

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
FACULDADE DE BIOMEDICINA

FERNANDA SANTOS LOUREIRO

AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DAS PROPRIEDADES
ANTIINFLAMATÓRIAS DA PLANTA *MAYTENUS ILICIFOLIA* MART EX
REISSEK (CELESTRACEAE)

BELÉM
2009

FERNANDA SANTOS LOUREIRO

AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DAS PROPRIEDADES
ANTIINFLAMATÓRIAS DA PLANTA *MAYTENUS ILICIFOLIA* MART EX
REISSEK (CELESTRACEAE)

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à
Faculdade de Biomedicina da Universidade
Federal do Pará, como requisito parcial para a
obtenção do grau de Bacharel em Biomedicina.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Elena Crespo López.

BELÉM
2009

FERNANDA SANTOS LOUREIRO

**AVALIAÇÃO PRÉ-CLÍNICA DAS PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS
DA PLANTA *MAYTENUS ILICIFOLIA* MART EX REISSEK
(CELESTRACEAE)**

Este Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) foi julgado adequado para obtenção da
do título de Bacharel em Biomedicina e aprovado em sua forma final junto a
Faculdade de Biomedicina da Universidade Federal do Pará.

LOCAL E DATA DA DEFESA: Belém, 04 de dezembro de 2009

BANCA EXAMINADORA:

PRESIDENTE:

PROFA. DRA MARIA ELENA CRESPO LÓPEZ

MEMBRO:

PROFA. DRA GILMARA DE NAZARTH TAVARES BASTOS

MEMBRO:

PROF. MSC. LUÍS ANTÔNIO LOUREIRO MAUÉS

SUPLENTE:

PROF. DR. PERGENTINO JOSÉ DA CUNHA SOUSA

Agradecimentos

Agradeço:

Primeiramente a Deus, força maior e guia da minha vida;

Aos meus pais, que me deram todo o apoio de que precisei, sabendo incentivar essa filha em todos os momentos, compreendendo as ausências e dando suporte material e emocional ao desenvolvimento de minhas atividades;

Ao professor Rômulo Feio, que cedeu estrutura física, reagentes e apoio intelectual em prol dos experimentos;

Ao senhor Amarildo Melo, que não mediu esforços para me ajudar sempre que precisei;

Aos amigos do Laboratório de Farmacologia Molecular, em especial a Danielle Coelho, companheira em todas as etapas evolutivas do trabalho;

Ao professor José Eduardo da Silva Santos;

A professora Maria Elena Crespo López, alguém que se revelou mais que uma orientadora, e sim uma amiga disposta a sustentar-me nos momentos de maior dificuldade;

Ao programa institucional de bolsas de iniciação científica (PIBIC/CNPQ) pelo incentivo financeiro.

RESUMO

Maytenus ilicifolia L., ou espinheira-santa — como é conhecida na linguagem popular — é uma planta brasileira que vem sendo utilizada de diversas formas na medicina empírica. Uma das principais aplicações é do efeito gastroprotetor, o qual foi empírica e experimentalmente evidenciado. Todavia, não existe na literatura um vasto número de trabalhos sobre a propriedade anti-inflamatória dessa planta. Por isso, nesse estudo verificaremos o efeito antiedematogênico do sobrenadante etanólico do extrato aquoso de *M. ilicifolia* (SEEA). Para tanto serão realizados tratamentos pelas vias oral e intraperitoneal antes da indução de edema de pata por carragenina. O edema de pata será mensurado pelo método de plestismometria.

PALAVRAS-CHAVE

espinheira-santa, anti-inflamatório, antinociceptivo, produtos naturais

ABSTRACT

Maytenus ilicifolia L., or espinheira-santa in the popular language, is a brazilian plant that had been used to a lot of thinks in the empiric medicine. One of her principal applications is a gastric protective effect that was empiric and experimentally evidenced. However, don't have in the literature a large number of studies about the anti-inflammatory propriety of the plant. Thus, in this study we will search the antiedematogenic effect of the etanolic supernatant of the aqueous extract of *M. ilicifolia* (SEEA). So, we will do orals or intraperitoneal treatment before the paw edema induction by carrageenin. The paw edema will be measured per pletismometry.

KEY-WORDS

Espinheira-santa, anti-inflammatory, antinociceptive, natural products

SUMÁRIO

AGRADECIMENTO.....	i
RESUMO.....	ii
ABSTRACT.....	ii
SUMÁRIO.....	iii
LISTA DE FIGURAS.....	iv
 I – INTRODUÇÃO.....	 1
 II – OBJETIVOS	
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	6
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	6
 III – MATERIAL E MÉTODOS	
3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	7
3.2 SOLUÇÃO EXTRATIVA DE <i>MAYTENUS ILICIFOLIA</i>	7
3.3 PRÉTRATAMENTOS.....	7
3.4 AVALIAÇÃO DO EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA.....	8
3.5 AÇÃO DO INIBIDOR NÃO SELETIVO DA OXIDO NÍTRICO SINTASE (NOS) SOBRE O EFEITO DO SOBRENADANTE ETANÓLICO DO EXTRATO AQUOSO DE <i>MAYTENUS ILICIFOLIA</i>	8
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	8
 IV – RESULTADOS.....	 9
 V – DISCUSSÃO.....	 15
 VI – CONCLUSÃO.....	 19
 VII – REFERÊNCIAS.....	 20

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	<i>Maytenus ilicifolia</i> (Celastraceae). Sítio de Herta Bianco, Porto União/SC; - Foto de Anestor Mezzomo. Um arbusto de crescimento lento que atinge, no máximo, cinco metros de altura e com folhas inteiriças que apresentam espinhos nas bordas, caracterizando o seu nome popular: Espinheira Santa. <i>Fonte: http://picasaweb.google.com/lh/photo/A6-H4Tu089MAL0i7Bw53vw</i>	03
Figura 2	Camundongo Swiss	07
Figura 3	Sobrenadante etanólico do extrato aquoso de <i>Maytenus ilicifolia</i>	07
Figura 4	Efeito do sobrenadante etanólico do extrato aquoso de <i>Maytenus ilicifolia</i> (SEEA) sobre o edema induzido pela carragenina. Camundongos foram pré-tratados <u>intraperitonealmente</u> com solução salina isotônica (linhas e barras vermelhas) ou 300 mg/Kg de SEEA (linhas e barras azuis) <u>trinta minutos antes</u> da injeção de carragenina; (A) Edema mensurado nas primeiras quatro horas após a carragenina. (B) Edema mensurado nos 7 dias seguintes. Os resultados representam a média $\pm$ erro padrão de 5-6 animais por grupo. * $p < 0,05$ versus controle para cada tempo.	10
Figura 5	Efeito do sobrenadante etanólico do extrato aquoso de <i>Maytenus ilicifolia</i> (SEEA) sobre o edema induzido pela carragenina. Camundongos foram pré-tratados <u>intraperitonealmente</u> com solução salina isotônica (linhas e barras vermelhas) ou 300 mg/Kg de SEEA (linhas e barras azuis) <u>uma hora antes</u> da injeção de carragenina; (A) Edema mensurado nas primeiras quatro horas após a carragenina. (B) Edema mensurado nos 7 dias seguintes. Os resultados representam a média $\pm$ erro padrão de 5-6 animais por grupo. * $p < 0,05$ versus controle para cada tempo.	10
Figura 6	Efeito do sobrenadante etanólico do extrato aquoso de <i>Maytenus ilicifolia</i> (SEEA) sobre o edema induzido pela carragenina. Camundongos foram pré-tratados <u>intraperitonealmente</u> com solução salina isotônica (linhas e barras vermelhas) ou 300 mg/Kg de SEEA (linhas e barras azuis) <u>seis horas antes</u> da injeção de carragenina; (A) Edema mensurado nas primeiras quatro horas após a carragenina. (B) Edema mensurado nos 7 dias seguintes. Os resultados representam a média $\pm$ erro padrão de 5-6 animais por grupo. * $p < 0,05$ versus controle para cada tempo.	11
Figura 7	Efeito do sobrenadante etanólico do extrato aquoso de <i>Maytenus ilicifolia</i> (SEEA) sobre o edema induzido pela carragenina. Camundongos foram pré-tratados <u>intraperitonealmente</u> com solução salina isotônica (linhas e barras vermelhas) ou 300 mg/Kg de SEEA (linhas e barras azuis) <u>doze horas antes</u> da injeção de carragenina; (A) Edema mensurado nas primeiras quatro horas após a carragenina. (B) Edema mensurado nos 7 dias seguintes. Os resultados representam a média $\pm$ erro padrão de 5-6 animais por grupo. * $p < 0,05$ versus controle para cada tempo.	11

Figura 8	Efeito do sobrenadante etanólico do extrato aquoso de <i>Maytenus ilicifolia</i> (SEEA) sobre o edema induzido pela carragenina. Camundongos foram pré-tratados <u>intraperitonealmente</u> com solução salina isotônica (linhas e barras vermelhas) ou 300 mg/Kg de SEEA (linhas e barras azuis) 24 horas antes da injeção de carragenina; (A) Edema mensurado nas primeiras quatro horas após a carragenina. (B) Edema mensurado nos 7 dias seguintes. Os resultados representam a média $\pm$ erro padrão de 5-6 animais por grupo. * $p < 0,05$ versus controle para cada tempo.	12
Figura 9	Efeito do sobrenadante etanólico do extrato aquoso de <i>Maytenus ilicifolia</i> (SEEA) sobre o edema induzido pela carragenina. Camundongos foram pré-tratados <u>intraperitonealmente</u> com solução salina isotônica (linhas e barras vermelhas) ou 300 mg/Kg de SEEA (linhas e barras azuis) 48 horas antes da injeção de carragenina; (A) Edema mensurado nas primeiras quatro horas após a carragenina. (B) Edema mensurado nos 7 dias seguintes. Os resultados representam a média $\pm$ erro padrão de 5-6 animais por grupo. * $p < 0,05$ versus controle para cada tempo.	12
Figura 10	Ação do L-NAME sobre o efeito do sobrenadante etanólico do extrato aquoso de <i>Maytenus ilicifolia</i> (SEEA) sobre o edema de pata induzido pela carragenina. Camundongos foram pré-tratados com solução salina isotônica (SSI) (linhas e barras vermelhas), SEEA (linhas e barras laranjas), L-NAME (linhas e barras amarelas) ou SEEA + L-NAME (linhas e barras verdes) antes da injeção de carragenina; (A) Edema mensurado nas primeiras quatro horas após a carragenina. (B) Edema mensurado nos 7 dias seguintes. Os resultados representam a média $\pm$ erro padrão de 5-6 animais por grupo. * $p < 0,05$ versus SSI e # $p < 0,05$ versus L-NAME para cada tempo.	13
Figura 11	Efeito do sobrenadante etanólico do extrato aquoso de <i>Maytenus ilicifolia</i> (SEEA) sobre o edema induzido pela carragenina. Camundongos foram pré-tratados pela <u>via oral</u> com água (linhas e barras vermelhas), SEEA (30, 100 ou 300 mg/Kg v.o.; linhas e barras azuis, laranjadas e verdes respectivamente) ou indometacina (5 mg/kg, v.o.; linhas e barras amarelas) durante dois dias ; (A, C e E) Edema mensurado nas primeiras quatro horas seguintes a administração de carragenina. (B, D e F) Edema mensurado nos 7 dias seguintes. Os resultados representam a média $\pm$ erro padrão de 6 ou 7 animais por grupo. # $p < 0,05$ versus Indometacina. ND=não detectado	14

I - INTRODUÇÃO

O processo inflamatório consiste na resposta orgânica mais precoce diante de lesão tissular ou infecção. Este processo fisiológico envolve uma ação coordenada entre o sistema imunológico e o tecido no qual ocorreu a lesão (TILLEY, et. al., 2001). A inflamação, portanto, é uma desordem complexa envolvendo componentes celulares e moleculares, sendo uma resposta inespecífica a uma agressão específica. O agente responsável pela agressão pode ter natureza química, física ou biológica (ZHOU et. al., 2007; LIMA et. al., 2009).

É considerada essencialmente como uma resposta de defesa do organismo, geralmente localizada, transitória e autolimitada. Após seu desencadeamento, determinado por algum estímulo lesivo, observa-se uma fase inicial denominada fase aguda, que de maneira geral é estereotipada, ou seja, obedece a um padrão semelhante independente da natureza do estímulo, apresentando duração relativamente curta, perdurando por alguns minutos, várias horas ou por um ou dois dias (ARSATI, et. al., 1999). Durante o desenvolvimento da fase aguda ocorrem fenômenos vasculares e celulares que levam ao surgimento dos quatro sinais cardeais da inflamação: calor, rubor (eritema), tumor (edema) e dor, descritos por Cornelius Celsus no início do século (*“Signa inflammationis quatuor sunt: Rubor et Tumor, cum Calor et Dolor”*), redescobertos em 1443 pelo Papa Nicolas V. (LUENGO, 2005). Mais tarde foi introduzido, como o quinto sinal, a perda de função do tecido ou órgão lesado (ARSATI, et. al., 1999).

Quando o estímulo desencadeante do processo inflamatório é autolimitado ou controlado por tratamento, a inflamação é inibida e as repercussões sanadas. Se a inflamação não for tratada adequadamente, pode persistir ou recidivar, levando a um padrão de cronicidade, como ocorre em neoplasias, colagenoses e infecções crônicas (BALLOU, et. al., 1993; VOLANAKIS, et. al., 1993; BAUMANN, et. al., 1994).

Todavia, apesar de ser considerada como uma resposta de defesa do organismo, tornou-se claro que as reações inflamatórias ou imunológicas inadequadas formam um componente significativo de muitas, se não da maioria, das doenças encontradas na clínica. Conseqüentemente, os fármacos antiinflamatórios são extensamente empregados em todos os ramos da medicina (RANG & DALE, 2008).

Na atualidade tais fármacos podem ser divididos em três grandes grupos: os antiinflamatórios não-esteróides (AINEs); os fármacos anti-reumáticos modificadores da doença (ARMDs); e os glicocorticóides. As ações dos AINEs fundamentam-se na supressão da síntese de prostanóides em células inflamatórias através da inibição das isoformas da cicloxigenase, sem, no entanto, reduzir o acúmulo de células inflamatórias e portanto sem

conter a progressão da doença. Diferentemente, os ARMDs podem suspender e reverter a própria doença subjacente ao invés de somente reduzir os sintomas. O termo ARMDs inclui um grupo heterogêneo de agentes com estruturas químicas não relacionadas e diferentes mecanismos de ação. Já os glicocorticóides inibem tanto as manifestações precoces quanto as manifestações tardias da inflamação, ou seja, não apenas os sinais cardeais da inflamação, mas também os estágios posteriores de cicatrização e reparação da lesão, e as reações proliferativas observadas na inflamação crônica. Os glicocorticóides ligam-se a receptores intracelulares que, em seguida, sofrem dimerização, migram para o núcleo e interagem com o DNA para modificar a transcrição gênica (RANG & DALE, 2008).

Diante desse contexto, a busca por novas opções terapêuticas nessa área permanece constante mesmo após a descoberta dos inibidores seletivos da enzima ciclooxigenase II. Um dos dois principais motivos são os efeitos colaterais, que permanecem coexistindo com a ação farmacológica. O outro é que alguns desses agentes tornaram-se suspeitos de gerar efeitos cardiovasculares potencialmente tóxicos, como foi o caso do rofecoxib, retirado do mercado farmacêutico em setembro de 2004.

Dessa maneira, considerando a perspectiva de obtenção de novos fármacos, dois aspectos distinguem os produtos de origem natural dos fármacos sintéticos: a diversidade molecular e a função biológica. A diversidade molecular dos produtos naturais é muito superior àquela derivada dos processos de síntese (NISBET & MOORE, 1997). Ainda, segundo o mesmo autor, como produtos de organismos que possuem muitas similaridades com o metabolismo dos mamíferos, os produtos naturais muitas vezes exibem propriedades adicionais àquelas a eles associadas (NISBET & MOORE, 1997).

Inúmeros são os exemplos de medicamentos obtidos a partir de compostos bioativos das plantas medicinais. Dentre os de maior impacto podem ser citados: o ácido acetilsalicílico (sintetizado em 1897 por Kolbe a partir da salicina, a substância ativa da *Salix Alba L.* – salgueiro -, as pílulas contraceptivas femininas (obtidas a partir de saponinas isoladas de cactus mexicanos *Dioscorea macrostachya* (DJERASSI, 1970; CRABBE, 1979)); a morfina (um potente analgésico opióide isolado da *Papaver somniferum* por Setürner em 1806) a vincristina e a vinblastina (antineoplásicos obtidos da *Vinca rosea* (NOBLE, ET. al., 1958; JOHNSTON, et. al., 1986; ROWINSKY et. al., 1991)), e, ainda, a cocaína (*Erytroxylon coca*), a tubocurarina (*Chondodendron tomentosum*) e a atropina (*Atropa belladonna*), cujas descobertas permitiram à terapêutica atual o conhecimento dos anestésicos locais, bloqueadores neuromusculares e anticolinérgicos, respectivamente (SIMÕES, 2001).

Nas últimas décadas houve um aumento drástico do interesse pelas terapias naturais, não somente em países em desenvolvimento, mas também nos desenvolvidos (GRÜNWALD, 1995; FERREIRA, 1998; KATE & LAIRD, 1999). No entanto, a idéia de que as drogas obtidas de plantas medicinais são muito seguras e isentas de efeitos colaterais é errônea. As plantas têm centenas de metabólitos secundários e alguns deles são muito tóxicos. Exemplificam esse fato estão as drogas antineoplásicas, os digitálicos, a efedrina, ésteres de forbol, a estricnina, os curares e os heterosídeos cianogênicos (CALIXTO, 2000). A maior falha na detecção da toxicidade está na carência de relatos das ocorrências e na correlação causa/efeito, tornando os produtos vegetais aparentemente menos tóxicos (D'ARCY, 1993; DREW & MYERS, 1997; BAGHERI et al., 1998; CALIXTO, 2000).

Desta forma, o uso popular ou tradicional não é, por si só, suficiente para validar as plantas medicinais como medicamentos eficazes e seguros. Nesse sentido, as plantas medicinais não diferem dos xenobióticos sintéticos, uma vez que a autorização oficial do seu uso medicamentoso é necessária e deve ser fundamentada em evidências experimentais (estudos farmacodinâmicos, farmacocinéticos e toxicológicos, pré-clínicos e clínicos), que comprovem que os benefícios advindos do uso de medicamentos de origem vegetal superam os riscos a que são expostos aqueles que os utilizam (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1995).

Nesse contexto, dentre as espécies vegetais que se destacam por despertar interesse científico está a *Maytenus ilicifolia* demonstrada na figura 1 (OLIVEIRA et al., 1991; SOUZA-FORMIGONI et al., 1991; VARGAS et al., 1991). Ela é nativa do sul do Brasil, Paraguai, Uruguai e norte da Argentina (SCHULTES 1990; BRUNETON, 1995). Sua utilização na medicina popular e indígena varia de acordo com a localidade: a



Figura 1: *Maytenus ilicifolia* (Celastraceae). Sítio de Herta Bianco, Porto União/SC; - Foto de Anestor Mezzomo. Um arbusto de crescimento lento que atinge, no máximo, cinco metros de altura e com folhas inteiriças que apresentam espinhos nas bordas, caracterizando o seu nome popular: Espinheira Santa.

Fonte: <http://picasaweb.google.com/lh/photo/A6-H4Tu089MAL0i7Bw53vw>

M. ilicifolia é utilizada como contraceptivo e emenagogo no Paraguai (ARENAS & AZORERO, 1977) e abortivo, emenagogo e anticancerígeno na Argentina (MARTINEZ-CROVETTO, 1987). No Brasil, a infusão das suas folhas é utilizada principalmente para o tratamento de úlceras gástricas, dispepsias e outros distúrbios gástricos (MACAUBAS et al., 1988). A atividade gastroprotetora já foi validada cientificamente (SOUZA-FORMIGONI et al., 1991; BOSSOLANI, 2000), embora o seu mecanismo de ação na proteção gástrica não tenha sido totalmente esclarecido.

Uma das coisas mais interessantes é que em estudos com animais de laboratório, esta planta não demonstrou toxicidade, sugerindo até esse momento uma margem de segurança satisfatória para seu uso em seres humanos (OLIVEIRA et al., 1991).

Em estudos fitoquímicos realizados com a *M. ilicifolia* foram isolados, dentre outros metabólitos secundários, triterpenos aromáticos citotóxicos (SHIROTA et al., 1994; MOSSI, et al., 2009), flavonóides glicosídicos (LEITE et al., 2001) e taninos (SOUZA-FORMIGONI et al., 1991; MOSSI, et al., 2009). Compostos polifenólicos têm despertado grande interesse, pois podem promover efeitos cardiovasculares e gastroprotetores benéficos em humanos e ainda mediar uma diversidade de mecanismos relacionados com atividade anticâncer, antitumoral, e antioxidante (DUTHIE & CROZIER, 2000). Esses achados reforçam os indícios de atividade antitumoral e antileucêmica de substâncias isoladas do gênero *Maytenus* (MONACHE, 1972).

Flavonóides tetrassacarídeos isolados da infusão das folhas de outra espécie de *Maytenus*, a *M. aquifolium* (VILEGAS et al., 1999) e polissacarídeos do chá de folhas da *M. ilicifolia* (CIPRIANE, et al., 2006) apresentaram atividade protetora gástrica em ratos. Além de atividade antiulcerogênica, outros flavonóides têm sido associados à diminuição da morbidade e da mortalidade por doenças coronarianas (HERTOG et al., 1993; KNEKT et al., 1996; MULDOON & KRITCHEVSKY, 1996). Frequentemente esses compostos são descritos na literatura como vasodilatadores, (DUARTE et al., 1993; FITZPATRICK et al., 1993; HERRERA et al., 1996), podendo esse efeito ser dependente da presença de endotélio intacto (FITZPATRICK et al., 1993; ANDRIAMBELOSON et al., 1998; LEMOS et al., 1999) ou não (DUARTE et al., 1993; HERRERA et al., 1996). Já os taninos, apesar da ação antiulcerogênica reconhecida (EZAKI et al., 1985), estão presentes em pequena quantidade na composição da *M. ilicifolia*. São encontrados somente 0,2% de taninos em um total de 19,4% de compostos fenólicos (SOUZA-FORMIGONI et al., 1991).

Diversas pesquisas utilizando plantas medicinais têm procurado demonstrar a contribuição de substâncias de origem natural no efeito analgésico e antiinflamatório.

(SUZUKI et al., 2002; TESTAI et al., 2002). Ao que se refere ao potencial antiinflamatório da *M. ilicifolia*, na literatura só existe um único trabalho a respeito. Com seus experimentos, Jorge e colaboradores (2004) demonstraram que os extratos hexano e etil acetato da *M. ilicifolia* conseguiram inibir o edema de pata induzido por carragenina em ratos e a nocicepção e o edema de pata induzido por formaldeído em camundongos. No entanto, esse estudo não finalizou a caracterização do efeito antiinflamatório da *M. ilicifolia* e tampouco esclareceu os mecanismos farmacológicos envolvidos.

Assim sendo, o presente estudo procura contribuir para o esclarecimento do efeito antiinflamatório da planta *M. ilicifolia*, que venha auxiliar como meio farmacológico no futuro para o controle de inúmeros quadros patológicos.

II - OBJETIVOS

2.1 GERAL

Caracterizar o efeito antiedematogêncio do sobrenadante etanólico do extrato aquoso da planta *Maytenus ilicifolia* em camundongos.

2.2 ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos da administração intraperitoneal do SEEA sobre o edema de pata induzido pela carragenina.
- Investigar a influência do pré-tratamento dos animais com um inibidor da enzima óxido nítrico sintase (L-NAME) sobre o efeito antiedematogênico do SEEA no edema de pata induzido pela carragenina.
- Avaliar os efeitos da administração oral do SEEA sobre o edema de pata induzido pela carragenina.

III - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Foram utilizados camundongos *Swiss* (Figura 2), pesando entre 20 a 40 g, provenientes do biotério da Universidade Federal do Pará, mantidos sob condições controladas de temperatura ($21 \pm 2^\circ \text{C}$) e iluminação (ciclo claro/escuro de 12 horas, com luz ligada às 7:00 h), com livre acesso à água e ração. Os procedimentos experimentais propostos neste estudo estão de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

3.2 SOLUÇÃO EXTRATIVA DE *MAYTENUS ILICIFOLIA*

O sobrenadante etanólico do extrato aquoso de *M. ilicifolia* (SEEA), demonstrado na figura 3, foi fornecido ao laboratório de Farmacologia Experimental e Pré-Clínica e ao laboratório de Farmacologia Molecular da UFPA pelo Departamento de Bioquímica da Universidade Federal do Paraná. O SEEA foi diluído em solução salina isotônica (concentração de NaCl igual a 0,9%) para os tratamentos pela via intraperitoneal (i.p.) e em água para os tratamentos pela via oral (v.o.), atingindo a concentração de 30 mg/ml quando utilizado nos experimentos i.p., e 3 mg/ml, 10 mg/ml e 30 mg/ml nos estudos da v.o..



Figura 2: Camundongo *Swiss*.



Figura 3: Sobrenadante etanólico do extrato aquoso de *Maytenus ilicifolia*.

3.3 PRÉTRATAMENTOS

Os camundongos foram tratados com SEEA (30-300 mg/Kg por v.o. ou i.p.), trinta minutos, uma, seis, doze, vinte e quatro, e quarenta e oito horas antes da indução do edema de pata por carragenina (300 mg/pata). Animais controle receberam água destilada (v.o.) ou

solução salina isotônica estéril (i.p.). Para fins comparativos, nos experimentos da v.o., um grupo de animais foi tratado com indometacina (5 mg/kg, v.o.) uma hora antes da indução de edema de pata por carragenina (300 mg/pata).

3.4 AVALIAÇÃO DO EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA EM CAMUNDONGOS

Para provocar um processo inflamatório, depois de decorrido o tempo programado para os prétratamentos, os animais recebiam uma injeção de 50 µl da solução de carragenina na região plantar da pata traseira esquerda (300 µg/pata). Para verificação do edema de pata utilizou-se uma balança de precisão, sobre a qual era colocado um béquer contendo uma solução de água e detergente (10%) (FERREIRA, 1979), aonde a pata edemaciada dos animais era mergulhada 30 minutos, 1, 2, 3 e 4 horas após a injeção da carragenina para a avaliação imediata do desenvolvimento do edema, e 1, 2, 3 e 7 dias após para uma avaliação mais tardia. O deslocamento do volume da solução água e detergente (10%) proporcionado pela imersão das patas possibilitou, através de regressão linear, a determinação do edema em mililitros.

3.5 AÇÃO DO INIBIDOR NÃO SELETIVO DA OXIDO NÍTRICO SINTASE (NOS) SOBRE O EFEITO DO SOBRENADANTE ETANÓLICO DO EXTRATO AQUOSO DE *MAYTENUS ILICIFOLIA*.

Os animais receberam pela via sub-cutânea 10 mg/kg de L-NAME (N^G-nitro-L-arginina-metil-éster; um inibidor não seletivo da NOS) ou solução salina isotônica (0,1 ml/10 g) a cada 12 horas durante 36 horas, e uma última dose quatro horas depois. Vinte minutos depois desses prétratamentos injetou-se SEEA na dose de 300 mg/kg i.p. ou solução salina pela mesma via. O edema de pata foi induzido em todos os animais uma hora mais tarde, e mensurado como descrito anteriormente.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram apresentados de acordo com o programa GraphPad Prism 5.00 e os resultados expressos como a média ± erro da média de 5–7 animais por grupo. A análise estatística dos resultados para a comparação entre os grupos foi realizada através da análise da variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste t de Tukey.

IV - RESULTADOS

*1. Efeito da **injeção intraperitoneal** do sobrenadante etanólico do extrato aquoso de *Maytenus ilicifolia* sobre o edema induzido pela carragenina*

Para uma análise mais cautelosa dos resultados obtidos, foi analisado o padrão de desenvolvimento do edema no grupo controle. Na maioria dos casos, a fase inicial do desenvolvimento do edema apresentou um pico na terceira hora após a injeção de carragenina, seguido de decréscimo na quarta (Figuras 5A e 6A).

No grupo tratado intraperitonealmente com SEEA trinta minutos antes da indução de edema por carragenina, houve redução significativa na formação de edema a partir da terceira hora de avaliação (Figura 4A). No entanto, essa redução não se manteve por muito tempo, já que não foram registradas diferenças significativas em relação ao controle depois de dois dias de avaliação do edema (Figura 4B).

Essa atividade antiedematogênica do SEEA nas primeiras quatro horas de avaliação persistiu mesmo quando o tratamento foi realizado 1, 6, 12 e, embora em menor intensidade, 24 h antes da indução de edema pela carragenina (Figuras 5A, 6A, 7A e 8A, respectivamente). Foi observada a perda do efeito ao administrar-se SEEA i.p. 48h antes da indução de edema por carragenina (Figura 9A).

Interessantemente, quando administrado 1 h antes da carragenina, o SEEA foi capaz de reduzir a fase tardia do edema até 3 dias após a injeção de carragenina (Figura 5B).

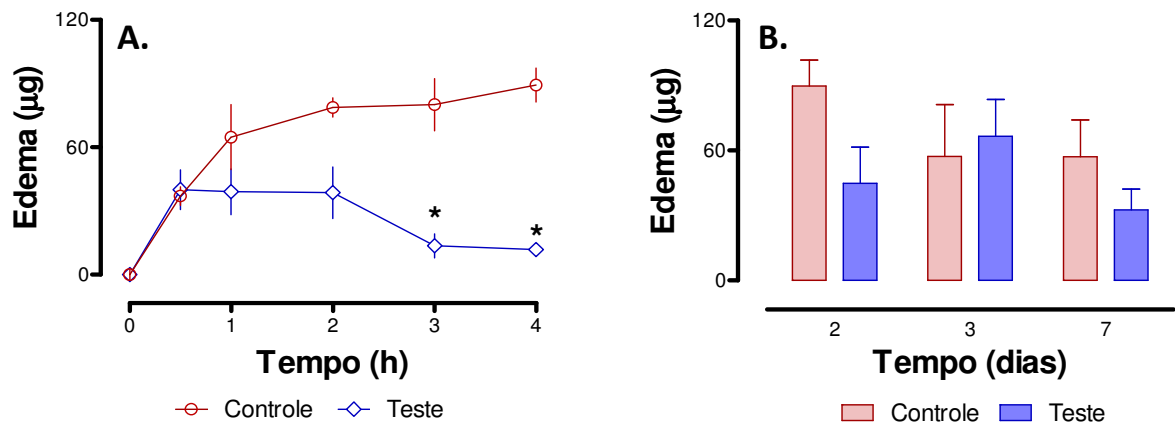


Figura 4: Efeito do sobrenadante etanólico do extrato aquoso de *Maytenus ilicifolia* (SEEA) sobre o edema induzido pela carragenina. Camundongos foram prétratados intraperitonealmente com solução salina isotônica (linhas e barras vermelhas) ou 300 mg/Kg de SEEA (linhas e barras azuis) trinta minutos antes da injeção de carragenina; **(A)** Edema mensurado nas primeiras quatro horas após a carragenina. **(B)** Edema mensurado nos 7 dias seguintes. Os resultados representam a média $\pm$ erro padrão de 5-6 animais por grupo. * $p < 0,05$ versus controle para cada tempo.

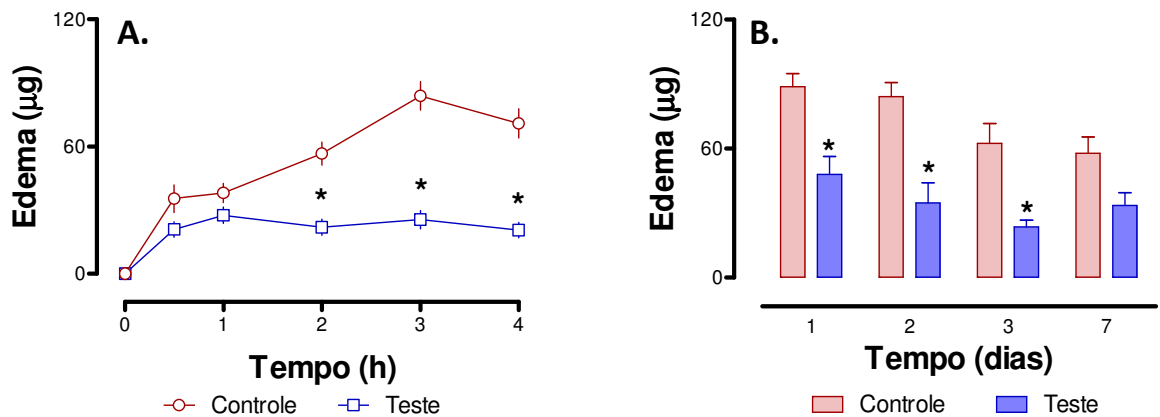


Figura 5: Efeito do sobrenadante etanólico do extrato aquoso de *Maytenus ilicifolia* (SEEA) sobre o edema induzido pela carragenina. Camundongos foram prétratados intraperitonealmente com solução salina isotônica (linhas e barras vermelhas) ou 300 mg/Kg de SEEA (linhas e barras azuis) uma hora antes da injeção de carragenina; **(A)** Edema mensurado nas primeiras quatro horas após a carragenina. **(B)** Edema mensurado nos 7 dias seguintes. Os resultados representam a média $\pm$ erro padrão de 5-6 animais por grupo. * $p < 0,05$ versus controle para cada tempo.

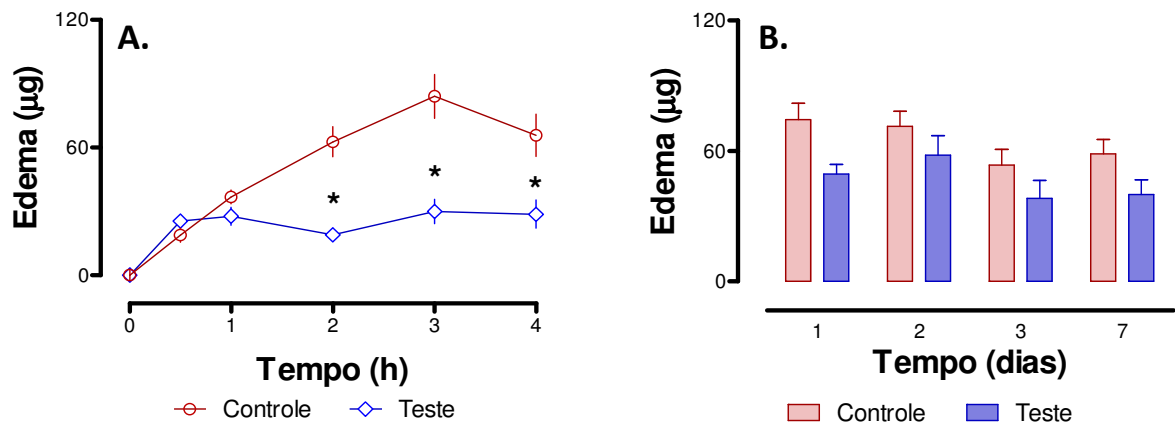


Figura 6: Efeito do sobrenadante etanólico do extrato aquoso de *Maytenus ilicifolia* (SEEA) sobre o edema induzido pela carragenina. Camundongos foram prétratados intraperitonealmente com solução salina isotônica (linhas e barras vermelhas) ou 300 mg/Kg de SEEA (linhas e barras azuis) seis horas antes da injeção de carragenina; (A) Edema mensurado nas primeiras quatro horas após a carragenina. (B) Edema mensurado nos 7 dias seguintes. Os resultados representam a média $\pm$ erro padrão de 5-6 animais por grupo. * $p < 0,05$ versus controle para cada tempo.

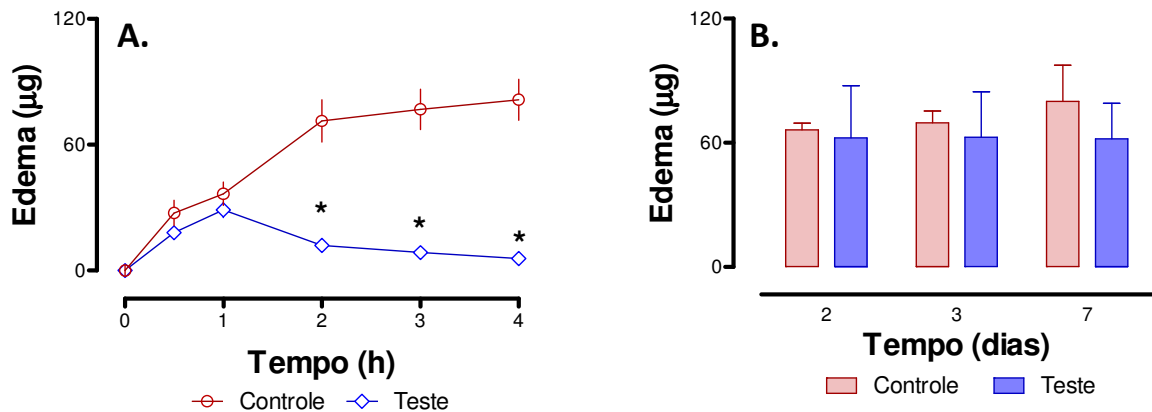


Figura 7: Efeito do sobrenadante etanólico do extrato aquoso de *Maytenus ilicifolia* (SEEA) sobre o edema induzido pela carragenina. Camundongos foram prétratados intraperitonealmente com solução salina isotônica (linhas e barras vermelhas) ou 300 mg/Kg de SEEA (linhas e barras azuis) doze horas antes da injeção de carragenina; (A) Edema mensurado nas primeiras quatro horas após a carragenina. (B) Edema mensurado nos 7 dias seguintes. Os resultados representam a média $\pm$ erro padrão de 5-6 animais por grupo. * $p < 0,05$ versus controle para cada tempo.

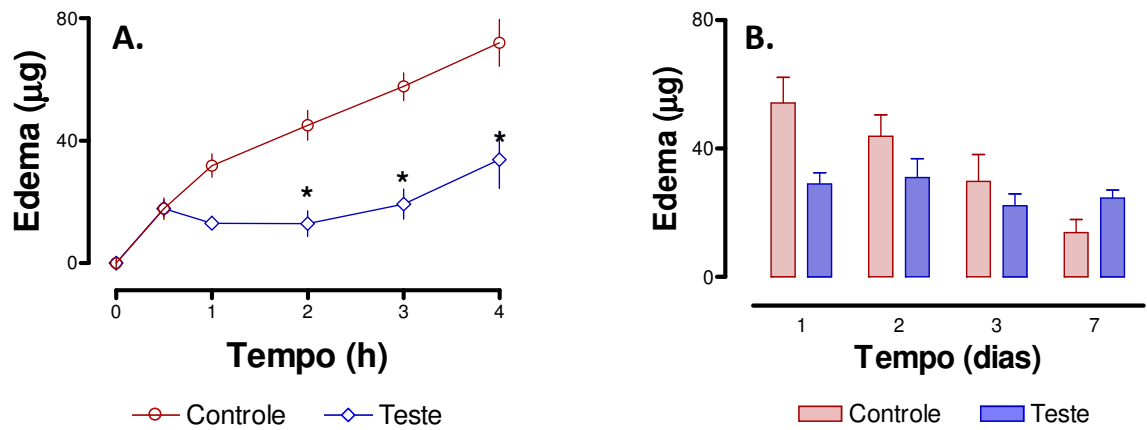


Figura 8: Efeito do sobrenadante etanólico do extrato aquoso de *Maytenus ilicifolia* (SEEA) sobre o edema induzido pela carragenina. Camundongos foram prétratados intraperitonealmente com solução salina isotônica (linhas e barras vermelhas) ou 300 mg/Kg de SEEA (linhas e barras azuis) 24 horas antes da injeção de carragenina; **(A)** Edema mensurado nas primeiras quatro horas após a carragenina. **(B)** Edema mensurado nos 7 dias seguintes. Os resultados representam a média $\pm$ erro padrão de 5-6 animais por grupo. * $p < 0,05$ versus controle para cada tempo.

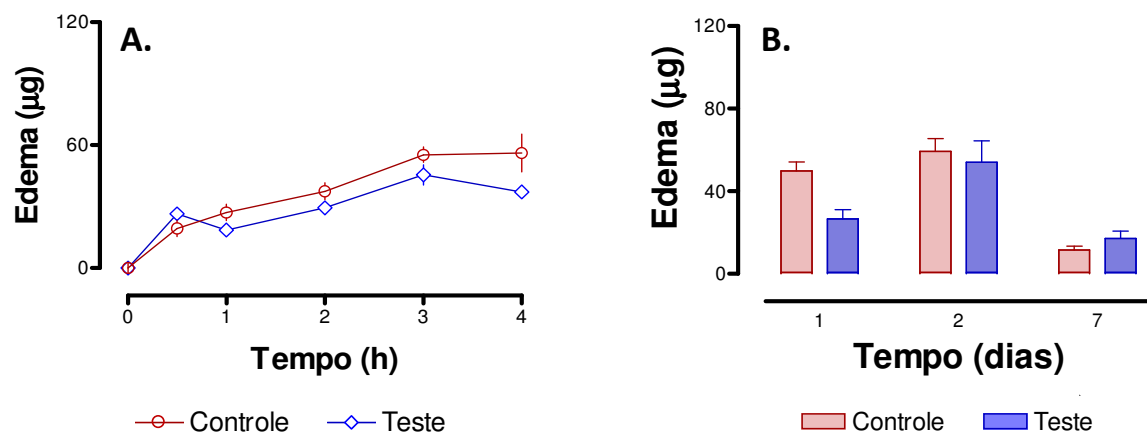


Figura 9: Efeito do sobrenadante etanólico do extrato aquoso de *Maytenus ilicifolia* (SEEA) sobre o edema induzido pela carragenina. Camundongos foram prétratados intraperitonealmente com solução salina isotônica (linhas e barras vermelhas) ou 300 mg/Kg de SEEA (linhas e barras azuis) 48 horas antes da injeção de carragenina; **(A)** Edema mensurado nas primeiras quatro horas após a carragenina. **(B)** Edema mensurado nos 7 dias seguintes. Os resultados representam a média $\pm$ erro padrão de 5-6 animais por grupo. * $p < 0,05$ versus controle para cada tempo.

2. Influência do **L-NAME** sobre o efeito do sobrenadante etanólico do extrato aquoso de *Maytenus ilicifolia* no edema induzido pela carragenina

Na avaliação da influência do L-NAME, um inibidor não seletivo da NOS, sobre o efeito antiedematogênico exercido pela administração intraperitoneal de 300mg/Kg de SEEA, não foram observadas variações no desenvolvimento do processo inflamatório relativas ao controle, nem na fase inicial nem na fase tardia da formação de edema induzido por carragenina (Figura 10).

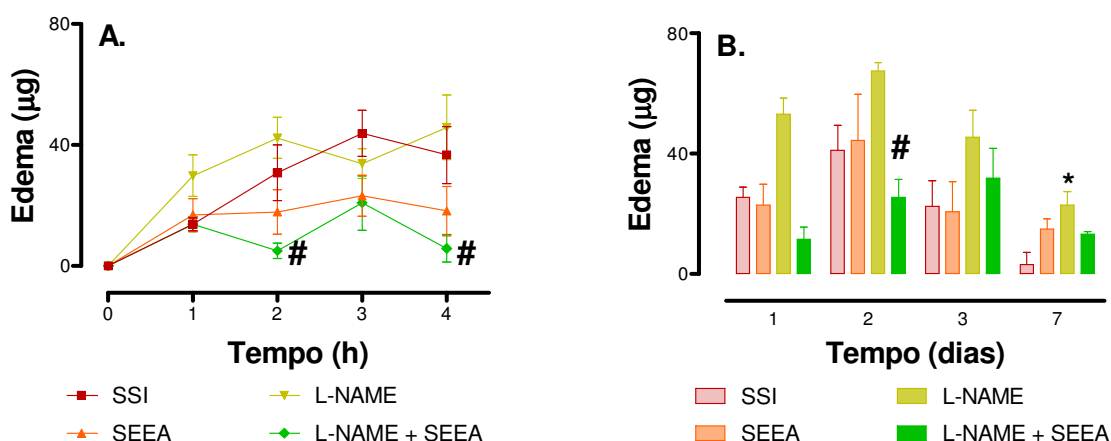


Figura 10: Ação do L-NAME sobre o efeito do sobrenadante etanólico do extrato aquoso de *Maytenus ilicifolia* (SEEA) sobre o edema de pata induzido pela carragenina. Camundongos foram pré-tratados com solução salina isotônica (SSI) (linhas e barras vermelhas), SEEA (linhas e barras laranjas), L-NAME (linhas e barras amarelas) ou SEEA + L-NAME (linhas e barras verdes) antes da injeção de carragenina; (A) Edema mensurado nas primeiras quatro horas após a carragenina. (B) Edema mensurado nos 7 dias seguintes. Os resultados representam a média $\pm$ erro padrão de 5-6 animais por grupo. * $p < 0,05$ versus SSI e # $p < 0,05$ versus L-NAME para cada tempo.

3. Efeito da **administração oral** do sobrenadante etanólico do extrato aquoso de *Maytenus ilicifolia* sobre o edema induzido pela carragenina

Na avaliação da resposta dependente da dose de SEEA administrada oralmente, não foram observadas variações no desenvolvimento do processo inflamatório relativas ao potencial da *M. ilicifolia*, nem na fase inicial nem na fase tardia da formação de edema induzido por carragenina (Figura 11). A indometacina (5 mg/kg, v.o.) – um agente antiinflamatório não esteróide usado como controle positivo – teve um efeito antiedematogênico significativo desde a segunda hora do início do edema (Figura 11) e até por 7 dias após a indução do edema.

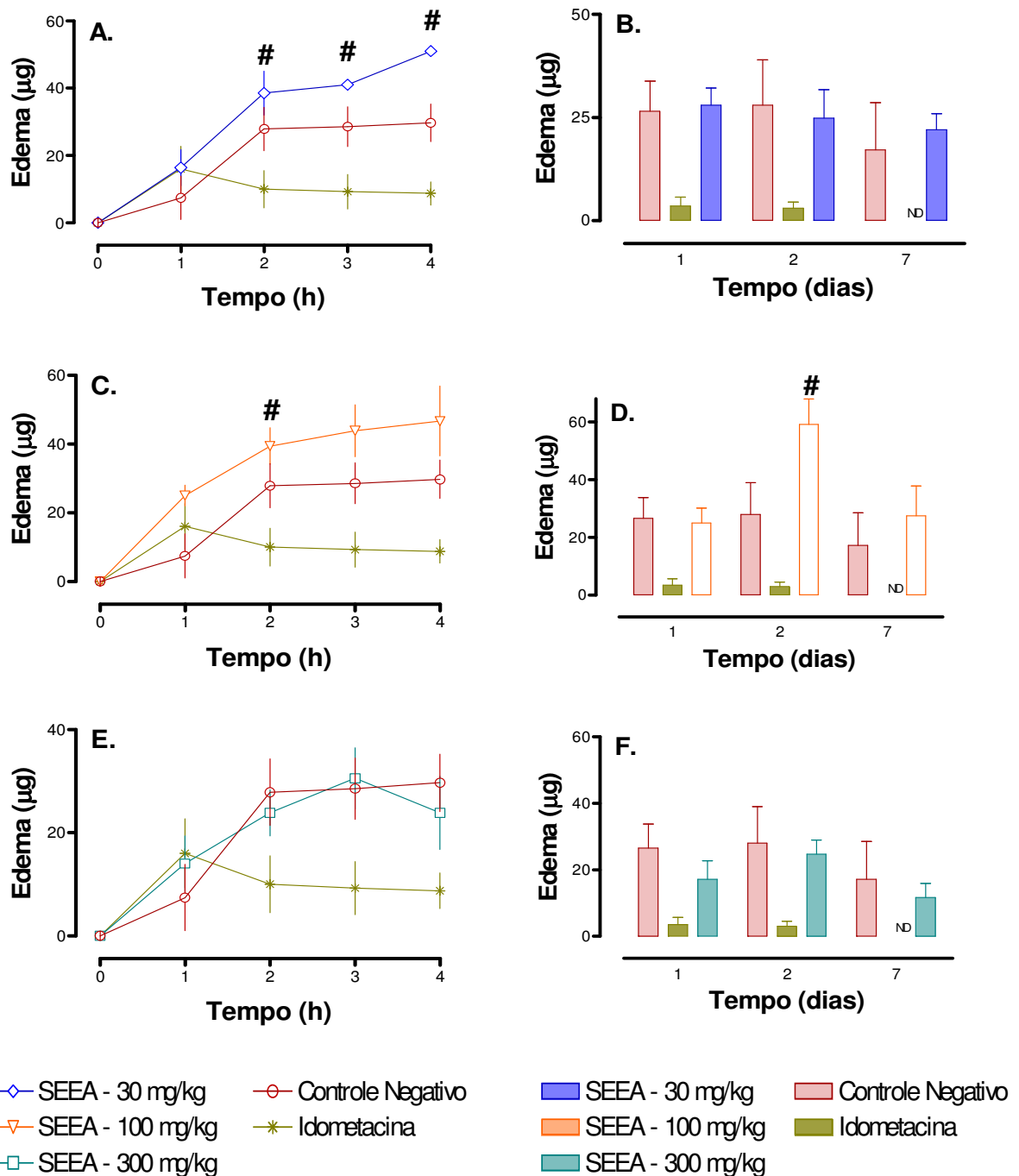


Figura 11: Efeito do sobrenadante etanólico do extrato aquoso de *Maytenus ilicifolia* (SEEA) sobre o edema induzido pela carragenina. Camundongos foram pré-tratados pela via oral com água (linhas e barras vermelhas), SEEA (30, 100 ou 300 mg/Kg v.o.; linhas e barras azuis, laranjadas e verdes respectivamente) ou indometacina (5 mg/kg, v.o.; linhas e barras amarelas) durante dois dias; (A, C e E) Edema mensurado nas primeiras quatro horas seguintes a administração de carragenina. (B, D e F) Edema mensurado nos 7 dias seguintes. Os resultados representam a média ± erro padrão de 6 ou 7 animais por grupo. # $p < 0,05$ versus Indometacina. ND=não detectado

V – DISCUSSÃO

Esse estudo revela, pela primeira vez, que uma fração obtida a partir das folhas de *M. ilicifolia*, o sobrenadante etanólico do extrato aquoso (SEEA), possui efeito antiinflamatório, e mais especificamente antiedematogênico. Isso porque os testes realizados avaliaram a influência do SEEA sobre um dos sinais cardeais da inflamação: o edema, por meio da indução de edema de pata por carragenina.

O único trabalho publicado até esse momento sobre o potencial antiinflamatório da *M. ilicifolia* utilizou dois outros extratos da planta: o hexano e o etil acetato (Jorge et al., 2004), ambos os dois solventes orgânicos. Nele, Jorge e colaboradores (2004) evidenciaram efeito antiinflamatório da *M. ilicifolia* através de experimentos com uma única dose para cada extrato, bem como um único intervalo de tempo para os prétratamentos. A avaliação do edema de pata estendeu-se por apenas 24 após a formação do edema, e nesse tempo o efeito dos extratos vegetais já havia cessado. Não houve portanto, estudo mais aprofundado das propriedades farmacocinéticas nem tentativa de elucidação dos mecanismos farmacológicos envolvidos nos efeitos demonstrados.

Considerando que o extrato usado no nosso trabalho só inclui componentes hidrossolúveis da planta, os compostos responsáveis pelo claro efeito antiedematogênico poderiam ser diferentes daqueles usados no trabalho de Jorge e colaboradores (2004). No entanto, estudos mais aprofundados sobre a identificação da composição de cada extrato serão necessários para esclarecer este ponto.

O edema de pata induzido pela carragenina é um modelo que frequentemente contribui para o estudo dos mediadores envolvidos nas respostas vasculares associadas à inflamação aguda. Segundo Salvemini e colaboradores (1996), Vajja e colaboradores (2004) e Teixeira e colaboradores (2006), o desenvolvimento do edema de pata promovido pela carragenina descreve três fases, onde vários mediadores operam em seqüência para produzir a resposta inflamatória. As duas primeiras horas do edema de pata mediado pela carragenina é histamina, serotonina, substância P e bradicinina-dependente. Já na segunda etapa, que se estende aproximadamente da primeira ou segunda até a sexta hora, atribui-se o efeito edematogênico à elevação da produção de prostaglandinas e ativação da cicloxigenase II, além da migração de neutrófilos. Por último, a etapa final do edema é resultado de uma complexa combinação entre mediadores.

Dentre esses mediadores está o óxido nítrico (ON). Importante tanto na inflamação aguda quanto na crônica, o ON é gerado a partir da L-arginina pela enzima óxido nítrico sintase, e praticamente todas as células inflamatórias são capazes de induzir a sua

produção (RANG & DALE, 2008). Assim, esse é um mediador que pode estar atuando em qualquer fase da resposta inflamatória. O ON vem sendo descrito como um agente pro ou antiinflamatório, isso porque o ON provavelmente possui um efeito global pró-inflamatório, aumentando a permeabilidade vascular e a produção de prostaglandinas, e atuando como um poderoso vasodilatador; por outro lado, algumas de suas propriedades são antiinflamatórias, a exemplo da inibição da adesão de neutrófilos e plaquetas, assim como a agregação plaquetária (RANG & DALE, 2008). Seu papel estaria relacionado com o modelo experimental empregado, e os efeitos diretos e indiretos nas diferentes células (TEIXEIRA, et. al., 2006)

Curiosamente, os efeitos antiinflamatórios somente foram observados após a administração intraperitoneal do SEEA (Figuras 4, 5, 6, 7 e 8), com os resultados mais expressivos ocorrendo nas primeiras horas que seguiam o tratamento (Figuras 4A, 5A, 6A, 7A e 8A). Essa atividade antiedematogênica do SEEA nas primeiras 4 h de avaliação persistiu mesmo quando o tratamento com o SEEA foi realizado 1, 6, 12 e, embora em menor intensidade, 24 h antes da indução de edema pela carragenina.

Este fato indica que a substância ativa, ou substâncias, envolvidas no potencial antiinflamatório da *M. ilicifolia* possuem uma meia vida relativamente longa (Figuras 5A, 6A, 7A e 8A, respectivamente), percebendo-se perda do efeito ao administrar-se SEEA i.p. 48h antes da indução de edema por carragenina (Figura 9A).

Uma vez que o SEEA i.p. foi capaz de reduzir o edema desde as primeiras horas do processo inflamatório, é possível sugerir que, de alguma forma, o papel dos mediadores inflamatórios descritos está sendo influenciado pelo SEEA, especialmente no que se refere à produção de prostaglandinas e ativação da cicloxigenase. Entretanto, considerando que uma única dose do SEEA i.p. uma hora antes do início do edema, foi suficiente para provocar um efeito antiedematogênico durante vários dias (Figura 5B), parece lógico pensar que, em essas condições, o SEEA é capaz de afetar outros mediadores como o ON.

A idéia de que o SEEA pode estar afetando a produção de ON é também apoiada por estudos recentes. Rattman (2006) demonstrou que o SEEA induz um relaxamento vascular completo em anéis de aorta de ratos. O relaxamento observado é mediado pela produção de ON endotélio-dependente promovido pela ativação da guanilato ciclase solúvel e abertura dos canais de potássio. Da mesma forma, Crestani (2009) também verificou o efeito hipotensor do SEEA também após injeção intraperitoneal.

Em relação ao edema de pata, Ferreira e colaboradores (2002) demonstraram que o desenvolvimento do edema induzido por carragenina e bradicinina, mas não por serotonina, foi reduzido em até 50% durante as quatro horas iniciais do desenvolvimento do edema em

animais pretratados com nitroprussiato de sódio (um doador de ON). Esses resultados apontavam já para uma atividade antiinflamatória do ON. Mais tarde foi também demonstrada a redução do edema na fase tardia de desenvolvimento (48 horas) por doadores de óxido nítrico (FERNANDES & ASSREUY, 2004). O efeito de doadores de ON foi revertido na presença de bloqueadores dos canais de potássio e inibidores da guanilato ciclase, indicando que essas são importantes vias para o efeito inibitório que o ON exerce sobre o edema de pata (FERNANDES, et. al., 2002; FERNANDES & ASSREUY, 2004).

Os resultados do presente estudo corroboram os dados de Fernandes e colaboradores (2002) e Fernandes & Assreuy (2004). Observando a figura 10 é possível perceber que a administração do inibidor não seletivo da óxido nítrico sintase, o L-NAME, tem a tendência de potencializar a formação do edema tanto na fase inicial quanto na fase tardia. Este fato fica ainda mais evidenciado na figura 10B, quando no sétimo dia de experimentação há diferença estatística entre os animais tratados com L-NAME em relação ao controle. A associação do SEEA ao L-NAME promoveu redução na formação do edema até 48 após a administração da carragenina em relação ao grupo tratado apenas com L-NAME. Assim, baseados em esses resultados e nos estudos citados acima, poderia ser hipotetizado que o efeito antiedematogênico do SEEA é canais de potássio e guanilato ciclase-dependente, induzindo o aumento da produção endógena de ON. O desenvolvimento de inovações terapêuticas que mantenham ou estimulem a produção de óxido nítrico endógeno, baseadas em novos agentes farmacológicos obtidos de plantas medicinais, podem conduzir ao gerenciamento mais eficaz de diversas circunstâncias patológicas (RATTMAN, 2006).

A fim de prosseguir com a investigação dos mecanismos moleculares envolvidos no efeito antiedematogênico promovido pelo SEEA, experimentos utilizando os modelos da bradicinina, histamina, serotonina e substância P serão realizados com o objetivo de verificar a participação desses mediadores na ação antiedematogênica do SEEA.

Além da farmacodinâmica, a farmacocinética do SEEA também foi objeto de estudo no presente trabalho. Assim, experimentos com administração oral de SEEA foram realizados já que esta via é a principal via de administração de fármacos (RANG & DALE, 2008). Interessantemente, com a administração oral dessa fração, não visualizamos nenhum efeito contra o edema gerado por agentes flogógenos, mesmo após a administração do SEEA por três dias consecutivos antes da indução do edema (Figura 11). Esse curioso resultado sugere pelo menos três justificativas possíveis:

1ª. a absorção oral do composto ou compostos presentes no SEEA e responsáveis pelo efeito antiedematogênico aqui descrito, é incompleta;

2ª. o pH ou as enzimas do estômago são capazes de inativar o (ou os) princípio ativo responsável por tais efeitos;

3ª. ou ainda, as substâncias ativas poderiam estar sofrendo metabolismo de primeira passagem (degradação que inicia quando um fármaco administrado pela via oral é absorvido no trato gastrointestinal e, através da circulação porta, vai inicialmente para o fígado, onde é submetido à biotransformação e degradação, podendo ser completamente metabolizado e inativado, não atingindo níveis na circulação sistêmica na sua forma ativa).

Experimentos futuros com a administração do SEEA diretamente no intestino delgado dos animais (simulando o que acontece com o uso de formulações farmacêuticas apresentadas na forma de cápsulas) auxiliariam na investigação dessas possibilidades.

Apesar de serem necessários mais estudos para garantir a eficácia e segurança dessa planta em seres humanos, atualmente a *M. ilicifolia* está enquadrada entre as plantas medicinais aprovadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), fazendo parte de um pequeno grupo de 34 plantas isentas da necessidade de testes de eficácia e de toxicidade para o registro e comercialização como fitoterápicos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004). Desse modo, preparações de *M. ilicifolia* vêm sendo utilizadas em humanos no Brasil, não havendo nenhuma reação adversa ou tóxica associada ao uso (CRESTANI, 2009) e tampouco em experimentos laboratoriais (OLIVEIRA et al., 1991). Os nossos resultados também apóiam o uso terapêutico da *M. ilicifolia* como alternativa farmacológica no tratamento da inflamação.

VI - CONCLUSÃO

O sobrenadante etanólico do extrato aquoso de *Maytenus ilicifolia* apresenta efeito antiedematogênico em animais experimentais após a administração intraperitoneal, mas não pela via oral. Esse efeito é relativamente prolongado e pode ser derivado do estímulo – guanilato ciclase e receptores de potássio dependente – da produção endógena de óxido nítrico.

VII - REFERÊNCIAS

- ANBRIAMBELOSON, E.; MAGNIER C.; HAANARCHIPOFF, G.; LOBSTEIN, A.; ANTON, R.; BERETZ, A. & STOCLET, J. C. **Natural dietary polyphenolic compounds cause endothelium-dependent vasorelaxation in rat thoracic aorta.** *J. Nutr.*, Bethesda, v.128, p.2324-2333, 1998.
- ANKER, R. & QUEZADA, A. **Arachidonic acid derivatives. II. Medical perspectives.** *Bol. méd. Hosp. Infant. Méx*; 1986; 43(5):316-22.
- ARENAS, P. & AZORERO, R.M. **Plants of common use in Paraguayan folk medicine for regulating fertility.** *Economic Botany*. 1977; v.31, p.298–301.
- ARSATI, F. & VEIGA, M.C.F.A. **Efeito do meloxicam sobre o extravasamento plasmático inuzido pelo óleo de mostarda na ATM de ratos.** Tese de mestrado, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo. (1999).
- BAGHERI, H.; BROUE, P.; LACROIX, I.; LARREY, D.; OLIVES, J.P.; VAYSSE, P.; GHISOLFI, J. & MONTASTRUC, J.L. **Fulminant hepatic failure after herbal medicine ingestion in children.** *Therapie*. 1998; v.53, n.1, p.82-83.
- BALLOU, S. P.; KUSNHER, I. **Labo-ratory evaluation of inflammation.** In: KEL LEY, W. N. et al., ed. *Textbook of rheumatology*. Philadelphia, W. B . Saunders, 1993. p. 671-80.
- BAUMANN, H.; GAULDIE, J. **The acute phase response.** *Immunol. Today*, v. 15, 1994. P.74-80.
- BOSSOLANI, M.P. **Mecanismo molecular da ação anti-secretora ácida gástrica de extratos e frações isoladas de *Maytenus ilicifolia* Mart e *Maytenus aquifolium* Mart.** Tese de mestrado, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, p. 108. (2000).
- BRUNETON, J. **Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants.** Intercept, UK,1995.
- CALIXTO, J.B. **Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents).** *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. 2000; v.33 n.2, p.179-189.
- CIPRIANI, T.R., MELLINGER C. G., DE SOUZA L. M., BAGGIO, C.H., FREITAS, C., MARQUES, M.C.A., GORIN, P.A.J., SASSAKI, G.L. & IACOMINI, M. **A Polysaccharide from a Tea (Infusion) of *Maytenus ilicifolia* Leaves with Anti-ulcer Protective Effects.** *J. Nat. Prod.*, **2006**, 69 (7), p.1018–1021
- CRESTANI S.; RATTMANN Y.D.; CIPRIANI THALES R.; DE SOUZA LAURO M.; IACOMINI M.; KASSUYA CANDIDA A.L.; MARQUES MARIA C.A.; DA SILVA-SANTOS J.E. **A potent and nitric oxide-dependent hypotensive effect induced in rats by semi-purified fractions from *Maytenus ilicifolia*.** *Vascular pharmacology* 2009; 51(1); p.57-63
- CRUZ, L.; GRAEBIN, C.S.; VIANA, A.; PIATO, A.L.S.; GHISLENI, D.; SANTOS, E.; LIMBERGER, J.; VAUCHER, L.; GNOATTO, S.C.B.; OLIVEIRA, S.Q.; OPPE, T.P.;

SCHAPOVAL, E.E.S. & EIFLER-LIMA, V.L. **Síntese e Ensaio *In Vivo* de Ésteres da Indometacina. Desenvolvimento de Aula Prática em Química Medicinal para Alunos de Pós-Graduação.** 2008; Lat. Am. J. Pharm. **27** (5): p.716-20.

D'ARCY, P.F. **Adverse reactions and interactions with herbal medicines. Part 2-drug interactions.** Adverse Drug Reactions and Toxicological Reviews. 1993; v.12, n.3, p.147-162.

DJERASSI, C. **Birth control after 1984.** Science, 1970; 169:941.

DREW, A.K. & MYERS, S.P. **Safety issues in herbal medicine: implications for the health professions.** The Medical Journal of Australia. 1997; v.166 n.10, p.538-541.

DUARTE, J.A.R.; APPELL, H.J.; CARVALHO, F.; BASTOS, M.L. & SOARES, J.M.C. **Endothelium derived oxidative stress may contribute to exercise induced muscle damage.** Int. J. Sports Med., Stuttgartv. 14, p. 440-443, 1993.

DUTHIE G. & CROZIER A.. **Plant-derived phenolic antioxidants.** Current Opinion in Lipidology. 2000; 11, 43±47.

ESPERIDIÃO, S.; AJEJE, R.; KOPELMAN, B.I.; SIMÕES, M.J.; EVÊNCIO-NETO, J. & JÚNIOR, L.K. **Chronic Effects of Acetylsalicylic Acid on Pregnant Rats.** Revista brasileira de ginecologia e obstetrícia (RBGO). 1998; v.20, n.5, p.245-249.

EZAKI, N.; KATO, M.; TAKIZAWA, N.; MORINOTO, S.; NONAKA, G. & NISHIOKA, I. Pharmacological studies on *Linderae umbellatae* Ramus, IV. Effects of condensed tannin related compound on peptic activity and stress-induced gastric lesions in mice. Planta Medica. 1985; 1, 34–38.

FERNANDES, D., ASSREUY, J. **Involvement of guanylate cyclase and potassium channels on the delayed phase of mouse carrageenan-induced paw oedema.** Eur. J. Pharmacol. 2004; 501: p.209–214

FERNANDES, D., DA SILVA-SANTOS, J. E., ASSREUY, J. **Nitric oxide-induced inhibition of mouse paw oedema: involvement of soluble guanylate cyclase and potassium channels.** Inflamm. Res. 2002; 51: p.377–384

FERREIRA, S H. **A new method for measuring variations of rat paw volume.** J. Pharm. Pharmacol.; 1979; n.31, p.648.

FERREIRA, S. H., org. – **Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil.** Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1998.

FERREIRA, P.E.M. & MARTINIB, R.K. **Cocaine: myths, history and abuse.** Revista Brasileira de Psiquiatria. 2001; v.23, n.3, p.96-99.

FITZPATRICK, T.B.; EISEN, A.Z.; WOLFF, K.; FREEDBERG, I.M. & AUSTEN, K.F. **Dermatology in General Medicine**, 4th ed. New York: McGraw-Hill, 1993.

GRÜNWALD, J. **The European phytotherapeutics market: figures, trends, analysis.** Drugs made in Germany. 1996; 39 (1): p.6-11.

HERTOG, M.G. HOLLMAN, P.C.; KATAN, M.B. & KROMHOUT, D. **Intake of potentially anticarcinogenic flavonoids and their determinants in adults in the Netherlands.** Nutrition and Cancer. 1993; v.20, n.1, p.21-29.

HERRERA, M.G.; ZARZUELO, A.; JIMENEZ, J.; MARHUENDA, E. & DUARTE, J. **Effects of flavonoids on rat aortic smooth muscle contractility: structure-activity relationships.** General Pharmacology. 1996; v.27, n.2, p.273-277.

JORGE, R. M.; LEITE, J. P. V.; OLIVEIRA, A. B. & TAGLIATI, C. A. **Evaluation of antinociceptive, anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of *Maytenus ilicifolia*.** Journal of Ethnopharmacology. Setembro 2004, v.94, n.1, p.93-100

KATE, K.T. & LAIRD, S.A., orgs. - **The commercial use of biodiversity: access to genetic resources and benefit-sharing.** Kew, Royal Botanic Gardens; 1999; p. 34-77.

KNEKT, O.; JARVINEN, R.; REUNANEN, A. & MAATELA, J. **Flavonoid intake and coronary mortality in skeletal muscle microcirculation.** Circulation Research. 1996; v.57, n.2, p.529-534

LEITE, J.P.V.; RASTRELLI, L.; ROMUSSI, G. & OLIVEIRA, A.B.; VILEGAS, J.H.Y., VILEGAS, W., PIZZA, C.. **Isolation and HPLC quantitative analysis of Flavonoid glycosids from Brazilian beverages (*Maytenus ilicifolia* and *Maytenus aquifolium*).** Journal of Agricultural & Food Chemistry. 2001; 49, 3796–3801.

LEMOES, V.S.; FREITAS, M.R.; MULLER, B.; LINO, Y.D.; QUEIROGA, C.E.G. & CÔRTEZ, S.F. **Doiclein, a new nitric oxide- and endothelium-dependent vasodilator flavonoid.** European Journal of Pharmacology. 1999; v. 386, n/s, p. 41-46.

LIMA, A.B. & SOUSA, P.J.C. **Estudo da ação antinociceptiva e anti-inflamatória do 1-Nitro-2-Feniletano, principal constituinte da *Aniba canelilla*.** Tese de mestrado, Universidade Federal do Pará, Pará. (2009).

LUENGO, M.B. **A historical revision of the main immunological events and pharmacology in the search of the understanding and treatment of inflammatory diseases.** Revista Eletrônica de Farmácia; 2005; Vol 2 (2), p.64-72.

MARIOT, M.P.; BARBIERI, R.L.; SINIGAGLIA, C.; BENTO, L.H. & RIBEIRO, M.V. **Presence of arils over *Maytenus ilicifolia* seedlings production.** Ciência Rural, 2005; v35, n.2, p.468-470.

MARTINEZ-CROVETTO. **Plantas reguladoras de la fecundidad utilizadas en la medicina popular del nordeste argentino.** América Indígena. 1977; v.472, p.79–93.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Secretaria de Vigilância Sanitária, Portaria n. 19/92 de 30.1.92. **Diário Oficial da União**, 197 (seção I), 1995.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Resolução n. 89 de 16.03.04. **Diário Oficial da União** (Sessão 1) de 18.03.2004, p.32-34.

MONACHE, F.D. **Maitenin: A new antitumoral substance from *Maytenus sp.*** *Gazetta Chimica Italiana*. 1972; 102: 317–20.

MOSSI, A.J.; MAZUTTI, M.; PAROUL, N.; CORAZZA, M.L.; DARIVA, C.; CANSIAN, R.L. & OLIVEIRA, J.V. **Chemical variation of tannins and triterpenes in Brazilian populations of *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reiss.** *Braz. J. Biol.* São Carlos, May 2009. vol.69 no.2

MULDOON F.M. & KRITCHEVSKY S.B. **Flavonoids and heart disease: evidence of benefit still fragmentary.** *Br. Med. J.* 1996; 312:458–459.

NISBET, L.J. & MOORE, M. **Will natural products remain an important source of drug research for the future?** *Curr. Opin. Biotechnol.*, 1997; v. 8 (6), p. 708-12.

OLIVEIRA, G.M.O.; MONTEIRO, M.G.; MACAÚBAS, C.; BARBOSA, V.P. & CARLINI, E.A. **Pharmacological and toxicologic effects of two *Maytenus* species in laboratory animals.** *Journal of Ethnopharmacology*. 1991; 34, p.29–41.

RANG, H.P. & DALE, M.M.; RITTER, J.M.; FLOWER, R.J. *Farmacologia*. Ed. Elsevier. São Paulo. 2008. p.226.

RATTMANN, Y. D.; CIPRIANI, T. R.; SASSAKI, G.L.; IACOMINI, M.; RIECK, L.; MARQUES, M.C.A. & DA SILVA SANTOS, J.E. **Nitric oxide-dependent vasorelaxation induced by extractive solutions and fractions of *Maytenus ilicifolia* mart ex reissek (Celastraceae) leaves.** *Journal of Ethnopharmacology* 2006; 104, p.328-335.

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.** *Bridsh Journal of Pharmacology*; 1996; n.118, p.829-838

SCHULTES, R.E. & RAFFAUF, R.F. **The Healing Forest Medicinal and toxic plants of the North West Amazonia.** *Discorides Press*. 1990; p.107-303.

SHIROTA, O.; MORITA, H.; TAKEYA, K. & ITOKAWA, H. **Cytotoxic aromatic triterpenes from *Maytenus ilicifolia* and *Maytenus ilicifolia*.** *Journal of Natural Products*. 1994; 57, 1675–1681.

SIMÕES, C.M.O.S.E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A. & PETROVICK, P.R. **Farmacognosia, da planta ao medicamento.** Rio Grande do Sul. (2001).

SOUZA-FORMIGONI, M.L.; OLIVEIRA, M.G.; MONTEIRO, M.G.; DA SILVEIRA-FILHO, N.G.; BRAZ, S. & CARLINI, E.A. **Antiulcerogenic effects of two *Maytenus* species in laboratory animals.** *Journal of Ethnopharmacology*. 1991; v.34, n.1, p.21-27.

STEEMBOCK, W. & REIS, M.S. **Fundamentos para o manejo de populações naturais de espinheira-santa, *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reiss. (Celastraceae).** Tese de Mestrado. Universidade Federal de Santa Catarina, Santa Catarina (2003).

SUZUKI, S.; CHUANG, L.F.; YAU, P.; DOI, R.H. & CHUANG, R.Y.. **Interactions of opioid and chemokine receptors: Oligomerization of mu, kappa, and delta with CCR5 on immune cells.** *Exp Cell Res.* 2002; 280:192–200.

TEIXEIRA, C.G.L.; PICCOLI, A.; COSTA, P.; SOARES, L. & DA SILVA-SANTOS, J.E. **Involvement of the nitric oxide/soluble guanylate cyclase pathway in the anti-oedematogenic action of *Pfaffia glomerata* (Spreng) Pedersen in mice.** *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 2006, 58: p.667-675.

TESTAI, L.; CHERICONI, S.; CALDERONE, V.; NENCIONI, G.; NIERI, P.; MORELLI, I. & MARTINOTTI, E. **Cardiovascular effects of *Urtica dioica* L. (Urticaceae) roots extracts: *In vitro* and *in vivo* pharmacological studies.** *J. Ethnopharmacol.* 2002; 81: 105-109.

TILLEY, S.L.; COFFMAN, T.M. & KOLLER, B.H. **Mixed messages modulation of inflammation and immune responses by prostaglandins and thromboxanes.** *J Clin Invest*, 2001;108:15-23.

VAJJA, B.N.L.; JULURI, S.; KUMARI, M.; KOLE, L.; CHAKRABARTI, R. & JOSHI, V.D. **Lipopolysaccharide-induced paw edema model for detection of cytokine modulating anti-inflammatory agents.** *International Immunopharmacology*; Julho, 2004; v.4: 7, p.901-909.

VARGAS, V.M.F.; GUIDOBONO, R.R. & HENRIQUES, J.A.P. **Genotoxicity of plant extracts.** *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1991; 86: 67-70.

VIEGAS, J.R.C. & BOLZANI, V.S. **Os produtos naturais e a química medicinal moderna.** *Química nova.* 2006; v.29, n.2, p.326-337.

VILEGAS, W.; SANOMMIYA, M.; RASTRELLI, L. & PIZZA, C. **Isolation and structure elucidation of two new flavonoid glycosides from the infusion of *Maytenus aquifolium* leaves. Evaluation of the antiulcer activity of the infusion.** *Journal of Agricultural & Food Chemistry.* 1999; 47, 403–406.

VOLANAKIS, J. E. **Acute-phase proteins in rheumatic diseases.** In: McCARTY, D. J.; KOOPMAN, W. J., eds. *Arthritis and allied conditions.* 12. ed. Philadelphia, Lea & Febiger, 1993. p.469-78.

ZHOU, H.Y.; SHIN, E.M.; GUO, L.Y.; ZOU, L.B.; XU, G.H.; LEE, S.H.; ZE, K.R.; KIM, E.K.; KANG, S.S. & KIM, Y.S. **Anti-inflammatory activity of 21 (a,b)-methymelianodiol, novel compounds from *Poncirus trifoliata* Rafinesque.** *European Journal of Pharmacology*, 2007; 572, 239-248.