIECK, L.; ANDRADE-MARQUES, M. C.; MESIA-VELA, S. **Gastroprotective mechanisms of indole alkaloids from *Himatanthus lancifolius***. *Planta Med.*, v.71, p.733-738, 2005.
- BALBACHAS, A. **As plantas curam**. 2nd. São Paulo: Missionária, 1965.
- BARRETO, M.G. CARVALHO, I.A. NERY, L. GONZAGA, M.A.C. Kaplan. **Chemical constituents from *Himatanthus articulata*** Journal of Brazilian Chemical Society, 9 (1998), pp. 430–434
- BARRETO, A.S, AMARAL ACF, SILVA JRA, SCHRIPSEMA J, REZENDE CM, PINTO AC 2007. Ácido 15 desmetilisoplumierídeo, um novo iridóide isolado das cascas de *Plumeria rubra* e do látex de *Himatanthus sucuuba*. **Química nova** 30: 1133-1135.
- BASBAUM, A.I.; JESSEL, T.M. **Principles of Neurosciece** Mc Graw-Hill, New York, p. 472-491, 2000.
- BELL, A. D 1991. **Plant form, an illustrated guide to flowering plant morphology** Oxford University Press Oxford, UK.
- BERTOLINI, A.; OTTANI, A.; SANDRINI, M. Dual acting anti-inflammatory drugs: A reappraisal. **Pharmacological Research**, v. 44 (6), p. 437 – 450, 2001.

BLAKE, D.R.; ALLEN, R.E.; LUNEC, J. Free radicals in biological systems: a review oriented to inflammatory processes. **British Medical Bulletin**, 43(2): 371-385, 1987).

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria Nacional de Vigilância Sanitária. **Portaria SVS nº 971 de 03.05.2006**. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. Diário Oficial da União, 04.05.2006. Disponível em: <[http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2006/prt0971\\_03\\_05\\_2006.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2006/prt0971_03_05_2006.html)> Acesso em: 20.10.2011.

BOERS, M. 2001. NSAIDS and selective COX-2 inhibitors: competition between gastroprotection and cardioprotection. **The Lancet**, v. 357, p. 1222-1223.

BRUTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. **Goodman & Gilman: As bases farmacológicas da terapêutica**. 11 ed. Rio de Janeiro: MacGraw-Hill, 2006.

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

CARVALHO, W. A.; CARVALHO, R. D. S.; RIOS-SANTOS, F. Analgésicos Inibidores Específicos da Ciclooxygenase-2: Avanços Terapêuticos\*. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 54, n. 3, p. 448- 464, 2004.

CARVALHO, W. A.; LEMÔNICA, L. Mecanismos Centrais de Transmissão e de Modulação da Dor. Atualização Terapêutica. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 48, n. 3, p. 221- 241, 1998.

CARVALHO, WA - Analgésicos, Antipiréticos e Antiinflamatórios, em: **Silva P - Farmacologia**, 6ª Ed, Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2002;431-455.

COLARES, A.V., et al., *Phytochemical and biological preliminary study of Himatanthus drasticus (Mart.) Plumel (Janaguba)*. **Pharmacognosy Magazine**, 2008. 4(14): p. 73-77.

COLLINS, T. Acute and chronic inflammation. In: COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. (Eds.). Robbins- **Pathologic basis of disease**. 6th ed. Philadelphia: Saunders, cap. 3, p. 50-88, 1999.

CONTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. (Trad. Barbosa, J. B.; De Vasconcelos, M. M.; Voeux, P. J.); Robbins – **Patologia Estrutural e Funcional**, 6ª ed., Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, 2000.

CYSTER, JG. Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs. **Science** 1999; 286: 2098-102.

DEKKER, L. V.; SEGAL, A W. Perspectives: signal transduction. Signals to move cells. **Science**. v 287, n 5455, p 982 – 985, feb., 2000.

- DI STASI LC, HIRUMA-LIMA, CA 2002. Gentianales medicinais. In: Di Stasi. L.C., Hiruma-Lima, C.A. (orgs.) **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. São Paulo. Editora da Unesp, p. 375-385.
- ENDO, Y.; HAYASHI, H.; SATO, T.; MARUNO, M.; OHTA, T.; NOZOE, S. Confluent acid and 2'-O-methylperlatolic acid, monoamine oxidase B inhibitors in a Brazilian plant, *Himatanthus sucuuba*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 42, n. 6, p. 1198-1201, 1994.
- FANTONI, D. T.; MASTROCINQUE, S. Fisiopatologia e Controle da Dor. In: FANTONI, D.T.; CORTOPASSI, S. R. G. **Anestesia em Cães e Gatos**. São Paulo: Rocca, 2002. p. 323-334
- FIORUCCI, S.; MELI, R.; BUCCI, M.; CIRINO, G. 2001. Dual inhibitors of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase. A new avenue in anti-inflammatory therapy? **Biochemical Pharmacology**, v. 62, p. 1433.
- FLOWER, R. J.; PERRETTI, M. Controlling inflammation a fat chance? **The Journal of Experimental Medicine (JME)**, v. 201, p. 671-674, 2005.
- FRANÇA, O. O.; BROWN, R. T.; SANTOS, C. A. Uleine and demethoxyaspidospermine from the bark of *Plumeria lancifolia*. **Fitoterapia**, v.71, p.208-210, 2000.
- GARRY, E.M.; JONES, E.; Fleetwood -Walker, S.M. Nociception in vertebrates: key receptor participating in spinal mechanisms of chronic pain in animals. **Brain Research Reviews**, v. 46, n. 2, p. 216-224, 2004.
- GERALDO, J. M.; ALFENA, R. C. G. Papel da dieta na prevenção e no controle da inflamação crônica - evidências atuais. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 52, n.6, São Paulo, 2008.
- GILMAN, A.G.; GOODMAN, L.S.; RALL, T.W.; MURAD, F. **Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics**. 11a ed. Rio de Janeiro: Grow-Hill, 2006.
- GUERRA, M. O.; PETERS, V. M. Screening for reproductive toxicity in rats for a decoction of *Himatanthus sucuuba* stem bark. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 34, p. 195-199, 1991.
- GUYTON, A.C.; HALL, J.E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 9. Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1998.
- HAEGGSTRÖM, J. Z. Structure, Function, and Regulation of Leukotriene A4 Hydrolase. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 161. P. S25–S31, 2000.
- HALLÉ, F.; OLDEMAN, R.A.A.; TOMLINSON, P.B. **Tropical trees and forests - An Architectural Analysis**.. Berlin: Springer-Verlag. 1978, 441p.

HEINRICH, P.C.; BEHRMANN, I. MULLER-NEWEN, G.; SCHAPER, F.; GRAEVE, L. Interleukin-6-type cytokine signaling through the gp 130/jak/stat pathway. **Biochem J.** v 334, p 297 – 314, 1998.

HELLEBREKERS, L. J. **Dor em Animais.** São Paulo: Manole, 2002. p. 69-79.

HUNZIKER, M. H. L. (1992). Opioid nature of learned helplessness and stress-induced analgesia without reexposure to shock. **Behavioural Pharmacology**, 3, 117-121.

IMS Health. **Pharmerging shake-up.** Disponível em: [www.imshealth.com/pharmerging](http://www.imshealth.com/pharmerging)>. Acesso em: 10 mar. 2010.

JASON, J.; ARCHIBALD, L. K.; NWANYAANWU, O. C.; BYRD, M. G.; KAZEMBE, P. N.; DOBBIE, H.; JARVIS, W. R. Comparison of serum and cell-specific cytokines in humans. **Clin Diagn Lab Immunol.** v 8, n 6, p 1097 – 1103, 2001.

KOHN, S. Structural basis of hyperpermeability of tumor blood vessels. **Lab. Invest.** 67:596, 1992.

LAPA A. J, SOUCCAR C, Lima-Landman MTR, Castro MSA, Lima TCM. Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais. **Sociedade Brasileira de Plantas Mediciniais.** Porto Alegre. 2003.

LEITE, G.D., PENHA, A.S., da SILVA, G.Q., COLARES, A.V., RODRIGUES, F.G., COSTA, J.G., CARDOSO, A.L., CAMPOS, A.R., 2009. Gastroprotective effect of medicinal plants from Chapada do Araripe, Brazil. **Journal of Young Pharmacists** 1, 54–56.

LIMA JUNIOR, J. F. DIMENSTEIN M. A fitoterapia na saúde pública em Natal/RN: visão do odontólogo. **Saúde Rer.**, Piracicaba, v.8, n. 19, p. 37-44 2006.

LORENZI H, Matos FJA 2008 . **Plantas medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas.** 2. Ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum.

LUCETTI, D.L., et al., *Anti-inflammatory effects and possible mechanism of action of lupeol acetate isolated from Himatanthus drasticus (Mart.) Plumel.* **Journal of inflammation**, 2010. 7: p. 60.

LUNA, S. P. L. Dor, analgesia e bem estar animal. **ANAIS - I Congresso Internacional de Conceitos em Bem-estar Animal**, p. 16-18, 2006.

MAGALHÃES, J.L.; BOECHAT, N.; ANTUNES, A.M.S. Principales desafios de la producción pública de medicamentos en Brasil y panorama del sistema de salud. **Revista Cubana de Salud Pública**, v.34, n.3, 2008.

MAJNO, G. The Healing Hand: Man and Wound in the Ancient World. **Harvard University Press. Cambridge, MA., USA**, 571 pp, 1975.

- MAJNO, G. The capillary then and now: An overview of capillary pathology. **Mod. Pathol.** 5:9, 1992.
- MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, p. 428-35, 2008.
- MELO, A.F.M. et al. Atividade antimicrobiana in vitro do extrato de *Anacardium occidentale* L. sobre espécies de *Streptococcus*. **Rer. Bras. Farmacog.**, João Pessoa, v. 16, n.2, p. 202-205, abr/jun, 2006.
- MERSKEY, H.; BOGDUK, N. Classification of chronic pain: descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. Seattle: **IASP** Press, 1994.
- MONACO, J.L.; LAWRENCE, W.T., Acute Wound healing – Na overvien. **Clin. Plastic. Surg.** V.3, p.1-12, 2003.
- MORENO, C. R.; VÁZQUEZ, P. L.; PARRONDO, C. D.; HERRERO, F. T.; LADO, F. L. Lugar em terapéutica de los medicamentos antagonistas del factor de necrosis tumoral: de los efectos indeseados y recomendaciones. **Anales de Medicina Interna**, Madrid, v. 23, n. 1, p. 37-45, Feb. 2006.
- MYLLAN, M.J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in Neurobiology**, v.57, n.1, p.1-164, 1999.
- NEWMAN, S. L.; HENSON, J.E.; HENSON. P. M. Phagocytosis of senescent neutrophils by human monocyte derived macrophages and rabbit inflammatory macrophages **J Exp Méd.**, v. 156, p.430-442, 1992.
- NIGROVIC, PA, Lee DM. Review: Mast cells in inflammatory arthritis. **Arthritis Res Ther.** 2005 7: 1-11.
- NOBREGA, O. T. et alii. Retail Prices of Essential Drugs in Brazil: an international comparison. **Revista Panamericana de La Salud Publica.** 2007; 22 (2): 118-23.
- O'LEARY, R.; WOOD, E.J.; GUILLOU, P.J. Pathological Acarring: Strategic Interventions **Eur. J. Surg.** V.168, p. 523-534, 2002.
- PATOCKA J: Biologically active pentacyclic triterpenes and their current medicine signification. **J Appl Biomedicine** 2003, 1:7-12.
- PETRONELLI A, PANNITTERI G, TESTA U: Triterpenoids as new promising anticancer drugs. **Anticancer Drugs** 2009, 20:880-892
- PLUMEL, M.M., 1991. Le genre *Himatanthus* (Apocynaceae). Revision taxonomique. **Bradea**, 5: 1-118.
- PINTO, B. A. S. Estudo psicofarmacológico do extrato bruto das cascas de *Himatanthus drasticus* Mart. Orientador: Roberto Sigfrido Gallegos Olea.

**Dissertação** (Mestrado) - Universidade Federal do Maranhão, Programa de Pós - Graduação em Saúde e Ambiente, 63 fl., 2011.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia**. 6ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 246 – 276, 2007.

RATES, SMK. Plants as source of drugs. **Toxicon**. 2001; 39(5):603-13.

RATTMANN, Y.D., et al., *Effects of alkaloids of Himatanthus lancifolius (Muell. Arg.) Woodson, Apocynaceae, on smooth muscle responsiveness*. **Journal of ethnopharmacology**, 2005. **100**(3): p. 268-75.

REUTER, S.; GUPTA, S. C.; CHATURVEDI, M.M. BHARAT B. Aggarwal Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? **Free Radical Biology & Medicine**, v. 49, p. 1603–1616, 2010.

RIEDEL, W.; NEECK, G. Nociception, pain and antinociception: current concepts. **Zeitschrift für Rheumatologie**, v.60, n. 6, p. 404-415, 2001.

RIZZINI C. T. 1990. *Árvores e madeiras úteis do Brasil: Manual de dendrologia brasileira*. São Paulo, Edgard Blücher, 296p.

ROBBINS et al. **Patologia estrutural e funcional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996. 1277 p.

RYAN, G. B.; MAJNO, G. Acute Inflammation. **American Journal of Pathology**, v. 86, n. 1, p. 185-274, 1977.

RYGH, L.J.; HOLE, K.; TJOLSEN, A. Molecular Mechanisms in Acute and Chronic Pain States. **Tidsskrift for den Norske Lægeforening**, v. 125, n. 17, p. 2374-2377, 2005.

SACOMAN, K.M. MONTEIRO, A. POSSENTI, G.M. FIGUEIRA, M.A. FOGLIO, J.E. CARVALHO. **Cytotoxicity and antitumoral activity of dichloromethane extract and its fractions from Pothomorphe umbellata**.

SAFAIHY, H., SAILER, E.R. Anti-inflammatory actions of pentacyclic triterpenes. **Planta Médica**, v.63, 487-493, 1997.

SALEEN M, Murtaza I, WITKOWSKY O, KOHL AM, MADDODI N: Lupeol triterpene, a novel diet-based microtubule targeting agent: disrupts surviving/cFLIP activation in prostate cancer cells. **Biochem Biophys Res Commun** 2009, 388:576-582.

SALLES, M. J. C.; SPROVIERI, S. R. S.; BEDRIKOW, R.; PEREIRA, A. C.; CARDENUTO, S. L.; AZEVEDO, P. R. C.; SILVA, T. M.; GOLIN, V. Síndrome da resposta inflamatória sistêmica/sepsis- revisão e estudo da terminologia e fisiopatologia. **Revista Associação Médica Brasileira**, v. 45, n.1, p. 86-92, 1999.

- SCHAIBLE, H.G. Peripheral and central mechanisms of pain generation. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v.177, n.3, p.28, 2007.
- SHEERAN P, HALL GM: Cytokines in anaesthesia. **Br J Anaesth** 78: 201-19, 1997.
- SILVA JRA, REZENDE CM, PINTO AC, PINHEIRO MLB, CORDEIRO MC, TAMBORINI E, YOUNG CM, BOLZANI VS: Ésteres triterpenos de *Himatanthus sukuuba*(Spruce) Woodson. **Química Nova** 1998, 21:702-704.
- SMITH CM, MARKS AD, LIEBERMAN MA e MARKS DB. Metabolism of the Eicosanoids. In: **Mark's Basic Medical Biochemistry: a Clinical Approach**. Lippincott Williams & Wilkins, 2004: 654-667.
- SCHMITZ, L. M., BECHER, S. 2005. Novel molecular targets in the search for anti-inflammatory agents. **Phytochemistry Reviews**, v. 4, p. 19-25.
- SOMMER, C.; KRESS, M. Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. **Neuroscience Letters**, v. 361, p. 184-187, 2004.
- SPINA, A.P., 2004. Estudos taxonômicos micro-morfológico e filogenéticos do gênero *himatanthus willd. Ex Schult* (Apocynaceae: Rauvolfioideae-plumerieae). Ph. D. Thesis, **Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, Brasil**.
- SPINOSA, H.S., GÓRNIK, S.L., BERNARDI, M.M. **Farmacologia aplicada a Medicina Veterinária**. 4a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 239-272.
- SPRINGER, T. A. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. **Cell**, v.76, n.2, Jan 28, p.301-14. 1994.
- TOWNSEND, M. J.; MCKENZIE, A. N. Unravelling the net? Cytokines and diseases. **J Cell Sci**. v 113, p 3549 – 3550, 2000.
- TUNDIS, M.R. LOIZZO, F. MENICHINI, G.A. STATTI, F. MENICHINI **Pharmacological activities of iridoids: recent developments** Mini-Reviews in Medicinal Chemistry, 8 (2008), pp. 399–420.
- VANNIER, E.; MILLER, L. C.; DINARELLO, C. A. Co-ordinated anti-inflammatory effects of interleukin-4: Interleukin-4 suppresses interleukin-1 production but upregulates gene expression and synthesis of interleukin-1 receptor antagonist. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 89, p. 4076-4080, 1992.
- VEIGA-JUNIOR, V. F. da. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.18, n. 2, p. 308-313, 2008.

- VERRI JR, W.A., CUNHA, T.M., PARADA, C.A., POOLE, F.Q.C., FERREIRA, S.H. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: Targets for analgesic drug development? **Pharmacology & Therapeutics**, v.112, p.116-138, 2006.
- VILLEGAS, L. F.; FERNÁNDEZ, I. D.; MALDONADO, H.; TORRES, R.; ZAVALA A.; VAISBERG, A. J.; HAMMOND, G. B. Evaluation of the wound-healing activity of selected traditional medicinal plants from Peru. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 55, n. 3, p. 193-200, 1997.
- WANNMACHER L e BREDEMEIER M. **Antiinflamatórios não-esteróides**: uso indiscriminado de inibidores seletivos de ciclooxigenase-2. ISSN 1810-0791 2004;1(2):1-6.
- WEISSMAN, G. Inflammatio: Historical perspectives. In Gallin, J. I., 1992 (eds.): inflammation: **Basic Principles and Clinical Correlates**, 2 ed. New York, Raven Press, p. 5-13.
- WERS, O. 2007. Inhibition of 5-lipoxygenase product synthesis by natural compounds of plant origin. **Planta Medica**, v. 73, p. 1331-1357.
- WHITE, M. Mediators of inflammation and the inflammatory process. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 103, n. 3, PART 2, 1999.
- WITTE, M.B.; BARBUL, A. Role of nitric oxide in wound repair. **The American Journal of Surgery**, 183, 406-412, 2002.
- WOOD, C. A.; LEE, K.; VAISBERG, A. J.; KINGSTON, D. G. I.; NETO, C. C.; HAMMOND, G. B. A bioactive spiro lactone iridoid and triterpenoids from *Himatanthus sucuuba*. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 49, n. 11, p. 1477-1478, 2001.
- XING, Z. Current understanding of macrophage type 1 cytokine responses during intracellular infections. **Histol. Histopathol.** v 15, n 1, p 199-205, 2000.

## **ANEXO:** Instruções para autores do periódico *Natural Product Communications*.

### **Information for Authors**

Natural Product Communications (NPC) invites research articles on all aspects of natural products including Isolation, Structure Elucidation, Spectroscopic Properties, Analytical Methods, Biosynthesis, Chemotaxonomy, Pharmacognosy, Chemical Ecology, Biodiversity, Biotransformations, Synthesis, Partial Synthesis, Structure-Activity Relationship, Fermentation and Tissue Culture. Thus, coverage of the journal spans practically all areas of fundamental chemical and biochemical research and could broadly be organized into following sections/subsections:

1. Accounts/Reviews/Invited Articles
2. Short/Preliminary Communications
3. Full papers, that will include:
  - a. Essential Oil/Perfumery Products
  - b. Fermentation/Tissue Culture/Biotechnology
  - c. Isolation/Characterization
  - d. Chemotaxonomy/Chemical Ecology/Biodiversity
  - e. Synthesis/Partial Synthesis
  - f. Bioactivity/Structure-activity relationship
  - g. Analytical and Theoretical Aspects
  - h. Highlights and Concepts
4. Letters to Editor/Correspondence
5. Book reviews together with notices of meetings concerned with natural products

**The contents of papers are the sole responsibility of the authors, and publication shall not imply the concurrence of the Editors or Publishers.**

Authors are invited to submit their full and comprehensive reviews, shorter reviews/accounts of recent developments in a particular field, to any member of the Editorial Board. Prior consultation with one of the editor is advised, however unsolicited reviews may be considered for publication. Short/Preliminary Communications are for the purpose of rapidly publishing exceptionally important contributions; comprehensive papers with full experimental details would be subsequently reported. Authors must provide a covering letter detailing and justifying the request to have their manuscript considered in this subcategory.

#### **Conditions:**

Authors must accept full responsibility for the factual accuracy of the data presented and should obtain any authorization necessary for publication. Manuscripts will be considered for publication depending on the interest and value and with the understanding that they contain original unpublished work and are submitted exclusively to the journal *Natural Product Communications*. Manuscripts that report fragmentary parts of a larger study will be returned to the authors at the Editors' discretion. The structural analysis of new substances is now so routine that papers reporting one or two new compounds are rarely acceptable, unless other information on their properties or on the sources is included. The publication of known compounds with potentially important bioactivity or detailed spectroscopic investigations will be considered.

#### **Preparation of manuscripts:**

In order to achieve uniform presentation and to avoid unnecessary delays because of further inquiries, all authors are urged to observe the following guidelines.

#### **Templates:**

##### NPC Template

Authors are strongly encouraged to use templates for the preparation of manuscripts. The template offers the authors many features that ease manuscript preparation and submission; all graphics and

Tables can be integrated into the manuscript where author wishes to place them. Moreover, the use of templates allow authors to view their paper in a style close to the final printed form. All manuscripts will be fully typeset from the author's electronic files. It should be noted that due to defined typesetting standards and the complex requirements of electronic publishing, the Publisher will not always be able to exactly match the layout the author has submitted. The use of journal templates is preferable and its' adoption will speed the publication process. To ensure successful use of template, author should save the final document as word file with a '.doc' extension (rather than the '.dot' extension).

**Title Page:**

Title : Concise and informative appearing at the top of page one should reflect the contents of the manuscript. First letters of all words should be capitalized except for conjunctions, articles and prepositions. Author names and affiliations : Please provide fully spelled-out first name of each author and the addresses at which the research was performed. Indicate all affiliations with a lower-case superscript letter immediately after the author's name and in front of appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name, and the email address of corresponding author. Corresponding author: Please indicate the corresponding author with asterisk, who is willing to handle correspondence at all stages of refereeing, and publications, also-post publication. Ensure that telephone and fax numbers (with country and area code) are provided in addition to the email address and the complete postal address.

**Abstract:**

A concise abstract briefly stating the purpose of the research, major findings, and conclusions, should appear on the page.

**Keywords:**

At the end of textual abstract, authors are requested to provide a list (3-8) keywords which identify most important subjects covered in the manuscript.

**Main text:**

The manuscript should be written as clearly and concisely as possible. Common headings such as Introduction, Results and Discussion, and Conclusions should not be used as text within these sections should be self explanatory. Please avoid lengthy surveys of the literature, except when perspective (reviews) articles, are involved. Tables must be created in word format and must have a title. Designate footnotes as a, b, c, etc. Number tables consecutively.

**Experimental:**

Typically this section should be divided into subsections, the contents of which varies according to the subject matter of the article. This must contain all the information to guarantee reproducibility. In an introductory paragraph, special equipment, etc. should be detailed. A precise workup containing all details, e.g., the amount of solvent used for extraction, details of chromatographic purifications and yields etc., should be given. Products yield should be given in terms of g or mol as well as in %. Physical and spectroscopic data can be included in the experimental section or, in case that a large number of compounds are prepared, presented in tables. Spectroscopic data should be stated in the order and format shown in following example:

PDF Example

**<sup>1</sup>H NMR:** Always give coupling constants for well resolved peaks. After each chemical shift, enter in parenthesis number of protons, multiplicity, coupling constants, and assignment in that order. **<sup>13</sup>C NMR:** Carbon-13 NMR data should be reported to the nearest 0.1 ppm with the number of attached hydrogens designated as CH<sub>3</sub>, CH<sub>2</sub>, CH and C notion. Many types of data can be effectively presented in tabular form and authors are encouraged to do so. The title of the table should accurately and concisely describe the contents of the table.

**Acknowledgments:**

The inclusion of an acknowledgments section is optional. It may include credit to technical assistance, financial support and other appropriate recognition, and should be brief and placed after the experimental section.

#### **Figure legends, Tables, Figures, Schemes:**

Every graphic file requires a unique title and must be referred to in the text. Drawings can only be named Scheme, Figure, or Equation. **Crystallographic Data:** Complete X-ray data will not be published. They should be deposited at an appropriate international data institute, which is then cited in a reference. If a representation of the crystal structure (e.g., ORTEP) is to be included, it should be accompanied by the following data:

1. formula
2. crystal data
3. method of collection
4. methods of structure solution and refinement
5. selected bond lengths and angles

**Supplementary data:** NPC accepts electronic supplementary material to support and enhance scientific research. Therefore, spectral data all compounds should be included on separate sheets at the end of the manuscript which will be published online. The presence of these files will be signified by a footnote to the article title, and by a description included in a "Supplementary data" section at the end of the paper.

#### **References:**

References should be placed collectively after the acknowledgments section and numbered consecutively. Authors are encouraged to list all relevant references and cite extensively. Each reference may have its own citation number, or alternatively, reference referring to the same topic may be grouped under a common number but separated as (a), (b) (c) etc. List all authors; including diacritical marks (umlaut, acute accent, etc.) when these appear in original. Responsibility for the accuracy of bibliographic citations lies entirely with authors. Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Unpublished results and personal communications should not be in the reference list, but may be mentioned in the text. Citation of a reference as "in press" implies that the item has been accepted for publication. Indicate references by number(s) in square brackets in line with text. The actual authors can be referred to, but the reference number (s) must always be given.

**Illustration:** Line drawing should be supplied on a separate sheet at the same size as the intended version (so no enlargement or reduction is required), maximum width 83 mm(1 column) and 170 mm (2 columns). Lettering on the artwork must be set in 8pt type. Computer-generated artwork must be submitted as laser printed output at a resolution of 600 dots per inch on high quality paper. Dot matrix printer output is unacceptable. Tints are to be avoided; hatching should be used instead. Drawn artwork should be carefully lettered and drawn in black ink. Provide copies as well as the originals. Black and white photographs should be supplied as sharp, glossy black and white prints (not photocopies or previously published material). Laser output photographs are to be avoided. Both drawings and photographs should be clearly identified on the back with the figure number and the author's name. Artwork on disk is preferred. Each graphic should be in a separate file, should conform to the information above and be supplied as a source (original) file as well as .EPS file, if different. Provide hard copy print out of each figure, clearly identified. **Color:** The facility exist for color reproduction, however the inclusion of color photographs in a paper must be agreed with Editor in advance. Charges for color reproduction will be at the discretion of the Editor and the Publisher. **Proofs:** Page proofs for corrections of Publisher's errors only will be emailed to the corresponding author, and should be returned with corrections as quickly as possible, normally within 48 hours of receipt. Any other changes may be chargeable to the author. Proof reading is solely author's responsibility. Author should ensure that corrections are returned in one communication and are complete, as subsequent corrections will not be possible. **Book Reviews:** The Editor-in-Chief will be pleased to receive books for possible reviews. **Copyright:** By accepting a manuscript, the publisher acquires the copyright, including the right of translation, for the duration of copyrighted period. Therefore, upon acceptance of an article, authors are asked to transfer copyright. This transfer will ensure the widest possible dissemination of information. A form to facilitate transfer of copyright will be

provided. If excerpts from other copyrighted works are included; the author(s) must obtain written permission from the copyright owner and credit the source(s) in the article.

Copyright Transfer Notice

**Reprints:** The corresponding author will receive electronic reprints in PDF format accompanied by one copy of the electronic issue free of charge. **Corrections:** If errors of consequence are detected in a published paper, the author should send a correction to the Editor-in-Chief for publication as an addition or correction.

**Author's Enquiries:** For enquiries concerning accepted manuscripts and galley proofs should be directed to:

NPC Editorial Office

Natural Product, Inc.

7963, Anderson Park Lane

Westerville, OH 43081

USA

Email: [editorial@naturalproduct.us](mailto:editorial@naturalproduct.us)



# International Journal of Pharmacology

ISSN 1811-7775

**science**  
alert

**ansinet**  
Asian Network for Scientific Information

RESEARCH ARTICLE

OPEN ACCESS

DOI: 10.3923/ijp.2015.732.737

## *Chenopodium ambrosioides* in the Repair of Fractures in Rabbits

<sup>1</sup>Vicente F. Pinheiro Neto, <sup>1</sup>Rachel M. Ribeiro, <sup>1</sup>Camila S. Morais, <sup>1</sup>Denilson A. Vieira, <sup>2</sup>Porfírio C. Guerra, <sup>2</sup>Ana L. Abreu-Silva, <sup>1</sup>José R. Silva Junior, <sup>1</sup>Marilene O.R. Borges and <sup>1</sup>Antonio C.R. Borges

<sup>1</sup>Department of Physiological Sciences, Federal University of Maranhão, Avenue of the Portuguese, 1966 Bacanga, Maranhão, 65080-805, Brazil

<sup>2</sup>Department of Veterinary Medicine, State University of Maranhão (UEMA), São Luis, Maranhão, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Article History:

Received: April 30, 2015

Accepted: July 07, 2015

#### Corresponding Author:

Antonio C.R. Borges

Department of Physiological Sciences,  
Federal University Maranhão,

Avenue of the Portuguese,

1966 Bacanga, Maranhão,

65080-805, Brazil

Tel: + 55983272-8533

### ABSTRACT

*Chenopodium ambrosioides* L. (Amaranthaceae), popularly known as “mastruz” or “erva-de-santa-maria”, is a perennial plant found in Brazil and used in folk medicine for the treatment of contusions and fractures. The objective of this study was to evaluate the topical effect of a cataplasm prepared from fresh *C. ambrosioides* leaves on the treatment of fractures experimentally induced in rabbits. Thirty rabbits were divided into three groups (n = 10). After anesthesia, a radius fracture was created and the animals received topical applications of *C. ambrosioides* cataplasm (MZG), diclofenac sodium (DG) and isotonic solution 0.9% NaCl (Control). At 30 days, we evaluated the animal bone regeneration through both qualitative macroscopic analysis of the fracture focus as by determination of serum alkaline phosphatase (ALP). The evolution of bone repair has been verified at 30 and 45 days through the histological analysis. No significant difference in ALP levels was observed between groups. In addition, no allergic reactions or impairment of tissue adjacent to the fracture focus were seen in any of the groups. In contrast, although all groups exhibited similar tissue architecture, the histological analysis revealed greater formation of mature bone tissue in MZG at 30 days, when compared to DG and control group. In addition, higher collagen fiber density was observed in MZG at 45 days. These results indicate *Chenopodium ambrosioides* as a promising therapeutic agent for bone regeneration. The plant may be useful as a raw material for the production of biomaterials for fracture healing, contributing to its validation in ethnomedicine.

**Key words:** *Chenopodium ambrosioides*, mastruz, fracture healing

### INTRODUCTION

More than 6 million fractures occur worldwide each year. Many patients require long-term treatment, with consequent increased costs for them and for the public health system (Giannoudis and Dinopoulos, 2010).

Natural biomaterials, including those derived from medicinal plants used by the population, are of great importance since they are biocompatible and easily applied and stored, in addition to favoring bone growth (Franco *et al.*, 2001).

*Chenopodium ambrosioides* L. (*syn. Dysphania ambrosioides* (L.) Mosyakin and Clemants), Chenopodiaceae,

popularly known as “mastruz” or “erva-de-santa-maria”) is used by the population in Brazil and Latin America as teas, infusions or syrups for the treatment of inflammatory disorders, leishmanial ulcers (Franca *et al.*, 1996) or contusions and fractures (Baptistel *et al.*, 2014).

Pharmacological trials suggest that *C. ambrosioides* has action antitumor (Nascimento *et al.*, 2006), *in vitro* (Bezerra *et al.*, 2006) and *in vivo* leishmanicidal (Patricio *et al.*, 2008). Additionally, studies have reported anti-inflammatory and anti-nociceptive activity of this plant species (Ibironke and Ajiboye, 2007; TrivellatoGrassi *et al.*, 2013).

Despite its traditional use in contusions and fractures, studies that scientifically validate the therapeutic property of this plant are sparse. In Brazil, the federal government created in 2009 a program that compiled a list of 71 medicinal plant species used by the population as alternatives for the treatment of health disorders. On this list, called the National Register of Plants of Interest to the National Health System (Relação Nacional de Plantas de Interesse do Sistema Único de Saúde-RENISUS), *C. ambrosioides* occupies the 17th position, but without importance for the use in bone fractures.

Preliminary studies conducted by our group showed that the cataplasm prepared from fresh leaves of *Chenopodium ambrosioides* has a potential for repair of soft tissue and bone fractures induced experimentally in rabbits. These findings were obtained by evaluating the inflammatory process, inhibition of edema and radiographic analysis (Pinheiro Neto *et al.*, 2005).

Considering the importance of this plant species as a raw material potential for obtaining biomaterials, the aim of this study was to evaluate the effect of the cataplasm of *C. ambrosioides* leaves on bone regeneration fractures in radio rabbits through analysis serum biochemical and histological evaluation.

## MATERIALS AND METHODS

**Plant material:** *Chenopodium ambrosioides* leaves were collected at the time of use in the herbarium of the 'Prof. Dr. Berta Lange de Morretes' Medicinal Plant Garden, UFMA (São Luís- MA, Brazil), in October 2006. A voucher specimen was cataloged, identified and deposited under the registration number 0998.

**Preparation of the *Chenopodium ambrosioides* cataplasm:** Fresh leaves were washed with distilled water to remove impurities and then dried on filter paper and triturated in a homogenizer. The material obtained was mixed with saline (0.9% NaCl) (3 g of tissue per 1 mL saline) at room temperature. This mixture was called Cataplasm and was directly applied to the fractures.

**Experimental animals:** Thirty adult male New Zealand rabbits (*Oryctolagus cuniculus*), weighing  $3.0\pm 0.5$  kg, obtained from the Animal House of the State University of Maranhão (UEMA) were used. The animals were kept at a temperature of  $24\pm 1^\circ\text{C}$  and received ration and water *ad libitum*. The animals were acclimated for 10 days and handled under the same conditions. Next, the rabbits were randomly divided into three groups of 10 animals each: Control group, *C. ambrosioides* ("mastruz") group (MZG) and Diclofenac Sodium (DG) group. The protocol was approved by the Ethics Committee on Animal Research of UEMA (Permit No. 0026/2006).

**Anesthetic technique and bone defect creation:** The animals were anesthetized by intramuscular injection of 5%

ketamine hydrochloride ( $30\text{ mg kg}^{-1}$ ) and 2% xylazine hydrochloride ( $4\text{ mg kg}^{-1}$ ). An incision of approximately 3 cm was then made in the skin and subcutaneous tissue in the middle third of the left radius. A complete, simple, transverse diaphyseal fracture (1 cm) was created at this site with an oscillating bone saw, followed by topical application of 10 mL isotonic solution 0.9% NaCl (control), 10 mL of the cataplasm (MZG) or 2 g (gel) diclofenac sodium (DG). The diclofenac sodium was used as anti-inflammatory for positive control. The tissues were closed with simple sutures. During the postoperative period, dressings were applied daily for 10 consecutive days and the sutures were removed after this period (Miranda *et al.*, 2005). The animals were euthanized with anesthetics overdose. The evolution of the tissue adjacent to the fracture focus was observed macroscopically throughout the experiment, evaluating features such as color, occurrence of edema, suture dehiscence, presence of a hypertrophic scar and possible allergic reactions.

**Biochemical parameters and bone markers:** Thirty days after surgery, five animals of each group were anesthetized and blood was collected for biochemical analysis of alkaline phosphatase (ALP). The blood samples were collected into tubes without EDTA and centrifuged at  $3000\times g$  for 10 min for the collection of serum. Serum ALP was measured with the Labtest® kit in a semi-automated apparatus-Bioplus® (Bioplus, Barueri, São Paulo).

**Histological evaluation:** Histological analysis was performed 30 and 45 days after surgery and application of isotonic solution 0.9% NaCl, *C. ambrosioides* cataplasm or sodium diclofenac to monitor the evolution of bone callus formation, considering the neoformation of fibrous, cartilaginous and bone tissues during the healing process. Cross-sections were cut from the fractured bone segments and fixed in 10% buffered formalin for 24 h. After decalcification in 10% nitric acid, the fragments were processed and stained with Hematoxylin and Eosin (HE) and Sirius red (Franco *et al.*, 2001). The histological sections were submitted to descriptive qualitative analysis for evaluation of the pattern of bone regeneration.

**Statistical analysis:** The ALP results are expressed as the Mean±Standard Error of the Mean (SEM) for 05 animals/group and were compared by analysis of variance (ANOVA) followed by the Newman-Keuls post-test, considering  $p<0.05$  significant. Statistical analysis was performed using the GraphPad Prism 5.0 program. The histological results are expressed qualitatively.

## RESULTS

**Qualitative macroscopic analysis of the fracture focus:** No alterations were observed in the tissue adjacent to the

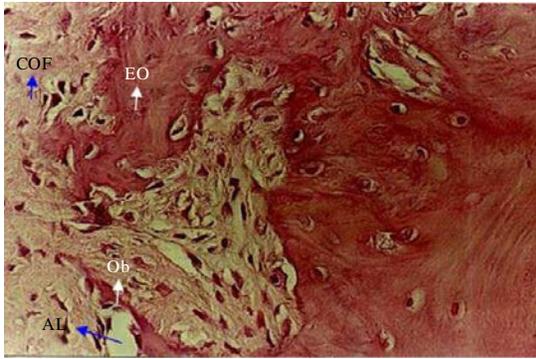


Fig. 1: Fracture site photomicrograph from the control group at 30 days after surgery. AL: Active lacuna, EO: Endochondral ossification, Ob: Osteoblasts, COF: Fibrous bony callus. Hematoxylin and Eosin stain (HE) (400X magnification)

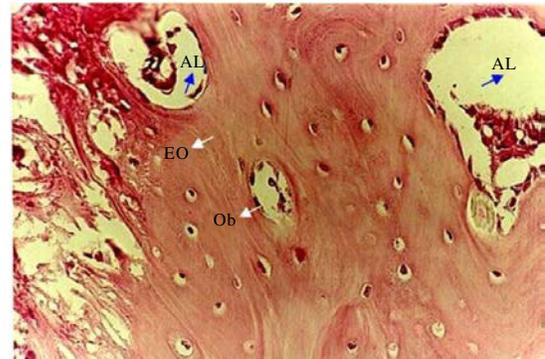


Fig. 2: Fracture site photomicrograph from the diclofenac sodium group at 30 days after surgery. AL: Active lacuna, EO: Endochondral ossification, Ob: Osteoblasts. Hematoxylin and Eosin stain (HE) (400X magnification)

fracture focus in any of the groups studied. In addition, no allergic reactions were seen at the site of application. *Chenopodium ambrosioides* cataplasm was found to be biocompatible in the experimental model used.

**Effect of *Chenopodium ambrosioides* cataplasm on serum ALP levels:** No significant difference in ALP levels was observed at 30 days. The levels were  $104.0 \pm 34.0$ ,  $103.0 \pm 29.0$  and  $121.0 \pm 21.0$  UI L<sup>-1</sup> in the control, DG and MZG, respectively. The reference range of ALP in rabbits reported in the literature is  $72.4 \pm 29.7$  IU L<sup>-1</sup>.

**Histological evaluation of *Chenopodium ambrosioides* cataplasm:** Histological analysis of the fracture focus 30 days after the surgical procedure revealed similar bone remodeling in all groups, including the presence of endochondral ossification and osteoblasts. A fibrous bone callus and discrete maturation of lacunae were observed in the control group (Fig. 1). Endochondral ossification was observed in DG during this early stage, with the presence of active lacunae and osteoblasts (Fig. 2). There was an increase in osteoclasts during the process of phagocytosis in MZG, in addition to active lacunae and formation of mature bone (Fig. 3). Histological analysis at 45 days showed endochondral ossification and the presence of osteoblasts in the control group (Fig. 4). Abundant cartilaginous tissue (cartilaginous collar) and large numbers of chondrocytes and osteoblasts were seen in DG (Fig. 5). Fibroblast proliferation and an increase in collagen density were also observed during this phase in the control and DG, accompanied by neovascularization in the former. In contrast, animals of MZG exhibited marked formation of mature bone tissue and a moderate density of collagen when compared to the other groups (Fig. 6).

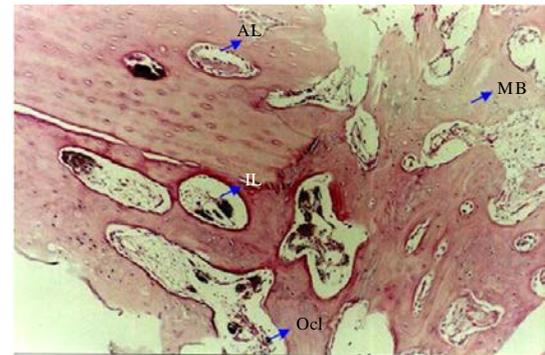


Fig. 3: Fracture site photomicrograph from the *Chenopodium ambrosioides* cataplasm group at 30 days after surgery. AL: Active lacuna, IL: Inactive lacuna, MB: Mature bone, Ocl: Osteoclast. Hematoxylin and Eosin stain (HE) (400X magnification)

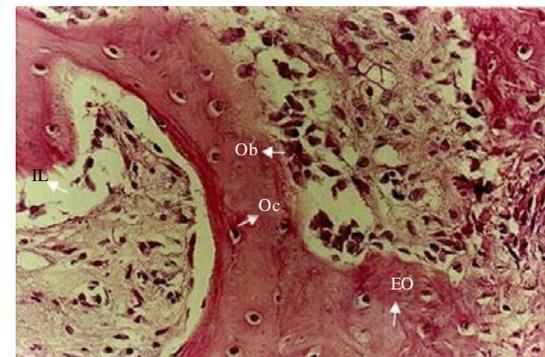


Fig. 4: Fracture site photomicrograph from the control group at 45 days after surgery. IL: Inactive lacuna, EO: Endochondral ossification, Ob: Osteoblasts, Oc: Osteocytes. Hematoxylin and Eosin stain (HE) (400X magnification)

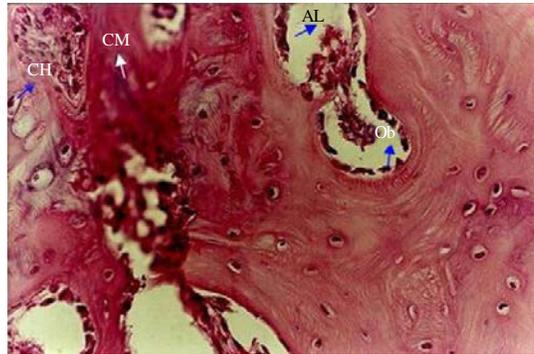


Fig. 5: Fracture site photomicrograph from the diclofenac sodium at 45 days after surgery. AL: Active lacuna, CM: Cartilage Matrix, CH: Hypertrophic chondrocytes, Ob: Osteoblasts, HE: Hematoxylin and Eosin stain (400X magnification)

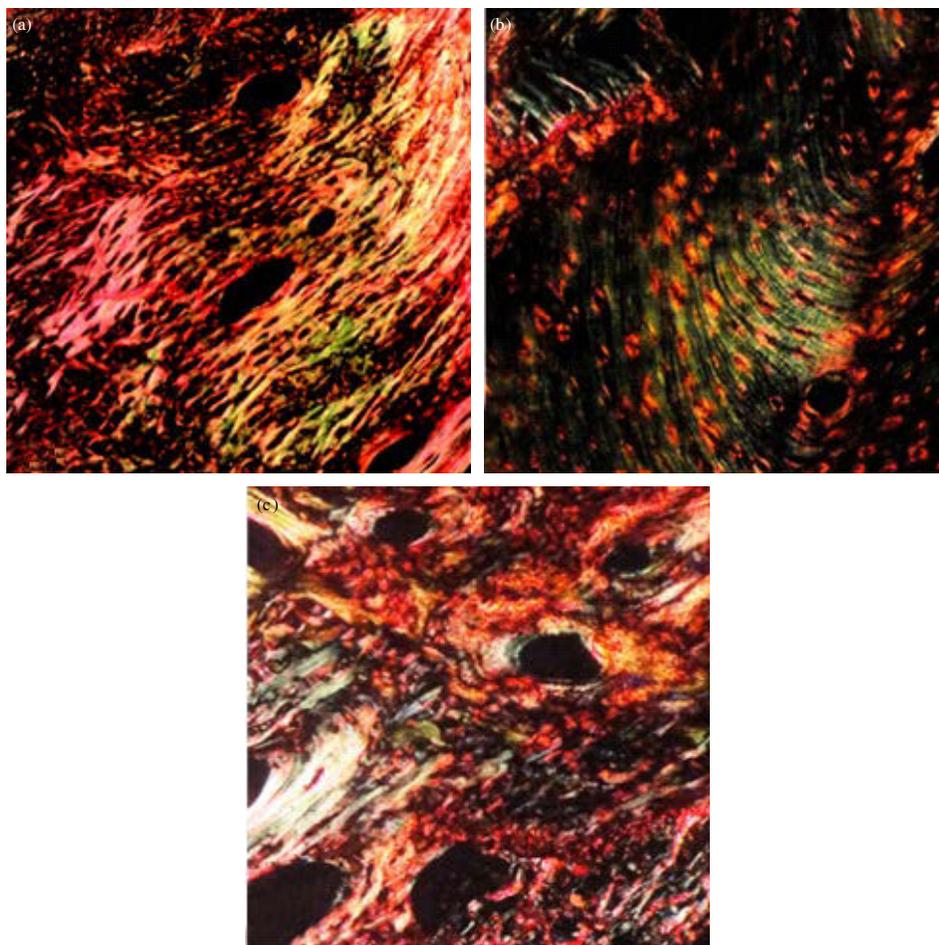


Fig. 6(a-c): Photomicrographs of collagenization of the rabbit radius at 45 days after surgery, (a) Control group, (b) Diclofenac sodium and (c) *Chenopodium ambrosioides* cataplasma. Sections stained by Sirius red method (400X magnification)

## DISCUSSION

The present study shows that *C. ambrosioides* cataplasma acts on the process of bone repair when applied topically to fractures induced in rabbits, suggesting this plant species to be

a promising biomaterial since it is biocompatible and easily applied and favors bone growth.

Fractures characterized by substantial bone loss play an important role in clinical-surgical routine in both human and veterinary medicine (Alievi *et al.*, 2007). The healing potential

of a bone fracture depends on patient-related variables, location and the treatment employed. These variables must create biological and mechanical conditions that favor the repair process by influencing factors that are determinant for the organization and final process of fracture consolidation (Muller *et al.*, 2004).

The main objective of surgical treatment is to fill the fracture with material that can promote osteoinduction and/or osteoconduction and consequently, reparative osteogenesis (Tsonis, 2002). This type of treatment is a constant challenge in orthopedic therapy since the ideal bone implant should not physically modify the tissue and should not induce allergic reactions, in addition to being easily obtained in the amount and shapes necessary to fill the bone defect.

The *C. ambrosioides* cataplasm was found to be applicable and biocompatible since no alterations in adjacent tissue or allergic reactions were observed in the animals studied (qualitative macroscopic analysis) throughout the period of topical treatment of the fracture.

Bone formation involves endochondral ossification and the production of cartilage in the bone tissue which is used secondarily by osteoblasts for the formation of new bone. Bone formation comprises the following steps: Proliferation of chondrocytes, chondrocyte hypertrophy, matrix mineralization, apoptosis, vascular invasion, ossification and remodeling of lamellar bone (Marino and Ziran, 2010).

Histological analysis after 30 days of treatment showed a similar tissue architecture in all groups. However, greater formation of new bone was observed in MZG (Fig. 3) suggesting that the *C. ambrosioides* cataplasm promotes osteogenesis and may serve as a stimulator of bone regeneration (Wong and Rabie, 2006; Pereira-Junior *et al.*, 2007; Filho *et al.*, 2009; Ishizeki *et al.*, 2009).

In addition, a greater density of collagen fibers was observed in MZG at 45 days (Fig. 6). The extracellular matrix which is rich in collagen, contributes to mineralization, angiogenesis and growth factor production and therefore, favors bone regeneration (Roden, 2010).

Within the context of bone remodeling, important markers of real-time bone formation are total ALP and bone ALP (Seibel, 2000; Allen, 2003). In the present study, no difference in ALP activity was observed between MZG and the other groups. This finding might be explained by the fact that this enzyme is not specific for bone neoformation and future studies using osteocalcin and bone ALP are necessary.

The results of this study show that cataplasm of *Chenopodium ambrosioides* leaves induces early bone neoformation, contributing to the treatment of bone repair and opening new perspectives for its use as an alternative, easily obtainable biomaterial.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank the Brazilian funding agencies CNPq and FAPEMA for financial support. The study is part of the thesis presented by Vicente Férrer Pinheiro Neto to the Postgraduate

Program in Biotechnology (RENORBIO)/Federal University of Maranhão (UFMA) in collaboration with Instituto Federal do Maranhão (IFMA) and Universidade Estadual do Maranhão (UEMA).

#### REFERENCES

- Alievi, M.M., J.E.W. Schossler, L.D. Guimaraes, A.N.C. de Oliveira, C.K. Traeslel and P.A. Ferreira, 2007. [Honey preserved cortical allografts in the repair of diaphyseal femoral defect in dogs: Clinical and radiographic evaluation]. *Ciencia Rural*, 37: 450-457, (In Portuguese).
- Allen, M.J., 2003. Biochemical markers of bone metabolism in animals: Uses and limitations. *Vet. Clin. Pathol.*, 32: 101-113.
- Baptistel, A.C., J.M.C.P. Coutinho, E.M.F. Lins Neto and J.M. Monteiro, 2014. [Medicinal plants used in the Community Santo Antonio, city of Currais, Southern Piauí, Brazil: An ethnobotanical approach]. *Revista Brasileira Plantas Medicinai*s, 16: 406-425.
- Bezerra, J.L., G.C. Costa, T.C. Lopes, I.C.D.S. Carvalho and F.J. Patricio *et al.*, 2006. [Evaluation of the *in vitro* leishmanicidal activity of medicinal plants]. *Revista Brasileira Farmacognosia*, 16: 631-637, (In Portuguese).
- Filho, J.R.L., E.S.S. Andrade, J.R. Albergaria-Barbosa, I.B. Camargo and R.R. Garcia, 2009. Effects of demineralized bone matrix and a *Ricinus communis* polymer on bone regeneration: A histological study in rabbit calvaria. *J. Oral. Sci.*, 51: 451-456.
- Franca, F., E.L. Lago and P.D. Marsden, 1996. Plants used in the treatment of leishmanial ulcers due to *Leishmania (Viannia) Braziliensis* in an endemic area of Bahia, Brazil. *Revista Sociedade Brasileira Medicina Tropical*, 29: 229-232.
- Franco, K.L., A.P.B. Borges, M.I.V. Vilorio, E.S. Fernandes and A.F. Fehlberg, 2001. [Pure synthetic hydroxyapatite, collagen associated synthetic hydroxyapatite and liposome associated synthetic hydroxyapatite as a bone substitute for defects in bone healing of dogs: Transmitted light microscopy osteointegration aspects]. *Arquivo Brasileiro Medicina Veterinaria Zootecnia*, 53: 1-7, (In Portuguese).
- Giannoudis, P.V. and H.T. Dinopoulos, 2010. Autologous bone graft: When shall we add growth factors? *Foot Ankle Clin.*, 15: 597-609.
- Ibironke, G.F. and K.I. Ajiboye, 2007. Studies on the anti-inflammatory and analgesic properties of *Chenopodium ambrosioides* leaf extract in rats. *Int. J. Pharmacol.*, 3: 111-115.
- Ishizeki, K., T. Kagiya, N. Fujiwara, K. Otsu and H. Harada, 2009. Expression of osteogenic proteins during the intrasplenic transplantation of Meckel's chondrocytes: A histochemical and immunohistochemical study. *Arch. Histol. Cytol.*, 72: 1-12.

- Marino, J.T. and B.H. Ziran, 2010. Use of solid and cancellous autologous bone graft for fractures and nonunions. *Orthop. Clin. North Am.*, 41: 15-26.
- Miranda, E.S., F.T.S. Cardoso, J.F.M. Filho, M.D.R. Barreto, R.M.M. Teixeira, A.L. Wanderley and K.E. Fernandes, 2005. [Organic and inorganic bone graft use in rabbits' radius surgical fractures repair: An experimental and comparative study]. *Acta Ortopedica Brasileira*, 13: 245-248, (In Portuguese).
- Muller, S.S., E.C. Curcelli, T. Sardenberg, A. Zuccon, J.L. de Crudis Jr. and C.R. Padovani, 2004. [Clinical and biomechanical analysis of the effect of diclofenac sodium in tibial fracture healing in rats]. *Acta Ortopedica Brasileira*, 12: 197-204, (In Portuguese).
- Nascimento, F.R.F., G.V.B. Cruz, P.V.S. Pereira, M.C.G. Maciel and L.A. Silva *et al.*, 2006. Ascitic and solid Ehrlich tumor inhibition by *Chenopodium ambrosioides* L. treatment. *Life Sci.*, 78: 2650-2653.
- Patricio, F.J., G.C. Costa, P.V.S. Pereira, W.C. Aragao-Filho and S.M. Sousa *et al.*, 2008. Efficacy of the intralesional treatment with *Chenopodium ambrosioides* in the murine infection by *Leishmania amazonensis*. *J. Ethnopharmacol.*, 115: 316-319.
- Pereira-Junior, O.C.M., S.C. Rahal, P. Iamaguti, S.L. Felisbino, P.T. Pavan and L.C. Vulcano, 2007. Comparison between polyurethanes containing castor oil (soft segment) and cancellous bone autograft in the treatment of segmental bone defect induced in rabbits. *J. Biomater. Applic.*, 21: 283-297.
- Pinheiro Neto, V.F., B.M.A. Araujo, P.C. War, M.O.R. Borges and A.C.R. Borges, 2005. [Effects of poultice of mastruz sheets (*Chenopodium ambrosioides* L.) in bone and soft tissue repair in radio in rabbits]. *Brazil. J. Phytother.*, 3: 62-66, (In Portuguese).
- Roden, Jr., R.D., 2010. Principles of bone grafting. *Oral Maxillofac. Surg. Clin. North Am.*, 22: 295-300.
- Seibel, M.J., 2000. Molecular markers of bone turnover: Biochemical, technical and analytical aspects. *Osteoporosis Int.*, 11: S18-S29.
- TrivellatoGrassi, L., A. Malheiros, C. Meyre-Silva, Z.D.S. Buss and E.D. Monguilhott *et al.*, 2013. From popular use to pharmacological validation: A study of the anti-inflammatory, anti-nociceptive and healing effects of *Chenopodium ambrosioides* extract. *J. Ethnopharmacol.*, 145: 127-138.
- Tsonis, P.A., 2002. Regenerative biology: The emerging field of tissue repair and restoration. *Differentiation*, 70: 397-409.
- Wong, R.W.K. and A.B.M. Rabie, 2006. Effect of gusuibu graft on bone formation. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, 64: 770-777.