



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA – UFBA
INSTITUTO MULTIDISCIPLINAR EM SAÚDE
CAMPUS ANÍSIO TEIXEIRA
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

KELLE OLIVEIRA SILVA

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANA,
ADERÊNCIA, ANTIOXIDANTE, ANTI-INFLAMATÓRIA E
ANTINOCICEPTIVA DE *ANADENANTHERA MACROCARPA*
(BENTH) BRENAN**

Vitória da Conquista - BA
2011

KELLE OLIVEIRA SILVA

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANA,
ADERÊNCIA, ANTIOXIDANTE, ANTI-INFLAMATÓRIA E
ANTINOCICEPTIVA DE *ANADENANTHERA MACROCARPA*
(BENTH) BRENAN**

Dissertação apresentada ao Instituto Multidisciplinar em Saúde da Universidade Federal da Bahia no Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas para a obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Profa. Dra. Regiane Yatsuda

Co-Orientadora: Profa. Dra. Andréia de Castro Perez

Vitória da Conquista - BA
2011

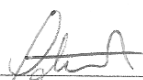
KELLE OLIVEIRA SILVA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE
ANADENANTHERA MACROCARPA (BENTH) BRENAN**

Dissertação apresentada à Universidade Federal da Bahia e ao Colegiado do Programa Multicêntrico de Ciências Fisiológicas, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

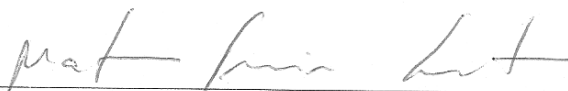
Defesa em 16 de fevereiro de 2011.

Banca examinadora



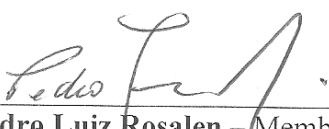
Regiane Yatsuda – Orientadora

Doutora em Odontologia pela Universidade Estadual de Campinas
Docente da Universidade Federal da Bahia



Mateus Freire Leite – Membro Convidado

Doutor em Ciências Farmacêuticas pela Universidade de São Paulo
Docente da Universidade Federal da Bahia



Pedro Luiz Rosalen – Membro Convidado

Doutor em Odontologia pela Universidade Estadual de Campinas
Docente da Universidade Estadual de Campinas



Fabrício de Araújo Moreira – Membro Convidado

Doutor em Ciências Biológicas (Farmacologia) pela Universidade de São Paulo
Docente da Universidade Federal de Minas Gerais

Dedico este trabalho aos meus pais, **Edvaldo Pereira da Silva e Jacira Macedo Oliveira Silva**, que sempre me guiaram sem cobrar explicações pelo modo de vida contrário e por me permitir uma vida de tantas alegrias.

O Alessandro Souza Brito, é por este compromisso eterno de amor que encontrei motivação nos momentos mais difíceis e com quem compartilhei os momentos mais sublimes deste curso.

Ao meu irmão **Fábio Oliveira Silva** e à sua esposa **Ada Duarte**, pois sei o quanto torceram por mim e o quanto devem estar felizes com esta conquista.

À **Júlia Duarte Oliveira Silva e Artur Duarte Oliveira Silva** por existirem.

Aos professores **Regiane Yatsuda, Mariluze P. Cruz e Lucas M. Marques** por suas presenças constantes.

AGRADECIMENTOS

A **Deus** causa primária de todas as coisas, a quem tentamos compreender e ser agradecidos pela dádiva da vida.

Agradeço às Intituições financiadoras, **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico** (CNPq-UNIVERSAL 014/2008; 014/2010), **Fundação de Amparo à Pesquisa e à Inovação Tecnológica do Estado da Bahia** (FAPESB/PPSUS 0008/2009) e à Instituição que me concedeu bolsa de estudo a **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior** (CAPES).

O ingresso no mestrado me abriu um grande horizonte de conhecimentos, de oportunidades e, sem dúvida alguma, um imenso prazer. Hoje tenho a certeza que ninguém caminha sozinho, sempre existe alguém em quem se apoiar nos momentos de fraqueza, ou compartilhar os momentos de alegria. É para elas que apresento meus mais sinceros agradecimentos e carinho.

Em especial, a minha professora orientadora, **Dra. Regiane Yatsuda**, pela imensa paciência, dedicação, amizade e pela confiança em me aceitar em seu laboratório, pelos valiosos ensinamentos, e por seu exemplo “único” de pesquisadora.

À minha “Co” de coração, a professora doutoranda **Mariluze Cruz**, que sempre se mostrou solícita no auxílio em momentos de dificuldade.

Às perseverantes professoras **Dra. Amélia Cristina Mendes de Magalhães**, **Dra. Telma de Jesus Soares** e **Dra. Najara de Oliveira Belo**, por todo empenho e zelo para fazer com que o Programa Multicêntrico desponte como um projeto para a geração de bons frutos.

A todos os docentes do Departamento de Fisiologia e Farmacologia da UFMG e Departamento de Fisiologia da UFRJ, em especial àqueles que participaram mais diretamente da minha formação científica: **Profa. Dra. Leida Botion**, **Profa. Dra. Janetti N. Francischi**, **Prof. Dr. Fabrício Moreira**, **Prof. Dr. Walter Araujo Zin** e **Prof. Dr. Igor Dimitri Gama Duarte**, pela contribuição para com a minha formação científica.

Aos pesquisadores **Dr. Marcelo H. Napimoga**, **Dra. Juliana T. Clemente-Napimonga**, **Dr. Humberto M. Spindola**, **Dra. Mary Ann Folgio**, **Dr. Pedro Luiz Rosalen** e **MSc. Avaldo de Oliveira S. Filho** pelo amparo, auxílio, suporte técnico e disponibilidade para a pesquisa.

À **Érika Pereira de Souza**, o meu bebê, por sua amizade, conversas, ensinamentos, convivência, alimentação, conselhos e por seu exemplo de comprometimento com a pesquisa.

À mãe **Joseline Cezário Duarte** pelo empenho, responsabilidade e compromisso demonstrados para com o projeto.

Aos amigos e companheiros de laboratório **Andressa Araújo Oliveira**, **Camila Brito Cardoso**, **Cassya Maviony Fiuza Andrade**, **Daniel Dias Sampaio**, **Emanuella Gomes Maia**, **Geysa Silva Santos**, **Gladistone Correia Messias**, **Keila Silva de Jesus**, **Maiana Ferraz Andrade**, **Mahala Correia Cláudio**, **Márcio Augusto Meira Santana**, **Maria Conceição Góes Santos de Souza**, **Monique Dutra Fonseca**, **Mússio Pirajá Mattos**, **Naira Kelle Barbosa Ribeiro**, **Priscila Silva Cunegundes**, **Rafael Santos Dantas Miranda**

Dórea, Roberta Alves Mota, Tiara Oliveira Castro e Vinícius Saboia Meireles por toda amizade e ajuda do transcorrer desta conquista. Nem tenho palavras para agradecer a todos vocês pelo carinho e pelo cuidado que tiveram comigo. Mostrando que realmente temos uma equipe, que sabemos trabalhar em grupo e isso é uma lição que levaremos para toda a nossa vida, um grande ensinamento, além de muitos outros, que se insere neste grande universo que é a nossa pesquisa. Saibam que eu fui apenas à porta-voz de um trabalho desenvolvido com muito empenho de todos, e que se hoje tenho um título eu ofereço todo o reconhecimento a vocês.

Ao professor **Dr. Lucas M. Marques** por estar sempre por perto.

Aos meus colegas de jornada **Anna Carolina Saúde Dantas, Daniela de Oliveira Gusmão, Everaldo Nery de Andrade, Liliansy Souza de Brito Amaral, Raimundo Nonato Faria e Samira Itana de Souza.**

A todos aqueles que de maneira direta ou indiretamente estiveram ao meu lado com intuito de ajudar e compartilhar o amor fraternal.

“Todos os meus pensamentos estavam concentrados em meus estudos. Tudo de novo que via e aprendia dava-me um imenso prazer. Era como um mundo novo aberto para mim, o mundo da ciência, que me era finalmente permitido conhecer em liberdade.”

Marie Curie, em uma carta datada de 1892.

SILVA, Kelle Oliveira. **Avaliação da atividade biológica de *Anadenanthera macrocarpa* (Benth) Brenan**. 97f. il. 2011. Dissertação (Mestrado) – Instituto Multidisciplinar em Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2011.

RESUMO

Anadenanthera macrocarpa (Benth) Brenan, conhecida na região nordeste do Brasil como angico, é amplamente utilizada na medicina popular tradicional para tratar problemas respiratórios e inflamações. Este estudo teve como objetivo avaliar as atividades antimicrobiana, antiaderente, antioxidante, anti-inflamatória e antinociceptiva de *A. macrocarpa* do semiárido da Bahia, coletadas na região da Floresta Nacional Contendas do Sincorá (FLONA), segundo dados etnofarmacológicos da região. Os extratos etanólicos da casca, galho e folha foram preparados por maceração e suas frações de hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol foram preparadas por partição. Para a avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos e suas frações foram realizados testes de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM). A atividade antiaderente dos extratos etanólicos foi avaliada sobre *Streptococcus mutans* UA159 e *Streptococcus sobrinus* 6715 pelo ensaio de Concentração Inibitória Mínima de Aderência (CIMA). Para a medida da atividade antioxidante dos extratos etanólicos foram utilizadas as técnicas de autooxidação do sistema β -caroteno/ácido linoléico e atividade sequestrante do radical DPPH. Para os ensaios antinociceptivo e anti-inflamatório do extrato etanólico da casca foram utilizados camundongos *Balb-C*. O efeito antinociceptivo foi avaliado pelos testes de contorção abdominal induzido por ácido acético 0,6%, pela injeção intraplantar de formalina 1,5% e pelo método de von Frey eletrônico após injeção intraplantar de carragenina (Cg). Para a determinação da atividade anti-inflamatória foram realizados testes de migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal, avaliação da permeabilidade vascular analisada pelo teste de azul de Evans, detecção de citocinas por ELISA, mensuração do acúmulo de neutrófilos na pata medido por ensaio de atividade da mieloperoxidase e formação edema de pata induzido por Cg 1% medido por hidropletismômetro. Os resultados mostraram que as frações hexano e acetato de etila da casca, o extrato etanólico e a fração hexano do galho e as frações hexano e diclorometano da folha apresentaram atividade antibacteriana com CIM menores que 100 $\mu\text{g/mL}$ frente às bactérias do grupo mutans. O crescimento de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 foi inibido pelos extratos etanólico da casca (CIM = 500 $\mu\text{g/mL}$) e da folha (CIM = 1000 $\mu\text{g/mL}$). A bactéria *Escherichia coli* ATCC 25922 teve seu crescimento inibido pela fração diclorometano da casca, galho e folha e fração acetato de etila da folha (CIM = 500 $\mu\text{g/mL}$). Os resultados mostram a potencialidade da *A. macrocarpa* na inibição da aderência. Observou-se um comportamento antioxidante relevante dos extratos etanólicos da casca, galho e folhas (500 e 1000 $\mu\text{g/mL}$), alguns extratos apresentaram valores superiores aos encontrados para os padrões alfa-tocoferol e BHT. O extrato etanólico da casca (50 e 100 mg/kg) apresentou inibição da nocicepção visceral induzida por ácido acético e induzida pela formalina na pata (50 e 100 mg/kg) e inibiu a hipernocicepção mecânica (teste de von Frey) e migração de neutrófilos (teste Mieloperoxidase). O extrato etanólico da casca reduziu o extravasamento de plasma induzido por Cg e aumentou os níveis de IL-10. Os resultados evidenciaram que *A. macrocarpa* é uma espécie rica em atividade biológica, sendo promissor o isolamento e identificação de seus compostos bioativos.

Palavras-chave: Plantas medicinais - *Anadenanthera macrocarpa*. Farmacologia experimental. Extratos vegetais – Farmacologia. Bioensaios.

Silva, Kelle Oliveira. **Assessment of biological activity of *Anadenanthera macrocarpa* (Benth) Brenan**. 97f. il. 2011. Thesis (MA) - Multidisciplinary Health Institute, Federal University of Bahia, Vitória da Conquista, 2011.

ABSTRACT

Anadenanthera macrocarpa (Benth) Brenan, known in northeastern Brazil as angico, is widely used in traditional folk medicine to treat respiratory problems and inflammation. This study aimed to evaluate the antimicrobial, nonstick, antioxidant, anti-inflammatory and antinociceptive *A. macrocarpa* in the semi-arid region of Bahia, collected in the region of the National Forest Contentions Sincorá (FLONA), according to ethnopharmacological the region. The ethanol extracts of bark, twig and leaf were prepared by maceration and fractions of hexane, dichloromethane, ethyl acetate and butanol were prepared by partition. To evaluate the antimicrobial activity of ethanol extracts and fractions tests were performed Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC). The nonstick activity of ethanol extracts was evaluated on *Streptococcus mutans* UA159 and *Streptococcus sobrinus* 6715 by test Minimal Inhibitory Concentration of Adherence (MICA). To measure the antioxidant activity of ethanol extracts were used the techniques of autoxidation system β -carotene/linoleic acid and DPPH scavenging activity. To test the antinociceptive and anti-inflammatory extract of the bark were used *Balb-C*. The antinociceptive effect was evaluated by the writhing test induced by acetic acid 0.6% by intraplantar injection of formalin 1.5% and the method of von Frey electronic after intraplantar injection of carrageenan (Cg). To determine the anti-inflammatory activity tests were performed neutrophil migration into the peritoneal cavity, evaluation of vascular permeability assessed by Evans blue test, detection of cytokines by ELISA, measuring the accumulation of neutrophils in the paw measured by activity assay myeloperoxidase and edema formation induced paw Cg 1% as measured. The results showed that the fractions hexane and ethyl acetate peel, the ethanol extract and the hexane fraction of the branch and the hexane and dichloromethane fractions of the leaf showed antibacterial activity with MIC less than 100 $\mu\text{g/mL}$ on the mutans streptococci. The growth of *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 was inhibited by ethanol extracts of the bark (MIC = 500 $\mu\text{g/mL}$) and leaf (MIC = 1000 $\mu\text{g/mL}$). The bacterium *Escherichia coli* ATCC 25922 had its growth inhibited by dichloromethane fraction of the bark, twig and leaf and ethyl acetate fraction of the leaf (MIC = 500 $\mu\text{g/mL}$). The results show that *A. macrocarpa* in the inhibition of adherence. There was a significant antioxidant behavior of ethanol extracts of bark, twig and leaf (500 and 1000 mg/mL), some extracts showed higher values than those found for the standard α -tocopherol and BHT. The extract of the bark (50 and 100 mg/kg) showed inhibition of visceral nociception induced by acetic acid and formalin-induced paw (50 and 100 mg/kg) and inhibited hypernociception mechanical (von Frey test) and migration neutrophils (Myeloperoxidase test). The extract of the bark reduced the plasma leakage induced by Cg and increased levels of IL-10. The results showed that *A. macrocarpa* is a species rich in biological activity, and promising the isolation and identification of their bioactive compounds.

Keywords: Medicinal plants - *Anadenanthera macrocarpa*. Experimental pharmacology. Plant extracts – Pharmacology. Biological assay

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Árvore de <i>Anadenanthera macrocarpa</i> (Benth) Brenan adulta (Local: Departamento Nacional de Infra-Estrutura de Transportes do Distrito Federal).....	31
Figura 2	Folhas e inflorescência (a), frutos (b), frutos antes da dispersão (c) e sementes (d) de <i>Anadenanthera macrocarpa</i> (Benth) Brenan adulta (Local: Departamento Nacional de Infra-Estrutura de Transportes do Distrito Federal).....	32
Figura 3	Cromatografia de camada fina dos extratos etanólicos (a) da folha, galho e casca e de suas respectivas frações de hexano (b), diclorometano (c), acetato de etila (d) e butanol (e).....	45
Figura 4	Efeito do extrato etanólico da casca de <i>Anadenanthera macrocarpa</i> (Benth) Brenan no teste de contorção abdominal induzida por ácido acético (0,6%) em camundongos.	55
Figura 5	Efeitos do extrato etanólico da casca de <i>Anadenanthera macrocarpa</i> (Benth) Brenan na resposta à nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina em camundongos.....	56
Figura 6	Efeitos do extrato etanólico da casca de <i>Anadenanthera macrocarpa</i> (Benth) Brenan no edema de pata induzido por formalina 1,5%.....	57
Figura 7	Efeito do extrato etanólico da casca de <i>Anadenanthera macrocarpa</i> (Benth) Brenan sobre a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida por Cg.....	58
Figura 8	Efeito do extrato etanólico da casca de <i>Anadenanthera macrocarpa</i> (Benth) Brenan na permeabilidade vascular, teste de azul de Evans.....	59
Figura 9	Efeito do extrato etanólico da casca de <i>Anadenanthera macrocarpa</i> (Benth) Brenan sobre as citocinas TNF- α (a) e IL-1 β (b) na produção de exsudato peritoneal.....	59
Figura 10	Efeito do extrato etanólico da casca de <i>Anadenanthera macrocarpa</i> (Benth) Brenan na inibição da nocicepção mecânica.....	60
Figura 11	Efeito do extrato etanólico da casca de <i>Anadenanthera macrocarpa</i> (Benth) Brenan sobre o edema de pata induzido por Cg 1%.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Rendimentos dos extratos etanólicos e de suas respectivas frações de hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol obtidos da casca, galho e folha de <i>Anadenanthera macrocarpa</i>	44
Tabela 2	Atividade antimicrobiana do extrato etanólico da casca e suas frações de hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol de <i>Anadenanthera macrocarpa</i> (Benth) Brenan nos ensaios de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) com as bactérias <i>S. mutans</i> UA159, <i>S. mutans</i> Ingbritt 1600, <i>S. sobrinus</i> 6715, <i>E. faecalis</i> ATCC 29212, <i>E. coli</i> ATCC 25922, <i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145 e <i>S. aureus</i> ATCC 25923.....	47
Tabela 3	Atividade antimicrobiana do extrato etanólico do galho e das suas frações de hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol de <i>Anadenanthera macrocarpa</i> (Benth) Brenan expressos pela Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) com as bactérias <i>S. mutans</i> UA159, <i>S. mutans</i> Ingbritt 1600, <i>S. sobrinus</i> 6715, <i>E. faecalis</i> ATCC 29212, <i>E. coli</i> ATCC 25922, <i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145 e <i>S. aureus</i> ATCC 25923.....	48
Tabela 4	Atividade antimicrobiana do extrato etanólico da folha e suas frações de hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol de <i>Anadenanthera macrocarpa</i> (Benth) Brenan expressos pela Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) com as bactérias <i>S. mutans</i> UA159, <i>S. mutans</i> Ingbritt 1600, <i>S. sobrinus</i> 6715, <i>E. faecalis</i> ATCC 29212, <i>E. coli</i> ATCC 25922, <i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145 e <i>S. aureus</i> ATCC 25923.....	50
Tabela 5	Atividade aderente “in vitro” dos extratos etanólicos da casca, galho e folha de <i>Anadenanthera macrocarpa</i> (Benth) Brenan pelos ensaios de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Inibitória Mínima de Aderência (CIMA) contra as bactérias <i>S. mutans</i> UA159 e <i>S. sobrinus</i> 6715.....	51
Tabela 6	Determinação da capacidade antioxidante “in vitro” pelo sistema β -caroteno/ácido linoléico dos extratos etanólicos da casca, galho e folha de <i>Anadenanthera macrocarpa</i> (Benth) Brenan e dos padrões hidroxitolueno de butila (BHT) e Alfa-tocoferol.....	52
Tabela 7	Determinação da capacidade antioxidante “in vitro” pelo método de sequestro de radicais livres DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) dos extratos etanólicos da casca, galho e folha de <i>Anadenanthera macrocarpa</i> (Benth) Brenan.....	54

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AN	Angico
ANOVA	Análise de variância
BHT	Hidroxitolueno de butila
BHI	Brain Heart Infusion
CBM	Concentração Bactericida Mínima
Cg	Carragenia
CHE	Extrato etanólico da casca
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
COX	Ciclooxigenase
COX-2	Ciclooxigenase do tipo 2
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
Dr.	Doutor
Dra.	Doutora
D.P.	Desvio padrão
EDTA	Ácido etileno diamino tetra acético
ELISA	<i>Enzyme-linked immuno-sorbent assay</i> – ensaio imuno-enzimático em fase sólida
FAPESB	Fundação de Amparo à Pesquisa e à Inovação Tecnológica do Estado da Bahia
FDA	Food and Drug Administration
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CHE	Extrato etanólico da casca
g	Gramas
GTFs	Glucosiltransferases
h	Horas
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
i.p.	Intraperitoneal
i.pl.	Intraplantar
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IC ₅₀	Concentração que inibe a resposta em 50%
IL-1	Interleucina-1
IL-10	Interleucina-10
IL-13	Interleucina-13
IL-1ra	Antagonista de receptor de IL-1
IL-1β	Interleucina-1β
IL-4	Interleucina-4
IL-6	Interleucina-6
iNOS	Óxido nítrico sintase
kg	Quilograma
LOX	Lipoxigenases
M	Molar
Min	Minutos

mL	Mililitros
MPO	Mieloperoxidase
MSc.	Mestre
NaCl	Cloreto de sódio
NaPO ₄	Fosfato de sódio
NO	Óxido nítrico
OD	Densidade óptica
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAF	Fator de Ativação Plaquetária
PBS	Salina tamponada com fosfatos
PG	Prostaglandinas
pg	Picograma
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGHS	Prostaglandina sintase endoperóxido hidrogênio
PGHS-1 e 2	PGHS-1 e PGHS-2
pH	Potencial hidrogeniônico
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
Prof.	Professor
RNA	Ácido ribonucléico
s.c.	Subcutânea
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa
UFBA	Universidade Federal da Bahia
UESB	Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UFMG	Univesidade Federal de Minas Gerais
UNICAMP	Universidade de Campinas
v.o.	Via oral
v/v	Relação entre volume e volume
μ M	Micromol
μ L	Microlitros
μ g	Microgramas
VH	Veículo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
2	FUNDAMENTOS TEÓRICOS	18
2.1	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE PLANTAS MEDICINAIS.....	18
2.1.1	Atividade antimicrobiana.....	19
2.1.2	Estudo da atividade antiaderente.....	21
2.1.3	Atividade antioxidante.....	23
2.1.4	Atividade anti-inflamatória.....	24
2.1.5	Atividade antinociceptiva.....	26
2.2	<i>ANADENANTHERA COLUBRINA</i> (BENTH.) BRENAM.....	29
2.2.1	Aspectos da planta.....	30
2.2.2	Composição química e usos medicinais.....	30
3	OBJETIVOS	35
3.1	OBJETIVO GERAL.....	35
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	35
4	MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1	COLETA E IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE VEGETAL.....	36
4.2	PREPARO DOS EXTRATOS, FRACIONAMENTO E CROMATOGRAFIA DE CAMADA FINA.....	36
4.3	ESTUDO ANTIMICROBIANO.....	37
4.3.1	Microrganismos.....	37
4.3.2	Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	37
4.3.3	Concentração Bactericida Mínima (CBM).....	38
4.4	ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIADERENTE.....	38
4.4.1	Inibição da Aderência Celular de <i>Streptococos</i> do grupo <i>mutans</i> e <i>sobrinus</i> à superfície.....	38
4.5	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	38
4.5.1	Autoxidação do sistema β -caroteno/ácido linoléico.....	38
4.5.2	Atividade sequestrante do radical DPPH.....	39

4.6	MODELOS EXPERIMENTAIS PARA A AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA.....	39
4.6.1	Animais	39
4.6.2	Teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético	40
4.6.3	Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina em camundongos	40
4.6.4	Procedimento experimental para avaliar a migração de neutrófilos	41
4.6.5	Avaliação da permeabilidade vascular	41
4.6.6	Detecção de citocinas por ELISA	41
4.6.7	Teste de Von Frey	42
4.6.8	Ensaio de atividade da Mieloperoxidase	42
4.6.9	Medida do edema de pata em camundongos	43
4.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	43
5	RESULTADOS	44
5.1	RENDIMENTOS DOS EXTRATOS ETANÓLICOS E DAS FRAÇÕES DE <i>A. MACROCARPA</i>	44
5.2	CROMATOGRAFIA DE CAMADA FINA.....	45
5.3	ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA “IN VITRO” DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DA CASCA, GALHO E FOLHA E SUAS RESPECTIVAS FRAÇÕES DE <i>A. MACROCARPA</i> (BENTH) BRENAN.....	46
5.4	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIADERÊNCIA “IN VITRO” DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DA CASCA, GALHO E FOLHAS DE <i>A. MACROCARPA</i> (BENTH)	51
5.5	INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE “IN VITRO” DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DA CASCA, GALHO E FOLHA DE <i>A. MACROCARPA</i> (BENTH) BRENAN.....	52
5.6	AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA OBTIDAS DO EXTRATO ETANÓLICO DA CASCA DE <i>ANADENANTHERA MACROCARPA</i> (BENTH) BRENAN.....	55
6	DISCUSSÃO	62
7	CONCLUSÃO	76
	REFERÊNCIAS	77

1 INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), as plantas medicinais são representadas por todas as espécies silvestres ou cultivadas, quando utilizadas como recurso para prevenir, aliviar, curar ou modificar um processo fisiológico normal ou patológico ou quando estas são fontes de fármacos ou de seus precursores (ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD, 2000).

Em 1978, a OMS reconheceu os medicamentos de origem vegetal como recurso terapêutico (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001) e recomendou aos países que executassem levantamentos regionais e identificação botânica de espécies vegetais usadas na medicina popular tradicional; estimulassem e indicassem o uso das plantas medicinais com eficácia e segurança comprovadas e contraindicassem o emprego das práticas medicinais populares consideradas inúteis ou prejudiciais (CAVALCANTE, 2010).

O desenvolvimento de estudos de atividade biológica de produtos naturais, estudos do conhecimento e do uso de produtos naturais em populações locais contribuem para a descoberta de formas alternativas econômicas no tratamento e prevenção de doenças dessas populações, além de originar dados para conservação da biodiversidade das espécies nativas e na melhoria de qualidade de vida da população estudada, além de manter as tradições do conhecimento popular (PAULA et al., 2001).

A vantagem no desenvolvimento de pesquisas farmacológicas de plantas medicinais é o seu grande alcance social, permitindo que as informações sejam retornadas à população, através de folhetos educacionais, que relatem a identificação da espécie, melhor época e forma de colheita, parte empregada e modo de preparo (CARLINI, 1983). Para os países em desenvolvimento, poderiam substituir princípios ativos importados por tinturas padronizadas de espécie de fácil cultivo e com equivalência terapêutica, permitindo assim menores gastos com doenças (FARNSWORTH, 1985).

Além disso, o uso de plantas medicinais não se restringe às zonas rurais ou regiões desprovidas de assistência médica e farmacêutica, sendo também utilizadas intensamente no meio urbano como forma alternativa ou complementar aos medicamentos da medicina oficial. O uso de fitoterápicos no Brasil constitui um mercado de US\$ 400 milhões, e ainda são recomendadas pela Organização das Nações Unidas que reconheceu o uso de plantas medicinais por 2/3 da população da Terra (BARATA, 2010). Estima-se que o Brasil possui aproximadamente 55 mil espécies vegetais catalogadas, das quais apenas 8% foram estudadas

para identificação de moléculas bioativas e, quatro mil são reconhecidas como plantas medicinais (BRASIL, 2004).

Os fitofármacos, moléculas com ação terapêutica de origem vegetal representam uma alternativa tecnológica e econômica em relação ao elevadíssimo custo do desenvolvimento de um novo medicamento realizado através da análise combinatória e síntese de moléculas a partir de moldes biológicos que apresentam diversos efeitos indesejáveis tais como a própria dificuldade de adaptação ao receptor biológico (LASTRES et al., 2001).

Portanto, o valor dos produtos naturais é claramente reconhecido na descoberta de novos compostos bioativos, sendo que das novas drogas aprovadas pelo Food and Drug Administration (FDA) desde 1983 até 1994, 28% procedem inteiramente de produtos naturais, 39% são derivados de produtos naturais e 33% são drogas de origem sintética (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2003).

Nessa perspectiva de aumento do mercado de medicamentos, a participação das plantas medicinais é fundamental, particularmente no desenvolvimento de fitoterápicos e na identificação de novas moléculas ou protótipos básicos para geração de novos medicamentos sintéticos (YATSUDA, 2004), visto que muitos constituintes de plantas e/ou seus derivados semi-sintéticos constituem uma parcela apreciável dos fármacos de ponta recém introduzidos no mercado. Trata-se de um mercado poderoso a busca de novas moléculas para assegurar a competitividade na produção de novos medicamentos patenteados. Além disto, também representam a oportunidade de elaborar os medicamentos denominados fitoterápicos, que são extratos vegetais padronizados e validados do ponto de vista da sua eficácia, segurança e qualidade (BHATTARAM; GRAEF; KOHLERT, 2002).

A pesquisa direcionada para a descoberta de novos produtos naturais para fins terapêuticos se justifica pela busca de menores efeitos adversos e maior eficiência quando comparados aos produtos industrializados na terapêutica de doenças de alta prevalência e morbidade como infecções, cânceres e imunodeficiências (CLARDY; WALSH, 2004). Para isto são necessários estudos biomonitorados começando com extratos brutos, com a identificação, isolamento e síntese dos compostos biologicamente ativos, estudos laboratoriais “in vitro”, passando por modelos de estudo “in vivo” e culminando com os estudos clínicos longitudinais (CATE; MARSH, 1994).

Deste modo, o presente trabalho tem como tema o estudo da atividade biológica de *Anadenanthera macrocarpa* (Benth) Brenan, coletada na região de caatinga de Contendas do Sincorá (BA) como possível candidata a fitofármaco, a fim de unificar o uso popular e o científico. A realização deste trabalho justificou-se, principalmente pela necessidade do

estudo de plantas medicinais do semiárido brasileiro, além do isolamento e identificação dos compostos bioativos, possibilitando a geração de patentes, inovação tecnológica, implantação de novas metodologias nos laboratórios e o uso sustentável da biodiversidade. A descoberta de novos produtos de origem natural ou compostos químicos isolados com atividade biológica é de grande interesse científico, ambiental, tecnológico e econômico para o país, tanto para o desenvolvimento de fitoterápicos quanto dos fitofármacos no Brasil.

2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE PLANTAS MEDICINAIS

As plantas medicinais têm formado a base dos cuidados de saúde em todo o mundo desde os primórdios da humanidade e ainda são amplamente utilizados com grande importância no comércio internacional. O reconhecimento de seu valor clínico, farmacêutico e econômico continua a crescer, embora isso varie muito entre os países. As plantas são importantes para a investigação farmacológica e desenvolvimento de medicamentos, não só quando fitocompostos bioativos são usados diretamente como agentes terapêuticos, mas também como matérias-primas para a síntese de drogas ou como modelos para os compostos farmacologicamente ativos (NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2003).

Os produtos naturais, em particular as plantas, contêm inúmeros constituintes e seus extratos, quando testados, podem apresentar efeitos sinérgicos entre os diferentes princípios ativos devido à presença de compostos de classes ou estruturas diferentes contribuindo para a mesma atividade; assim, no estudo da atividade biológica de extratos vegetais é importante a seleção de bioensaios para a detecção do efeito específico (MACIEL; PINTO; VEIGA, 2002).

As espécies vegetais apresentam a capacidade de produzir, transformar e acumular inúmeras substâncias que não estão necessariamente relacionadas de forma direta com a manutenção da vida da planta, mas garantem vantagens para a sua sobrevivência e para a perpetuação da espécie, são os chamados metabólitos secundários. A sua produção é determinada por necessidades ecológicas e possibilidades biossintéticas. Assim, os metabólitos secundários por serem fatores de interação entre organismos, frequentemente apresentam a atividades farmacológicas importantes (SANTOS, 2007).

A maioria dos metabólitos secundários é formada no metabolismo da glicose. A glicose é convertida em moléculas de ácido pirúvico, que podem seguir duas vias diferentes. Na primeira, moléculas de piruvato entram na via do ácido chiquímico pra formar todos os metabólitos secundários aromáticos (alcaloides indólicos, quinolínicos, isoquinolínicos; ligninas e lignanas; cumarinas e taninos hidrossolúveis). Na segunda, o piruvato continua sendo oxidado até formar moléculas de acetil-coenzima A (acetil-CoA). Essas podem seguir três vias diferentes: via do ciclo do ácido cítrico, via do mevalonato e via da condensação do acetato, formando os alcaloides pirrolidínicos, tropânicos, pirrolizidínicos, piperidínicos e quinolozidínicos. A via do mevalonato origina os terpenóides e os esteróis. A combinação de uma unidade do ácido chiquímico, e uma ou mais unidades do acetato ou derivados deste,

poderá resultar na produção de antraquinonas, flavonóides e dos taninos condensados (OLIVEIRA; GODOY; COSTA, 2003; SANTOS, 2007).

A avaliação do potencial terapêutico de plantas medicinais e seus metabólitos secundários (tais como alcalóides, esteróides, triterpenos, taninos, saponinas, flavonóides, lignanas), têm sido objeto de estudo, por meio da avaliação das ações farmacológicas através de testes pré-clínicos com animais, visando possibilidades de futuramente virem a ser aproveitados como agentes medicinais (ARRUDA, 2008). A avaliação da atividade biológica inclui a investigação da atividade farmacológica e toxicológica de substâncias isoladas, frações e extratos totais da droga vegetal (ZANETTI, 2002). A necessidade de comprovar a atividade biológica de uma planta e de seus derivados é necessária pois aborda a um estudo farmacológico da medicina popular (SONAGLIO et al., 1999).

As preparações vegetais têm uma característica muito especial que as distinguem de drogas químicas: uma única planta pode conter um grande número de fitocompostos bioativos e ainda mais em uma combinação de plantas. Essa complexidade é um dos desafios mais importantes para a tentativa de identificar um único composto bioativo no universo enorme que inclui um único extrato bruto (MENDONÇA-FILHO, 2006).

2.1.1 Atividade antimicrobiana

As doenças infecciosas representam uma importante causa de morbidade e mortalidade entre humanos, especialmente nos países em desenvolvimento. Assim, as indústrias farmacêuticas têm sido motivadas para o desenvolvimento de novas drogas antimicrobianas nos últimos anos, especialmente em função da ocorrência de resistência microbiana a tais medicamentos. Em geral, bactérias tem habilidade genética de transmitir e adquirir resistência a drogas usadas como agentes terapêuticos (NASCIMENTO et al. 2000), pois são frequentes os relatos sobre isolamentos de bactérias que eram reconhecidamente sensíveis as drogas de uso na rotina, mas que se tornam resistentes a todos, ou a quase todos, fármacos disponíveis no mercado (SAKAGAMI; KAJAMURA, 2006).

A época áurea da terapia antimicrobiana iniciou-se em 1941. Desde então inúmeros pacientes foram curados de infecções potencialmente fatais usando-se um ou mais esquemas terapêuticos com antibióticos. Porém, o uso indiscriminado de tais drogas resultou no aparecimento de patógenos resistentes, o que tornou necessário o emprego, cada vez maior, de novos fármacos. Daí a grande importância da pesquisa por novas substâncias com poder bactericida ou bacteriostático (FALCÃO et al., 2002).

A resistência a drogas de patógenos humanos e animais é um dos casos mais bem documentados de evolução biológica e um sério problema tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento. Baquero e Blázquez (1997) relataram o perigo do retorno a uma era pré-antibiótico, particularmente considerando que nenhuma nova classe de antibiótico foi descoberta nos últimos anos, apesar das intensas pesquisas das indústrias farmacêuticas. Em vista do presente cenário, a busca por novas substâncias antimicrobianas a partir de fontes naturais, incluindo plantas, tem ganhado importância nas companhias farmacêuticas (DUARTE, 2006).

Uma das medidas utilizadas na batalha contra a resistência bacteriana é a modificação dos antibióticos em uso, no entanto, pouco sucesso tem sido obtido. Por esses motivos, a descoberta de novas moléculas, de fonte natural, com atividade antimicrobiana é assunto de máxima urgência. A diversidade de moléculas encontradas em plantas faz das mesmas promissoras fontes de novos agentes antimicrobianos (COUTINHO et al., 2008).

Os trabalhos relacionados à atividade antimicrobiana de plantas teve início na década de 1940. Em 1943, Osborn pesquisando a atividade de 2300 plantas superiores contra *Astaphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, verificou que plantas pertencentes a 63 gêneros continham substâncias que inibiam o crescimento de um ou de ambos os microrganismos (PEDERSON; FISHER, 1984). No Brasil, as pesquisas sobre substâncias antimicrobianas de origem vegetal tiveram início com Cardoso e Santos (1948) que avaliaram extratos de 100 diferentes plantas indicadas em terapêutica como anti-inflamatórias ou cicatrizantes. Destas cinco extratos apresentaram atividade contra *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Proteus X-19*.

Diversas árvores nativas do Brasil são conhecidas pela etnofarmacologia por terem propriedades antimicrobianas e que ao mesmo tempo, podem preencher critérios de preservação ambiental e manejo autossustentável tais como: *Anadenanthera colubrina* (angico), *Anacardium occidentale* (cajueiro), *Pterodon emarginatus* (sucupira), *Copaifera langsdorffii* (copaíba), *Myroxylon peruiferum* (bálsamo-do-peru), *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão), *Bixa orellana* (urucum), *Eugenia uniflora* (pitanga), *Psidium guajava* (goiabeira), *Mimosa tenuiflora* (tepezcuíte), *Ilex paraguariensis* (erva-mate), *Ocotea odorifera* (sassafrás), *Hymenaea courbaril* (jatobá), *Schinus terebinthifolia* (aroeira), *Genipa americana* (jenipapo), *Tabebuia avellanadae* (ipê-roxo) e *Casearia sylvestris* (guaçatonga) (GONÇALVES; ALVES FILHO; MENEZES, 2005).

As plantas são possuidoras de várias vias metabólicas que dão origem a compostos, tais como, fenóis, terpenos, alcaloides, lecitinas, polipeptídios e poliacetilenos. Além dessas

classes, outras substâncias de origem vegetal mostram certa atividade antimicrobiana, como: poliaminas, isotiocianatos, tiossulfatos e glicosídeos (NOGUEIRA, 2000). Os vegetais ricos em taninos, flavonóides, óleos essenciais e polifenóis estão entre os extratos mais avaliados para esta atividade (COUTINHO et al., 2008). Alguns pesquisadores preferem dar a essas substâncias inibidoras, de origem vegetal, a denominação de fitocidas ou de substâncias semelhantes a antibióticos "Antibiotic Like-Substances" (GEISMANN, 1963).

Os compostos isolados de plantas são substâncias com estruturas químicas bem diferenciadas dos antimicrobianos obtidos a partir de bactérias, leveduras e fungos. Tais produtos podem atuar no metabolismo intermediário ativando enzimas no nível nuclear ou ribossomal, provocando alterações nas membranas ou interferindo no metabolismo (ESTEVAM, 2006). Portanto, a pesquisa para a obtenção de substâncias de origem vegetal com propriedades antimicrobiana com efeitos adversos menos graves que os atuais fármacos constituem uma fonte de pesquisa intensa (BRESOLIN; FILHO, 2003).

2.1.2 Estudo da atividade antiaderente

Na cavidade oral as superfícies dentais são recobertas por depósitos microbianos, com espessura determinada de acordo com sua localização. Os microrganismos precisam aderir-se firmemente a uma superfície porque se não serão levados pelo fluxo salivar e deglutidos, dessa forma a maioria dos microrganismos são encontrados em áreas de estagnação (MARSH; NYVAD, 2003; LEITES; PINTO; SOUZA, 2006). O biofilme dental assim formado é composto por um grupo heterogêneo de microrganismos nos diferentes sítios e tende a se estabilizar com o passar do tempo. Essa homeostase bacteriana resulta de um processo dinâmico nas interações microbianas (MARSH, 1989) e a atividade metabólica causa flutuações de pH até mesmo em condições de repouso. Tais flutuações de pH causam alterações no fluido do biofilme ou placa dental, resultando em um distúrbio no equilíbrio na interface dente e placa, levando a intermitente perda e ganho de minerais na superfície dental (JOHNSON, 1991). O processo de desmineralização dental só ocorre na presença de microrganismos (LEITES; PINTO; SOUZA, 2006).

A aderência bacteriana à película adquirida representa um dos primeiros mecanismos envolvidos na iniciação do desenvolvimento do biofilme dental. O biofilme dental é considerado o fator de maior importância dentro da etiologia das doenças bucais, como cáries, gengivites e periodontites, tendo uma relação muito grande com a higiene bucal deficiente. (ALVES et al., 2008).

Fejerskow e Manji demonstraram as relações entre o biofilme e os múltiplos determinantes biológicos que influenciam a possibilidade de desenvolvimento da lesão de cárie. Os dentes são colonizados por bactérias que existem no biofilme, cujo metabolismo ocasiona flutuações no pH. Este metabolismo é influenciado por fatores determinantes que por si só não levam ao desenvolvimento de cárie, mas modulam sua atividade. Entre estes encontramos a composição do próprio biofilme, composição e capacidade tampão da saliva, velocidade da secreção salivar e composição e frequência da dieta. Além dos fatores determinantes, existem os fatores confundidores, que são aqueles que variam de população para população nos quais se incluem os fatores sócio-econômicos, educacionais e comportamentais (WEYNE; HARARI, 2002; PERINETTI et al., 2005; LEITES; PINTO; SOUZA, 2006).

A microbiota oral é um complexo ecossistema que contém uma grande variedade de espécies microbianas (MOSCA, 2008). Alguns autores consideram que o *Streptococcus mutans* são os maiores agentes etiológicos responsáveis pela cárie dental em humanos (LOESCHE, 1986) em conjunto com o grupo sorológico *Streptococcus sobrinus* (KLEIN et al., 2004). São cocos Gram positivos, anaeróbios facultativos, microaerófilos que fazem parte taxonomicamente dos *Streptococcus* do Grupo Mutans. Os *Streptococcus* do Grupo Mutans são um grupo de microrganismo altamente cariogênicos por sua alta capacidade de colonizar a superfície dentária, produção (acidogênico) e sobrevivência (acidúrico) em meio ácido, produzir polissacarídeos extracelulares (LEITES; PINTO, SOUZA, 2006). O *Streptococcus mutans* podem aderir-se às mucinas salivares de alto peso molecular, que constituem parte da película salivar do esmalte (KISHIMOTO; HAY; GIBBONS, 1989). Os *Streptococcus mutans* podem ainda aderir-se às cepas de *Streptococcus sanguis*, *Streptococcus mitis* e *Actinomyces viscosus*, que são os microrganismos predominantes durante a formação primária do biofilme dental (LAMONT; ROSAN, 1990).

Tendo em vista a necessidade de prevenção e melhora dos índices de cárie na população, a remoção do biofilme dental constitui um método bastante valioso. Inúmeras substâncias químicas vêm sendo pesquisadas, com o objetivo de inibir a formação e a progressão do biofilme dental. Dentre estas substâncias destacam-se, atualmente, os produtos de origem vegetal por se mostrarem potencialmente eficazes no que se refere à atividade antimicrobiana sobre bactérias cariogênicas, podendo atuar seletivamente sobre estas bactérias (GEBARA; ZARDETTO; MAYER, 1996).

A busca por uma nova droga capaz de eliminar ou amenizar os males causados por patógenos, tem sido incessante nas últimas décadas. O uso de substâncias encontradas na

natureza tem como objetivo reduzir o impacto econômico causado com o desenvolvimento de novas drogas sintéticas. Dentro deste contexto, a procura por novos produtos naturais com atividade antibacteriana para a prevenção de doenças bucais é de suma importância para obtenção de um meio efetivo de controle da formação de um biofilme patogênico (YATSUDA, 2004).

Todavia, apesar do inegável potencial fitoquímico do Brasil, o uso de plantas medicinais na Odontologia brasileira, seja para tratar doenças bucais ou doenças sistêmicas com manifestações bucais, tem sido pouco explorado (NESS; SHERMAN; PAN, 1999). Além do mais, os produtos odontológicos à base de plantas medicinais mais populares no mercado utilizam plantas estrangeiras: *Sanguinaria canadensis* L. (colutório antimicrobiano – Estados Unidos e Canadá) e *Matricaria chamomilla* L. (creme dental anti-inflamatório – Alemanha) (CAVALCANTE, 2010).

2.1.3 Atividade antioxidante

As espécies reativas de oxigênio, radicais hidroxila, peroxila e o ânion superóxido têm um papel importante nas reações fisiológicas do corpo humano. No entanto, se houver produção excessiva de radicais de oxigênio durante os processos patofisiológicos ou devido a fatores ambientais adversos e não existirem antioxidantes disponíveis “in vivo”, pode ocorrer doenças e danos profundos em tecidos (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

Antioxidante é um composto que protege o sistema biológico contra o efeito nocivo de processos ou reações que podem causar oxidação excessiva (KRINSKY, 1994). O reino vegetal constitui uma importante fonte de produtos naturais que diferem amplamente em suas propriedades biológicas e estruturas químicas e que possuem efeito antioxidante. Os antioxidantes têm sido associados com redução do risco de doenças crônicas, como por exemplo, doenças cardiovasculares, câncer, diabetes, doença de Alzheimer e de Parkinson (LIN; CHANG, 2005).

As plantas podem conter grande variedade de moléculas sequestrantes de radicais livres, como compostos fenólicos das classes dos flavonóides, quinonas, cumarinas, lignanas e taninos. Pesquisas relatam que muitos desses compostos possuem atividades antioxidantes (REDDY; ODHAV; BHOOLA, 2003). Os flavonóides possuem alta reatividade que se expressa na sua afinidade com polímeros biológicos e sua capacidade de sequestrar radicais livres (ARGOLO et al., 2004).

Diversas técnicas têm sido utilizadas para determinar a atividade antioxidante “in vitro”, de forma a permitir uma rápida seleção de substâncias e/ou misturas potencialmente interessantes, na prevenção de doenças crônico-degenerativas. Dentre estes métodos destacam-se o sistema de co-oxidação do β -caroteno/ácido linoléico e o método de sequestro de radicais livres, tais como DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila). O método de oxidação do β -caroteno/ácido linoléico avalia a atividade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoléico. O método está fundamentado em medidas espectrofotométricas da descoloração (oxidação) do β -caroteno induzida pelos produtos de degradação oxidativa do ácido linoléico (HUANG; OU; PRIOR, 2005).

Igualmente ao sistema β -caroteno/ácido linoléico, o método de radicais livres está baseado no descoramento de uma solução composta por radicais estáveis DPPH de cor violeta quando da adição de substâncias que podem ceder um átomo de hidrogênio. Entretanto, o primeiro método determina a atividade de uma amostra ou composto de proteger um substrato lipídico da oxidação, enquanto que o método de inibição de radicais DPPH baseia-se na transferência de elétrons de um composto antioxidante para um oxidante (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

2.1.4 Atividade anti-inflamatória

O processo inflamatório agudo pode ser definido como um conjunto de alterações bioquímicas e celulares que ocorrem em resposta a estímulos inespecíficos, tais como infecções ou danos teciduais (HANSSON, 2005). A inflamação é uma resposta complexa do tecido vivo e vascularizado envolvendo eventos como retração de células endoteliais, aumento da permeabilidade vascular e do fluxo sanguíneo local, aumento da migração de granulócitos e células mononucleares, assim como proliferação de tecido granulomatoso (ARRUDA, 2008).

As reações inflamatórias locais são caracterizadas por quatro sinais típicos: rubor (hiperemia), tumor (edema), calor (aumento da temperatura local) e dor, como descritos por Cornelius Celsus, no início da era Cristã (GILROY et al., 2004). O quinto sinal da inflamação, que é a perda da função do tecido ou órgão lesado, associado com reações crônicas foi descrito posteriormente por VIRCHOW no século XIX (KALISCH, 1975). A resposta fisiológica observada no processo inflamatório está relacionada com a liberação de diferentes mediadores pró-inflamatórios, como aminas biogênicas (histamina e serotonina),

cininas (bradicininas), prostanóides (prostaglandinas), citocinas (TNF- α , IL-1 β e IL-6), fator de ativação plaquetária (PAF) e substância P (KIM et al., 2007).

A descoberta de novos fármacos a partir de plantas conduziu ao isolamento de muitas substâncias que ainda hoje são utilizadas clinicamente, ou então serviram como protótipos para a síntese de novos fármacos. Dentre os 40 fármacos anti-inflamatórios aprovados entre 1983 e 1994, 12 foram derivados ou baseados em polifenóis de origem natural. Estima-se que 40% dos medicamentos disponíveis na terapêutica atual foram desenvolvidos a partir de fontes naturais: 25% de plantas, 13% de microrganismos e 3% de animais. Dos fármacos aprovados no período entre 1981 e 2002, cerca de 60% eram produtos naturais ou foram desenvolvidos a partir destes (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2008).

Muitas plantas medicinais usadas popularmente para tratar condições inflamatórias apresentam polifenóis exibindo atividades anti-inflamatórias “in vitro” e “in vivo”. Os polifenóis são amplamente distribuídos na dieta humana, principalmente em derivados de plantas alimentares e bebidas (frutas, verduras, nozes, sementes, ervas, especiarias, chá e vinho tinto) e representam mais de 8000 estruturas fenólicas. Por um lado, os flavonóides e os taninos são os principais componentes deste grupo com mais de 4000 compostos (CURIN; ANDRIANTSITOHAINA, 2005).

Plantas ricas em taninos são empregadas na medicina tradicional para tratar feridas, queimaduras, inflamações e o poder antisséptico dos taninos podem ser explicados por sua capacidade de precipitar proteínas das células superficiais das mucosas e dos tecidos, formando uma camada protetora sobre a pele ou mucosa danificada, impedindo assim, o desenvolvimento de microrganismos (PANSERA et al., 2003).

Os taninos provavelmente exercem alguns dos seus papéis no tratamento médico de estados doentes em virtude de três características gerais, que todos eles possuem, em maior ou menor grau: (i) a sua complexação com íons metálicos (ferro, manganês, vanádio, cobre, alumínio, cálcio, etc.), (ii) a sua atividade antioxidante e contra radicais-livres, e (iii) a sua capacidade de formar complexos com outras moléculas, incluindo macromoléculas tais como proteínas e polissacarídeos (HASLAM, 1996).

Os flavonóides são encontrados também em várias plantas medicinais e medicamentos à base de plantas e têm sido utilizados na medicina popular. Contudo, parece que estes compostos são importantes não só para as plantas, mas também para os animais, incluindo seres humanos. Os flavonóides têm sido reportados por possuir atividades antiviral (CRITCHFIELD et al., 1994), antialérgica, antiplaquetária (CAROTENUTO et al., 1996), anti-inflamatória e antitumoral (LIM et al., 2006).

Os flavonóides possuem atividades anti-inflamatórias testadas “in vitro” e “in vivo”. Vários mecanismos de ação têm sido propostos para explicar a sua atividade “in vivo”. Muitos flavonóides exercem atividades antioxidantes e de redução dos radicais livres. Alguns derivados modulam as atividades de células da inflamação como mastócitos e linfócitos. Em particular, inibem a atividade de enzimas no metabolismo do ácido araquidônico; fosfolipase A₂ (PLA₂), ciclooxigenase (COX) e/ou Lipoxigenases (LOX). Investigações recentes têm também demonstrado que certos flavonóides, derivados principalmente da flavona, têm capacidade para regular a expressão de enzimas pró-inflamatórias como a COX-2 (uma isoforma induzível da COX) e induzível óxido nítrico sintase (iNOS), assim como os produtos da reação destas enzimas pró-inflamatórias, incluindo as prostaglandinas (PG) e óxido nítrico (NO) que são crucialmente envolvidas na inflamação (HAN et al., 2005).

2.1.5 Atividade antinociceptiva

A dor foi conceituada, em 1986, pelo Comitê de Taxonomia da Associação Internacional para o estudo da Dor (IASP) como uma subjetiva e desagradável experiência sensorial e emocional, que está normalmente associada a uma lesão tecidual atual ou potencial ou descrita em termos de tais lesões (PORRECA et al., 2002). A dor é uma experiência complexa que não envolve apenas a transdução do estímulo nociceptivo ambiental, mas também uma condição capaz de gerar alterações cognitivas e emocionais processadas pelo cérebro (JULIUS; BASBAUM, 2001).

Em uma descrição fisiológica da dor, pode-se considerar que ela tem importante papel no controle da homeostasia, atuando como um mecanismo de alerta do corpo informando que algo está ameaçando o bem-estar, possibilitando assim atenção para identificação e controle desta ameaça em potencial (WALL, 1999). Assim que o mecanismo de alerta é estabelecido, a ameaça de dor pode provocar uma resposta comportamental generalizada, respostas endócrinas (secreção de corticosterona) e ativação simpática (levando a elevações de pressão sanguínea e batimentos cardíacos), que, juntos com uma antinocicepção transitória, auxiliam o melhoramento do desempenho dos repertórios comportamentais, permitindo o afastamento de situações de risco com mais sucesso (MILLAN, 1999).

Contudo, a dor persistente perde sua utilidade como sistema de aviso e se torna crônica e debilitante (JULIUS; BASBAUM, 2001). Os transtornos dolorosos constituem um problema de saúde pública, podendo gerar repercussões que incapacitam ou limitam as atividades normais de um indivíduo, funcionando como um sistema de advertência que pode

tornar-se crônico (PORRECA et al., 2002). Os fenômenos mais frequentes relacionados aos quadros dolorosos são os estresses, a ansiedade, o medo e a depressão (TURP et al., 2004).

Uma distinção entre dor e nocicepção se faz necessária, pois o termo nocicepção pode ser definido como a percepção de uma lesão real sendo controlada por um sistema de receptores que transmitem informações sobre a lesão para o Sistema Nervoso Central através de fibras nervosas especializadas (KONTINEN et al., 2001). Por outro lado, o conceito de dor envolve tanto o componente sensorial, quanto o emocional (COUTAUX et al., 2005). Assim, enquanto a dor envolve a percepção de um estímulo aversivo e exige à capacidade de abstração e elaboração de impulsos sensoriais, a nocicepção refere-se às manifestações neurofisiológicas geradas pelo estímulo nocivo (ALMEIDA et al., 2004).

A transmissão da dor envolve uma interação complexa de estruturas centrais e periféricas desde a pele, vísceras ou outros tecidos até o córtex cerebral (FURST, 1999). A dor reflete a ativação de sensores, denominados nociceptores, por estímulos potencialmente perigosos que excedem a faixa fisiológica (MILLAN, 1999). Os nociceptores estão presentes na pele e em outros tecidos como terminações nervosas livres sensíveis a estímulos de diferentes origens, como mecânicos, térmicos e químicos, capazes de induzirem aumento da condução nervosa (TING et al., 2006). De fato, estudos eletrofisiológicos mostraram a existência de neurônios sensoriais primários que podem ser excitados por calor nocivo, pressão intensa ou irritantes químicos, mas não por estímulos inócuos como um leve toque (BURGESS et al., 1967).

Após a lesão tecidual ocorre à produção e liberação de mediadores inflamatórios pelos neurônios sensoriais e por células não neuronais como plaquetas, células sanguíneas, mastócitos, células endoteliais, fibroblastos e células de Schwann (BESSON, 1997). Esses mediadores podem agir sinergicamente potencializando a resposta nociceptiva ou ainda levar a uma sensibilização dos nociceptores promovendo uma hiperalgesia, que é definida como desvio à esquerda da curva estímulo-resposta que demonstra a magnitude da dor em resposta à intensidade do estímulo (RAJA et al., 1999).

Os nociceptores estão localizados nas terminações de fibras nervosas dos tipos A δ e C que, quando ativadas, sofrem alterações estruturais em sua membrana, o que permite a deflagração de potenciais de ação (AL-CHAER; TAUB, 2002). As fibras aferentes primárias são classificadas de acordo com critérios funcionais e anatômicos, entre eles velocidade de condução, diâmetro e grau de mielinização. As fibras A δ possuem uma camada fina de mielina, conduzem a resposta a uma velocidade de 2,5 a 20 m/s, e respondem principalmente a estímulos mecânicos ou térmicos. As fibras C não são mielinizadas, tem velocidade de

condução menor que 2,5 m/s e respondem a estímulos mecânicos, térmicos ou químicos. Admite-se que devido suas velocidades de condução, as fibras A δ mediarão à dor primária, que seria a dor aguda e cortante, e as fibras C mediarão à dor secundária, ou seja, a dor tardia e difusa. A dor visceral é única no sentido de que não existem os componentes primário e secundário; ao contrário, a dor visceral frequentemente é pouco localizada, profunda e lenta (JULIUS; BASBAUM, 2001).

A ativação dos nociceptores em resposta a estímulos nocivos leva à despolarização e geração de um potencial de ação que se propaga ao longo de toda a fibra (WOOLF; SALTER, 2000). A maior parte da estimulação destas fibras é produzida pela ativação de receptores específicos acoplados a cascatas de segundos mensageiros intracelulares e canais iônicos. Os canais iônicos responsáveis por correntes de entrada em nociceptores são principalmente os canais de cálcio dependentes de voltagem e os canais de sódio dependentes de voltagem, enquanto os canais de potássio são responsáveis por correntes de saída. Os canais de sódio são os principais responsáveis pela geração e condução de potenciais de ação em neurônios (BEVAN, 1999) e podem ser classificados em dois grandes grupos: os sensíveis à tetrodotoxina, que estão presentes nas fibras A δ , em todo sistema nervoso e no gânglio da raiz dorsal e os resistentes à tetrodotoxina, que são encontrados especialmente nas fibras C do gânglio da raiz dorsal (LAI et al., 2002).

Os nociceptores primários fazem sinapse no corno dorsal da medula espinhal com neurônios de segunda ordem (MORENILLA-PALAO et al., 2004). Os nociceptores chegam de maneira altamente organizada no corno dorsal da medula espinhal, com as fibras mielinizadas A δ terminando principalmente nas lâminas I e V e as fibras C, não mielinizadas, na lâmina II (MILLAN, 1999). Os neurônios sensoriais secundários são ativados pela liberação de glutamato e substância P dos aferentes primários, além disso, este processo excitatório também depende de canais de cálcio e sódio (HILL, 2001).

Os neurônios de segunda ordem formam tratos aferentes da medula espinhal que transmitem os impulsos nociceptivos para estruturas do tronco cerebral e diencéfalo, incluindo o tálamo, substância cinzenta periaquedutal, região parabraquial, formação reticular da medula, complexo amigdalóide, núcleo septal e hipotálamo, entre outras (ALMEIDA et al., 2004). Ali, neurônios de terceira ordem emitem axônios através da cápsula interna ao córtex somatosensorial onde ocorre a somatização do estímulo nocivo, ou emitem axônios ao giro cingulado anterior, envolvido com os componentes emocionais da dor (VALE, 2003).

O controle da transmissão da dor também está sujeito à modulação pelas vias descendentes originadas no tronco cerebral. Um circuito modulador endógeno descendente

conectando a substância cinzenta periaquedutal, incluindo o núcleo magno da rafe e estruturas adjacentes da medula rostral ventromedial e o corno dorsal da coluna é responsável pela ativação de conexões que promovem inibição ou facilitação da nocicepção (REN; DUBNER, 2002). A modulação descendente da informação nociceptiva envolve uma série de sistemas de neurotransmissores, dentre os quais podemos mencionar os sistemas opióide, serotoninérgico, noradrenérgico, gabaérgico, adenosinérgico, além de canabinóides endógenos entre outras substâncias (MILLAN, 2002).

Para o controle da dor e da inflamação são utilizados fármacos analgésicos, também denominados antiálgicos (CELOTTI; LAUFER, 2001). Pesquisas etnofarmacológicas tradicionais no uso de plantas para o alívio da dor são vistas como estratégia produtiva e lógica na procura por novas drogas analgésicas (ELISABETSKY et al., 1995).

Pode-se afirmar que ainda não se dispõe de um fármaco anti-inflamatório e antinociceptivo ideal, embora altamente eficazes, os analgésicos de ação central não podem ser dissociados de efeitos adversos importantes. E os analgésicos de ação periférica têm seu uso limitado devido a propriedades inerentes frequentemente não dissociáveis de efeitos indesejáveis tais como lesões do trato gastrointestinal e renal (FERREIRA, 1993).

Nas últimas décadas muitos esforços têm sido feitos na procura de novas drogas analgésicas. Estima-se que os analgésicos sejam a maior categoria terapêutica, entretanto buscam-se compostos com maior ação e menores efeitos colaterais. Os produtos naturais são importantes fontes de novas substâncias químicas analgésicas (ELIZABETSKY; CASTILHOS, 1990).

2.2 *ANADENANTHERA MACROCARPA* (BENTH) BRENAM

O gênero *Anadenanthera* pertence à subfamília Mimosoideae da família *Leguminosae*. Inicialmente proposta por Brenan em 1955, consistia de quatro espécies, anteriormente incluídas no gênero *Piptadenia* devido às semelhanças morfológicas. Tem como sinônimas botânicas: *A. colubrina* ou *Piptadenia colubrina* (CARVALHO, 1994; PESSOA, 2008). Em 1964, o pesquisador Altschul em sua revisão taxonômica sobre o gênero *Anadenanthera*, o considerou composto de apenas duas espécies, *A. peregrina* (L.) Speg. e *A. colubrina* (Vell.) Brenan. É conhecida popularmente como: angico, angico branco, angico preto, angico vermelho, angico de casca, arapiraca e cambuí-angico (LORENZI, 1998).

A *A. macrocarpa* é a espécie de angico com a maior distribuição geográfica (CARVALHO, 1994). É nativa das florestas tropicais da América do Sul, estando

amplamente distribuída no Norte da Colômbia e em ampla parte do Brasil, ocorrendo desde o Maranhão até o Paraná, crescendo em altitudes superiores a 400 m (DELGLOBO et al., 1998).

O angico está entre as espécies nativas do Semi-Árido que se encontra em risco de extinção, apesar de ser uma espécie de ampla ocorrência, facilmente adaptada a diversos tipos de ambiente (RODRIGUES et al., 2007) e apresentar expressiva regeneração natural (GONÇALVES et al., 2008). Entretanto possui grande demanda no mercado, sendo utilizada como planta ornamental, fornecedora de tanino, energética, resinífera, madeireira e, inclusive, medicinal. Esse uso intenso, até por indústrias, coloca em risco a existência dessa e de outras espécies, aliado à ausência de cultivos ou de métodos de propagação (RODRIGUES et al., 2007).

2.2.1 Aspecto da planta

Quanto às suas características morfológicas, esta espécie é uma árvore (Figura 1) que pode chegar até 25 m de altura, 90 cm de diâmetro, possui copa ampla ou reduzida, tronco reto, com casca marrom-clara, quase lisa (PAULA; ALVES, 1997). Suas folhas (Figura 2a) são compostas bipinadas, com 15 a 20 jugas, folíolos opostos de 4-6 mm de comprimento com 20-80 jugos (LORENZI, 1998).

A inflorescência é alva, as flores são hermafroditas e reunidas em glomérulos globosos, aromáticas com 10 estames livres (MACHADO et al., 2006), sendo estas melíferas, brancas e pequenas, que florescem a partir do mês de novembro, prolongando-se até janeiro (LORENZI, 1998). Os frutos, Figura 2b e c, são de vagem comprida e estreita, entretanto a maturação ocorre durante os meses de julho a agosto, possuindo grande quantidade de sementes viáveis (LORENZI, 1998), de cor castanho-avermelhado, planos e curvos ou sinuosos, ápice mucronado, com superfície rugosa. Cada fruto contém de oito a quinze sementes, coloração castanho a pardo-avermelhadas escuras, brilhantes, arredondadas, achatadas, sem asas, com cerca de 2 cm de diâmetro (Figura 2d) (MACHADO et al., 2006).

2.2.2 Composição química e usos medicinais

O angico se tornou um dos mais utilizados inebriantes xamânicos nas tribos indígenas da América do Sul. No Brasil, a espécie era chamada de Kurupá pelos índios Tupí-Guaraní, Aimpê e Aimpã pelos índios da tribo Tupari.



Figura 1 – Árvore de *Anadenanthera macrocarpa* (Benth) Brenan adulta (Local: Departamento Nacional de Infra-Estrutura de Transportes do Distrito Federal) (PRESTE, 2007).

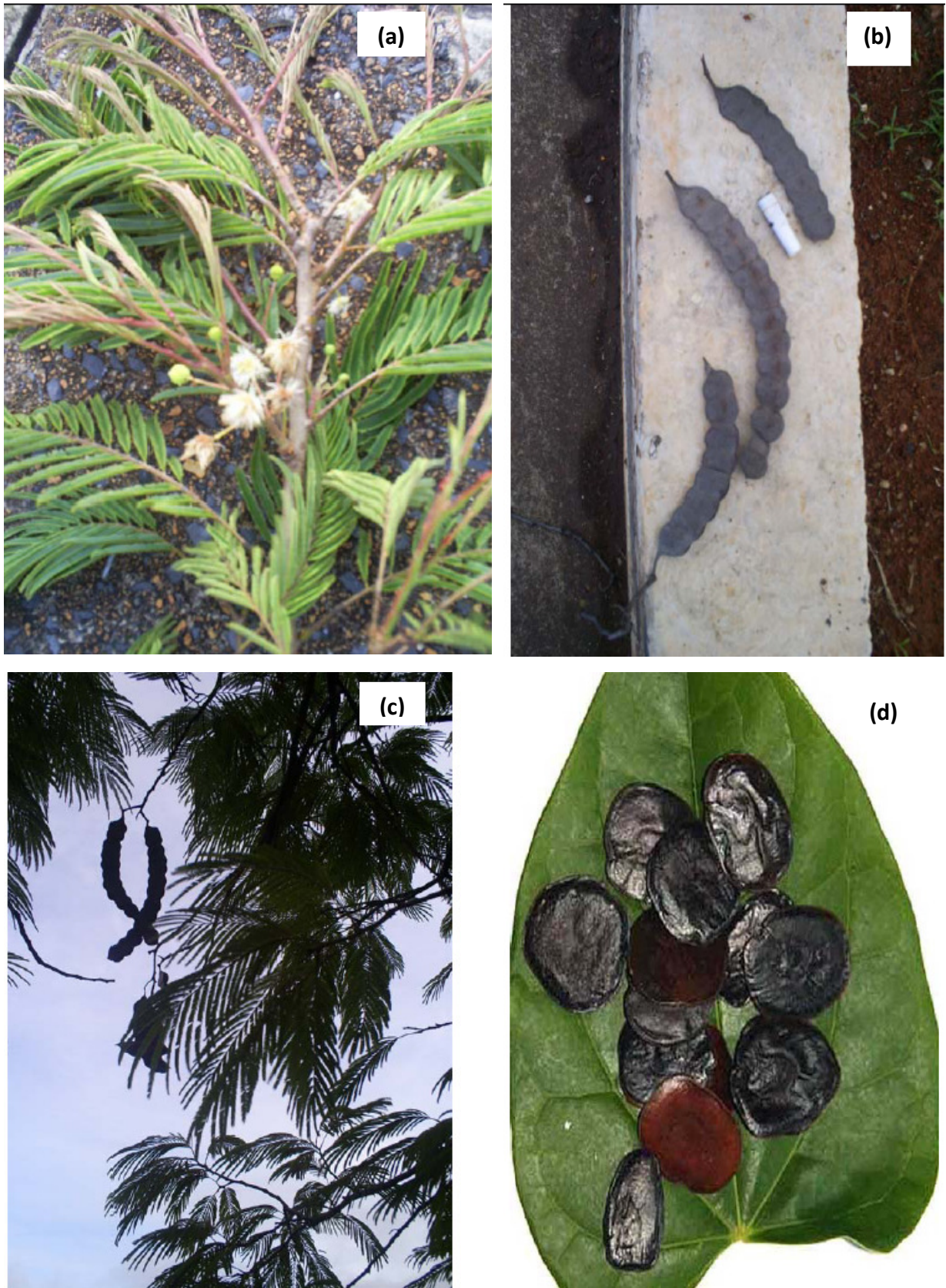


Figura 2 – Folhas e inflorescência (a), frutos (b), frutos antes da dispersão (c) e sementes (d) de *Anadenanthera macrocarpa* (Benth) Brenan adulta (Local: Departamento Nacional de Infra-Estrutura de Transportes do Distrito Federal) (PRESTE, 2007).

A utilização do angico por tribos indígenas brasileiras em suas cerimônias místico-religiosas despertou a curiosidade de pesquisadores quanto à possíveis efeitos narcóticos relacionados com o uso dessa espécie vegetal. Os índios utilizavam as sementes torradas e pulverizadas, sendo consumidas na forma de rapé. Foi constatado que as sementes são ricas em alcalóide (TORRES; REPKE, 2006).

O uso popular da *A. macrocarpa* foi avaliado por Monteiro e colaboradores (2006), verificando-se que a sua maior aplicação medicinal está ligada ao tratamento de problemas respiratórios e de inflamações de um modo geral, sendo a entrecasca a parte mais utilizada. Várias propriedades medicinais são atribuídas à goma de angico, que incluem o tratamento de infecções respiratórias, como a pneumonia e a bronquite, uso como abortivo, no tratamento de constipação e dores de cabeça (TORRES; REPKE, 2006), e também vem sendo empregado no tratamento de anginas, diarréias, leucorréia, gonorréia e ulcerações da pele (PIO CORRÊA, 1978).

A utilização de produtos farmacêuticos da espécie *A. macrocarpa*, como o medicamento distribuído no Brasil com o nome comercial de Elixir Sanativo®, por exemplo, origina-se das propriedades adstringentes de sua casca (PAULA, 1981). A tintura de angico faz parte do produto fitoterápico Sanativo®, que é constituído a partir da associação dos extratos etanólicos de espécies vegetais nativas da região Nordeste do Brasil. Na sua composição estão presentes 20% de angico (*A. macrocarpa*), 20% de aroeira (*Schinus terebinthifolius*), 1,7% de camapu (*Physalis angulata*) e 1,7% de mandacaru (*Cereus peruvianus*). Este produto tradicional é produzido desde 1888 pela empresa Laperli (Laboratório Pernambucano Ltda.), tem seu efeito terapêutico anti-inflamatório relacionado às propriedades farmacológicas apresentadas pelas espécies vegetais que constituem sua fórmula (ARRUDA, 2008).

O conhecimento químico do gênero *Anadenanthera* é extenso, reflexo de aproximadamente de um século de interesse econômico e alguns 200 anos de interesse científico (TORRES; REPKE, 2006). As espécies deste gênero são bem conhecidas por demonstrarem elevadas concentrações de tanino, particularmente na sua entrecasca (GUTIERREAZ-LUGO et al., 2004). A espécie *A. macrocarpa* apresenta casca amarga, adstringente com aproximadamente 32% de tanino, sendo este constituinte fitoquímico considerado o principal responsável pelas atividades terapêuticas da espécie (PIO CORRÊA, 1978). Os taninos são utilizados pelas plantas contra herbívoros (HARBONE; PALO; ROBBINS, 1991). Foi avaliada a concentração de taninos presentes na *A. macrocarpa*, em diferentes épocas do ano e verificou-se que a entrecasca e as folhas apresentam maiores teores

de taninos (7,2 e 15,3%, respectivamente) na estação mais seca do ano (MONTEIRO et al., 2006).

Outros trabalhos também revelaram a presença do alcalóide indólico bufotenina na concentração de 2,1%, em extrato etanólico de suas sementes. Além do mais, desta espécie é extraído um exsudado gomoso, a “goma arábica”, que é um complexo heteropolissacarídeo ácido formado principalmente por moléculas de galactose e arabinose, sendo esta estrutura denominada de “aragal”, empregada na indústria e contra infecções pulmonares e das vias respiratórias (DELGLOBO et al., 1998). Em estudos das partes aéreas desta espécie foi isolado um novo flavonóide denominado de anadantoflavona, e mais 11 compostos já conhecidos: alnusenol, lupenona, lupeol, ácido betunílico, α -amirina, β -amirina, β -sitosterol, estigmasterol, apigenina, ácido 4-hidroxibenzóico e ácido cinâmico (GUTIERRES-LUGO et al., 2004).

A anadantoflavona isolada das partes da *A. macrocarpa* demonstrou atividade anti-inflamatória por meio de uma ação inibitória sobre as atividades das Lipoxigenases 12 e 15, presentes nas plaquetas e nos retículos humanos, apresentando valores de Concentração Inibitória média (IC₅₀) de $13 \pm 3 \mu\text{M}$ e $17 \pm 3 \mu\text{M}$, respectivamente. A lupenona, o lupeol e a α -amirina também demonstraram relativa atividade inibitória da ação das Lipoxigenases. A apigenina inibiu seletivamente a atividade da 15-lipoxigenase, com IC₅₀ de $40 \pm 1 \mu\text{M}$ (GURIERREZ-LUGO et al., 2004). Além do mais, a apigenina é considerada um potente inibidor das glicosiltransferases, afetando o acúmulo de *S. mutans* por meio da redução da formação de glucanos insolúveis e pelo aumento do conteúdo de glucanos solúveis da matriz de polissacarídeos nos biofilmes “in vitro” (KOO et al., 2006).

Um estudo realizado por Moretão e colaboradores (2004), com o Aragal, isolado da goma do angico foi estudado quanto aos seus efeitos imunomoduladores e antitumorais. Observou-se um aumento no recrutamento de macrófagos, uma atividade pró-oxidante, além do mais, o aragal também promoveu um crescimento na produção do Fator de Necrose Tumoral (TNF- α) pelos macrófagos. Na concentração de 100 mg/kg, o aragal mostrou atividade antitumoral contra tumores sólidos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as atividades antimicrobiana, antiaderência, antioxidante, anti-inflamatória e antinociceptiva de *Anadenanthera macrocarpa* (Benth) Brenan do semiárido da Bahia, coletadas na região da Floresta Nacional Contendas do Sincorá (FLONA), segundo dados etnofarmacológicos da região.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Estudar a atividade antimicrobiana “in vitro” dos extratos etanólicos da casca, galho e folha e suas respectivas frações de hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol;
- b) Avaliar a atividade antiaderente “in vitro” dos extratos etanólicos da casca, galho e folha;
- c) Investigar a atividade antioxidante “in vitro” dos extratos etanólicos da casca, galho e folha;
- d) Analisar as atividades anti-inflamatória e antinociceptiva “in vivo” do extrato etanólico da casca de *A. macrocarpa* (Benth) Brenan.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE VEGETAL

Para o desenvolvimento desta pesquisa, a espécie vegetal estudada foi *Anadenanthera macrocarpa* (Benth) Brenan, conhecida popularmente como angico. Essa planta foi escolhida para o estudo devido ao uso medicinal pela população local de Contendas do Sincorá, previamente avaliado por meio de um estudo etnofarmacológico (DUARTE et al., 2008).

Os estudos etnofarmacológicos e etnobotânicos foram realizados na região de caatinga de Contendas do Sincorá (Bahia). Nessa etapa foram realizadas entrevistas e aplicação dos questionários com a população local. Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (processo N° 053/2007), tendo sido avaliado o questionário aplicado à população juntamente com o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

A espécie vegetal foi coletada na Floresta Nacional Contendas do Sincorá (FLONA), que é uma área com cobertura florestal de espécies predominantemente nativas e tem como objetivo básico o uso múltiplo sustentável dos recursos florestais e a pesquisa científica, com ênfase em métodos para exploração sustentável de florestas nativas. Essa área de preservação ambiental já foi estudada quanto à composição da cobertura vegetal de 11.034,34 hectares.

Para a coleta da planta, foi concedido pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), o Registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico (N 12292-1) e a Autorização para atividade com finalidade científica (N 13258-1). A espécie coletada foi fotografada, e devidamente localizada e catalogada, e depositada no Herbário da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), campus de Vitória da Conquista, sob coordenação do Prof. MSc. Avaldo de Oliveira S. Filho. As exsiccatas foram preparadas seguindo as orientações de Mori e colaboradores, (1989) e a identificação taxonômica feita por comparação no herbário e através de literatura.

4.2 PREPARO DOS EXTRATOS, FRACIONAMENTO E CROMATOGRAFIA DE CAMADA FINA

Extratos etanólico foram preparados separadamente a partir das partes da planta seca e moída, por maceração com etanol, agitando esporadicamente. Após filtração, os extratos foram concentrados em evaporador rotativo até eliminação do etanol, fornecendo os extratos

para os testes. Os extratos foram particionados com solvente de polaridade crescente dando origem as frações de hexano, diclorometano, acetato de etila, e butanol que foram também testados. (YATSUDA et al., 2005; CELEGHINI; VILEGAS; LANCAS, 2001; VILEGAS; MARCHI; LANCAS, 1997; DUARTE et al., 2003).

Foi realizada a técnica de cromatografia em camada fina para comparação das amostras obtidas. Para isso, as amostras foram preparadas na concentração de 10 mg/mL em solvente apropriado e aplicadas com volume de 10 µL em bandas de 7 mm em lâmina de alumínio sílica gel. A placa foi eluida com sistema de solvente apropriado em cuba de vidro. Depois de eluida e seca a placa foi observada em câmara de ultravioleta (MATOS, 1988).

4.3 ESTUDO ANTIMICROBIANO

4.3.1 Microrganismos

Os microrganismos utilizados na determinação da concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima foram *Streptococcus mutans* UA159, *Streptococcus mutans* Ingbritt 1600, *Streptococcus sobrinus* 6715, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145 (YATSUDA et al., 2005).

4.3.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

As suspensões bacterianas foram inoculadas em proporção 1:1000 do meio BHI (Brain Heart Infusion), de modo a obter uma concentração bacteriana em torno de $1-2 \times 10^5$ UFC/mL. Após a homogeneização, foi colocado um volume de 190 µL do inóculo e 10 µL dos extratos das plantas medicinais, com as concentrações finais variando entre 1000 a 31,25 µg/mL, com diluição seriada em razão 2. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa em condições pré-estabelecidas para cada microrganismo. A CIM foi considerada a menor faixa de concentração dos extratos que inibiu completamente o crescimento bacteriológico visível, sendo confirmada a inibição com o corante resazurina (Yatsuda et al., 2005).

4.3.3 Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Para a determinação da CBM foram utilizadas placas de Petri contendo meio de cultura BHI ágar. Uma alíquota de 20 µL das suspensões utilizadas no teste da CIM foi inoculada em placas BHI ágar. A CBM foi a menor concentração que causou 99,9% de morte celular, ou seja, sem crescimento bacteriano visível sobre o ágar (Yatsuda et al., 2005).

4.4 ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIADERENTE

4.4.1 Inibição da Aderência Celular de *Streptococos* do grupo *mutans* e *sobrinus* à superfície

A Concentração Inibitória Mínima de Aderência (CIMA) da bactéria ao vidro foi determinada na presença de sacarose a 1%, usando-se concentrações sub-CIM. As suspensões bacterianas de *S. mutans* UA159 e *S. sobrinus* 6715 foram inoculadas por microdiluição no meio BHI, de modo a obter uma concentração bacteriana em torno de $1-2 \times 10^5$ UFC/mL. Em seguida, os tubos foram incubados em estufa, inclinação de 30°, em condições pré-estabelecidas para cada microrganismo. A concentração inibitória da aderência celular desses microrganismos foi considerada a menor faixa de concentração dos extratos em que não houve aderência a superfície de vidro, indicado por meio de cristal de violeta 1% (CURRAN et al., 1998; KOO et al., 2002; DUARTE et al., 2003; YATSUDA et al., 2005).

4.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

4.5.1 Autoxidação do sistema β-caroteno/ácido linoléico

A medida da atividade antioxidante pela oxidação acoplada do beta-caroteno e do ácido linoléico, foi realizada de acordo com o método de Emmons et al. (1999), com algumas modificações. Pesou-se 10 mg de β-caroteno, os quais foram dissolvidos em 100 mL de clorofórmio. Após isto, retirou-se uma alíquota de 3 mL da solução clorofórmio/beta-caroteno e adicionado 40 mg de ácido linoléico e 400 mg de Tween 40. Em seguida, o clorofórmio foi removido com a utilização de uma corrente de gás nitrogênio e o resíduo obtido redissolvido em 100 mL de água aerada por 30 minutos. Alíquotas de 3 mL da emulsão β-caroteno/ácido

linoléico foram misturadas com 50 μ L dos extratos da planta, e incubadas em banho-maria a 50°C. A oxidação da emulsão foi monitorada em espectrofotômetro a 470 nm, no tempo inicial e em intervalos de 20 minutos durante 2 horas. Para a amostra controle utilizou-se solvente no lugar do extrato da planta. Foram utilizados padrões de BHT e alfa-tocoferol em concentrações de 90 μ g/mL. A atividade antioxidante foi expressa como percentual de inibição relativa comparada ao controle depois de 20 e 120 minutos usando a equação descrita por Emmons e colaboradores (1999).

4.5.2 Atividade sequestrante do radical DPPH

A medida da capacidade sequestrante a ser determinada pelo método DPPH baseou-se no princípio de que o DPPH, sendo um radical livre estável de coloração violeta, aceita um elétron ou um radical hidrogênio para tornar-se uma molécula neutra, sendo reduzido na presença de um antioxidante e adquirindo coloração amarela (Mensor et al., 2001). Foram utilizados padrões de α -tocoferol e hidroxitolueno de butila (BHT) na concentração de 90 μ g/mL. A mistura de reação foi constituída pela adição de 500 μ L dos padrões ou extratos da planta, 3,0 mL de etanol 99% e 300 μ L do radical DPPH em solução de etanol 0,5 mM e incubada por 45 minutos, em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. A atividade antirradical foi determinada na forma de atividade antioxidante, pela equação demonstrada por Mensor e colaboradores (2001). O controle negativo foi feito substituindo-se o volume do extrato por igual volume do solvente utilizado na extração. O branco foi preparado substituindo o volume da solução de DPPH por igual volume de solvente.

4.6 MODELOS EXPERIMENTAIS PARA A AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA

4.6.1 Animais

Foram utilizados nos experimentos camundongos *Balb-C* machos, pesando entre 20-25g. Os animais permaneciam climatizados, sob o ciclo claro e escuro (12 h claro/12 h escuro), com temperatura controlada (22 ± 2 °C) e livre acesso à água e comida. Os camundongos foram homogeneamente distribuídos entre os grupos. Todos os animais utilizados foram climatizados no laboratório pelo menos uma hora antes dos testes, realizados

na fase clara do ciclo. O número de animais e a intensidade dos estímulos utilizados foram os mínimos necessários para demonstrar de forma consistente o efeito dos tratamentos.

4.6.2 Teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético

O efeito antinociceptivo foi avaliado pelo teste de contorção abdominal induzida por ácido acético 0,6% (0,1 mL/10 g, i.p.), de acordo com procedimentos previamente descritos por Koster, Anderson e Beer (1959) e Vacher, Duchêne-Marullaz, Barrat (1964). Os animais foram tratados com extrato etanólico da casca (50, 100 ou 200 mg/kg, s.c.) ou veículo (etanol 10%, v/v) 30 minutos antes da injeção de ácido acético. Os animais do controle negativo receberam somente solução salina 0,9% (i.p.). Os ratos foram colocados em caixas separadas e depois da administração do ácido acético, o número de contorções e movimentos de alongamento (contração da musculatura abdominal e extensão dos membros posteriores) foram contados a cada 5 min por um período de 30 min.

4.6.3 Nociceção induzida pela injeção intraplantar de formalina em camundongos

O modelo de nociceção induzida pela formalina permite avaliar dois tipos distintos de nociceção: a de origem neurogênica (estimulação direta das fibras nociceptivas) e a de origem inflamatória (caracterizada pela liberação de mediadores inflamatórios). O comportamento de nociceção induzido por formalina foi avaliado como descrito anteriormente (TJÖLSEN et al., 1992). Um volume de 20 µL de solução de formalina 1,5% foi injetado intraplantarmente (i.pl.) na superfície ventral da pata direita dos animais pré-tratados 30 min antes com extrato etanólico da casca (50, 100 ou 200 mg/kg, s.c.), veículo (10% etanol, v/v, s.c.), indometacina (10 mg/kg, s.c.) ou morfina (5 mg/kg, s.c.). Os camundongos foram observados individualmente durante 30 min após a injeção de formalina e o comportamento da nociceção foi determinado pelo número de elevações da pata, mordidas e lambidas na pata injetada, contados durante o período de tempo de observação. A fase 1 (neurogênica) foi definida como 0-15 min após a injeção, e a fase 2 (inflamatória) foi definida como 15-30 min após a injeção. Após o final do experimento, as patas posteriores foram removidas e pesadas em uma balança analítica. O peso da pata que recebeu formalina foi diminuído do peso da pata que não recebeu injeção, a fim de determinar a formação de edema. Os resultados foram expressos como g.

4.6.4 Procedimento experimental para avaliar a migração de neutrófilos

Para a determinação da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal, o extrato etanólico da casca (50, 100 ou 200 mg/kg) foi administrado por via subcutânea 30 minutos antes da administração do estímulo inflamatório, uma injeção intraperitoneal de Carragenina (Cg), 500 µg/cavidade. Os camundongos foram sacrificados 4 h após a administração de Cg e as células da cavidade peritoneal foram coletadas por lavagem da cavidade com 3 mL de tampão fosfato (PBS) contendo EDTA 1 mM (NUNES et al., 2009). O volume recuperado foi semelhante em todos os grupos experimentais e correspondeu a aproximadamente 95% do volume injetado. A contagem total foi realizada em câmara de Neubauer e a contagem diferencial de células (100 células no total) foi realizada em lâminas preparadas em citocentrífuga e coradas com panótico (PRESVAC[®] CT12, Curitiba, Brasil) e as lâminas foram coradas com Panótico (Laborclin, Brasil). Os resultados são apresentados como o número de neutrófilos por cavidade.

4.6.5 Avaliação da permeabilidade vascular

A permeabilidade vascular foi analisada pelo teste de azul de Evans (THURSTON et al., 2000). Quinze minutos antes da administração do extrato etanólico da casca, o corante azul de Evans (50 mg/kg) diluído em 50 µL de solução salina foi injetado por via venosa no plexo ocular. O extrato etanólico da casca (100 mg/kg) foi administrado por via subcutânea 30 minutos antes do estímulo inflamatório (injeção intra-peritoneal de Cg, 500 µg/cavidade). Os camundongos foram sacrificados 4 h após a administração de Cg e a cavidade peritoneal foi lavada com 3 mL de PBS. O conteúdo do azul de Evans (o extravasamento de proteína) foi calculado usando uma curva padrão de azul Evans e a absorbância de cada amostra foi medida em 620 nm usando um espectrofotômetro (Genesys[®], Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA) (ALVES et al., 2008).

4.6.6 Detecção de citocinas por ELISA

Os camundongos receberam extrato etanólico da casca (100 mg/kg, s.c.) ou veículo (etanol 10%, v/v), após 2 h do estímulo Cg (500 µg/cavidade), o exsudato peritoneal foi recuperado para a quantificação das citocinas. Os níveis de fator de necrose tumoral (TNF)-α

e interleucina (IL)-10 foram determinados por ELISA, utilizando protocolos fornecidos pelo fabricante (R&D Systems[®], Minneapolis, EUA) para ambos os experimentos. Os resultados são expressos em pg/mL.

4.6.7 Teste de Von Frey

O limiar de nocicepção mecânica foi medido pelo método de von Frey eletrônico, conforme descrito (NAPIMOGA et al., 2007). Em uma sala silenciosa, os camundongos foram colocados em gaiolas de acrílico (12 x 20 x 17 cm) com piso de grade de arame, 30 min antes do experimento. O teste consistiu de produzir uma pressão na pata do animal com um transdutor de força de mão adaptado com uma ponta (0,8 mm² diâmetro da ponta, eletrônica de Von Frey, Insight Equipamentos[®], Brasil). Um espelho inclinado sob a grade proporcionou uma visão clara da pata camundongos. O estímulo foi automaticamente interrompido, e sua intensidade foi registrada quando a pata foi retirada. O intervalo entre dois ensaios consecutivos na mesma pata foi de pelo menos 1 min, totalizando seis ensaios de cada animal. A força máxima aplicada foi de 50g. Os camundongos foram pré-tratados com extrato etanólico da casca 100 mg/kg (s.c.) ou veículo (etanol 10%, v/v) e depois de 30 min, foi injetado Cg (100 µg/pata, i.pl.) na superfície ventral da pata dos animais. Após três horas o teste Von Frey foi realizado.

4.6.8 Ensaio da atividade de Mieloperoxidase

A extensão do acúmulo de neutrófilos na pata foi medido por ensaio de atividade da mieloperoxidase, como descrito anteriormente (NUNES et al., 2009). Após o teste de Von Frey, o tecido da pata foi retirado e homogeneizado em tampão pH 4,7 (0,1 M NaCl, 0,02 M NaPO₄, 1,015 M NaEDTA), seguido por centrifugação a 3000 × g por 15 min. O precipitado foi submetido a lise hipotônica (1,5 mL de solução de NaCl 0,2%) e após 30 segundos, adição de igual volume de uma solução contendo NaCl 1,6% e glicose 5%. Após nova centrifugação, o sedimento foi ressuspensão em 0,05 M de tampão NaPO₄ (pH 5,4) contendo brometo de hexadeciltrimetilamônio 0,5%. Depois disso, o tecido foi congelado em nitrogênio líquido por três vezes e centrifugado a 10.192 × g por 15 min e homogeneizado. A atividade da mieloperoxidase no sedimento ressuspensão foi determinada pela variação de densidade óptica a 450 nm usando luminol (1,6 mM) e H₂O₂ (0,5 mM). Os resultados foram calculados através

da comparação da densidade óptica do sobrenadante do tecido da pata com uma curva padrão de números de neutrófilos (pureza > 95%).

4.6.9 Medida do edema de pata em camundongos

A atividade anti-inflamatória foi estudada usando o modelo de edema de pata induzido por Cg 1%, administrada em volume de 0,1 mL/animal na região subplantar da pata direita dos camundongos (WINTER; RISLEY; NUSS, 1962). O volume da pata foi medido pela retirada da coluna de água usando um hidropletismômetro (modelo 7150, Ugo Basile[®], Varese, Itália), no momento 0 e os intervalos de 1, 2, 4, 24, 36 e 72 h imediatamente após a injeção de Cg subplantar. O extrato etanólico da casca, nas doses de 100 mg/kg de dexametasona (300 mg/kg) e controle (solução salina 0,9%) foram administrados (s.c.) 30 minutos antes do agente edematogênico a diferentes grupos de animais para cada tratamento (n = 9/grupo). Os dados obtidos para os vários grupos foram relatados como média \pm D.P. e expresso em mililitros.

4.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foram realizadas triplicatas de três experimentos distintos para os testes de atividade antimicrobiana e antioxidante (n = 9). Os dados obtidos foram submetidos inicialmente a uma análise exploratória para determinação do melhor teste estatístico, sendo em seguida aplicado o teste mais conveniente para cada análise do presente trabalho. Os resultados obtidos foram expressos em média \pm D.P. e foi realizada comparação estatística entre os grupos usando análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, seguida do teste de Bonferroni, usando o programa GraphPad Prism[®] versão 5.00. Valores foram considerados significantes quando $P < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 RENDIMENTOS DOS EXTRATOS E DAS FRAÇÕES DE *A. MACROCARPA*

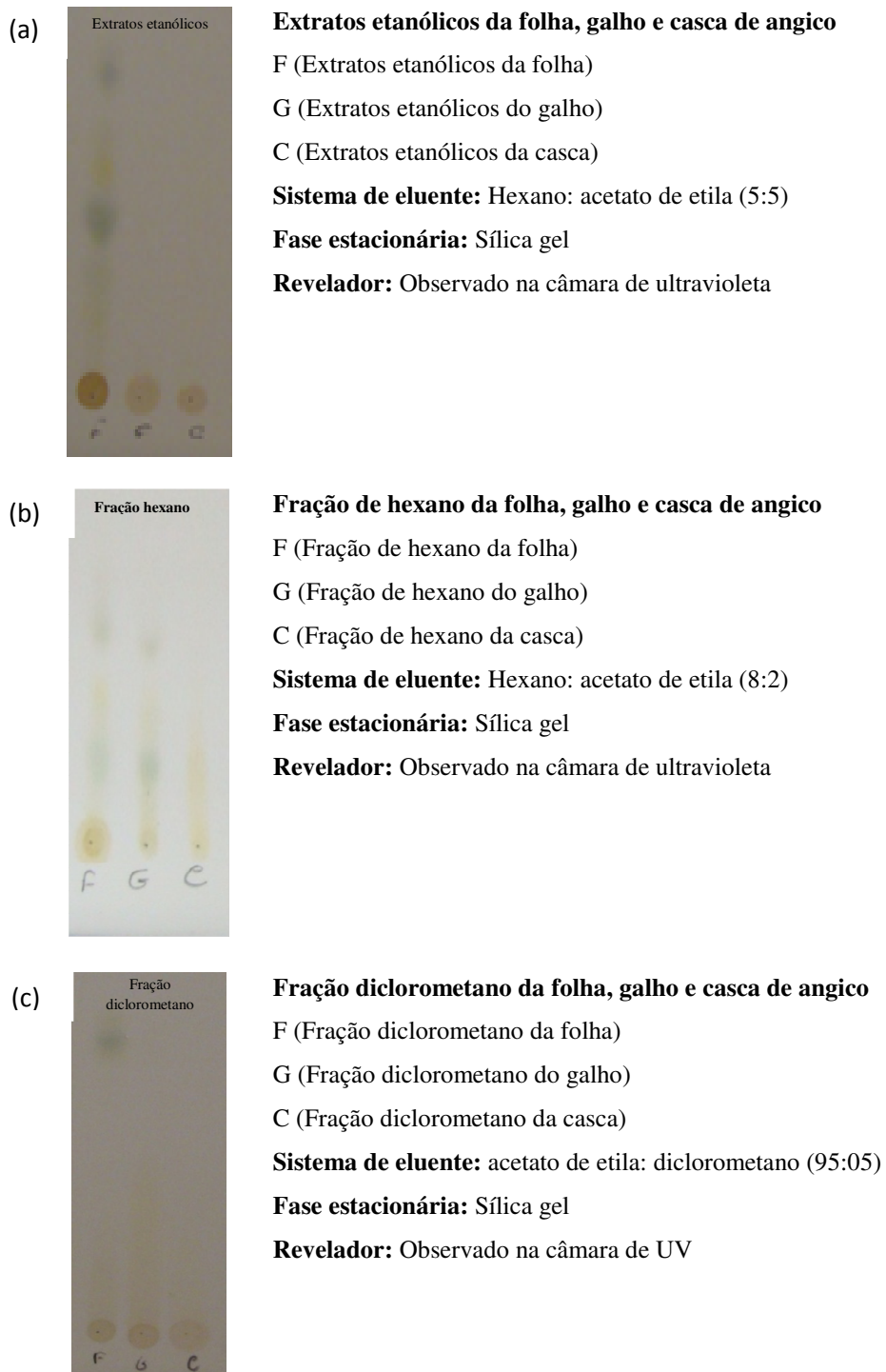
Os extratos etanólicos da casca, galho e folha de *A. macrocarpa*, após filtração, foram concentrados, obtendo-se os extratos etanólicos brutos (Tabela 1) com rendimentos de 8,43% da casca, 12,57% do galho e 23,64% da folha, em relação ao peso da planta seca. Logo em seguida, aproximadamente 20g de cada extrato bruto foi submetido à extração por partição, seguindo gradiente crescente de polaridade, hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol. Após a evaporação, foram obtidas quatro frações de cada um dos extratos brutos com os seguintes rendimentos: 2,29% (hexano), 4,02% (diclorometano), 70,91% (acetato de etila) e 14,91% (butanol) da casca; 3,15% (hexano), 6,11% (diclorometano), 37,17% (acetato de etila) e 8,22% (butanol) do galho; e 23,71% (hexano), 2,21% (diclorometano), 50,49% (acetato de etila) e 16,06% (butanol) da folha, em relação ao peso do extrato bruto (Tabela 1). Observa-se que as frações de acetato de etila possuem um maior rendimento para as três partes, casca, galho e folha.

Tabela 1 – Rendimentos dos extratos etanólicos e de suas respectivas frações de hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol obtidos da casca, galho e folha de *Anadenanthera macrocarpa*.

Rendimento dos extratos/fração		
Parte da planta	Extratos/Fração	Rendimento (%)
Casca	Etanólico	8,43
	Hexano	2,29
	Diclorometano	4,02
	Acetato de etila	70,91
	Butanol	14,91
Galho	Etanólico	12,57
	Hexano	3,15
	Diclorometano	6,11
	Acetato de etila	37,17
	Butanol	8,22
Folha	Etanólico	23,64
	Hexano	23,71
	Diclorometano	2,21
	Acetato de etila	50,49
	Butanol	16,06

5.2 CROMATOGRAFIA DE CAMADA FINA

A figura 3 traz a cromatografia de camada fina dos extratos etanólicos (a) da folha, galho e casca de angico e de suas frações de hexano (b), diclorometano (c), acetato de etila (d) e butanol (e).



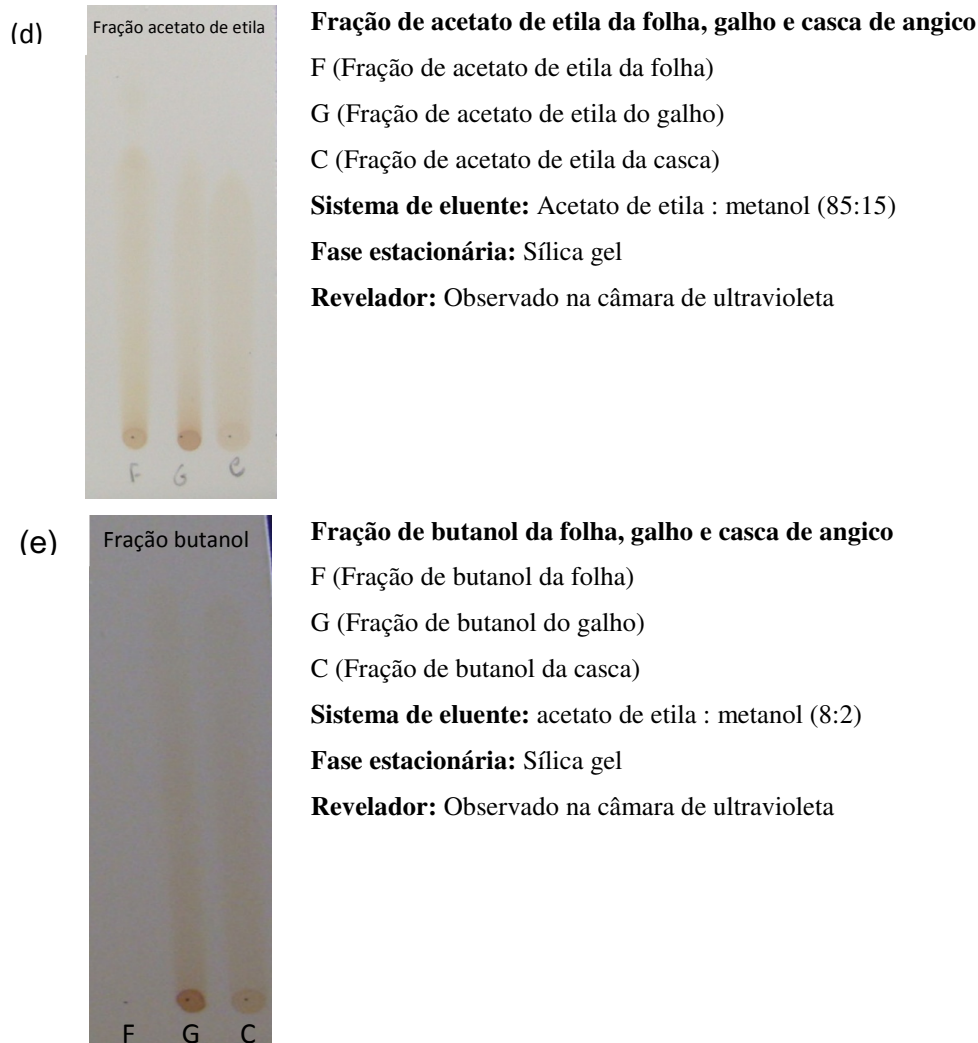


Figura 3 – Cromatografia de camada fina dos extratos etanólicos (a) da folha, galho e casca e de suas respectivas frações de hexano (b), diclorometano (c), acetato de etila (d) e butanol (e). As amostras foram preparadas na concentração de 10 mg/mL em solvente apropriado e aplicadas com volume de 10 μ L em bandas de 7 mm em lâmina de alumínio sílica gel. A placa foi eluída com sistema de solvente apropriado em cuba de vidro. Depois de eluída e seca observou-se em câmara de ultravioleta.

5.2 ESTUDO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA “IN VITRO” DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DA CASCA, GALHO E FOLHA E SUAS RESPECTIVAS FRAÇÕES DE *A. MACROCARPA*

Para avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos e frações de angico, foram feitos ensaios qualitativos por meio dos testes de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM). Os resultados de CIM e CBM encontrados na avaliação do extrato etanólico da casca e das frações de hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol da casca de angico com as bactérias *S. mutans* UA159, *S. mutans* Ingbritt 1600, *S. sobrinus* 6715, *E. faecalis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* estão na Tabela 2.

Tabela 2 – Atividade antimicrobiana do extrato etanólico da casca e suas frações de hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol de *Anadenanthera macrocarpa* (Benth) Brenan pelos ensaios de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) frente às bactérias *S. mutans* UA159, *S. mutans* Ingbritt 1600, *S. sobrinus* 6715, *E. faecalis* ATCC 29212, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 10145 e *S. aureus* ATCC 25923.

MICROORGANISMO	TESTE	EXTRATO/FRAÇÕES DA CASCA				
		Etanólico	Hexano	Diclorometano	Acetato de etila	Butanol
<i>S. mutans</i> UA159	CIM*	250	125	1000	62,5	1000
	CBM*	250	#	#	500	#
<i>S. mutans</i> Ingbritt 1600	CIM*	125	62,5	250	250	250
	CBM*	250	125	1000	1000	#
<i>S. sobrinus</i> 6715	CIM*	#	#	#	#	#
	CBM*	#	#	#	#	#
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	CIM*	#	#	#	#	#
	CBM*	#	#	#	#	#
<i>E. coli</i> ATCC 25922	CIM*	#	#	500	#	#
	CBM*	#	#	#	#	#
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145	CIM*	500	#	#	#	#
	CBM*	#	#	#	#	#
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	CIM*	500	#	125	250	#
	CBM*	#	#	500	500	#

*Valores expressos em µg/mL.

#Sem atividade antimicrobiana nas concentrações testadas.

O extrato etanólico da casca e suas frações de hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol apresentaram atividade antimicrobiana frente às bactérias *S. mutans* UA159 e *S. mutans* Ingbritt 1600. Nenhum extrato ou fração mostrou atividade frente *S. sobrinus* 6715 e *E. faecalis*. Pelos resultados, apenas a fração de diclorometano da casca apresentou inibição do crescimento de *E. coli* (CIM de 500 µg/mL), sendo que não foi observada atividade bactericida nas concentrações testadas. Observa-se também, que houve a inibição do crescimento de *P. aeruginosa* na concentração de 500 µg/mL pelo extrato etanólico da casca, sem atividade bactericida. Para a cepa de *S. aureus*, o extrato da casca de *A. macrocarpa* apresentou CIM de 500 µg/mL, sem atividade bactericida. Sendo que a fração diclorometano

da casca apresentou CIM de 125 µg/mL e CBM de 500 µg/mL e a fração de acetato de etila da casca na CIM de 250 µg/mL, obtendo-se uma concentração bactericida de 500 µg/mL.

A Tabela 3 apresenta a atividade antimicrobiana do extrato etanólico do galho e das suas frações de hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol de *A. macrocarpa* (Benth) Brenan contra as bactérias *S. mutans* UA159, *S. mutans* Ingbritt 1600, *S. sobrinus* 6715, *E. faecalis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*.

Tabela 3 – Atividade antimicrobiana do extrato etanólico do galho e das suas frações de hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol de *Anadenanthera macrocarpa* (Benth) Brenan expressos pela Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) frente às bactérias *S. mutans* UA159, *S. mutans* Ingbritt 1600, *S. sobrinus* 6715, *E. faecalis* ATCC 29212, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 10145 e *S. aureus* ATCC 25923.

MICROORGANISMO	TESTE	EXTRATO/FRAÇÕES DO GALHO				
		Etanólico	Hexano	Diclorometano	Acetato de etila	Butanol
<i>S. mutans</i> UA159	CIM*	31,25	31,25	500	500	#
	CBM*	250	#	1000	1000	#
<i>S. mutans</i> Ingbritt 1600	CIM*	#	#	#	500	#
	CBM*	#	#	#	#	#
<i>S. sobrinus</i> 6715	CIM*	1000	#	1000	#	500
	CBM*	#	#	#	#	#
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	CIM*	#	#	500	500	500
	CBM*	#	#	#	#	#
<i>E. coli</i> ATCC 25922	CIM*	#	#	500	#	#
	CBM*	#	#	#	#	#
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145	CIM*	#	#	#	#	#
	CBM*	#	#	#	#	#
<i>S. aureus</i>	CIM*	#	#	125	250	#
	CBM*	#	#	500	500	#

*Valores expressos em µg/mL.

#Sem atividade antimicrobiana nas concentrações testadas.

Os resultados obtidos para a *S. mutans* UA159 mostram que o extrato etanólico e as frações de hexano, diclorometano e acetato de etila foram ativos, mas a fração de butanol do galho não apresentou atividade antimicrobiana para esta bactéria. O extrato etanólico e a

fração hexânica da casca apresentaram a menor CIM (31,25 µg/mL), com atividade bactericida pelo extrato etanólico da casca (CBM de 250 µg/mL).

Para *S. mutans* Ingbritt 1600 somente a fração acetato de etila foi ativa, inibindo o crescimento na concentração de 500 µg/mL, sem apresentar atividade bactericida. O extrato bruto e as frações hexano, diclorometano e butanol do galho de angico não mostraram atividade para *S. mutans* Ingbritt 1600. Para *S. sobrinus* 6715 o extrato bruto do galho (CIM de 1000 µg/mL) e as frações diclorometano (1000 µg/mL) e butanol (500 µg/mL) apresentaram inibição do crescimento. Não foi encontrada atividade bactericida para *S. sobrinus* 6715 nas concentrações avaliadas.

E. faecalis teve seu crescimento inibido nas concentrações de 500 µg/mL para as frações diclorometano, acetado de etila e butanol, mas sem apresentarem atividade bactericida. O extrato etanólico e a fração hexânica não apresentaram atividade antibacteriana. Quanto à cepa *E. coli*, apenas a fração diclorometano apresentou efeito inibitório do crescimento desta bactéria na concentração de 500 µg/mL, sem atividade bactericida para o extrato bruto e as quatro frações. Os resultados também evidenciaram que o extrato e as frações do galho foram incapazes de inibir o crescimento desta bactéria nas concentrações avaliadas. Para os testes com *S. aureus*, as frações diclorometano (CIM = 125 µg/mL e CBM = 500 µg/mL) e acetato de etila (CIM = 250 µg/mL e CBM = 500 µg/mL) do galho não só inibiram o crescimento bacteriano, mas apresentaram atividade bactericida.

Por último, foi avaliada a atividade antimicrobiana do extrato e frações da folha de *A. macrocarpa* contra *S. mutans* UA159, *S. mutans* Ingbritt 1600, *S. sobrinus* 6715, *E. faecalis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*, sendo que os resultados estão apresentados na Tabela 4. O que se pode inferir dos resultados obtidos é que a fração butanólica da folha não apresentou atividade de inibição do crescimento contra nenhuma das cepas utilizadas neste experimento.

É também possível verificar que o extrato etanólico da folha apresentou atividade de inibição do crescimento e atividade bactericida para *S. mutans* UA159 (CIM de 500 µg/mL e CBM de 250 µg/mL) e *S. sobrinus* 6715 (CIM de 1000 µg/mL e CBM de 250 µg/mL) e inibição do crescimento de *P. aeruginosa* (CIM de 1000 µg/mL) e *S. aureus* (CIM de 125 µg/mL). Frente a todas as bactérias testadas, a fração hexânica da folha de *A. macrocarpa* apresentou atividade de inibição do crescimento para *S. mutans* UA159 (CIM de 31,25 µg/mL).

Avaliando-se a atividade antimicrobiana da fração de diclorometano observou-se uma inibição do crescimento para *E. coli* (CIM de 500 µg/mL), bem como, atividade bactericida para *S. mutans* UA159 (CIM de 31,25 µg/mL e CBM de 62,5 µg/mL) e *S. aureus* (CIM de

250 µg/mL e CBM de 250 µg/mL). Esta fração se mostrou incapaz de inibir o crescimento de *S. mutans* Ingbritt 1600, *S. sobrinus* 6715, *E. faecalis* e *P. aeruginosa* nas concentrações testadas.

Tabela 4 – Atividade antimicrobiana do extrato etanólico da folha e suas frações de hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol de *Anadenanthera macrocarpa* (Benth) Brenan expressos pela Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) frente às bactérias *S. mutans* UA159, *S. mutans* Ingbritt 1600, *S. sobrinus* 6715, *E. faecalis* ATCC 29212, *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 10145 e *S. aureus* ATCC 25923.

MICROORGANISMO	TESTE	EXTRATO/FRAÇÕES DA FOLHA				
		Etanólico	Hexano	Diclorometano	Acetato de etila	Butanol
<i>S. mutans</i> UA159	CIM*	500	31,25	31,25	125	#
	CBM*	250	#	62,5	1000	#
<i>S. mutans</i> Ingbritt 1600	CIM*	#	#	#	500	#
	CBM*	#	#	#	#	#
<i>S. sobrinus</i> 6715	CIM*	1000	#	#	500	#
	CBM*	250	#	#	#	#
<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	CIM*	#	#	#	250	#
	CBM*	#	#	#	#	#
<i>E. coli</i> ATCC 25922	CIM*	#	#	500	500	#
	CBM*	#	#	#	#	#
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145	CIM*	1000	#	#	#	#
	CBM*	#	#	#	#	#
<i>S. aureus</i>	CIM*	125	#	250	250	#
	CBM*	#	#	250	#	#

*Valores expressos em µg/mL.

#Sem atividade antimicrobiana nas concentrações testadas.

Com relação ao estudo realizado com a fração de acetato de etila da folha houve atividade antimicrobiana para *S. mutans* Ingbritt 1600 (CIM de 500 µg/mL), *S. sobrinus* 6715 (CIM de 500 µg/mL), *E. faecalis* (CIM de 250 µg/mL), *E. coli* (CIM de 50 µg/mL) e *S. aureus* (CIM de 250 µg/mL). Mostrou-se também capaz de inibir o crescimento com atividade bactericida para *S. mutans* UA159 (CIM de 125 µg/mL e CBM de 1000 µg/mL).

5.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIADERÊNCIA “IN VITRO” DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DA CASCA, GALHO E FOLHAS DE *A. MACROCARPA* (BENTH) BRENAN

Considerando a importância da busca de novos medicamentos para uso odontológico com ação antimicrobiana e efeitos colaterais reduzidos, o presente estudo objetivou verificar a ação dos extratos etanólicos da casca, galho e folhas de *A. macrocarpa* (Benth) Brenan sobre a aderência de dois estreptococos do grupo mutans: *S. mutans* UA159 e *S. sobrinus* 6715. O ensaio realizado foi à determinação de Concentração Inibitória Mínima de Aderência (CIMA), sendo os resultados apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 – Atividade antiaderente “in vitro” dos extratos etanólicos da casca, galho e folha de *Anadenanthera macrocarpa* (Benth) Brenan pelos ensaios de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Inibitória Mínima de Aderência (CIMA) contra as bactérias *S. mutans* UA159 e *S. sobrinus* 6715.

EXTRATO	BACTÉRIAS			
	<i>S. mutans</i> UA159		<i>S. sobrinus</i> 6715	
	CIM*	CIMA*	CIM*	CIMA*
Casca	250	31,25	#	#
Folha	500	250	1000	250
Galho	31,25	7,81	1000	#

*Valores expressos em µg/mL.

#Sem atividade antimicrobiana nas concentrações testadas.

Os resultados demonstram que a aderência de *S. mutans* UA159 foi inibida pelos três extratos etanólicos, casca (CIMA de 31,25 µg/mL), galho (CIMA de 7,81 µg/mL) e folha (CIMA de 250 µg/mL), sendo que a melhor atividade foi do extrato do galho. Para *S. sobrinus* 6715 somente o extrato etanólico da folha foi capaz de inibir a aderência desse microrganismo (CIMA de 250 µg/mL).

5.4 INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE “IN VITRO” DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DA CASCA, GALHO E FOLHA DE *A. MACROCARPA* (BENTH) BRENAN.

A atividade antioxidante de extratos etanólicos da casca, galho e folhas de *A. macrocarpa* (Benth) Brenan foi avaliada por meio de dois métodos: sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de sequestro de radicais livres DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila).

A Tabela 6 apresenta os valores da capacidade antioxidante determinada pelo sistema β -caroteno/ácido linoléico dos extratos etanólicos da casca, galho e folhas de *A. macrocarpa* (Benth) Brenan nos tempos iniciais (20 min) e finais (120 min) do experimento. Também foram testadas soluções padrões dos antioxidantes butil-hidróxi-tolueno (BHT) e alfa-tocoferol.

Tabela 6 – Determinação da capacidade antioxidante *in vitro* pelo sistema β -caroteno/ácido linoléico dos extratos etanólicos da casca, galho e folha de *Anadenanthera macrocarpa* (Benth) Brenan e dos padrões hidroxitolueno de butila (BHT) e Alfa-tocoferol.

TESTES		CONCENTRAÇÃO	TEMPO	
			20 min	120 min
Padrões	BHT	90 $\mu\text{g/mL}$	91,39 \pm 0,01 % ^{a*}	98,14 \pm 0,01 % ^a
	Alfa-tocoferol	90 $\mu\text{g/mL}$	71,33 \pm 0,09 % ^{b*}	87,83 \pm 0,05 % ^{ab*}
Parte da planta	Casca	500 $\mu\text{g/mL}$	48,75 \pm 9,67% [*]	80,24 \pm 3,39% ^b
		1000 $\mu\text{g/mL}$	51,53 \pm 9,14% [*]	87,23 \pm 0,46% ^{ab}
	Folha	500 $\mu\text{g/mL}$	86,31 \pm 4,47% ^{ab}	83,84 \pm 10,33% ^b
		1000 $\mu\text{g/mL}$	89,30 \pm 4,33% ^a	88,35 \pm 8,05% ^{ab}
	Galho	500 $\mu\text{g/mL}$	77,91 \pm 2,54% ^b	81,21 \pm 3,78% ^b
		1000 $\mu\text{g/mL}$	86,03 \pm 7,67% ^{ab}	86,84 \pm 3,88% ^{ab}

^a Os valores são representados como média \pm D.P. de triplicatas. Valores seguidos pela mesma letra não compartilhou diferenças significativas comparando os dados de BHT, α -tocoferol e extratos em 20 min ou 120 min em $P < 0,05$ (teste de Bonferroni). * Valores seguidos por partes mesmo símbolo diferenças significativas comparando os dados de BHT, α -tocoferol e extratos, entre 20 min e 120 min $P < 0,05$ (teste de Bonferroni).

Os resultados mostram que o BHT apresentou maior atividade antioxidante em comparação ao alfa-tocoferol, em concentrações de 90 µg/mL, no tempo de 20 min ($P < 0,05$) e similar no tempo de 120 min ($P > 0,05$). Observa-se também uma atividade antioxidante crescente dos padrões até o tempo de 120 min.

A seguir, os extratos etanólicos da casca, galho e folhas de *A. macrocarpa* (Benth) Brenan foram avaliados em relação a sua atividade antioxidante nas concentrações de 500 µg/mL e 1000 µg/mL. Como se pode avaliar nos resultados, o extrato etanólico das folhas apresentou a maior capacidade antioxidante, com resultados superiores aos encontrados para o alfa-tocoferol, mas nesta técnica, não superou os valores encontrados para o antioxidante sintético BHT. O extrato etanólico da casca foi o que apresentou a menor capacidade oxidativa. O extrato proveniente do galho foi tão eficaz quanto o padrão alfa-tocoferol na atividade de inibir a oxidação do β-caroteno.

Como se pode observar, o extrato da casca apresenta uma atividade antioxidante crescente ao longo do experimento, tendo aos 120 min de experimento atividade semelhante ao alfa-tocoferol na concentração de 500 µg/mL ($80,24 \pm 3,39\%$) ($P > 0,05$) e a concentração de 1000 µg/mL ($87,23 \pm 0,46\%$), semelhante ao BHT e alfa-tocoferol ($P > 0,05$). Além disso, as duas concentrações testadas apresentam atividade antioxidante similar no tempo de 20 min e 120 min ($P > 0,05$).

Já para os extratos etanólicos da folha e galho, foi observada atividade antioxidante constante em todo o experimento. Os extratos etanólicos da folha e galho não diferiram quanto às atividades antioxidantes comparadas as duas concentrações de 500 e 1000 µg/mL testadas nos dois tempos ($P > 0,05$). Somente a concentração de 1000 µg/mL dos extratos etanólicos do galho e folha no tempo de 120 min apresentaram atividade antioxidante semelhante ao BHT ($P > 0,05$), inibindo a peroxidação lipídica. E no tempo de 120 min, não se observa diferença estatística na atividade antioxidante entre os extratos etanólicos do galho e folha na concentração de 500 e 1000 µg/mL.

A capacidade de sequestrar o radical DPPH (expressa em percentual de atividade antioxidante) exibida pelos extratos etanólicos da casca, galho e folhas de *A. macrocarpa* (Benth) Brenan encontram-se apresentados na Tabela 7.

A partir da análise dos resultados obtidos, o padrão BHT neste método evidenciou um perfil diferente daquele observado no método anteriormente descrito, com percentuais de atividade antioxidante menores, principalmente no início do experimento (Tabelas 6 e 7). O

padrão alfa-tocoferol apresentou uma melhor atividade antioxidante neste teste em comparação ao BHT em ambos os tempos de 15 e 105 min ($P < 0,05$).

Tabela 7 – Determinação da capacidade antioxidante “in vitro” pelo método de sequestro de radicais livres DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) dos extratos etanólicos da casca, galho e folha de *Anadenanthera macrocarpa* (Benth) Brenan.

TESTES		CONCENTRAÇÃO	TEMPO	
			15 min	105 min
Padrões	BHT	90 µg/mL	45,37 ± 2,63 % ^a	85,82 ± 0,75 % ^{a*}
	Alfa-tocoferol	90 µg/mL	91,07 ± 0,68 % ^{bc}	90,78 ± 0,17 % ^{bc}
Parte da planta	Casca	500 µg/mL	88,66 ± 1,72 % ^{ac}	88,19 ± 1,93 % ^{ac}
		1000 µg/mL	93,19 ± 0,39 % ^{bc}	92,72 ± 0,51 % ^{bc}
	Folha	500 µg/mL	93,80 ± 1,74 % ^{bc}	93,71 ± 1,28 % ^{bc}
		1000 µg/mL	93,79 ± 1,03 % ^{bc}	93,89 ± 1,43 % ^{bc}
	Galho	500 µg/mL	93,61 ± 1,21 % ^b	92,22 ± 0,92 % ^b
		1000 µg/mL	93,15 ± 1,38 % ^{bc}	92,83 ± 2,11 % ^{bc}

^a Os valores são representados como média ± D.P. de triplicatas. Valores seguidos pela mesma letra não compartilhou diferenças significativas comparando os dados de BHT, α -tocoferol e extratos em 15 min ou 105 min em $P < 0,05$ (teste de Bonferroni). * Valores seguidos por partes mesmo símbolo diferenças significativas comparando os dados de BHT, α -tocoferol e extratos, entre 15 min e 105 min $P < 0,05$ (teste de Bonferroni).

No tempo de 15 minutos, os extratos etanólicos da casca, galho e folha nas concentrações de 500 e 1000 µg/mL não diferenciam na atividade antioxidante entre si ($P > 0,05$) e foram similares à atividade do alfa-tocoferol (91,07 ± 0,68%) ($P > 0,05$) e superior ao padrão BHT (95,37 ± 2,63). Já no tempo de 120 minutos, observa-se que para os três extratos etanólicos, casca, galho e folha, nas concentrações de 500 e 1000 µg/mL não houve diferença entre eles quanto à atividade antioxidante ($P > 0,05$) e atividade semelhante ao alfa-tocoferol (90,78 ± 0,17%) ($P > 0,05$).

5.5 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA OBTIDAS DO EXTRATO ALCÓOLICO DA CASCA DE *ANADENANTHERA MACROCARPA* (BENTH) BRENAN

A atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do extrato etanólico da casca foi avaliada por meio de diferentes ensaios. Para avaliar o efeito antinociceptivo do extrato etanólico da casca, foram realizados dois tipos diferentes de testes: nocicepção visceral (ensaio contorção abdominal induzida por ácido acético) e nocicepção neurogênica e inflamatória (teste da formalina).

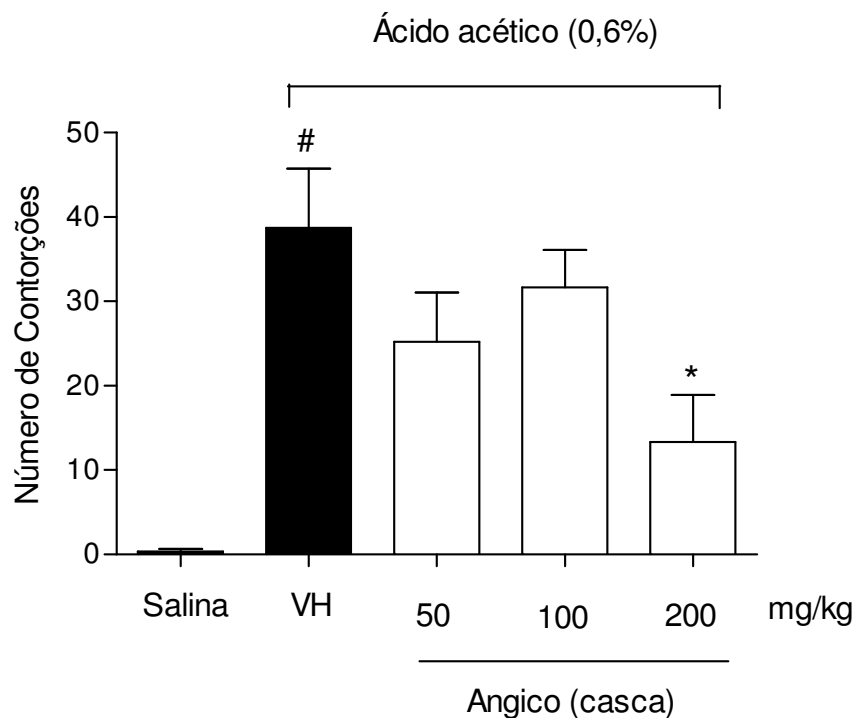


Figura 4 – Efeito do extrato etanólico da casca de *Anadenanthera macrocarpa* (Benth) Brenan no teste de contorção abdominal induzida por ácido acético (0,6%) em camundongos. Os animais foram pré-tratados com diferentes doses do extrato (50, 100 e 200 mg/Kg, s.c.) ou veículo (etanol 10%, v/v). Os resultados são apresentados como médias \pm D.P. da contorção em camundongos ($n = 6$). A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. * $P < 0,05$ quando comparado o grupo dos camundongos tratados com veículo e tratados com o extrato, com indução posterior da nocicepção com ácido acético. # $P < 0,05$ comparado ao grupo salina. VH: Veículo.

A dose de 200 mg/Kg do extrato etanólico da casca foi à única que promoveu uma redução significativa ($P < 0,05$) no número de episódios de contorção induzida pela administração de ácido acético em comparação ao grupo tratado com o veículo (etanol 10%, v/v) (Figura 4).

No teste da formalina, a administração do extrato etanólico da casca (s.c.) (50, 100 e 200 mg/kg), 30 min antes da formalina, não conseguiu inibir a primeira fase (primeiros 5 minutos) induzida pela formalina na pata do animal (Figura 5). No entanto, o extrato etanólico da casca nas três doses testadas reduziu significativamente, de forma dose-dependente, a nocicepção induzida pela formalina na segunda fase do ensaio (50-30 minutos) (Figura 4). É importante ressaltar, que as doses de 50 e 100 mg/kg não apresentaram diferença estatística quando comparada ao grupo morfina na inibição da nocicepção induzida ($P > 0,05$). Considerando o fato de que a primeira fase dos resultados do teste de formalina resulta essencialmente, da estimulação direta dos nociceptores e a segunda fase do teste da formalina envolve um período de sensibilização durante o qual ocorrem os fenômenos inflamatórios, os resultados sugerem que o efeito antinociceptivo do extrato etanólico da casca é mediado, em parte, por propriedades anti-inflamatórias do extrato etanólico da casca.

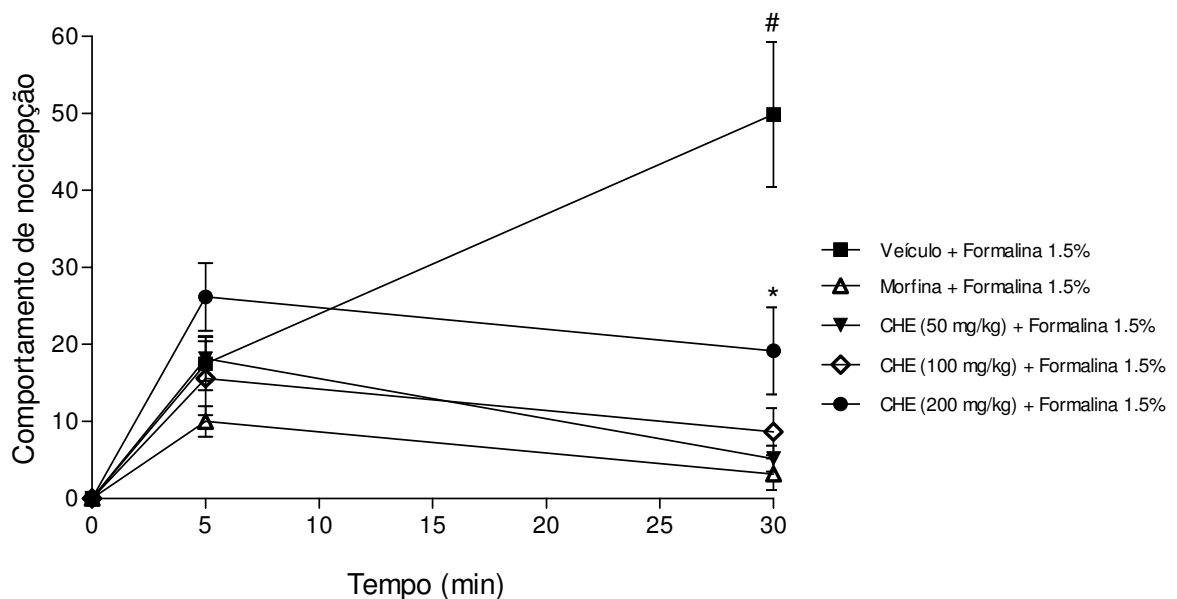


Figura 5 – Efeitos do extrato etanólico da casca de *Anadenanthera macrocarpa* (Benth) Brenan na resposta à nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina em camundongos. Os animais foram pré-tratados por administração subcutânea de morfina (1 mg/kg), extrato da planta (50, 100 e 200 mg/kg) ou veículo (etanol 10%, v/v). Os resultados são apresentados como média \pm D.P. ($n = 6$) do número de elevações, sacudidas e lambidas da pata injetada por um período de 30 min. A análise estatística foi realizada por meio do ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. * $P < 0,05$, quando comparado o grupo dos camundongos tratados com morfina ao grupo de camundongos tratados com o extrato. # $P < 0,05$ quando comparado ao grupo veículo. CHE: Extrato etanólico da casca.

Em concordância, o tratamento com o extrato etanólico da casca (50, 100 e 200 mg/Kg), diminuiu a formação de edema induzido por injeção de formalina na pata do camundongo (300 μ g/pata) (Figura 6). Além disso, todas as doses diminuiram o edema nos

mesmos níveis da indometacina ($P > 0,05$), e não apresentaram diferenças estatísticas entre as doses testadas ($P > 0,05$) (Figura 6).

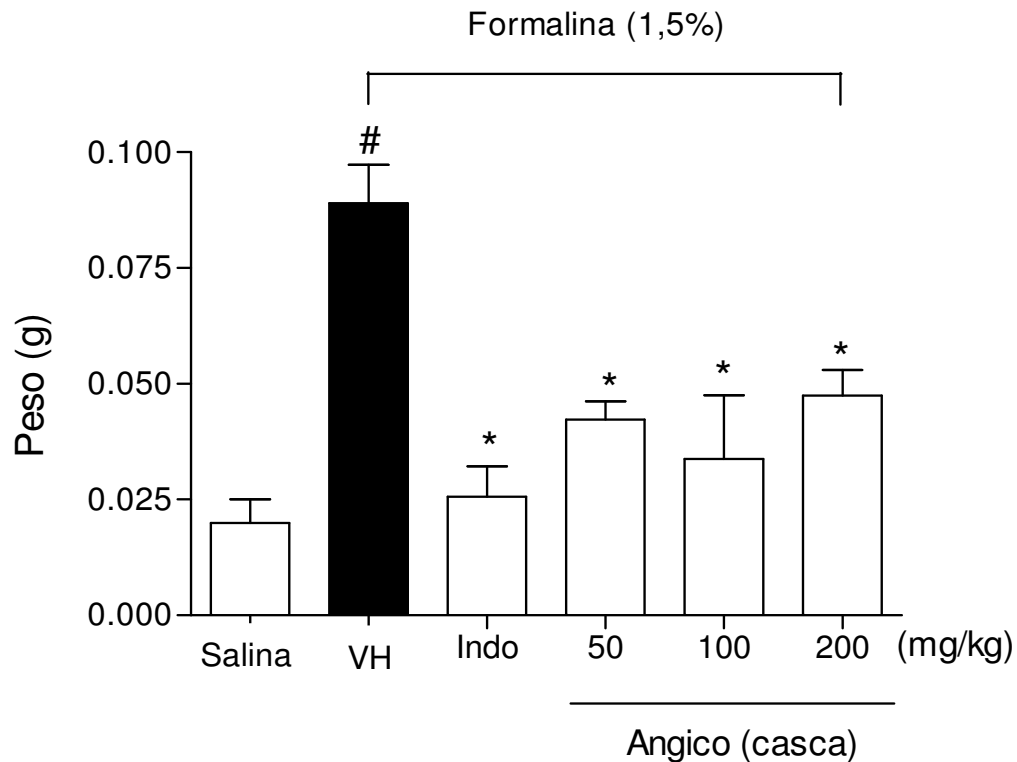


Figura 6 – Efeitos do extrato etanólico da casca de *Anadenanthera macrocarpa* (Benth) Brenan no edema de pata induzido por formalina 1,5%. Os animais foram pré-tratados por administração de indometacina (10 mg/kg em 10 ml/kg, s.c.), extrato (50, 100 e 200 mg/kg, s.c.) ou veículo (etanol 10%, v/v, s.c.). Os resultados são apresentados como média \pm D.P. ($n = 6$) do volume (mL) de edema da pata injetada após 30 min (s.c.). A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. * $P < 0,05$ quando comparado com grupo veículo. # $P < 0,05$ comparado ao grupo salina. VH: Veículo.

Tem sido demonstrado que os neutrófilos desempenham um papel relevante na gênese da nocicepção inflamatória induzida por Cg uma vez que estas células são fonte de citocinas hipernociceptivas ou mediadores hipernociceptivos de ação direta (CUNHA et al., 2008). Assim, para avaliar o efeito anti-inflamatório do extrato etanólico da casca de angico, primeiro foi avaliado o efeito na migração de neutrófilos induzida pela Cg na cavidade peritoneal do camundongo. O pré-tratamento com extrato etanólico da casca (100 e 200 mg/Kg; s.c.) diminuiu de forma dose-dependente a migração de neutrófilos nos camundongos ($P < 0,05$) (Figura 7). A partir deste experimento, foi estabelecido que a dose efetiva do extrato etanólico da casca para inibir a migração de neutrófilos é de 100 mg/kg, uma vez que não foi observada uma melhora na eficácia com uma dose mais elevada. Para os próximos experimentos, foi padronizada a dose de 100 mg/kg de extrato etanólico da casca a ser avaliada.

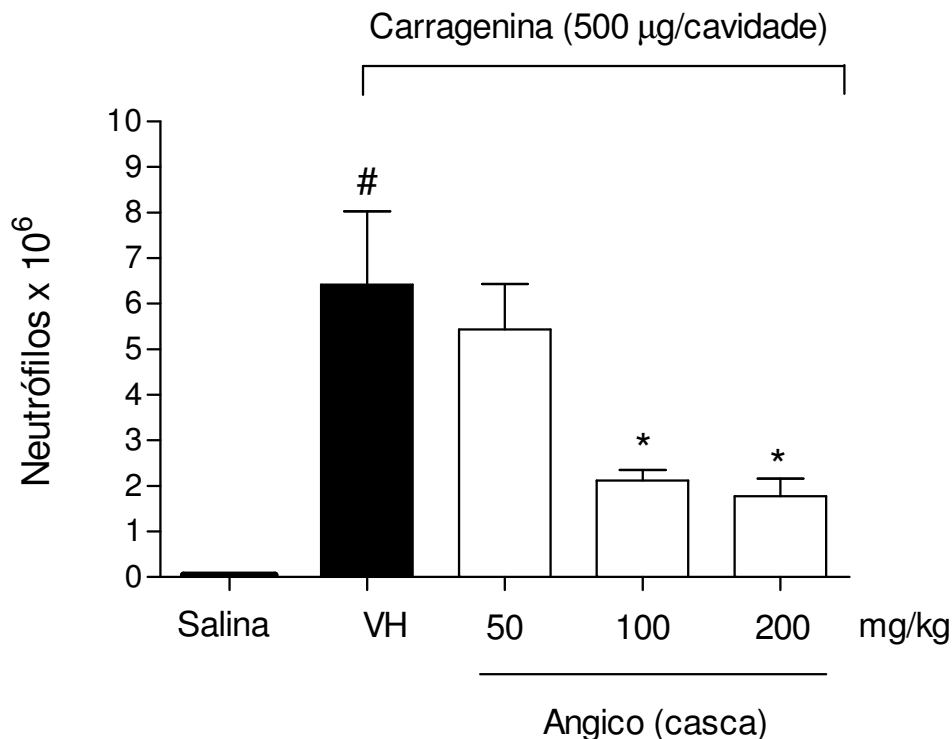


Figura 7 – Efeito do extrato etanólico da casca de *Anadenanthera macrocarpa* (Benth) Brenan sobre a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida por Cg. Grupos de camundongos (n = 6) foram pré-tratados por via subcutânea com diferentes doses do extrato (50, 100 e 200 mg/kg) 30 min antes da Cg (500 µg/cavidade) induzir peritonite. As células foram contadas 4 horas após a injeção de Cg. Cada valor representa a média ± D.P. A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. * P < 0,05 quando comparado com grupo veículo. # P < 0,05 comparado ao grupo salina. VH: Veículo.

Além da migração de neutrófilos, é fundamental avaliar o extravasamento vascular que é outro parâmetro importante na resposta inflamatória. Desta forma, foi testada a hipótese de que extrato etanólico da casca reduz a permeabilidade microvascular induzida por Cg. A Figura 8 mostra que o pré-tratamento (30 min, s.c.) com 100 mg/Kg de extrato etanólico da casca reduziu significativamente (P < 0,05) o extravasamento do corante azul de Evans no líquido peritoneal.

Além disso, os resultados mostram que a concentração do mediador pró-inflamatório TNF- α no líquido peritoneal dos camundongos não foi afetada nos animais tratados com o extrato etanólico da casca (P > 0,05) (Figura 9a), entretanto, foi observado um aumento significativo (P < 0,05) na concentração de IL-10, uma citocina com atividade anti-inflamatória (Figura 9b).

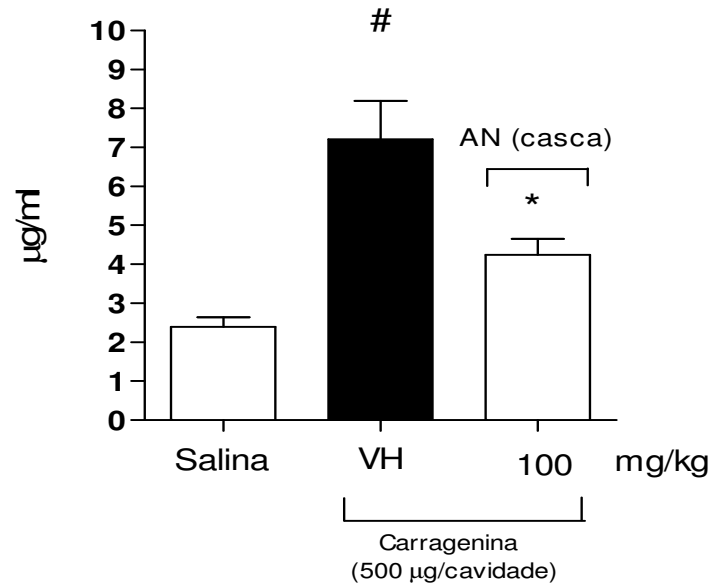


Figura 8 – Efeito do extrato etanólico da casca de *Anadenanthera macrocarpa* (Benth) Brenan na permeabilidade vascular, teste de azul de Evans. Os animais foram pré-tratados por administração do extrato (100 mg/kg, s.c.), 30 min antes da injeção de Cg (500 mg/cavidade, i.p.). O aumento da permeabilidade vascular foi avaliado após 4 h. Os resultados são apresentados como média \pm D.P. (n = 6) da concentração de corante azul de Evans. A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. * P < 0,05 quando comparado com grupo veículo. # p < 0,05 comparado ao grupo salina. VH: Veículo; AN: Extrato etanólico da casca de angico.

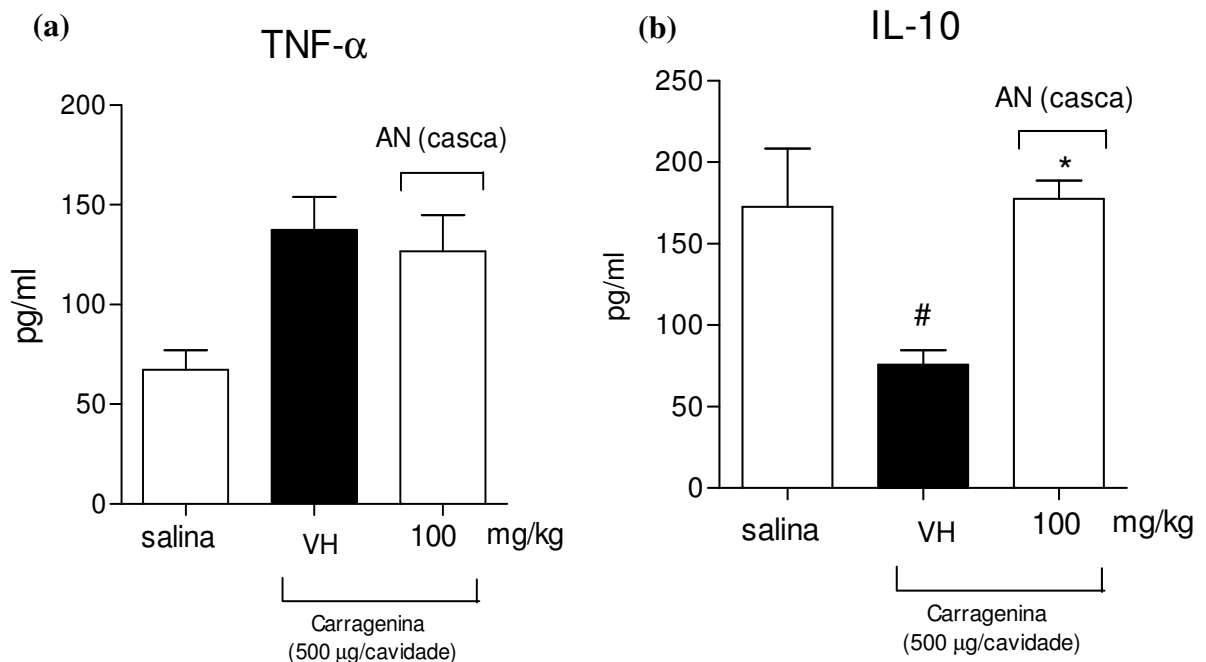


Figura 9 – Efeito do extrato etanólico da casca de *Anadenanthera macrocarpa* (Benth) Brenan sobre as citocinas TNF- α (a) e IL-1 β (b) na produção de exsudato peritoneal. Os animais foram injetados com veículo ou extrato (100 mg/kg), e 15 minutos mais tarde, foi injetada a Cg. As concentrações de citocinas foram determinadas por ELISA. Os resultados são apresentados como média \pm D.P. de seis animais em cada grupo e são representativos de dois experimentos diferentes. A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. * P < 0,05 quando comparado com grupo veículo. # p < 0,05 comparado ao grupo salina. VH: Veículo; AN: Extrato etanólico da casca de angico.

Posteriormente, foi avaliado o efeito anti-inflamatório sobre o mecanismo de nocicepção mecânica. A nocicepção mecânica induzida por Cg foi realizada por meio do teste de Von Frey. Conforme mostrado na Figura 10a, o extrato etanólico da casca (100 mg/kg; s.c.), administrada 30 min antes da injeção intraplantar de Cg (100 µg/pata), inibiu a nocicepção mecânica ($P < 0,05$).

Esse efeito sobre a hipernocicepção mecânica parece também estar intimamente associada à capacidade do extrato etanólico da casca em inibir a migração de neutrófilos para o tecido plantar induzida pela Cg, avaliada pela dosagem da atividade de mieloperoxidase (MPO) (Figura 10b). A MPO foi utilizada como um marcador indireto da ativação de neutrófilos no local do processo inflamatório (FRÖDE; MEDEIROS, 2001).

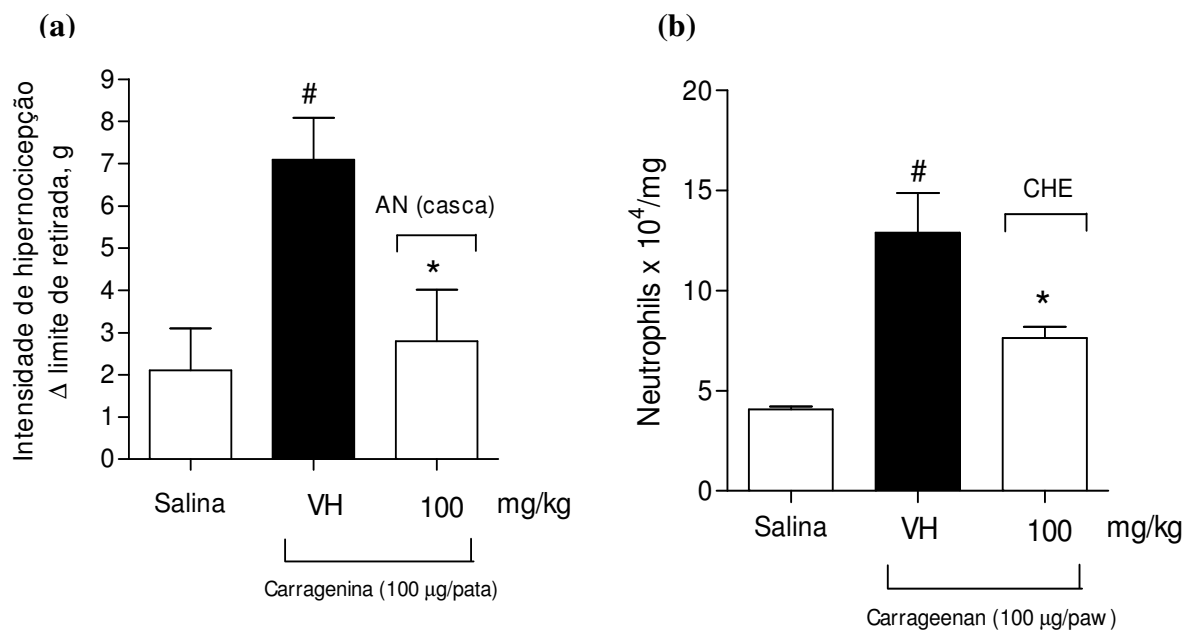


Figura 10 – Efeito do extrato etanólico da casca de *Anadenanthera macrocarpa* (Benth) Brenan na inibição da nocicepção mecânica. Os camundongos foram tratados com extrato (100 mg/kg, s.c.), 15 minutos antes da injeção i.pl. de Cg (Cg, 100 mg/pata) ou veículo (etanol 10%, v/v). As respostas hipernociceptivas foram avaliadas 3 h após estímulo, seguido pela coleta do tecido plantar da pata para análise da mieloperoxidase (Figura a e b, respectivamente). Os resultados são apresentados como média \pm D.P. de seis animais em cada grupo ($n = 6$) e são representativos de dois experimentos diferentes. A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. * $P < 0,05$ quando comparado com grupo veículo. # $P < 0,05$ comparado ao grupo salina. VH: Veículo; AN: Extrato etanólico da casca de angico.

Além destes experimentos, avaliou-se o extravasamento de plasma induzido por Cg na pata. Como pode ser observado na Figura 11, um único tratamento subcutâneo dos camundongos com o extrato etanólico da casca 100 mg/kg foi capaz de reduzir ($P < 0,05$) a formação de edema induzido por Cg (1%, 0,1 mL/pata), um efeito que começou em 2 horas e foi observado até 4 h após a administração deste agente flogístico. No tempo de 2 h, a atividade anti edematogênica de extrato etanólico da casca foi maior do que a dexametasona (P

< 0,05) e em 4 h a atividade foi comparável ao da dexametasona ($P < 0,05$). Apesar disso, o extrato etanólico da casca não inibiu ($P > 0,05$) a resposta edematogênica evocadas por Cg em camundongos após 4h (dados não mostrados) (Figura 11).

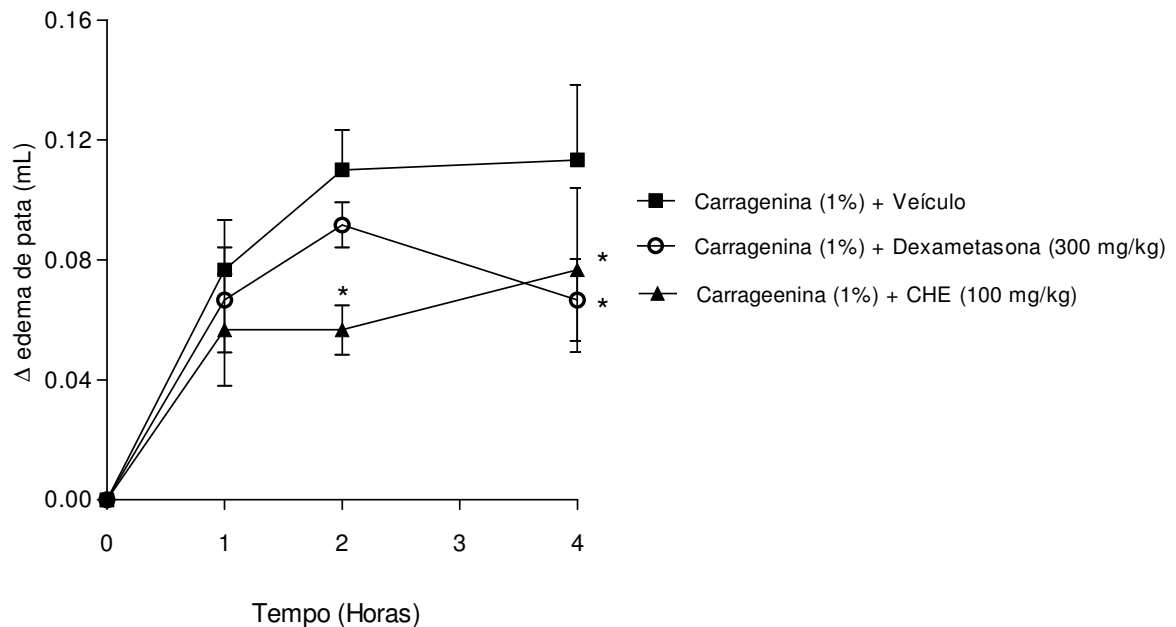


Figura 11 – Efeito do extrato etanólico da casca de *Anadenanthera macrocarpa* (Benth) Brenan sobre o edema de pata induzido por Cg 1%. Os animais foram pré-tratados por administração subcutânea do extrato (100 mg/kg), 1 h antes da injeção intraplantar de Cg (1%). O edema foi medido 1-4 horas após a Cg. Os resultados são apresentados como média \pm D.P. (n = 6) do edema da pata (mL). * $P < 0,05$ quando comparado ao grupo tratado com Cg. Os resultados são apresentados como média \pm D.P. de seis animais em cada grupo e são representativos de dois experimentos diferentes. A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. CHE: Extrato etanólico da casca de angico.

6 DISCUSSÃO

Acredita-se que as plantas sejam uma importante fonte de novos produtos químicos e matéria-prima para a indústria farmacêutica. Por isso, a avaliação do potencial da atividade biológica do extrato e frações de *Anadenanthera macrocarpa* (Benth) Brenan do semiárido da Bahia, é de grande interesse científico, ambiental, tecnológico e econômico, para tanto, foram feitos estudos com os extratos brutos e frações da casca, galho e folhas preparados a partir de plantas coletadas na Floresta Nacional Contendas do Sincorá, para avaliação da atividade antimicrobiana, antioxidante, antinociceptiva e anti-inflamatória.

As pesquisas com extratos vegetais estão explorando a ação antimicrobiana, o que pode representar uma saída para o combate aos microrganismos, em razão do grande aumento da resistência de microrganismos patogênicos a múltiplas drogas, devido ao uso indiscriminado de antimicrobianos, levando assim, a procura dessas novas alternativas terapêuticas (SAMY; GOPALAKRISHNAKONE, 2008).

Embora, não tenham sido encontrados na literatura estudos anteriores sobre a atividade antimicrobiana da folha e do galho de *A. macrocarpa* e suas respectivas frações, no presente trabalho, utilizando os ensaios de (CIM) e (CBM) com as bactérias *S. mutans* UA159, *S. mutans* Ingbritt 1600, *S. sobrinus* 6715, *E. faecalis*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus*, ficou demonstrado que grande parte dos microrganismos usados nos testes apresenta sensibilidade aos extratos e frações testados. Sendo que as cepas de *S. mutans* UA159 e *S. Ingbritt* 1600 foram às cepas mais sensíveis quanto à inibição do crescimento pelos extratos e frações. Destaca-se a CIM obtida em baixa concentração (31,25 µg/mL) para *S. mutans* UA159 pelos extratos etanólicos da folha e frações de hexano do galho e folha, e fração diclorometano da folha, indicando que os possíveis compostos bioativos podem estar presentes em maior concentração nestas frações e possuem característica apolar.

De acordo com Takana et al (2005) e Holetz et al (2002) a atividade antimicrobiana pode ser classificada de acordo com a CIM em: Inativa (CIM > 1000 µg/mL); atividade fraca (500 < CIM < 1000 µg/mL); atividade moderada (100 < CIM < 500 µg/mL) e ativa boa (CIM < 100 µg/mL). Os resultados do presente estudo indicam que as frações de hexano e acetato de etila da casca com *S. mutans* Ingbritt 1600 e *S. mutans* UA159, respectivamente, as frações etanólico e hexano do galho e as frações hexano e diclorometano da folha (frente à *S. mutans* UA159) de *A. macrocarpa* apresentaram atividade antibacteriana ativa boa, com concentrações inibitórias menores que 100 µg/mL.

Outros estudos realizados com extratos da *A. macrocarpa* demonstram a atividade antimicrobiana dessa espécie. Na avaliação da atividade antimicrobiana a CIM do extrato bruto de angico frente a 10 amostras de cepas de *S. aureus* de origem humana foi determinada por Palmeira et al (2010). Todas as amostras mostraram-se sensíveis a ação do extrato de *A. macrocarpa*, com halos de inibição variando de 19 a 25 mm. O extrato etanólico do angico apresentou atividade antimicrobiana e CIM de 3,12 g/100 mL para todas as cepas de *S. aureus* testadas (PALMEIRA et al., 2010).

É importante registrar que a atividade antimicrobiana assim como a CIM difere, principalmente, quando se trata de microrganismos pertencentes a outros gêneros. Observa-se um perfil de atividade antimicrobiana diferente entre os extratos e frações da casca, galho e folha em relação à atividade antimicrobiana sobre diferentes cepas testadas. Segundo Viana (2003), o extrato de angico possui atividade antimicrobiana para *Salmonella* spp., apresentando CIM na concentração de 12,5 g/100 mL ou seja equivalente a diluição 1/8. Resultados semelhantes foram encontrados por Kluczynik et al (2010). Este fato provavelmente se deve as características dos microrganismos analisados, mostrando que não é pertinente a avaliação da atividade antimicrobiana de um produto, comparando-a ao comportamento de resistência e/ou sensibilidade entre bactérias Gram positivas e Gram negativas.

Deste modo, considerando-se os resultados de Viana (2003), é provável que os extratos de *A. macrocarpa* sejam mais eficazes frente a bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *S. mutans*) do que a bactérias Gram-negativas (*Salmonella* spp.). Em nosso estudo, o crescimento da bactéria Gram-negativa *P. aeruginosa*, ainda que com maior CIM em relação aos outros micro-organismos testados, foi inibida pelo extrato etanólico da casca (CIM = 500 µg/mL) e da folha (CIM = 1000 µg/mL). A outra bactéria Gram-negativa utilizada neste experimento a *E. coli* teve seu crescimento inibido pela fração diclorometano da casca, galho e folha (CIM = 500 µg/mL) e acetato de etila da folha (CIM = 500 µg/mL).

Contudo, em um estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas do Brasil, realizado por Gonçalves, Alves Filho e Menezes (2005), o extrato etanólico da casca do tronco de angico coletada no estado de São Paulo, não apresentou ação antibacteriana frente a *E. coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Providencia* spp., *Proteus mirabilis*, *P. aeruginosa*, *Shigella sonnei*, *Staphylococcus* spp. e *S. aureus*. Estes autores sugerem que todos estes microrganismos sejam resistentes ao extrato da planta uma vez que eles também apresentaram resistência a alguns antibióticos comerciais. Além do mais, é muito importante ressaltar que

existem diferenças entre as composições químicas das plantas, em decorrência dos locais e épocas do ano da coleta das espécies vegetais.

Em um estudo, Weber (2010) verificou um resultado contrário ao encontrado por Gonçalves, Alves Filho e Menezes (2005). Realizou-se um estudo da casca do caule de *A. colubrina* coletada em Pernambuco com bactérias multidroga-resistentes: *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *Candida albicans*, *Shigella sonnei*, *Salmonella entérica* e *E. coli*. As linhagens de *S. aureus* foram as mais sensíveis ao extrato alcoólico e as frações de acetato de etila e hexano (apresentando CIM com métrica geométrica de 62,5; 62,5 e 125 µg/mL, respectivamente) quando comparados a *P. aeruginosa*, *S. sonnei*, *S. enterica*, *E. coli* e *C. albicans*.

Há pouco registro pertinente, na literatura, quanto ao possível mecanismo de ação de produtos oriundos de plantas. Entretanto, sabe-se que algumas substâncias naturais possuem grande capacidade de inibir a síntese dos ácidos nucleicos (DNA e RNA), interferindo na formação de purina ou pirimidina, ou, ainda, bloqueando a polimerização dos nucleotídeos; ao mesmo tempo, estudos sobre a atividade de extratos vegetais e seu mecanismo de ação têm demonstrado que eles agem nas estruturas da parede celular (SINGH; SHUKLA, 1984).

Os compostos isolados de plantas são substâncias cuja estrutura química, com raras exceções, apresenta grandes diferenças em relação aos antibióticos derivados de microrganismos. Esses agentes antimicrobianos isolados de plantas superiores podem agir como reguladores do metabolismo intermediário, ativando ou bloqueando reações enzimáticas, afetando diretamente uma síntese enzimática, seja em nível nuclear ou ribossomal, ou mesmo alterando estruturas de membranas (SINGH; SHUKLA, 1984).

Em uma ampla revisão sobre plantas medicinais, Recio e Ríos (1989) fizeram uma avaliação quanto à atividade antimicrobiana de extratos, óleos essenciais e de substâncias obtidas de vegetais, e destacaram os resultados obtidos com os óleos essenciais, alcalóides, cumarinas, triterpenos, citral, mirceno, timol, xantanol, ácido caurêmico, entre outros que, em baixas concentrações, exercem inibição sobre o crescimento de bactérias Gram-positivas, Gram-negativas, leveduras e fungos filamentosos, confirmando a grande importância que possuem como perspectivas para a produção de novos e eficientes produtos farmacêuticos que possam ser usados na terapêutica de processos infecciosos.

O presente estudo veio também, evidenciar que os extratos etanólicos de *A. macrocarpa* apresentam atividade antimicrobiana sobre os microrganismos presentes no biofilme dental, como *S. mutans* UA159, mas também demonstrou “in vitro” inibição da aderência bacteriana na superfície, fator predisponente para o desenvolvimento da cárie e doenças periodontais.

Em prospecções fitoquímicas, a casca do tronco de *A. macrocarpa* é muito rica em taninos e análises fitoquímicas desse órgão, também isolaram alcalóides, flavonóides, triterpenóides (luperona, lupeol), componentes fenólicos (dalbergina; 3,4,5-dimetoxidalbergiona) (DUKE, 1985). Koo et al. (2002) determinaram os efeitos da atividade biológica de compostos polifenólicos sobre a atividade de glucosiltransferase, a viabilidade do biofilme e do desenvolvimento de cárie em ratos. Os resultados mostraram que a apigenina apresentou desprovida de atividade antibacteriana e inibiu a atividade de glucosiltransferase.

A cárie dental é uma doença multifatorial, relacionada não só com a dieta do hospedeiro, mas também com o desequilíbrio desta comunidade, de modo a favorecer o estabelecimento de uma microbiota cariogênica (VAN HOUTE, 1994; LOESCHE, 1986). Esta dieta promove um aumento da proporção de estreptococos do grupo mutans, uma vez que estes microrganismos apresentam algumas vantagens ecológicas quando da presença deste açúcar no meio bucal, permitindo a sua aderência, colonização e posterior acúmulo na superfície lisa do esmalte dental (HAMADA; SLADE, 1980; LOESCHE, 1986). Além disso, a fermentação de carboidratos da dieta pelas bactérias, principalmente sacarose, resulta na produção de ácidos e produtos que inicialmente desmineralizam o esmalte e posteriormente a dentina, sendo que, quando esse processo não é controlado, ocorre à formação das lesões cariosas (SANSONE et al., 1993; ALAM et al., 2000).

Os estreptococos do grupo mutans, principalmente o *Streptococcus mutans*, são considerados os maiores patógenos em relação à etiologia da cárie (HAMADA; SLADE, 1980), devido ao alto número destes microrganismos isolados em locais cariados, e possui uma enorme variedade de características fisiológicas que facilitam a colonização em locais propensos à cárie (VAN HOUTE, 1994).

Os estreptococos do grupo mutans, além de serem acidúricos e acidogênicos, não só fermentam a sacarose como, a partir desta, sintetizam glucanos através das enzimas glucosiltransferases – GTFs, o que é considerado um fator de virulência para esses microrganismos (HAMADA; SLADE, 1980). Atualmente, três GTFs distintas, secretadas pelo *Streptococcus mutans*, estão bem caracterizadas tanto bioquimicamente como ao nível molecular: 1) GTF B - codificado pelo gene *gtf B*, que sintetiza glucanos insolúveis em água tendo ligações glicosídicas principais α (1→3); 2) GTF C - codificado pelo gene *gtf C*, que sintetiza uma mistura de glucanos insolúveis e solúveis, este último apresentando ligações glicosídicas principais α (1→6); e 3) GTF D - codificado pelo gene *gtf D*, que sintetiza basicamente glucanos solúveis (LOESCHE, 1986; HANADA, KURAMITSU, 1989). A GTF

produzida por *S. sanguinis* (GTF Ss) pode também estar envolvida com o desenvolvimento da placa dental. Os glucanos, principalmente os insolúveis em água, têm sido considerados como os principais fatores de aderência e acúmulo de estreptococos cariogênicos sobre a superfície dental (HAMADA; SLADE, 1980; RÖLLA et al., 1983; TANZER; FEEDMAN; FITZGERALD, 1985; SCHILLING; BOWEN, 1992). Em acréscimo, tem sido demonstrado que estes glucanos aumentam a porosidade (DIBDIN; SHELLIS, 1988; VAN HOUTE, 1994) bem como causam mudanças na composição inorgânica da matriz da placa (CURY; REBELLO; DEL BEL CURY, 1997), tornando-a ainda mais cariogênica. Assim, estreptococos do grupo mutans e glucanos são considerados fatores críticos no desenvolvimento da placa dental cariogênica.

A odontologia moderna realça a busca por substâncias biocompatíveis, especialmente, dentre aquelas que entrarão em contato direto com os tecidos. Neste contexto, a fitoterapia tem evoluído notadamente nos últimos anos e tem estimulado a avaliação de diferentes produtos vegetais com propriedades terapêuticas na odontologia (COSTA et al., 2008).

Segundo Cavalcante (2010), na área da Odontologia não há consenso sobre o nível de inibição de crescimento aceitável para produtos naturais. Para Aligianis et al. (2001), o extrato tem forte inibição quando exibe CIM até 500 µg/mL; tem inibição moderada quando a CIM for de 600 a 1500 µg/mL e, fraca inibição quando o valor da CIM for acima de 1600 µg/mL. No trabalho de Magina (2009), foram considerados ativos os extratos com CIM menor que 1000 µg/mL e, muito ativos os extratos com CIM inferior a 100 µg/mL.

Os resultados observados neste estudo com os extratos etanólicos da casca, galho e folhas de *A. macrocarpa* são promissores, uma vez que apresentaram forte inibição do crescimento de *S. mutans* UA159, que foi sensível em baixas concentrações do extrato, destacando-se o extrato etanólico do galho que teve CIM de 31,25 µg/mL. Os extratos etanólicos do galho e da folha têm inibição moderada com CIM de 1000 µg/mL frente à *S. sobrinus* 6715. Todavia, o extrato etanólico da casca não apresentou capacidade de inibir o crescimento de *S. sobrinus* 6715 nas concentrações avaliadas. Outro importante resultado é a capacidade dos extratos *A. macrocarpa* em inibir a aderência de *S. mutans* UA159 e *S. sobrinus* 6715 em baixas concentrações sub-inibitórias (sub-CIM), como obtido com o extrato do galho para *S. mutans* UA159.

A capacidade do *S. mutans* em utilizar alguns polissacarídeos extra e intracelular como compostos de armazenamento de curto prazo fornece um benefício adicional ecológico a este microrganismo, simultaneamente aumentando a quantidade de produção de ácido e a extensão da acidificação. A persistência desse ambiente ácido leva à seleção da microbiota altamente

ácido tolerante (BEIGHTON, 2005; MARQUIS; CLOCK; MOTA-MEIRA, 2003), o ambiente de baixo pH dentro da matriz da placa resulta em desmineralização do esmalte adjacente, iniciando assim, o processo de cárie dentária. Portanto, os polissacarídeos extracelulares e a acidificação do biofilme da matriz são fatores críticos para a formação e o estabelecimento da placa bacteriana cariogênica (BOWEN, 2002; MARSH, 2003), e oferecem alvos para a intervenção quimioterápica (KOO et al., 2002; KOO; JEON, 2009). Os polissacarídeos insolúveis, que são compostos de ligações principalmente 1-3 e 1-6, sintetizada principalmente pelas enzimas GTF B e C, são os principais componentes da matriz de polissacarídeos extracelular que são associados com o desenvolvimento, acúmulo e cariogenicidade do biofilme dental (BOWEN, 2002; PAES LEME et al., 2006).

Em um levantamento realizado por Oliveira (2010), na mesorregião do sertão paraibano, evidenciou que 83,3% dos raizeiros fazem a indicação de *A. macrocarpa* para o tratamento de afecções bucais. Com relação a estes dados apresentados, pode-se perceber que existe um conhecimento empírico popular acumulado ao longo dos séculos em relação ao uso medicinal do angico. Diante do atual contexto do uso de *A. macrocarpa* como recurso terapêutico na Odontologia, é importante a realização desta pesquisa para a verificação “in vitro” da atividade antimicrobiana e anti-placa dos extratos desta planta.

Uma possível explicação da ação dos extratos vegetais está no fato de que vários fatores estão associados ao processo de adesão das bactérias às superfícies dentais, dentre estes, a interação de proteínas, adesinas, lectinas e interações hidrofóbica (PEREIRA et al., 2006). Desta forma, a interferência com a adesão bacteriana nas superfícies dos dentes pode ser um caminho para se obter o controle do biofilme dental, e conseqüentemente prevenir a instalação de patologias orais, sendo esta uma indicação para a utilização de produtos naturais.

Finalmente, como ainda não se dispõe de uma substância ideal para o controle químico do biofilme dental e como, com exceção do flúor, os efeitos profiláticos dos agentes relacionados à prevenção da cárie dentária ainda são escassos (FEJERSKOV; KIDD, 2007), os resultados obtidos deste estudo são promissores devido à capacidade dos extratos de *A. macrocarpa* exercerem influência inibitória na aderência de estreptococos do grupo mutans, sendo necessário desenvolver mais estudos para elucidar o mecanismo de ação sobre os fatores de virulência desses microrganismos.

Com o objetivo de pesquisar novas espécies com esta atividade, o presente trabalho realizou um estudo da atividade antioxidante de extratos etanólicos da casca, galho e folhas de

A. macrocarpa (Benth) Brenan por meio de dois métodos, o sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de sequestro de radicais livres (DPPH).

Os radicais livres são compostos fortemente reativos formados endogenamente no organismo humano, e que, apesar de possuírem uma função fisiológica, podem causar lesão celular (GALIZIA; WAITZBERG, 2001). Os danos oxidativos irreversíveis causados por radicais livres estão associados ao desenvolvimento de várias doenças com características degenerativas, por exemplo, a aterosclerose, Doença de Parkinson, Mal de Alzheimer, distúrbios cardiovasculares, câncer e diabetes (UCHÔA et al., 2007). Os radicais livres são formados quando elétrons do último orbital de um átomo ficam desemparelhados por ganho ou perda de um elétron. Essa transferência de elétrons ocorre nas reações de oxirredução. O oxigênio molecular (O_2) é a principal fonte de radicais livres na célula (BRASILEIRO FILHO, 2006).

Existem substâncias que apresentam atividades antioxidantes, e conseqüentemente, protegem o organismo dos radicais livres e assim retardam ou previnem o desenvolvimento de doenças ao inibirem a iniciação ou propagação da reação de oxidação em cadeia (ANDRADE et al., 2007). A utilização de compostos antioxidantes encontrados na dieta ou mesmo sintéticos é um dos mecanismos de defesa contra os radicais livres que podem ser empregados nas indústrias de alimentos, cosméticos, bebidas e também na medicina (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

No entanto, estudos em animais evidenciaram que a exposição aguda e prolongada a antioxidantes sintéticos levou ao desenvolvimento de tumores de fígado, pâncreas e glândulas (HIROSE et al., 1986), aumento da formação de H_2O_2 nos microsomas, alterando as funções hepáticas (ROSSING; KAHL; HILDEBRANDT, 1985), carcinogênese no estômago de ratos (ITO et al., 1983) e adenomas e carcinomas em células hepáticas (WÜRTZEN; OLSEN, 1986). Considerando que o uso de antioxidantes sintéticos não é muito recomendado, no século passado, a partir dos anos 80, deu-se início às pesquisas com antioxidantes naturais visando à substituição total ou parcial dos antioxidantes sintéticos (BROINIZ et al., 2007). Além de alimentos já conhecidos que possuem antioxidantes, como frutas e verduras, a procura de espécies vegetais já conhecidas que possuem esta atividade vem se acentuando (ESTEVAM, 2006).

Os vegetais contêm substâncias antioxidantes distintas, cujas atividades têm sido bem comprovadas nos últimos anos. A presença de compostos fenólicos, tais como flavonóides, ácidos fenólicos, antiocianinas, além dos já conhecidos; vitaminas C, E e carotenóides, contribuem para os efeitos benéficos destes alimentos. Somando-se a isto, estudos têm

demonstrado que polifenóis naturais possuem efeitos significativos na redução do câncer, e evidências epidemiológicas demonstram correlação inversa entre doenças cardiovasculares e consumo de alimentos fonte de substâncias fenólicas, possivelmente por suas propriedades antioxidantes (AJAIKUMAR et al., 2005).

O sistema β -caroteno/ácido linoléico está presente em diversos estudos. Tal método avalia a atividade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoléico e está fundamentado em medidas espectrofotométricas da descoloração (oxidação) do β -caroteno induzida pelos produtos de degradação oxidativa do ácido linoléico. Este método determina a atividade de uma amostra ou composto de proteger um substrato lipídico da oxidação (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

A capacidade de sequestrar o radical DPPH é um método que se baseia na transferência de elétrons de um composto antioxidante para um radical livre, o DPPH, que ao se reduzir perde sua coloração púrpura. Desta forma, avalia apenas o poder redutor do antioxidante, que ao doar um elétron se oxida, e por este motivo não detecta substâncias pró-oxidantes (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

Optar por diferentes testes para a avaliação da atividade antioxidante é importante para a obtenção de resposta mais precisa sobre a interação dos compostos presentes na amostra com os diferentes radicais gerados durante a reação (ROBARDS, 1999). No teste de oxidação do β -caroteno e ácido linoléico, pode-se medir na primeira etapa (15 a 45 minutos) a capacidade dos compostos em doar elétrons ou átomos de hidrogênio, prolongando o período de indução e, na segunda etapa (75 a 105 minutos) a interação com os compostos gerados na degradação do ácido linoléico (JARDINI; MANCINI FILHO, 2007). Por outro lado, se compostos polares forem testados apenas pelo método do β -caroteno pode-se correr o risco de subestimar a atividade antioxidante desses compostos (CARPES, 2008). Dessa forma, é necessário o uso de outros métodos, como o do DPPH que se baseia na redução deste radical pela abstração do H^\bullet pelo antioxidante (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

Existem substâncias antioxidantes que reagem de forma particular com o DPPH implicando em uma cinética diferenciada. Podem-se citar os compostos que reagem lentamente, como o BHT, com estabilização entre 1 e 6 horas, os compostos de cinética rápida, que levam poucos segundos, como o ácido ascórbico e isogenol, e os de cinética intermediária, com reações entre 5 e 30 min, como o α -tocoferol e o ácido rosmarínico (BRAND-WILLIAMS, 1995). Neste estudo, a cinética de reação e a atividade antioxidante dos padrões foram bastante distintas. Em uma cinética de reação o alfa-tocoferol apresentou uma atividade antioxidante elevada por meio dos métodos do DPPH e β -caroteno. Entretanto,

para o BHT pode-se observar valores altos de atividade antioxidante quando utilizado o sistema β -caroteno/ácido linoléico, porém apenas valores menores no método do DPPH, principalmente dos 15 minutos, demonstrando uma cinética relativamente lenta, um comportamento distinto dessa substância pelos dois métodos de determinação da atividade antioxidante.

Para que sejam considerados antioxidantes e possam exercer seu papel biológico é necessário que, em baixa concentração, sejam capazes de impedir, retardar e prevenir à auto-oxidação ou oxidação mediada por radicais livres e que o produto formado após a reação seja estável (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996). A partir da análise dos resultados mostrados tanto no sistema β -caroteno/ácido linoléico e no método de sequestro de radicais livres (DPPH), observa-se um comportamento cinético antioxidante relevante dos extratos etanólicos da casca, galho e folha de *A. macrocarpa* (Benth) Brenan, tanto em 500 quanto em 1000 $\mu\text{g/mL}$, sugerindo que os compostos antioxidantes presentes nestes extratos são bons sequestradores de radicais livres, capazes de bloquear a reação na etapa da iniciação, com alguns extratos apresentando atividade igual ou superiores aos encontrados para o alfa-tocoferol e BHT, mostrando assim, que são bons bloqueadores de reações oxidativas.

Em um estudo que avalia a capacidade antioxidante de *A. macrocarpa*, extratos da casca do caule apresentaram atividade antioxidante. Segundo este estudo, estes extratos apresentam atividade contra o íon peroxila, importantes agentes que intermediam a peroxidação lipídica, danificando assim as membranas celulares, e em consequência desta propriedade, pode desempenhar um papel importante além da atividade anti-inflamatória desta planta descrita na literatura (DESMARCHELIER et al., 1999).

Sugere-se que a atividade antioxidante “in vitro” dos extratos etanólicos da casca, galho e folha de *A. macrocarpa* pode ser explicada pela presença de compostos polifenólicos presentes nesses extratos. A atividade antioxidante de um extrato vegetal está diretamente ligada à sua quantidade de compostos fenólicos totais. Quanto maior a quantidade de compostos fenólicos, maior a atividade antioxidante (SINGH; CHIDAMBARA MURTHY; JAYAPRAKASHA, 2002). Em estudos das partes aéreas desta espécie foi isolado um novo flavonóide denominado de anadantoflavona, e mais 11 compostos já conhecidos: alnusenol, lupenona, lupeol, ácido betunílico, α -amirina, β -amirina, β -sitosterol, estigmasterol, apigenina, ácido 4-hidroxibenzóico e ácido cinâmico (GUTIERRES-LUGO et al., 2004), todos metabólitos com capacidade antioxidante.

No grande grupo dos compostos fenólicos, os flavonóides e os ácidos fenólicos são os que mais se destacam e, são considerados os antioxidantes fenólicos mais comuns de fontes

naturais (KARAKAYA, 2004). A capacidade antioxidante dos polifenóis é devido, principalmente, as suas propriedades redutoras que funcionam como sequestradores de radicais e, algumas vezes, como quelantes de metais (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1997). Os intermediários formados pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático (SOUSA et al., 2007). Agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo, cuja intensidade da ação antioxidante exibida por estes fitoquímicos é diferenciada uma vez que depende fundamentalmente, do número e posição de hidroxilas presentes na molécula (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1997).

Assim, com resultados de atividade antioxidante obtidos, todas as partes da *A. macrocarpa* testados, ou seja, casca, galho e folha podem ser promissores na identificação de compostos antioxidantes.

E por fim, no presente estudo, procurou-se investigar as propriedades antinociceptiva e anti-inflamatória do extrato etanólico da casca de *A. macrocarpa* por meio de vários modelos de indução da nocicepção e inflamação em camundongos com a finalidade de validar seu uso etnofarmacológico.

É bem reconhecido que a maioria dos novos medicamentos descobertos nas últimas décadas tem a sua origem da natureza. Constituintes químicos obtidos de plantas medicinais e outros produtos naturais têm sido cada vez mais utilizados para tratar várias doenças inflamatórias (NAPIMOGA; YATSUDA, 2010). No entanto, o uso indiscriminado de algumas plantas para o tratamento de uma vasta gama de doenças, sem qualquer evidência científica ainda é muito grande e pode ser muito prejudicial.

O presente estudo demonstrou as propriedades antinociceptiva do extrato etanólico da casca de *A. macrocarpa* em dois tipos diferentes de nocicepção: (1) nocicepção visceral (ensaio de contorções abdominais induzidas por ácido acético) - que tem sido muito utilizado como uma ferramenta de triagem para a avaliação de novos agentes com atividades analgésica ou anti-inflamatória, e é descrito como um modelo típico de nocicepção inflamatória visceral (TJÖLSEN; HOLE, 1997). Os efeitos algícos do ácido acético são devidos à liberação de vários mediadores como a histamina, serotonina, bradicinina, citocinas e prostaglandinas (PGE₂ e PGF₂), com um aumento no líquido peritoneal dos níveis desses mediadores (DERAEDT et al., 1980; IKEDA et al., 2001). Esses mediadores são capazes de aumentar a permeabilidade vascular, bem como de reduzir o limite da nocicepção e estimular o terminal nervoso de fibras nociceptivas (MARTINEZ et al., 1999). O ácido acético pode também

ativar diretamente canais de comunicação não seletivos localizados em vias aferentes primárias (JULIUS; BASBAUM, 2001).

(2) Nociceção neurogênica e inflamatória (teste da formalina) - O teste da formalina tem uma vantagem sobre outros testes frequentemente usados, como se trata de uma resposta bifásica, com uma fase inicial (Fase 1) e uma fase final (Fase 2), respectivamente, representando a nociceção neurogênica e inflamatória (HUNSKAAR; HOLE, 1987). Fase 1 corresponde à nociceção neurogênica aguda sensível às drogas que interagem com o sistema opióide, enquanto que na Fase 2 (fase final) corresponde à nociceção inflamatória e é inibida por drogas anti-inflamatórias não-esteróides. Estudos anteriores demonstraram que formalina libera vários mediadores inflamatórios (HUNSKAAR; HOLE, 1987; SANTOS; CALIXTO 1997) como a serotonina, histamina, bradicinina e prostaglandinas, que, pelo menos até certo ponto podem causar a sensibilização dos neurônios nociceptivos centrais (VERMA et al., 2005).

Os resultados demonstraram que o extrato etanólico da casca de *A. macrocarpa* foi capaz de reduzir a resposta nociceptiva comportamental induzida pelo teste de contorção e da fase 2 do teste da formalina. O pré-tratamento com o extrato etanólico da casca de *A. macrocarpa* (50 e 100 mg/kg) inibem a resposta comportamental nociceptiva induzida por formalina na fase 2, um efeito antinociceptivo comparável à morfina. Semelhante, o extrato etanólico da casca de angico (50, 100 e 200 mg/kg) reduziu o edema de pata induzido pela formalina, sendo comparável a indometacina, um potente anti-inflamatório não-esteroidal, que inibe a produção de prostaglandinas, confirmando a ação anti-inflamatória do extrato. Esses resultados apoiam a hipótese da participação do extrato etanólico da casca na inibição da síntese de prostaglandinas e em mecanismos periféricos (BINGHAM et al., 2006). No entanto, a possibilidade de que o extrato etanólico da casca atua sobre a COX ainda precisa ser analisada em estudos futuros. Além disso, o efeito antinociceptivo do extrato etanólico da casca no teste de contorção sugerem que este efeito está relacionado com a supressão da síntese e/ou liberação endógena de substâncias pró-inflamatórias ou pelo bloqueio dos receptores, resultando em efeito antinociceptivo periférico. Essas explicações são corroboradas pelos resultados obtidos com o extrato etanólico da casca na segunda fase do modelo de formalina e na permeabilidade vascular analisada pelo teste do extravasamento do corante azul de Evans.

No presente estudo, também se demonstrou um potencial efeito anti-inflamatório do extrato etanólico da casca de *A. macrocarpa*. Na tentativa de elucidar os mecanismos de ação da atividade anti-inflamatória do extrato, foi realizado o teste de migração de neutrófilos para

a cavidade peritoneal. O modelo de migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal é um modelo experimental de inflamação aguda bem caracterizado, que permite a quantificação e correlação de migração celular, juntamente com vários mediadores pró-inflamatórios (MOORE, 2003). A inflamação induzida por Cg envolve a migração celular, exsudação de plasma e produção de mediadores, como o óxido nítrico, prostaglandina E₂, (IL)-1 β , IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF)- α (SALVEMINI et al., 1996; LORAM et al., 2007). Esses mediadores são capazes de recrutar leucócitos, como neutrófilos, em vários modelos experimentais. O extrato etanólico da casca (100 e 200 mg/kg) inibiu a migração de neutrófilos de maneira dose-dependente e também mostrou potente capacidade de diminuir a permeabilidade vascular evocada pela Cg no teste de azul de Evans. Estes sugerem uma inibição da liberação, na fase inicial da inflamação aguda (1/2-1 h) da bradicinina, histamina e serotonina e da liberação de prostaglandinas em uma fase posterior de inflamação aguda (3-4 h) pelas células locais (DI ROSA et al., 1971; MORRIS, 2003).

As citocinas TNF- α e IL-1 β são importantes mediadores pró-inflamatórias que estão relacionadas com a liberação de outros mediadores pró-inflamatórios, incluindo a bradicinina e substância P (KUO et al., 2000; SANTOS et al., 2003). Esses últimos mediadores estão associados com a quimiotaxia de leucócitos e moléculas de adesão no processo inflamatório (UTSUNOMIYA; NAGAI; OH-ISHI, 1994). O TNF- α é reconhecido como uma potente citocina pró-inflamatória, que é rapidamente produzida em grandes quantidades pelos macrófagos em resposta a estímulos inflamatórios, como infecção bacteriana (VERRI et al., 2006). Para limitar as consequências deletérias da ação prolongada de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β), sua liberação é acompanhada pela liberação de citocinas anti-inflamatórias, como IL-4, IL-10, IL-13 e IL-1ra. Essas citocinas anti-inflamatórias modulam eventos imunes e inflamatórios inibindo a produção e ação das citocinas pró-inflamatórias (VERRI et al., 2006). A diminuição na migração de neutrófilos promovida pelo extrato etanólico da casca não pode ser atribuído à supressão da liberação da citocina pró-inflamatória TNF- α , mas pode ser atribuído ao aumento da produção de IL-10 em camundongos que pode levar à inibição da produção ou ação de citocinas pró-inflamatórias, o que pode levar ao baixo recrutamento de neutrófilos.

Além disso, o extrato etanólico da casca de *A. macrocarpa* apresentou efeitos antinociceptivos em modelos de nocicepção mecânica, teste de Von Frey, este dado pode estar associado com a sua ação anti-inflamatória. Essa idéia é reforçada pelos resultados que mostram que a administração do extrato etanólico da casca causou uma inibição pronunciada da migração de neutrófilos mediada pela Cg na cavidade peritoneal e na formação de edema.

A injeção de Cg na região sub-plantar produz edema desenvolvido em duas fases características: a primeira entre 0 e 24 h, o segundo começa às 24 horas após a injeção de Cg. Durante a primeira fase (fase inicial), os neutrófilos são as células predominantes, enquanto que durante a segunda fase (fase final), há um intenso acúmulo de macrófagos, eosinófilos e linfócitos. Todas essas células são potencialmente capazes de liberar agentes inflamatórios, como aminas vasoativas, prostaglandinas, fatores quimiotáticos, leucotrienos, fator de ativação plaquetária e os componentes lisossômicos (HURLEY, 1983; HENRIQUES et al., 1987).

A Cg induz um processo inflamatório agudo envolvendo três fases: primeira, segunda e terceira fases causadas pela liberação de histamina e serotonina, bradicinina e prostaglandinas, respectivamente (DI ROSA; GIROUD; WILLOUGHBY, 1971; CRUNKHON; MEACOCK, 1971). O edema e a inflamação induzidos por Cg é consequência do aumento de histamina e 5-hidroxitriptamina durante 1 h, após o qual o aumento da permeabilidade vascular é mantido pela liberação de cininas até 2,30 h e de 2,30-6 h os mediadores parecem ser as prostaglandinas, cuja liberação está intimamente associada com a migração de leucócitos para o sítio inflamado (DI ROSA; GIROUD; WILLOUGHBY, 1971). Tanto a histamina quanto a serotonina são caracterizadas pelo aumento da permeabilidade vascular. As prostaglandinas respondem pela máxima resposta vascular durante a terceira fase da inflamação (VINEGAR; SCHREIBER; HUGO, 1969).

No presente trabalho, o tratamento anterior subcutâneo com o extrato etanólico da casca foi eficaz na redução da resposta edematogênica evocada por Cg em camundongos entre a segunda e a quarta hora após a injeção, e o extrato foi mais eficaz que a dexametasona no tempo de 2 h, sendo tão eficaz quanto o anti-inflamatório não-esteroidal em 4 h na redução da resposta edematogênica. Esses dados permitem sugerir que a ação anti-inflamatória do extrato etanólico da casca de *A. macrocarpa* está relacionada com a inibição de uma ou mais vias de sinalização intracelular envolvidos nos efeitos de vários mediadores inflamatórios, como prostaglandinas e óxido nítrico, produzida por isoformas induzível da COX (COX-2) e óxido nítrico sintase (iNOS), respectivamente (SEIBERT et al., 1994). A atividade anti-edematogênica do extrato também está principalmente relacionada com a inibição da migração de neutrófilos na inflamação aguda observada no modelo de migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal. No entanto, o extrato não diminuiu o edema formado na fase tardia.

Além disso, o extrato etanólico da casca também demonstrou ação antinociceptiva através da redução dos níveis de MPO e, conseqüentemente, diminuindo o comportamento

nociceptivo, já que a migração de neutrófilos participa na cascata de eventos que levam a hipernocicepção mecânica (CUNHA et al., 2008). MPO é considerada um marcador de infiltração de células (principalmente neutrófilos) na inflamação. Assim, a atividade da mieloperoxidase é um marcador indireto de leucócitos ativados e está implicado na migração celular e exsudação, juntamente com o óxido nítrico (FRÖDE; MEDEIROS, 2001). O efeito inibitório do extrato etanólico da casca na segunda fase do modelo de formalina (fase inflamatória) confirma a atividade anti-inflamatória do extrato relacionada com a migração de neutrófilos (MPO).

Em resumo, os resultados demonstram um efeito importante para do extrato etanólico da casca de *A. macrocarpa* como um modulador chave em eventos inflamatórios relacionados com a inibição da migração de neutrófilos. Os mecanismos propostos da atividade antinociceptiva com base nos modelos de dor utilizados neste estudo mostram que elas são susceptíveis de serem mediadas periféricamente. Estas atividades anti-inflamatórias e antinociceptiva do extrato bruto etanólico da casca apoiam a utilização tradicional da planta na medicina popular e, principalmente, reforçando a importância e o potencial da *A. macrocarpa* como um fitoterápico no Brasil.

7 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos de atividade antimicrobiana, antiaderência, antioxidante, antinociceptiva e anti-inflamatória da espécie *A. macrocarpa* (Benth) Brenan, conhecida popularmente como angico, permitem considerar esta planta como uma fonte natural para a identificação de novos compostos bioativos, além de justificar o uso tradicional desta planta medicinal pela população, e principalmente, reforça a importância de *A. macrocarpa* como fitoterápico no Brasil.

A *A. macrocarpa* é uma espécie rica em atividade biológica, sendo promissor o isolamento e identificação de novos compostos bioativos e agentes terapêuticos. Deste modo, novos estudos devem ser realizados para investigar a composição química das partes da planta, além de identificar os compostos bioativos e elucidar seus mecanismos de ação, bem como a sua toxicidade principalmente a existência de possíveis efeitos indesejáveis no sistema gastrointestinal.

REFERÊNCIAS

- AJAIKUMAR, K. B.; ASHEEF, M.; BABU, B. H.; PADIKKALA, J. The inhibition of gastric mucosal injury by *Punica granatum* L. (pomegranate) methanolic extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, n. 1/2, p. 171-176, 2005.
- ALAM, S.; BRAILSFORD, S. R.; ADAMS, S.; ALLISON, C.; SHEEHY, E.; ZOITPOULOS, L.; KIDD, E. A.; BEIGHTON, D. Genotypic heterogeneity of *streptococcus oralis* and distinct aciduric subpopulations in human dental plaque. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 3330-3336, 2000.
- AL-CHAER, E. D.; TRAUB, R. J. Biological basis of visceral pain: recent developments. **Pain**, v. 96, p. 221-225, 2002.
- ALIGIANIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINOU, I. B. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origanum* species. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 49, p. 4168-4170, 2001.
- ALMEIDA, T. F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Research**, v. 1000, p. 40-56, 2004.
- ALSTCHUL, S. R. A taxonomic study of the genus *Anadenanthera*. **Contributions from the Gray herbarium of Harvard University**, n. 193, p. 3-65, 1964.
- ALVES, P. M.; PEREIRA, J. V.; HIGINO, J. S.; PEREIRA, M. S. V.; QUEIROZ, L. M. G. Atividade antimicrobiana e antiaderente “in vitro” do extrato de *rosmarinus officinalis* linn. (alecrim) sobre microrganismos cariogênicos. **Arquivos em Odontologia**, v. 44, n. 2, 2008.
- ANDRADE, C. A.; COSTA, C. K.; BORA, K.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G.; KERBER, V. A. Determinação do conteúdo fenólico e avaliação da atividade antioxidante de *Acacia podalyriifolia* A. Cunn. ex G. Don, Leguminosae-mimosoideae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 2, p. 231-235, 2007.
- ARGOLO, A. C. C.; SANT’ANA, A. E. G.; PLETSCHE, M.; COELHO, L. C. B. B. Antioxidant activity of leaf extracts from *Bauhinia monandra*. **Bioresource Technology**, v. 95, n. 2, p. 229-233, 2004.
- ARRUDA, V. M. **Avaliação farmacológica das atividades anti-inflamatória, analgésica e anti-ucrogênica do fitoterápico Sanativo®**. 2008. 82f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Pernambuco, Pernambuco. 2008.

BAQUERO, F.; BLÁZQUEZ, J. Evolution of antibiotic resistance, **Tree**, v. 12, p. 482-487, 1997.

BARATA, L. E. S. **Fitoterápicos**. Disponível em: <<http://www.herbario.com.br>>. Acesso em: 12 nov. 2010.

BEIGHTON, D. The complex oral microflora of high-risk individuals and groups and its role in the caries process. **Community Dentistry and Oral Epidemiology**, v. 33, p. 248-255, 2005.

BESSON, J. M. The complexity of physiopharmacologic aspects of pain. **Drugs**, v. 53, p. 1-9, 1997.

BEVAN, S. Nociceptive peripheral neurons: cellular properties. In: WALL, P. D.; MELZACK, R. **Textbook of pain**. Churchill Livingstone: Londres. 1999, p. 85-103.

BHATTARAM, A. V.; GRAEF, U.; KOHLERT, C. Pharmacokinetics and Bioavailability of Herbal Medicinal Products. **Phytomedicine**, n. 9, supl. III, p. 1-33, 2002.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BINGHAM, S.; BESWICK, P. J.; BLUM, D. E.; GRAY, N. M.; CHESSELL, I. P. The role of the cylooxygenase pathway in nociception and pain. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 17, p. 544-554, 2006.

BOWDEN, G. H. Microbiology of root surface caries in humans. **Journal of Dental Research**, v 69, p. 1205-1210, 1990.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF, 18 de março de 2004.

BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo Patologia**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. 1488p.

BRENAM, J. P. M. Notes of *Mimosideae*: I. **Kew Bull**, n. 2, p. 161-191, 1955.

BRESOLIN, T. M. B.; FILHO, V. C. Contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos. In: Ciências Farmacêuticas, Itajaí/Santa Catarina: Universidade do Vale do Itajaí, p. 239, 2003.

BROINIZI, P. R. B.; ANDRADE-WARTHA, E. R. S.; SILVA, A. M. O.; NOVOA, A. J. V.; TORRES, R. P.; AZEREDO, H. M. C.; ALVES, R. E.; MANCINI-FILHO, J. Avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos naturalmente presentes em subprodutos do pseudofruto de caju (*Anacardium occidentale* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 4, n. 27, p. 902-908, 2007.

BURGESS, P. R.; PERL, E. R. Myelinated afferents fibres responding specifically to noxious stimulation of the skin. **Journal of Physiology**, v. 190, p. 541-562, 1967.

CARDOSO, H. T.; SANTOS, M. L. Estudos sobre a presença de antibióticos nos vegetais. **Bras Med**, São Paulo, v. 62, p. 67-70, 1948.

CARLINI, E. A. Pesquisas com plantas brasileiras usadas em medicina popular. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 29, n. 5/6, p. 109-110, 1983.

CAROTENUTO, A.; DE FEO, V.; FATTORUSSO, E.; LANZOTTI, V.; MAGNO S.; CICALA, C. The flavonoids of *Allium ursinum*. **Phytochemistry**, v. 2, n. 41, p. 531-536, 1996.

CARPES, S. T. Avaliação do potencial antioxidante do pólen apícola produzido na Região Sul do Brasil. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1660-1664, 2008.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies florestais brasileiras: recomendações silviculturais, potencialidades e uso da madeira**. Brasília: EMBRAPA – SPI, 1994. 640 p.

CATE, J. M.; MARSH, P. D. Procedures for establishing efficacy of antimicrobial agents for chemotherapeutic caries prevention. **Journal of Dental Research**, v. 73, p. 695-703, 1994.

CAVALCANTE, A. L. F. A. **Plantas medicinais e saúde bucal: estudo etnobotânico, atividade antimicrobiana e potencial para interação medicamentosa**. 2010. 210f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa. 2010.

CELEGHINI, R. M. S.; VILEGAS, J. H. Y.; LANCAS, F. M. Extraction and quantitative HPLC analysis of coumarin in hydroalcoholic extracts of *Mikania glomerata* Spreng (“guaco”) leaves. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 12, p. 706-709, 2001.

CELOTTI, F.; LAUFER, S. Anti-inflammatory drugs: new multitarget compounds to face an old problem. The dual inhibition concept. **Pharmacological Research**, v. 43, p. 429-436, 2001.

CLARDY, J.; WALSH, C. Lessons from natural molecules. **Nature**, v. 432, n. 7019, p. 829-837, 2004.

COSTA, E. M. M.; ESMERALDO, M. R. A.; CARVALHO, M. G. F.; DANIEL, R. L. D. P.; PASTRO, M. F.; SILVA JÚNIOR, F. L. Avaliação da ação antimicrobiana da própolis e de substâncias utilizadas em endodontia sobre o *Enterococcus faecalis*. **Pesquisa Brasileira em Odontopediatria e Clínica Integrada**, v. 1, n. 8, p. 21-25, 2008.

COUTAUX, A.; ADAM, F.; WILLER, J. C.; LE BARS, D. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. **Joint Bone Spine**, v. 72, n. 5, p. 359-371, 2005.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonóides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**, v. 3, n. 1, 2008. Disponível em: <<http://www.uff.br/RVQ>>. Acesso em: 19 set. 2009.

CRITCHFIELD, J. M. M. K.; RACKE, J. C.; ZUNIGA-PFLUCKER, B.; CANNELLA, C. S.; RAINE, J.; GOVERMAN, M. J. T cell deletion in high antigen dose therapy of autoimmune encephalomyelitis. **Science**, n. 263, p. 1139, 1994.

CRUNKHON, P.; MEACOCK, S. E. R. Mediators of the inflammation induced in the rat paw by carrageenan. **British Journal of Pharmacology**, v. 42, p. 393-402, 1971.

CUNHA, T. M.; VERRI, W. A. JR.; SCHIVO I. R.; NAPIMOGA, M. H.; PARADA, C. A.; POOLE, S.; TEIXEIRA, M. M.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 83, p. 824-832, 2008.

CURIN, Y.; ANDRIANTSITOHAINA, R. Polyphenols as potential therapeutical agents against cardiovascular diseases. **Pharmacological Reports**, v. 57, p. 97-107, 2005.

CURRAN, T. M.; MA, Y.; RUTHERFORD, G. C.; MARQUIS, R. E. Turning on and turning off the arginine deiminase system in oral streptococci. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 44, p. 1078-1085, 1998.

CURY, J. A.; REBELLO, M. A. B.; DEL BEL CURY, A. A. "In situ" relationship between sucrose exposure and the composition of dental plaque. **Caries Research**, v. 31, p. 356-60, 1997.

DELGOBO, C. L.; GORIN, P. A. J.; JONES, C.; IACOMINI, M. Gum heteropolysaccharide and free reducing monosaccharides and oligosaccharides of *Anadenanthera colubrina*. **Phytochemistry**, v. 47, p. 1-8, 1998.

DERAEDT, R.; JOUGNEY, S.; DELEVALCEE, F.; FALHOUT, M. Release of prostaglandin E and F in an algogenic reaction and its inhibition. **European Journal of Pharmacology**, v. 51, p. 17-24, 1980.

DESMARCHELIER, C.; ROMÃO, R. L.; COUSSIO, J.; CICCIA, G. Antioxidant and free radical scavenging activities in extracts from medicinal trees used in the "caatinga" region of northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 67, n. 1, p. 69-77, 1999.

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

DIBDIN, G. H.; SHELLIS, R. P. Physical and biochemical studies of *Streptococcus mutans* sediments suggest new factor linking with cariogenicity of plaque with its extracellular polysaccharide content. **Journal of Dental Research**, v. 67, p. 890-5, 1988.

DUARTE, J. C.; CRUZ, M. P.; S. FILHO, A. O.; SILVA, F. G.; SANTOS, H. C. R.; SILVA, N. R. A.; MARQUES, L. M.; YATSUDA, R. Estudo etnofarmacológico e etnobotânico das plantas medicinais na região do semi-árido da Bahia. In: XX Internacional Congress of Ethnopharmacology e XX Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil, 2008, São Paulo. **XX Internacional Congress of Ethnopharmacology e XX Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil**, 2008. p. 03.032.

DUARTE, M. C. T. Atividade Antimicrobiana de Plantas Mediciniais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. **Multiciência: contruindo a história dos produtos naturais**, v. 7, 2006.

DUARTE, S.; KOO, H.; BOWEN, W. H.; HAYACIBARA, M. F.; CURY, J. A.; IKEGAKI, M.; ROSALEN, P. L. Effect of a Novel Type os Propolis and Its Chemical Fraction on

Glucosyltransferases and on Growth and Adherence of Mutans Streptococci. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 26, n. 4, p. 527-531, 2003.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de sequestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 2, n. 26, p. 446-452, 2006.

DUKE, J. A. **Handbook of medicinal herbs**. Flórida: CRC. Press, Inc., p. 21-420, 1985.

EDDY, N. N.; LEIMBACH, D. Synthetic analgesic. II. Dithienyl-butenyl and dithienylbutylamines. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 107, p. 385-388, 1953.

ELISABETSKY, E.; AMADOR, T.A.; ALBUQUERQUE, R. R.; NUNES, D. S.; CARVALHO, A. C. T. Analgesic activity of *Psychotria colorata* (Willd. ex R. & S.) Muell. Arg. alkaloids. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 48, p. 77-83, 1995.

ELISABETSKY, E.; CASTILHOS, Z. C. Plants used as analgesic by Amazonian caboclos as a basic for selecting plants for investigation. **Intenational Journal of Crude Drug Resarch**, v. 28, p. 309-320, 1990.

EMMONS, R. B.; DUNCAN, D.; ESTES, P. A.; KIEFEL, P.; MOSHER, J. T.; SONNENFELD, M.; WARD, M. P.; DUNCAN, I.; CREWS, S. T. The spineless-aristapedia and tango bHLH-PAS proteins interact to control antennal and tarsal development in *Drosophila*. **Development**, v. 126, p. 3937-3945, 1999.

ESTEVAM, C. S. **Estudo fitoquímica biomonitorado da entrecasca de *Maytenus rigida* Mart. (Celastraceae)**. 2006. 198f. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió. 2006.

FALCÃO, E. P. S.; SILVA, N. H.; GUSMÃO, N. B.; RIBEIRO, S. M.; HONDA, N. K.; PEREIRA, E. C. Atividade antimicrobiana de compostos fenólicos do líquen *Heterodermia leucomela* (L.) Poelt. **Acta farmacéutica bonaerense**, v. 21, n. 1, 2002.

FARNSWORTH, N. R. Medicinal plants in therapy. **Bull World Health Organ**, v. 63, n. 3, p. 965-981, 1985.

FERREIRA, S. H. The role of interleukins and nitric oxide in the mediation of inflammatory pain and its control by peripheral analgesics. **Drugs**, v. 46, p. 1-9.1993.

FRÖDE, T. S.; MEDEIROS, Y. S. Myeloperoxidase and adenosine-deaminase levels in the pleural fluid leakage induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. **Mediators Inflammation**, v. 10, p. 223-227, 2001.

FURST, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. **Brain Res Bull**, v. 48, n. 2, p. 129-41, 1999.

GALIZIA, M. S.; WAITZBERG, D. L. Mecanismos de ação dos radicais livres e antioxidantes. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v. 16, n. 2, p. 79-89, 2001.

GEBARA, E. C. E.; ZARDETTO, C. G. D. C; MAYER, M. P. A. Estudo “in vitro” da ação antimicrobiana de substâncias naturais sobre *S.mutans* e *S.sobrinus*. **Revista da Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas**, n. 10, p. 251-256, 1996.

GEISSMAN , T. A. **Flavonoid compounds, tannins, lignins, and related compounds**. New York: Elsevier, 1963. 265p.

GIBBONS, R. J.; VAN HOUTE, J. Bacterial adherence in oral microbial ecology. **Annual Review of Microbiology**, v. 29, p. 19-44, 1975.

GILROY, D. W.; LAWRENCE, T.; PERETTI, M.; ROSSI, A. G. Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 3, n. 5, p. 401-416, 2004.

GONÇALVES, A. L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 72, n. 3, p. 353-358, 2005.

GONÇALVES, A. L.; ALVES FILHO, A.; MENEZES, H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v.72, n.3, p.353-358, 2005.

GONÇALVES, E. O.; PAIVA, H. N.; NEVES, J. C.; GOMES, J. M. Crescimento de mudas de angico-vermelho (*Anadenanthera macrocarpa* (Benth.) Brenan) sob diferentes doses de macronutrientes. **Árvore**, v. 32, n. 6, p. 1029-1040, 2008.

GUTIERREZ-LUGO, M. T.; DESCHAMPS, J. D.; HOLMAN, T. R.; SUAREZ, E.; TIMMERMENN, B. N. Lipoxigenase inhibition by Anadanthoflavone, a new flavonoid from the aerials parts of *Anadenanthera columbrine*. **Planta Medica**, v. 70, p. 263-265, 2004.

HAMADA, S.; SLADE, H. D. Biology, immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans* and dental caries prevention. **Journal of Dental Research**, v. 63, p. 407-11, 1980.

HAN, C. K.; SON, M. J.; CHANG, H. W.; CHI, Y. S.; PARK, H.; KIM, H. P. Inhibition of prostaglandin production by a structurally-optimized flavonoid derivative, 2',4',7-trimethoxyflavone and cellular action mechanism. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 8, n. 28, p. 1366-1370, 2005.

HANADA, S.; KURAMITSU, H. K. Isolation and characterization of the *Streptococcus mutans* GTFD gene, coding for primer-dependent soluble glucan synthesis. **Infection and Immunity**, v. 57, p. 2079-85, 1989.

HANSSON, G. K. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease. **New England Journal of Medicine**, v. 352, n. 16, p.1685-1695, 2005.

HARBONE, J. B.; PALO, R. T.; ROBBINS, C. T. **Plant defenses against mammalian herbivore**. C R C Press LLC, 1991. 192 p.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. **Journal of Natural Products**, v. 59, p. 205-215, 1996.

HENRIQUES, M. G. M. O.; SILVA, P. M. R.; MARTINS, M. A.; FLORES, C. A.; CUNHA, F. Q.; ASSREUY-FILHO, J.; CORDEIRO, R. S. B. Mouse paw edema. A new model for inflammation? **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 20, p. 243-249, 1987.

HILL, R. G. Molecular basis for the perception of pain. **Neuroscientist**, v. 7, p. 282-292, 2001.

HIROSE, M.; HAGIWARA, A.; INOVE, K.; ITO, N. Combined effects of BHA and other antioxidants in induction of forestomach lesions in rats. **Cancer letters**, v. 30, n. 2, p. 169-174, 1986.

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

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 6, p. 1841-1856, 2005.

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

HURLEY, J. V. **Endogenous chemical mediators of inflammation**: acute inflammation. 2. ed. London: Churchill Livingstone, p. 102-108, 1983.

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

ITO, N.; FUKUSHIMA, S.; HAGIWARA, A.; SHIBATA, M.; OGISO, T. Carcinogenicity of butylated hydroxyanisole in F 344 rats. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 70, p. 343-352, 1983.

JARDINI, F. A.; MANCINI FILHO, J. M. Avaliação da atividade antioxidante em diferentes extratos da polpa e sementes da romã (*Punica granatum*, L.). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n. 1, 2007.

JOHNSON, N. W. **Dental caries**: markers of high and low risk groups and individuals. Cambridge: Cambridge University Press, 1991, p. 62-69.

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

KALISCH, P. A. An overview of research on the history of leprosy. **International Journal of Leprosy**, v. 43, n. 2, p. 129-144, 1975.

KARAKAYA, S. Bioavailability of phenolic compounds. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 44, n. 6, p. 453-464, 2004.

KIM, Y.; SO, H. S.; YOUN, M. J.; KIM, H. J.; WOO, W. H.; SHIN, S. H.; LEE, I.; MOON, B. S.; CHO, K. H.; PARK, R. Anti-inflammatory effect of sasim extracts in PHA-stimulated THP-1 and peripheral blood mononuclear cells from cerebral infarction patients. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, p. 32-39, 2007.

KISHIMOTO, E.; HAY, D. I.; GIBBONS, R. J. A human salivary protein which promotes adhesion of *Streptococcus mutans* serotype c strains to hydroxyapatite. **Infection and Immunity**, v. 57, n. 2, p. 3702-3707, 1989.

KLEIN, M. I.; FLORIO, M. F.; PEREIRA, A. C.; HÖFLING, J. F.; GONÇALVES, R. B. Longitudinal study of transmission, diversity, and stability of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* genotypes in Brazilian nurse children. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 42, n. 10, p. 4620-4626, 2004.

KLUCZYNIK, C. E. N.; SOUZA, J. H.; PALMEIRA, J. D.; FERREIRA, S. B.; ANTUNES, R. M. P.; ARRUDA, T. A.; MORAIS, M. R.; CATÃO, R. M. R. Perfil de sensibilidade de *Salmonella* sp. de ambiente aquático a antimicrobianos comerciais e a extratos etanólicos de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 42, n. 2, p. 141-144, 2010.

KONTINEN, V. K.; STANFA, L. C.; BASU, A.; DICKENSON, A. H. Electrophysiological evidence for increased endogenous GABAergic but not glycinergic inhibitory tone in the rat spinal nerve ligation model of neuropathy. **Anesthesiology**, v. 94, p. 333-339, 2001.

KOO, H.; JEON, J. G. Naturally occurring molecules as alternative therapeutic agents against cariogenic biofilms. **Advances in Dental Research**, v. 21, n. 1, p. 63-68, 2009.

KOO, H.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A.; PARK, Y. K.; BOWEN, W. H. Effects of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and on glucosyltransferase activity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 5, p. 1302-1309, 2002.

KOO, H.; SEILS, J.; ABRANCHES, J.; BURNE, R. A.; BOWEN, W. H.; QUIVEY Jr., R. G. Influence of apigenin on gtf gene expression in *Streptococcus mutans* UA159. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 2, p. 542-546, 2006.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; BEER, E. J. Acetic acid for analgesic screening. **Federation proceedings**, v. 18, p. 412-416, 1959.

KRINSKY, N. I. The biological properties of carotenoids. **Pure and Applied Chemistry**, v. 66, p. 1003-1010, 1994.

KUO, H. P.; LIN, H. C.; HWANG, K. H.; WANG, C. H.; LU, L. C. Lipopolysaccharide enhances substance P-mediated neutrophil adherence to epithelial cells and cytokine release. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 162, p. 1891-1897, 2000.

LAI, J.; GOLD, M. S.; KIM, C. S.; BIAN, D.; OSSIPOV, M. H.; HUNTER, J. C.; PORRECA, F. Inhibition of neuropathic pain by decreased expression of the tetrodotoxin resistant sodium channel, Nav1.8. **Pain**, v. 95, p. 143-152, 2002.

LAMONT, R. J.; ROSAN, B. Adherence of mutans streptococci to other oral bacteria. **Infection and Immunity**, v. 58, n. 6, p. 1738-1743, 1990.

LASTRES, H. M. M.; ALBAGLI, S.; LEMOS, C.; LEGEY, L. Desafios para Políticas na Era do Conhecimento: uma visão fluminense. Rio de Janeiro, **4ª Conferência Nacional de Ciência, Tecnologia e Inovação, Ministério da Ciência e Tecnologia**, 2001.

LEITES, A. C. B. R.; PINTO, M. B.; SOUSA, E. R. de S. Aspectos microbiológicos da cárie dental microbiological. **Salusvita**, v. 25, n. 2, p. 135-148, 2006.

LIM, H.; HO SON, K.; CHANG, H. W.; KANGS, S. S.; KIM, H. P. Inhibition of chronic skin inflammation by topical antiinflammatory flavonoid preparation, ato formula. **Archives of Pharmacal Research**, v. 29, n. 6, p. 503-507, 2006.

LIN, C. H.; CHANG, C. Y. Textural change and antioxidante properties of broccoli under different cooking treatments. **Food chemistry**, v. 90, n. 1-2, p. 9-15, 2005.

LOESCHE, W. J. Role of Streptococcus mutans in human dental decay. **Microbiology Reviews**, v. 50, p. 353-380, 1986.

LORAM, L. C.; FULLER, A.; FICK, L. G.; CARTMELL, T.; POOLE, S.; MITCHELL, D. Cytokine profiles during carrageenan-induced inflammatory hyperalgesia in rat muscle and hind paw. **Pain**, v. 8, p. 127-136, 2007.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 2. ed. São Paulo: Plantarum, v. 1, 1998.

MACHADO, R. R. B.; MEUNIER, I. M. J.; SILVA, J. A. A.; CASTRO A. A. J. F. Árvores nativas para arborização de Teresina, Piauí. **Revista da Sociedade Brasileira de Arborização Urbana**, v. 1, p. 10-18, 2006.

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

MAGINA, M. D. A.; DALMARCO, E. M.; WISNIEWSKI, A.; SIMIONATTO, E. L.; DALMARCO, J. B.; PIZZOLATTI, M. G.; BRIGHENTE, I. M. C. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of *Eugenia* species. **Journal of Natural Medicines**, v. 63, p. 345-350, 2009.

MARQUIS, R. E.; CLOCK, S. A.; MOTA-MEIRA, M. Fluoride and organic weak acids as modulators of microbial physiology. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 26, p. 493–510, 2003.

MARSCH, P. D.; NYVAD, B. The oral microflora and biofilms on teeth. In: FEJERSKOV, O.; KIDD, E. A. M. **Dental Caries**, London: Blackwell Munksgaard, 2003, p. 30-48.

MARSH, P. D. Are dental diseases examples of ecological catastrophes? **Microbiology**, v. 149, p. 279-294, 2003.

MARSH, P. D. Host defences and microbial homeostasis: role of microbial interactions. **Journal of Dental Research**, Chicago, v. 68, p. 1567-1575, 1989.

MARTINEZ, V.; THAKUR, S.; MOGIL, J. S.; TACHÉ, Y.; MAYER, E. A. Differential effects of chemical and mechanical colonic irritation on behavioral pain response to intraperitoneal acetic in mice. **Pain**, v. 81, p. 163-185, 1999.

MATOS, F. J. A. **Introdução a fitoquímica experimental**. Fortaleza: UFC, 1988.

MENDONÇA-FILHO, R. R.; Bioactive Phytocompounds: New Approaches in the Phytosciences. In: AHMAD, I.; AQIL, F.; OWAIS, M. **Modern Phytomedicine: turning medicinal plants into drugs**. Alemanha: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2006.

MENSOR L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; SANTOS, T. C.; COUBE, C. S. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 27-30, 2001.

MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in Neurobiology**, v. 57, p. 161-164, 1999.

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

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; LINS-NETO, E. M. F.; ARAÚJO, E. L.; AMORIN, E. L. C. Use patterns and knowledge of medicinal species among two rural communities in Brazil's semi-arid northeastern region. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, p. 173-186, 2006.

MOORE, A. R. Pleural models of inflammation: immune and nonimmune. **Methods in Molecular Biology**, v. 225, p. 123-128, 2003.

MORENILLA-PALAO, C.; PLANELLS-CASES, R.; GARCIA-SANZ, N.; FERRER-MONTIEL, A. Regulated exocytosis contributes to protein kinase C potentiation of vanilloid receptor activity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 2665-2672, 2004.

MORETÃO, M. P.; ZAPRONIO, A. R.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M.; OLIVEIRA, M. B. M. Induction of secretory and tumorigenic activities in peritoneal macrophages activated by an acidic heteropolysaccharide (ARAGAL) from the gum of *Anadenanthera colubrina* (Angico branco). **Immunology Letters**, v. 93, p. 189-197, 2004.

MORI, S. A.; SILVA, L. A. M.; LISBOA, G.; CORADIN, L. **Manual de manejo do herbário fanerogâmico**. CEPLAC, Ilhéus, 1989.

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

MOSCA, R. C. **Inibição do crescimento da microflora oral por venenos de serpentes**. 2008. 95f. Dissertação (Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares. Autarquia Associada à Universidade de São Paulo, São Paulo. 2008.

NAPIMOGA, M. H.; CAVADA, B. S.; ALENCAR, N. M.; MOTA, M. L.; BITTENCOURT, F. S.; ALVES-FILHO, J. C.; GRESPLAN, R.; GONÇALVES, R. B.; CLEMENTE-NAPIMOGA, J. T.; DE FREITAS, A.; PARADA, C. A.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Lonchocarpus sericeus lectin decreases leukocyte migration and mechanical hypernociception by inhibiting cytokine and chemokines production. **International Immunopharmacology**, v. 7, p. 824-835, 2007.

NAPIMOGA, M. H.; YATSUDA, R. Scientific evidence for *Mikania laevigata* and *Mikania glomerata* as a pharmacological tool. **The Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 62, p. 809-820, 2010.

NASCIMENTO, G. G. F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P. C.; SILVA, G. L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.31, n.4, p. 247-256, 2000.

NESS, J.; SHERMAN, F. T.; PAN, C. X. Alternative medicine: what the data say about common herbal therapies. **Geriatrics**, v. 54, n. 10, p. 33-38, 1999.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 7, p. 1022-1037, 2003.

NOGUEIRA, M. S. Ação de Produtos Naturais sobre Populações Bacterianas. 2000. 131p. (Dissertação de Mestrado em Genética) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

NUNES, B. S.; RENSONNET, N. S.; DAL-SECCO, D.; VIEIRA, S. M.; CAVADA, B. S.; TEIXEIRA, E. H.; MOURA, T. R.; TEIXEIRA, C. S.; CLEMENTE-NAPIMOGA, J. T.; CUNHA, F. Q.; NAPIMOGA, M. H. Lectin extracted from *Canavalia grandiflora* seeds presents potential anti-inflammatory and analgesic effects. **Naunyn-Schmied Arch Pharmacol**, v. 379, p. 609-616, 2009.

OLIVEIRA, M. A. C. **Plantas medicinais utilizadas para problemas bucais: estudo etnobotânico em diferentes biomas da Paraíba**. 2010. 111f. Monografia (Graduação em Odontologia) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa. 2010.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD. **Pautas para lãs metodologias de investigación de La medicina tradicional**. Ginebra, 2000. Disponível em: <<http://www.who.it./em>>. Acesso em: 21 ago. 2009.

PAES LEME, A. F.; KOO, H.; BELLATO, C. M.; BEDI, G.; CURY, J. A. The role of sucrose in cariogenic dental biofilm formation-new insight. **Journal of Dental Research**, v. 85, p. 878–887, 2006.

PALMEIRA, J. D.; FERREIRA, S. B.; DE SOUZA, J. H.; DE ALMEIDA, J. M.; FIGUEIREDO, M. C.; PEQUENO, A. S.; ARRUDA, T. A.; ANTUNES, R. M. P.; CATÃO, R.M. R. Avaliação da atividade antimicrobiana “in vitro” e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos hidroetanólico de angico sobre cepas de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 42, n. 1, p. 33-37, 2010.

PANSERA, M. R.; SANTOS, A. C. A.; PAESE, K.; WASUM, R.; ROSSATO, M.; ROTA, L. D.; PAULETTI, G. F.; SERAFINI, L. A. Análise de taninos totais em plantas aromáticas e medicinais cultivadas no Nordeste do Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 13, n. 1, p. 17-22, 2003.

PAULA, F.; RAMOS, E. F.; LOCKS, M.; BELTRÃO, M.; VARGAS, A. Plantas de utilização estomacal pela comunidade sertaneja de Central - Bahia - Brasil. *In: Anais da 5ª Jornada paulista de plantas medicinais. Natureza, ciência e comunidade*, Botucatu. p. 140, 2001.

PAULA, J. E. Estudo das estruturas internas das madeiras de dezesseis espécies da flora brasileira visando o aproveitamento econômico para a produção de álcool, carvão, coque e papel. **Brasil Florestal II**, v. 11, n. 47, p. 23-50, 1981.

PAULA, J. E.; ALVES, J. L. de H. **Madeiras nativas**: anatomia, dendrologia, dendrometria, produção e uso. Brasília, 1997. 543 p.

PEDERSON, C. S.; FISHER, P. Bactericidal activity of vegetable juice. **Journal of Bacteriology**, v. 47, p. 421-422, 1984.

PEREIRA, J. V.; PEREIRA, M. S. V.; SAMPAIO, F. C.; SAMPAIO, M. C. C.; ALVES, P. M.; ARAÚJO, C. R. F.; HIGINO, J. S. Efeito antibacteriano e antiaderente “in vitro” do extrato da *Punica granatum Linn.* Sobre microrganismos do biofilme dental. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 88-93, 2006.

PESSOA, W. S. **Avaliação do elixir Sanativo[®] sobre o processo de alveolite dental induzida em ratos (*Rattus norvegicus albinus*)**. 2008. 68f. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal do Pernambuco, Recife. 2008.

PIO CORRÊA, M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das plantas exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: Imprensa Nacional, p. 125-126, 1978.

PORRECA, F.; OSSIPOV, M. H.; GEBHART, G. F. Chronic pain and medullary mdescending facilitation. **Trends in Neuroscience**, v. 25, p. 319-324, 2002.

RAJA, S.N.; MEYER, R.A.; RINGKAMP, M.; CAMPBELL, J.N. WALL, P. D.; MELZACK, R. **Textbook of pain**. Churchill Livingstone: Londres. 1999, p.11-57.

REDDY, L.; ODHAV, B.; BHOOLA, K. D. Natural products for câncer prevention: a global perspective. **Pharmacol & therapeutics**, v. 99, p. 1-13, 2003.

REN, K.; DUBNER, R. Descending modulation in persistent pain: an update. **Pain**, v. 100, p. 1-6, 2002.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends Plant Science**, v. 4, p. 304-309, 1997.

ROBARDS, K.; PRENZLER, P. D.; TUCKER, G.; SWATSITANG, P.; GLOVER, W. Phenolic compounds and their role in processes in fruits. **Food Chemistry**, v. 66, n. 4, p. 401-436, 1999.

RODRIGUES, A. C. C.; OSUNA, J. T. A.; QUEIROZ, S. R. O. D.; RIOS, A. P. S. Efeito do substrato e luminosidade na germinação de *Anadenanthera colubrina* (Fabaceae, Mimosoideae). **Árvore**, v. 31, n. 2, p. 187-193, 2007.

RÖLLA, G. CIARDI, J.; EGGEN, K.; BOWEN, W. H.; AFSETH, J. Free glucosyl- and fructosyltransferase in human saliva and adsorption of these enzymes to teeth "in vivo". *In*: DOYLE, R. J.; CIARDI, J. E. **Glucosyltransferases, glucans, sucrose, and dental caries**. Washington: IRL Press, p. 21-30, 1983.

ROSSING, D.; KAHL, R.; HILDEBRANDT, A. G. Effect of synthetic antioxidants on hydrogen peroxide formation, oxyferro cytochrome P450 concentration and oxygen consumption in liver microsomes. **Toxicology**, v. 34, n. 1, p. 67-77, 1985.

SAKAGAMI, Y.; KAJAMURA, K. Bactericidal activities of disinfectants against vancomycin – resistant Enterococci. **Journal of Hospital Infection**, v.50, n.2, p.140-144, 2002.

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

SAMY, R. P.; GOPALAKRISHNAKONE, P. Therapeutic potential of plants as anti-microbials for drug discovery. **eCAM**, v. 7, n. 3, p. 283–294, 2010. Disponível em: <<http://ecam.oxfordjournals.org>>. Acesso em: 21 dez. 2010.

SANSONE, C. J.; VAN HOUTE, J.; JOSHIPURA, K.; KENT, R.; MARGOLIS, H. C. The association of mutans streptococci and non-mutans streptococci capable of acidogenesis at a low pH with dental caries on enamel and root surfaces. **Journal of Dental Research**, v. 72, p. 508-516, 1993.

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

SANTOS, D. R.; CALIXTO, J. B.; SOUZA, G. E. Effect of a kinin B₂ receptor antagonist on LPS-and cytokine-induced neutrophil migration in rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 139, p. 271-278, 2003.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O.; MENTZ, L. A.; SCHENKEL, E. P.; IRGANG, B. E.; STEHMANN, J. R. **Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da Universidade UFRGS, 2007.

SCHILLING, K. M.; BOWEN, W. H. Glucans synthesized “in situ” in experimental salivary pellicle function as specific binding sites for *Streptococcus mutans*. **Infection and Immunity**, v. 60, p. 284-95, 1992.

SEIBERT, K.; ZHANG, Y.; LEAHY, K.; HAUSER, S.; MASFERRER, J.; PERKINS, W.; LEE, L.; ISAKSON, P. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, p. 12013-12017, 1994.

SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Método para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v. 22, n. 1, p. 94-103, 1999.

SINGH, K. V.; SHUKLA, N. P. Activity on multiple resistant bacteria of garlic (*Allium sativum*) extract. **Fitoterapia**, v. 55, p. 313-315, 1984.

SINGH, R. P.; CHIDAMBARA MURTHY, K. N.; JAYAPRAKASHA, G. K. Studies on the antioxidant activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using “in vitro” models. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 81-86, 2002.

SONAGLIO, D. ORTEGA, G. G.; PETROVICK, P. R.; BASSANI, V. L. In: SIMÕES, C. M. O.; MENTZ, L. A.; SCHENKEL, E. P.; IRGANG, B. E.; STEHMANN, J. R. **Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da Universidade UFRGS, 2007.

SOUZA, J. R. P.; TAKAHASHI, L. S. A.; YOSHIDA, A. E.; GUIRAUD, M. C.; ROCHA, J. N. Tempo de armazenamento e temperatura na porcentagem e velocidade de germinação das sementes de camomila. **Ciência Rural**, v. 37, n. 4, p. 982-986, 2007.

TANZER, J. M.; FEEDMAN, M. L.; FITZGERALD, R. J. Virulence of mutans defective in glucosyltransferase, dextran-mediated aggregation, or dextranase activity. In: MERGENHAGEN, S. E.; ROSAN, B. **Molecular basis of oral microbial adhesion**. Washington, p. 204-11, 1985.

THURSTON, G.; RUDGE, J. S.; IOFFE, E.; ZHOU, H.; ROSS, L.; CROLL, S. D.; GLAZER, N.; HOLASH, J.; MCDONALD, D. M.; YANCOPOULOS, G. D. Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage. **Nature Medicine**, v. 6, p. 460-463, 2000.

TING, E.; ROVERONI, R. C.; FERRARI, L. F.; LOTUFO, C. M.; VEIGA, M. C.; PARADA, C. A.; TAMBELI, C. H. Indirect mechanism of histamine-induced nociception in temporomandibular joint of rats. **Life Science**, v. 81, n. 9, p. 765-771, 2006.

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

TJÖLSEN, A.; HOLE, K. Animals models of analgesia. In: DICKENSON, A. H.; BESSON, J. M. **The Pharmacology of pain**. Berlin: Springer-Verlag, p. 1-20, 1997.

TORRES, C. M.; REPKE, D. B. *Anadenanthera*: visionary plant of ancient South America. USA: Routledge, p. 95-104, 2006.

TURP, J. A.; DWORKIM, S. F. Screening for psychological risk factors in patients with chronic orofacial pain. **Journal of the American Medical Association**, v 135, p. 1119-1125, 2004.

UCHÔA, V. T.; CARVALHO, A. A.; SOUSA, C. M. M.; CHAVES, M. H.; SANT'ANA, A. E. G. Evaluation of the antioxidizing activity of isolated *Ximenia americana* L. extracts and compounds. In: **1ST Brazilian Conference on Natural Products and XXVII Annual Meeting on Micromolecular Evolution, Systematics and Ecology [RESEM]**; São Pedro, SP, 2007.

UTSUNOMIYA, I.; NAGAI, S.; OH-ISHI, S. Differential effects of indomethacin and dexamethasone on cytokine production in carrageenin-induced rat pleurisy. **European Journal of Pharmacology**, v. 252, p. 213-218, 1994.

VACHER, J.; DUCHÊNE-MARULLAZ, P.; BARRAT, P. A propos de quelques produits usuels. Comparaison de deux méthodes d'étude des analgésiques. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 11, p. 51-58, 1964.

VALE, F. M. Dor novos aspectos fisiopatológicos e consequentes estratégias farmacológicas. **Revista da Faculdade Medicina Lisboa**, v. 5, p. 291-304, 2003.

VAN HOUTE, J. Role of of micro-organisms in the caries etiology. **Journal of Dental Research**, v. 73, p. 672-81, 1994.

VERMA, P. R.; JOHARAPURKAR, A. A.; CHATPALLIWAR, V. A.; ASNANI, A. Antinociceptive activity of alcoholic extract of *Hemidesmus indicus* R.Br. in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, p. 298-301, 2005.

VERRI Jr., W. A.; CUNHA, T. M.; PARADA, C. A.; POOLE, S.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development? **Pharmacology & Therapeutics**, v. 112, p. 116-138, 2006.

VIANA, A. P. P. **Avaliação da atividade antimicrobiana de *Anadenanthera macrocarpa* e *Stryphnodendron coriaceum* frente a cepas de *Salmonella* spp.** 2003. 53 p. Monografia (Graduação) – Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande. 2003.

VILEGAS, J. H. Y.; MARCHI, E.; LANCAS, F. M. Extraction of lowpolarity compounds (with emphasis on coumarin and kaurenoic acid) from *Mikania glomerata* (Guaco) leaves. **Phytochemical Analysis**, v. 8, p. 266-270, 1997.

VINEGAR, R.; SCHREIBER, W.; HUGO, R. Biphasic development of carrageenan edema in rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 166, p. 96-103, 1969. WALL, P. D. Introduction to the fourth edition. In: WALL, P. D.; MELZACK, R. **Textbook of pain**. Churchill Livingstone: Londres. 1999, p.1-8.

WEBER SOBRINHO, C. R. **Determinação da atividade antimicrobiana e citotóxica de extratos da casca do caule de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan var. *Cebil* (Griseb.) Von Reis Alt. (angico-de-carço).** 2010. 111f. Dissertação (Mestrado em Patologia) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2010.

WINTER, C.; RISLEY, E.; NUSS, G. Carrageenan-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. In: **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine III**. p. 544, 1962.

WOOLF, C. J., SALTER, M. W. Neuronal plasticity: Increasing the gain in pain. **Science**, 288, 1765-1769, 2000.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Legal status of traditional medicine and complementary alternative medicine**. Geneve: World Health Organization; 2001. Disponível em: <<http://www.who.it.em>>. Acesso em: 21 ago. 2009.

WÜRTZEN, G.; OLSEN, P. Chronic study on BHT in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 24, n. 10-11, p. 1121-1125, 1986.

YATSUDA, R. **Efeito antimicrobiano “in vitro” da *Mikania laevigata* e *Mikania glomerata* sobre estreptococos do grupo mutans.** 2008. 67f. Dissertação (Mestrado em Odontologia). Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Piracicaba. 2004.

YATSUDA, R.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A.; MURATA, R. M.; REHDERB, V. L. G.; MELOB, L. V.; KOO, H. Effects of *Mikania* genus plants on growth and cell adherence of mutans streptococci. **Journal Ethnopharmacology**, v. 97, p. 83-189, 2005.

ZANETTI, G. D. ***Tropaeolum majus* L. morfo-histologia, fitoquímica, atividade antimicrobiana e toxicidade.** Santa Maria: Curso de Pós-Graduação em Ciências e Tecnologia Farmacêutica, UFSM, 2002. Dissertação de Mestrado.