



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE FARMÁCIA**

ÍTALA SAMARA DA SILVA DIAS

**TRIAGEM DA ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DA FRAÇÃO DE
ALCALÓIDES TOTAIS DE *Aspidosperma pyrifolium* Mart. (APOCYNACEAE)**

**CAMPINA GRANDE
OUTUBRO 2016**

ÍTALA SAMARA DA SILVA DIAS

**TRIAGEM DA ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DA FRAÇÃO DE
ALCALÓIDES TOTAIS DE *Aspidosperma pyrifolium* Mart (APOCYNACEAE)**

Monografia apresentada como Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) ao curso de graduação em Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, como exigência para obtenção do Título de Farmacêutica.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Vanda Lucia dos Santos

CAMPINA GRANDE
OUTUBRO 2016

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação.

D541t Dias, Itala Samara da Silva.
Triagem da atividade farmacológica da fração de alcaloides totais de *Aspidosperma pyrifolium* Mart. (APOCYNACEAE) [manuscrito] / Itala Samara da Silva Dias. - 2016.
34 p.

Digitado.
Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2016.
"Orientação: Profa. Dra. Vanda Lucia dos Santos, Departamento de Farmácia".

1. Antinocicepção 2. Anti-inflamatório. 3. *Aspidosperma pyrifolium*. 4. Toxicidade. I. Título.

21. ed. CDD 615.9

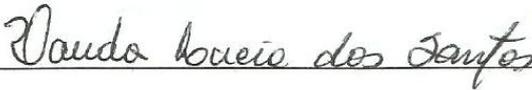
ÍTALA SAMARA DA SILVA DIAS

**TRIAGEM DA ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DA FRAÇÃO DE
ALCALÓIDES TOTAIS DE *Aspidosperma pyrifolium* Mart (APOCYNACEAE)**

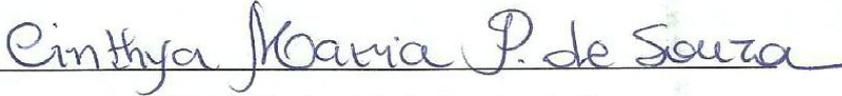
Monografia apresentada como Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) ao curso de graduação em Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba, como exigência para obtenção do Título de Farmacêutica.

Aprovado em 18/10/2016

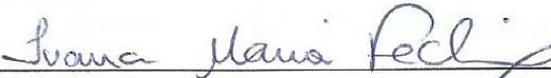
BANCA EXAMINADORA



Prof.^a. Dr.^a Vanda Lucia dos Santos (Orientadora)



Prof.^a M.^a Cinthya Maria Pereira de Souza



Prof.^a Dr. Ivana Maria Fchine

AGRADECIMENTOS

Há 11 anos deixei o acalento da minha família para conquistar um sonho. Muitos obstáculos tiveram que ser superados para que aqui eu conseguisse chegar. Por inúmeras vezes as adversidades me fizeram querer desistir e retornar ao meu lar, onde eu tinha tudo o que precisava. Eu não desisti e aqui estou, colhendo os louros por todos os anos que tive de me ausentar da presença da minha família e amigos.

Agradeço profundamente aos meus guias espirituais, espíritos de luz enviados por Deus, que me ampararam nos momentos de desânimo e derrotas e que me ajudaram a trilhar caminhos por vezes tão difíceis, auxiliando na minha evolução espiritual. Sem ajuda de almas tão evoluídas e cheias de luz, aqui eu não teria chegado.

Toda gratidão aos meus pais, meus mentores terrenos, eles me ensinaram a ter garra e trilhar o caminho da ética e da bondade. Sem o apoio diário, o amor constante, a torcida frequente, a confiança inabalável, eu não teria vencido. Palavras não são suficientes para expressar minha gratidão.

Aos meus avôs, Dirceu (*in memoriam*) e Emanuel, e as minhas avós Jaci e Isabel, todo o amor do mundo, vocês fazem parte dessa vitória. Obrigada por cada conselho, por sempre acreditarem em mim e por todo o amor. Vovó Dirceu, não tenho sua presença física, mas sei que seu coração está cheio de orgulho, obrigada por ter me propiciado as conversas mais agradáveis da vida, saudade eterna.

Aos meus amigos, meu muito obrigada, vocês fizeram, por diversas vezes, o papel de família, foram a minha fortaleza. Não há palavras para descrever a importância que cada um teve nesta árdua caminhada. Os momentos que vivemos serão eternos dentro do meu coração.

A Universidade Estadual da Paraíba e a todos os professores do Departamento de Farmácia por todos os conhecimentos transmitidos durante a graduação, em especial às professoras da minha banca por toda contribuição para a melhoria do meu trabalho.

Agradeço a minha querida orientadora Vanda, que me aceitou e me recebeu no Laboratório de Ensaios Farmacológicos de coração e braços abertos desde o primeiro momento. Muito obrigada por sua confiança, serei eternamente grata!

A todos, muito obrigada!

*“Todas as vitórias ocultam uma
abdicação”*

Simone De Beauvoir

RESUMO

TRIAGEM DA ATIVIDADE FARMACOLÓGICA DA FRAÇÃO DE ALCALÓIDES TOTAIS DE *Aspidosperma pyriforme* Mart (APOCYNACEAE)

¹Itala Samara da Silva Dias; ²Vanda Lucia dos Santos

^{1,2} Universidade Estadual da Paraíba - UEPB.

¹italasamarabaiana@hotmail.com

Quando se trata de fármacos para o tratamento da dor e inflamação, abre-se uma lacuna no que diz respeito ao regime medicamentoso a ser estabelecido, tendo em vista que ainda não dispomos de um fármaco analgésico e/ou anti-inflamatório ideal, ou seja, que não promovam efeitos colaterais potenciais. Assim, tem-se a necessidade de buscar medidas alternativas para o desenvolvimento de medicamentos para o combate da dor e inflamação. Nessa perspectiva, os produtos naturais encaixam-se como uma fonte promissora na pesquisa de moléculas com potencial atividade farmacológica. A *Aspidosperma pyriforme* Mart., conhecida popularmente por pereiro, apresenta em sua composição metabólitos relacionados com efeitos analgésicos e anti-inflamatórios. O objetivo deste trabalho foi avaliar o perfil toxicológico e realizar uma triagem da atividade farmacológica de frações de alcaloides totais de *A. pyriforme* (FAT-Ap) em modelos animais. Na toxicidade aguda foram utilizadas as doses de 50, 100 e 200 mg/kg (v.o), sendo os animais avaliados por 14 dias, quanto ao consumo de água, ração, parâmetros comportamentais e ao fim do período, alterações de peso e morfologia dos órgãos. A triagem da atividade anti-inflamatória e antinociceptiva, foi avaliada pelo teste de contorções induzidas por ácido acético, utilizando FAT-Ap nas doses de 10, 20 e 30 mg/kg (v.o), peritonite induzida por carragenina, utilizando a FAT-Ap em doses de 20 e 30 mg/kg (v.o). Os resultados de toxicidade mostraram que a dose de 200mg/kg foi 100% letal, a dose de 100mg/kg causou uma morte e os demais animais apresentaram alterações comportamentais frente ao sistema nervoso central e autônomo, foi observada também variações no consumo de ração, água e peso corporal, quando comparados ao grupo controle, na dose de 50mg/kg não foi observado variações significativas nos parâmetros analisados em relação ao controle. A dose de 30 mg/kg foi a que apresentou melhor atividade anti-inflamatória

e antinocipetiva. Deste modo, a FAT-Ap apresenta-se como fonte promissora para o desenvolvimento de medicamento com atividades anti-inflamatória e antinociceptiva. No entanto, apresentou indícios de toxicidade, sendo seu uso condicionado à determinação de doses seguras.

Palavras-Chave: Antinocicepção, anti-inflamatório, *Aspidosperma pyrifolium*

ABSTRACT

SCREENING DRUG ACTIVITY OF TOTAL ALKALOIDS FRACTION OF *Aspidosperma pyriformium* Mart (APOCYNACEAE)

¹Itala Samara da Silva Dias; ²Vanda Lucia dos Santos

^{1,2} Universidade Estadual da Paraíba - UEPB.

¹italasamarabaiana@hotmail.com

When it comes to drugs for the treatment of pain and inflammation, opens a gap concerning to the drug regimen to be established, given that still do not have an ideal analgesic drug and / or anti-inflammatory, or which do not promote potential side effects. Thus, there is the need to seek alternative measures for the development of drugs to combat pain and inflammation. In this perspective, natural products fits as a promising source in molecules with potential pharmacological activity research. The *Aspidosperma pyriformium* Mart., Popularly known as pereiro presents in its composition metabolites related to analgesic and anti-inflammatory effects. The objective of this study was to evaluate the toxicological profile and perform a screening of the pharmacological activity of total alkaloid fractions of *A. pyriformium* (FAT-Ap) in animal models. In acute toxicity were used doses of 50, 100 and 200 mg / kg (po), and the animals were evaluated for 14 days, as the water consumption, diet, behavioral parameters and at the end of the period, weight changes and morphology of the organs. The screening of anti-inflammatory and antinociceptive activity was evaluated by the writhing induced by acetic acid test, using FAT-Ap in doses of 10, 20 and 30 mg / kg (po), carrageenan-induced peritonitis, using the FAT-Ap at doses of 20 and 30mg / kg (po). The toxicity results show that the dose of 200mg / kg was 100% lethal, the dose of 100mg / kg caused the death and other animals showed behavioral changes across the central nervous system and autonomous, was also observed variations in feed intake, water and body weight when compared to the control group, at a dose of 50mg / kg was not observed significant changes in the parameters analyzed compared to control. The dose of 30 mg / kg showed the best anti-inflammatory and antinocipetive activities. Thus, the FAT-Ap is presented as a promising source for the development of medicines with anti-inflammatory and antinociceptive activities. However, it presented evidence of toxicity, and its use is conditioned to determine safe doses.

Keywords: antinociception, anti-inflammatory, *Aspidosperma pyrifoli*

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Efeito da administração oral da FAT-Ap na evolução ponderal (alteração da massa corpórea) e no consumo de água e ração em camundongos Swis durante 14 dias.....23
- Tabela 2. Efeito da administração oral da FAT-Ap sobre o peso relativo dos órgãos ao final do experimento.....24
- Tabela 3. Efeito antiquimiotático da FAT-Ap sobre o número de leucócitos totais no exsudato da cavidade intraperitoneal de camundongos após peritonite induzida por carragenina 1%.....25
- Tabela 4. Efeito antinociceptivo da FAT-Ap sobre o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético.....27

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	14
2.1 Objetivos gerais	14
2.2 Objetivos específicos.....	14
3. REFERENCIAL TEÓRICO	15
3.1 <i>Aspidosperma pyriforme</i> Mart.....	15
3.2 Toxicidade aguda	17
3.3 Modelos animais utilizados na triagem de atividade anti-inflamatória	17
3.3.1 Peritonite induzida por carragenina	17
3.3.2 Edema de pata induzida por carragenina	17
3.4 Modelos animais utilizados na triagem da atividade antinociceptiva.....	18
3.4.1 Contorções abdominais induzidas por ácido acético	18
3.4.2 Teste de Formalina.....	18
18	
4. METODOLOGIA	20
4.1 Obtenção da fração de alcaloides totais	20
4.2 Animais	20
4.3 Toxicidade aguda	20
4.4 Avaliação da atividade anti-inflamatória	21
4.5 Avaliação da atividade antinociceptiva	21
4.6 Análise Estatística	21
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	22
5.1 Toxicidade Aguda.....	22
5.2 Triagem da atividade anti-inflamatória.....	25
5.3 Triagem da atividade antinociceptiva	26
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	28
7. REFERÊNCIAS	29

1. INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais corresponde a uma das estratégias mais antigas para obter a cura, prevenção e tratamento de todos os tipos de enfermidades (MORAES; SANTANA, 2001). Há indícios que a utilização de produtos naturais, com fins medicinais, particularmente da flora, tenha nascido com a humanidade. Sendo um hábito que sempre existiu nas mais antigas civilizações (ANDRADE; CARDOSO; BASTOS, 2007). Nos dias atuais, preserva-se fortemente seu uso no tratamento de diversas enfermidades e isso se dá ao fato do tratamento realizado por plantas medicinais apresentarem baixo custo e eficácia comprovada pela medicina popular ao longo dos séculos.

No Brasil, em 2009, foi criado o Plano Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS) que tem por objetivo inserir, com segurança, eficácia e qualidade, plantas medicinais e fitoterápicos e serviços relacionados à fitoterapia no SUS. O programa busca também promover e reconhecer as práticas populares e tradicionais de uso de plantas medicinais e remédios caseiros, bem como orientar estudos e pesquisas que possam subsidiar a manutenção da relação de fitoterápicos disponíveis para uso da população. (BRASIL, 2009).

Agências regulatórias brasileiras criaram diversas resoluções e portarias visando à padronização e normatização do setor. Dentre elas, destacam-se a RDC n° 10 (BRASIL, 2010), na qual se encontra uma lista com mais de 60 plantas medicinais que podem ser usadas na forma de infusão (chás), e a RDC n° 14 (BRASIL, 2011) que normatiza o registro de fitoterápicos (CARVALHO, 2011; ZOLLNER; SCHWARZ, 2013).

O Brasil é um dos países com maior biodiversidade, na fauna e flora, do planeta, além de apresentar um valioso conhecimento tradicional associado ao uso de plantas medicinais. Apresenta também um forte potencial intelectual necessário para o desenvolvimento de pesquisas que resultem em tecnologias e terapias eficazes (BRASIL, 2006). Esta biodiversidade contribuiu para que o uso das plantas medicinais seja considerado um campo estratégico para o país, cujo maior potencial econômico da biodiversidade está na descoberta de novas drogas derivadas diretamente ou sintetizadas a partir de recursos biológicos (BRITO, 2010).

No entanto, o Brasil ainda precisa avançar no campo da fitoterapia. Este avanço só será capaz com forte campanha de esclarecimento público, que deve incluir os profissionais de saúde, principalmente médicos, para mostrar a segurança e eficácia das plantas medicinais de

uso tradicional, como uma alternativa terapêutica. É também importante um maior número de químicos de produtos naturais que se envolvam com o estudo de plantas medicinais, desde o trabalho de identificação do princípio ativo ao controle de qualidade dos produtos oferecidos ao consumidor (FERREIRA et al, 2010).

O território nordestino, destaca-se por apresentar forte endemismo e dinâmica bioecológica complexa. O bioma caatinga abrange grande parte dessa região e apresenta uma grande diversidade de plantas medicinais. Dessa forma, faz-se necessário pesquisas que abordem espécies vegetais nativas da caatinga como fontes geradoras de conhecimento de novas substâncias com potencial químico e farmacológico, para a investigação e isolamento de novos produtos naturais e posterior avaliação de suas atividades biológicas.

A *Aspidosperma pyriformium* MART., conhecida popularmente como pereiro, planta largamente encontrada no território nordestino, é uma forte promissora para o desenvolvimento de novos composto para o tratamento de inflamações e da dor.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Realizar a avaliação farmacológica da casca do caule de *Aspidosperma pyrifolium* Mart.

2.2 Objetivo específico

- Realizar a triagem da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória da fração de Alcaloides Totais de *Aspidosperma pyrifolium* Mart. (FAT-Ap)
- Avaliação da toxicidade aguda da FAT-Ap.

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 *Aspidosperma pyrifolium* Mart.

Pertence à família Apocynaceae, que apresenta cerca de 200 gêneros e 2000 espécies distribuídas em todos os continentes, nas regiões tropicais e subtropicais (JACOME, 2004).

É uma planta que ocorre nos estados do Norte e Nordeste. Tem larga dispersão em toda a zona da caatinga, sendo geralmente encontrado na zona do sertão baixo do Ceará, Rio Grande do Norte, Pernambuco e Paraíba, em vários tipos de solos e entre pedras e rochedos. É considerada espécie endêmica da caatinga (BRAGA, 1968). É popularmente conhecida como Pereiro, Pau-pereiro, Pereira-branca, Pereiro-branco, Pereiro-de-saia, Pereiro-preto, Pereiro-vermelho, Peroba-paulista, Peroba rosa, pau-de-coaru e Trevo.

Possui dentre seus fito constituintes, alcaloides, taninos, fenóis, flavonoides, xantonas, resinas e albumina (DANTAS, 2007).

Estudos anteriores, mostram que a *A. pyrifolium* apresenta efeito tóxico em caprinos e bovinos, promovendo a ocorrência de abortos ou nascimento de animais débeis que morrem após o parto. Observa-se também a ocorrência de intoxicações com sinais nervosos caracterizados por rigidez dos membros posteriores, com dificuldade de locomoção (SILVA, et al. 2006). Há relatos, que o maior número de abortos, em bovinos e caprinos, ocorre em períodos de estiagem. Isso se deve a escassez de forragem nos períodos de seca e consequentemente um maior consumo desta planta pelos animais (ASSIS, et al., 2009).

Estudos de toxicidade aguda realizados por Messiaes (2014), utilizando Extrato etanólico obtido por turbólise da *A. pyrifolium* (EET-Ap), mostram sinais de toxicidade em ratos, colaborando com os resultados de Lima *et al.* (2010) que atribui está toxicidade a presença de alcaloides indólicos presentes no gênero.

De acordo com o conhecimento popular, esta planta é utilizada na forma de macerato (casca) ou decocto, por suas propriedades analgésicas e anti-inflamatórias (dores de estômago, distúrbios respiratórios, cólicas, distúrbios urinários e dermatológicos), depurativas, antidesintéricas, bactericida, antissépticas e para problemas do fígado (ALBUQUERQUE et al, 2007; DANTAS, 2007; SANTOS, 2010).

Lins (2016), realizou o isolamento e identificação de dois alcaloides indólicos monoterpenoides da classe dos plumeranos, retirados da fração de alcaloides totais (FAT-Ap),

a presença de alcaloides indólicos está relacionado à várias atividades biológicas, entre elas anti-inflamatória e antinociceptiva.

As atividades analgésicas e anti-inflamatórias foram evidenciadas em ensaios farmacológicos em modelos animais, por Messiaes (2014), que obteve resultados que corroboram o uso popular desta espécie.

A dor promove efeito incapacitante, prejudicando por vezes o convívio social e profissional do indivíduo que é acometido por essa experiência sensitiva e emocional desagradável.

Quando se trata de fármacos para o tratamento da dor, abre-se uma lacuna no que diz respeito ao regime medicamentoso que pode ser estabelecido, tendo em vista que ainda não dispomos de um fármaco analgésico e/ou anti-inflamatório ideal, ou seja, que não promovam efeitos colaterais potenciais. Embora sejam altamente eficazes, os analgésicos de ação central geralmente não estão dissociados de efeitos adversos importantes. Adicionalmente, os analgésicos de ação periférica também apresentam efeitos indesejáveis, tais como lesões do trato gastrointestinal e renal (RANG et al., 2012). Assim, tem-se a necessidade de buscar medidas alternativas para o desenvolvimento de medicamentos para o combate da dor. Nessa perspectiva, os produtos naturais encaixam-se como uma fonte promissora na pesquisa de moléculas com potencial atividade analgésica (SILVA, et al, 2013).

A inflamação é um processo fisiológico complexo, que é regulado por várias vias de sinalização e requer a interação de diferentes tipos de células, modulando uma vasta gama de respostas celulares, incluindo maturação e função das células imunes, bem como a homeostase dos tecidos (MEDZHITOV, 2008).

A inflamação encontra-se no centro de muitas doenças comuns, incluindo artrite reumatoide, osteoartrite, aterosclerose, diabetes mellitus, neurodegeneração, infecção, alergia e câncer. Várias vias de sinalização formam uma rede pró-inflamatória e imunomoduladora, que assim definem a interação, os aspectos fisiológicos e fisiopatológicos da inflamação (MEDZHITOV, 2008).

Várias classes de drogas, tais como anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) e corticosteroides são utilizados para tratar doenças inflamatórias, estes apresentam propriedades analgésicas, anti-inflamatórias e antipiréticas através da sua ação sobre as vias do ácido araquidônico por inibição das COXs envolvidas nos mecanismos patogênicos da dor, inflamação e febre (GENÉ et al., 2009). No entanto, o uso clínico prolongado de grande parte dos medicamentos anti-inflamatórios prescritos sofrem desvantagens pelo fato de

apresentarem sérios efeitos colaterais como, hipertensão, hiperglicemia, aumento da susceptibilidade à infecção, osteoporose, glaucoma, problemas cardiovasculares, além do alto custo com o tratamento (GAUTAM e JACK, 2009)

É fundamental identificar novos e seguros fármacos para a prevenção e tratamento de doenças, incluindo doenças inflamatórias. Plantas medicinais são uma importante fonte de estudo, pois apresentam uma grande variedade de compostos biologicamente ativos.

3.2 Toxicidade aguda

Os estudos de toxicidade aguda são aqueles utilizados para avaliar a toxicidade produzida por uma substância teste, quando esta é administrada em uma ou mais doses durante um período não superior a 24 horas, seguido de observação dos animais por 14 dias após a administração (ANVISA, 2013).

A avaliação da toxicidade nos auxilia a determinar o potencial que novas substâncias e produtos tem de causar danos à saúde humana. Testes que avaliam a toxicidade sistêmica aguda são utilizados para classificar e apropriadamente rotular substâncias de acordo com o seu potencial de letalidade ou toxicidade como estabelecido pela legislação. Além da letalidade, outros parâmetros são investigados em estudos de toxicidade aguda sistêmica para identificar o potencial tóxico em órgãos específicos, identificar a toxicocinética e a relação dose-resposta (VALADARES, 2006).

3.3 Modelos animais utilizados na triagem de atividade anti-inflamatória

3.3.1 Peritonite induzida por carragenina

O ensaio consiste em avaliar o potencial que compostos possuem de inibir a resposta inflamatória na região peritoneal quando está é submetida a ação de agentes irritantes como a carragenina. Com esse teste, obtém-se dois parâmetros ligados a resposta anti-inflamatória: ação antiedematogênica, pela quantificação do volume de exsudato da cavidade peritoneal e o efeito antiquimiotático, pela determinação do número de leucócitos no exsudato coletado (BARROS et al., 2004).

3.3.2 Edema de pata induzido por carragenina

A injeção subcutânea de carragenina na pata de ratos ou camundongos induz aumento agudo e progressivo do volume da pata injetada. Este edema é proporcional à intensidade da resposta inflamatória, constituindo um parâmetro útil na avaliação da atividade anti-inflamatória de novos compostos.

A resposta inflamatória induzida pela carragenina é caracterizada por uma resposta bifásica com formação de edema acentuado resultante da produção rápida de vários mediadores inflamatórios, tais como histamina, serotonina e bradicinina, que ocorre em uma primeira fase, e subsequentemente liberação de prostaglandinas e óxido nítrico, segunda fase, com pico em 3 h, produzido por isoformas indutíveis de COX-2 e de óxido nítrico sintase (iNOS), respectivamente (THOMAZZI et al., 2010).

3.4 Modelos animais utilizados na triagem da atividade antinociceptiva

3.4.1 Contorções abdominais induzidas por ácido acético

O processo inflamatório é deflagrado por um agente agressor ou flogístico que provoca lesão tecidual. Esta lesão induz liberação de histamina dos grânulos localizados nos mastócitos (células teciduais), a qual é responsável pela gênese do processo inflamatório, que culmina com a liberação de prostaglandina, o agente causador da dor inflamatória (GOODMAN et al., 1996).

Assim sendo, o teste de contorção abdominal em camundongos é um método muito utilizado para se avaliar a atividade analgésica de substâncias contra dor de origem inflamatória, onde o ácido acético na concentração de 0,6% (v/v), induz lesão no abdômen do camundongo, o que é suficiente para provocar os espasmos traduzidos como contorções (KOSTER & ANDERSON, 1959).

3.4.2 Teste de Formalina

O teste da formalina é um método de avaliação comportamental utilizado para medir a efetividade de agentes antinociceptivos (HUNSKAAR e HOLE, 1987; RANDOLPH, 1997). Este modelo de dor está associada à lesão tecidual, no qual se quantifica a resposta

comportamental provocada pela injeção subcutânea de formalina diluída na pata traseira do animal (DUBUISSON e DENNIS, 1977; MARTINS *et al.*, 2006).

A vantagem deste teste sobre outros métodos de nocicepção é a possibilidade de avaliar dois tipos diferentes de dor ao longo de um período prolongado de tempo e, assim, permite o teste de analgésicos com diferentes mecanismos de ação (RANDOLPH, 1997).

As respostas comportamentais à formalina seguem um padrão bifásico composto de uma fase inicial aguda (primeira fase), e por um período mais prolongado (segunda fase) de atividade comportamental aumentada, que pode durar até cerca de uma hora. O período entre as fases é denominado intervalo de quiescência (DUBUISSON e DENNIS, 1977; MARTINS *et al.*, 2006).

A primeira fase inicia-se imediatamente após a injeção de formalina e se estende pelos primeiros 5 minutos (dor neurogênica ou aguda), estando relacionada com a estimulação química direta dos nociceptores das fibras aferentes do tipo C e, em parte, das fibras do tipo A δ e está associada à liberação de aminoácidos excitatórios, óxido nítrico e substância P. A segunda fase ocorre entre 15 e 30 minutos após a injeção de formalina e está relacionada com a liberação de vários mediadores pró-inflamatórios, como bradicinina, prostaglandinas e serotonina, entre outros. O intervalo de quiescência entre a primeira e a segunda fase é resultado de uma inibição da transmissão nociceptiva através de circuitos supra espinhais e espinhais (HUNSKAAR e HOLE, 1987).

4. METODOLOGIA

4.1 Obtenção da fração de alcaloides totais

As frações alcaloídicas totais de *A. pyrifolium* (FAT-Ap) utilizadas nos ensaios farmacológicos foram desenvolvidas no Laboratório de Fitoquímica (Labfit), localizado na Universidade Estadual da Paraíba. Para a obtenção dessas frações, foi realizado um estudo fitoquímico minucioso e diversos processos, como por exemplo: obtenção do extrato etanólico bruto das cascas de *A. pyrifolium*, Screening fitoquímico para detecção de alcaloides a partir do EEB e uma marcha para obtenção de alcaloides. Posteriormente, foi realizado o teste qualitativo de com reagente de Dragendorff, o qual formou um precipitado altamente positivo para alcaloides.

4.2 Animais

Foram utilizados animais adultos, camundongos *Swiss (Mus musculus)*, pesando entre 25 a 35g, de ambos os sexos. Estes foram mantidos em gaiolas plásticas em ambiente com temperatura e umidade ambiente, ciclo claro-escuro de 12 horas e comida e água *ad libitum*. Os protocolos experimentais foram submetidos e aprovados pelo Comitê de Ética em Uso de Animais (CUA) da faculdade de Ciências Sociais e Aplicadas de Campina Grande (FACISA), número de aprovação COM CEA 010012012 em 11 do junho de 2015 e conduzidos de acordo com as diretrizes éticas proposto pela *International Association for Study of Pain (IASP)* (ZIMMEMANN, 1983).

4.3 Toxicidade aguda

Para a determinação da toxicidade aguda da FAT-Ap, os animais foram divididos em 4 grupos de 12 camundongos (6 machos e 6 fêmeas) e separados em gaiolas de acordo com o sexo. Cada grupo, em jejum de 12 horas, recebeu, por via oral, salina, FAT-Ap 50 mg, FAT-Ap 100 mg e FAT-Ap 200 mg/kg. Após a administração, parâmetros como massa corporal,

consumo de água e de ração, e produção de excretas foram avaliados durante 30 min, 1, 2, 4, e a cada 24 horas por 14 dias. Assim como o estado de consciência e a disposição geral, a coordenação motora, o tônus muscular, os reflexos e a atividade do sistema nervoso autônomo. No 15º dia, os animais foram pesados e anestesiados com quetamina 5% e cloridrato de xilazina 2%. Em seguida os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical (ZIMMENANN, 1983), sendo os órgãos (fígado, baço, coração e rins) retirados, pesados e avaliados macroscopicamente (CUNHA *et al.* 2013).

4.4 Atividade anti-inflamatória

- **Peritonite induzida por carragenina**

Os animais foram divididos em 4 grupos de 5 animais e tratados por via oral com salina, indometacina 10 mg/kg, FAT-Ap 20 mg/kg ou FAT-Ap 30 mg/kg. Após 30 min, foi injetada uma solução de carragenina a 1% (0,1 mL/10 g) na cavidade intraperitoneal do animal. Quatro horas após a indução da inflamação, os animais foram eutanasiados, a cavidade intraperitoneal lavada com 2 mL do tampão fosfato (PBS), uma breve massagem foi realizada e em seguida coletado o fluido peritoneal para a contagem de leucócitos em câmara de Neubauer.

4.5 Avaliação de atividade antinociceptiva

- **Contorções abdominais induzidas por ácido acético**

Os animais foram divididos em 5 grupos de 5 animais de ambos os sexos, em jejum prévio de 12 horas. Foram tratados por via oral com Salina (10 mL/kg), dipirona (500mg/kg) e FAT-Ap (10mg, 20mg e 30 mg). Após 40 minutos, foi injetada uma solução de ácido acético a 1% (0,1 mL/10g) via intraperitoneal. Imediatamente os animais foram transferidos para funis de vidro transparentes e observados por 20 minutos para contabilizar o número e o tempo de início das contorções abdominais seguido do estiramento dos membros inferiores.

4.6 Análise estatística

Os resultados foram avaliados utilizando análise de variância de uma via (ANOVA), seguido do pós teste de Tukey. Os resultados foram expressos como média + ou – desvio padrão e o nível de significância de $p < 0,05$. O programa utilizado para o tratamento dos dados

foi o *GraphPad Prism*.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Partindo-se de 10g do extrato etanólico bruto, foi obtido 0,229g da fase de alcaloides totais, o que equivale a um rendimento de 2,29%. Esta fase foi utilizada para a realização da triagem farmacológica.

5.1 Toxicidade Aguda

O ensaio de toxicidade aguda foi baseado na RE Nº 90/2004 da ANVISA e no protocolo experimental de Almeida *et al.* (1999), sendo realizado objetivando a avaliação das alterações comportamentais frente ao sistema nervoso central, autônomo, pelo registro de sinais ou modificações de condutas, incluindo tempo de aparecimento, progressão e reversibilidade destes sintomas e ocorrência de morte.

Os resultados da toxicidade com o extrato etanólico desenvolvido por Messiades (2014), serviram como parâmetro para a escolha das doses que foram utilizadas para a avaliação da toxicidade aguda da FAT-Ap. Dessa forma, a fase alcaloídica (FAT-Ap.), mais concentrada que o extrato bruto, foi testada nas doses de 50, 100 ou 200 mg/kg para verificar seu potencial tóxico e a partir disto, ajustar as doses utilizadas para o estudo farmacológico.

A dose de 200 mg/kg foi 100% letal, até 30 minutos após administração oral. O principal efeito observado antes da morte dos animais foi a presença de tremores intensos, seguidos por convulsão.

A dose de 100 mg/kg da FAT-Ap causou morte de uma fêmea após uma hora de administração, sendo que, até quatro horas após, todos os animais que receberam esta dose apresentaram baixa resposta ao aperto da cauda, reflexo auricular e postura. Também apresentaram tremores e sinais de sedação e respiração forçada que foi revertido.

Na dose de 50 mg/kg os animais apresentaram leve sedação e respiração forçada nas primeiras 24 horas após administração oral.

As alterações no peso corporal e no peso dos órgãos também podem ser considerados como um indicador de efeitos adversos promovidos pela droga. É aceito como um sinal de

toxicidade quando o animal perde mais que 10% do peso corpóreo inicial (RAZA *et al.* 2002; TEO *et al.* 2002).

Para a dose de 50 mg/kg não foi observada variação significativa de peso, consumo de ração e água quando comparado ao grupo controle. Enquanto que para a dose de 100mg/kg houve diferença significativa destes parâmetros quando comparada ao grupo controle (Tabela 1).

Tabela 1: Efeito da administração oral da FAT-Ap na evolução ponderal (alteração da massa corpórea) e no consumo de água e ração em camundongos Swis durante 14 dias.

Parâmetro	Sexo	Salina	FAT 50 mg	FAT 100 mg
P. inicial (g)	M	28,83±1,32	27,67±2,58	30,67±0,81
P. final (g)		35,33±13,1	34,50±3,72	34,50±3,72
Ganho (%)		22,54	24,68	12,48***
P. inicial (g)		27,50±0,83	25,00±1,41	25,33±3,14
P. final (g)	F	33,50±0,83	30,17±2,04	28,67±12,61
Ganho (%)		21,81	20,58	13,18***
Consumo de ração/dia (g)	M	32,21±1,71	37,93±2,89**	28,50±2,31**
	F	37,00±3,25	36,07±2,86**	29,07±2,81**
Consumo de água/dia(mL)	M	52,14±1,31	52,86±1,25*	56,43±2,25*
	F	44,43±1,23	50,00±0,90*	56,43±3,93*

P. inicial=peso inicial; P. final=peso final; M=machos; F=fêmeas. Os resultados estão expressos como média±d.p. (n=5). Análise de variância de uma via (ANOVA) seguido do post teste de Tukey, *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. A ausência de asteriscos demonstra que os dados não foram significativos.

O consumo de ração e água, apesar de serem parâmetros importantes no estudo da segurança de um produto com finalidade terapêutica (IVERSEN *et al.* 2003), não se pode

inferir toxicidade ao extrato, apenas baseando-se nesse critério, sendo fundamental a análise da massa relativa dos órgãos. Essa alteração possui uma estreita relação com sinais de toxicidade. (DALLEGRAVE, 2003).

Dessa forma, o peso dos órgãos foi avaliado ao término do ensaio de toxicidade aguda, o que pode ser vista na **tabela 2**. Foi observado que para a dose de 50mg/kg não houve alterações significativas na massa dos mesmos. No entanto, para a dose de 100 mg/kg observou-se que o peso do fígado, em ambos os sexos, apresentou uma diminuição em sua massa, quando comparado ao grupo controle. Como não foram realizados estudos histopatológicos, não há como determinar a possível relação da diminuição da massa do fígado com a toxicidade da FAT-Ap.

Quanto às características macroscópicas dos órgãos dos animais, não foram visualizadas alterações.

Para inferirmos a toxicidade da FAT-Ap e seus riscos, é necessário a realização de diversos testes de toxicidade, como por exemplo: o estudo de toxicidade reprodutiva, a citotoxicidade, genotoxicidade, dentre outros.

Tabela 2: Efeito da administração oral da FAT-Ap sobre o peso relativo dos órgãos ao final do experimento

Peso relativo dos órgãos (g/100g)	Sexo	Salina	FAT 50 mg	FAT 100 mg
Fígado	M	4,26±2,18	4,72±0,60	3,81±0,60*
Baço		0,59±0,32	0,73±0,47	0,80±0,21
Coração		0,47±0,02	0,50±0,05	0,52±0,11
Rins		1,23±0,64	1,37±0,11	1,24±0,16
Fígado		4,65±0,46	4,45±0,18	3,53±1,74*
Baço	F	0,59±0,11	0,45±0,11	0,48±0,25
Coração		0,48±0,03	0,45±0,04	0,36±0,18

Rins	1,08±0,11	0,97±0,08	0,85±0,44
-------------	-----------	-----------	-----------

M=machos; F=fêmeas. Os resultados estão expressos como média±d.p. (n=5). Análise de variância de uma via (ANOVA) seguido do post teste de Tukey, *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. A ausência de asteriscos demonstra que os dados não foram significativos.

5.2 Triagem da atividade anti-inflamatória

A triagem da atividade inflamatória foi avaliada por meio do ensaio de peritonite. A peritonite induzida pela injeção intraperitoneal de carragenina é um modelo de inflamação amplamente utilizado na pesquisa de drogas anti-inflamatórias (LAPA et al., 2003). A injeção intraperitoneal de carragenina leva à migração de leucócitos para o local da inflamação (ZHANG et al., 2011).

A quantificação dos leucócitos através de uma câmara de Neubauer permite avaliar a influência de drogas neste parâmetro da resposta inflamatória, sendo particularmente sensíveis a anti-inflamatórios esteroidais (LAPA et al., 2003).

Os resultados (tabela 3), mostram que apenas a dose de 30 mg/kg de FAT-Ap inibiu de forma significativa (39,8 %), a migração leucocitária induzida por carragenina.

Tabela 3- Efeito anti-quimiotático da FAT-Ap sobre o número de leucócitos totais no exsudato da cavidade intraperitoneal de camundongos após peritonite induzida por carragenina 1%.

Tratamentos	Número global de polimorfonucleares (x10 ³ /mm ³)	Inibição (%)
Salina	14,58±0,67	--
Indometacina	8,03±1,35***	45,0

FAT-Ap 20 mg	12,09±2,27 ^{ns}	17,1
FAT-Ap 30 mg	8,77±1,15 ^{***}	39,8

Os resultados estão expressos como média±d.p. (n=5). Análise de variância de uma via (ANOVA) seguido do post teste de Tukey, *p<0,05; **p<0,01; ***p<0,001. A ausência de asteriscos demonstra que os dados não foram significativos.

Estudos realizados por MessiaDES (2014) utilizando o modelo de peritonite induzida por carragenina para testar o EET-Ap, nas concentrações de 62,5mg/kg; 125 mg/kg e 250 mg/kg, mostrou uma inibição sobre o número de leucócitos totais de 29,03%; 49,5 % e 59,14 %, respectivamente, apontando um potencial anti- inflamatório em todas as doses. Estes resultados corroboram com os encontrados para a FAT-Ap. No entanto, observa-se que FAT-Ap apresenta caráter anti-inflamatório utilizando uma dose inferior da que precisou ser usada do ETT-Ap, isso se dá ao fato da composição alcaloídica da FAT-Ap.

Este mesmo estudo de MessiaDES (2014), realizou o ensaio de edema de pata e os resultados demonstram efeito antiedematogênico do EET-Ap em todas as dose empregadas (62,5mg/kg; 125 mg/kg e 250 mg/kg de EET-Ap), exceto a de 125 mg no tempo de 2 horas (inibição de 14,81%), onde mostrou-se mais significativa em 4 horas (60, 59%). Ratificando mais uma vez o potencial anti-inflamatório da *A. pyriformium*, que apresenta em sua composição alcalóides e saponinas, compostos cuja ação é de cunho anti-inflamatório e antiedematogênico. (SANTOS et al.1995; BARBOSA-FILHO et al. 2006; SANTOS, 2010; MESSIADES, 2014).

5.3 Triagem da atividade antinociceptiva

No teste de contorção induzida por ácido acético em camundongos, a dor é gerada indiretamente, via mediadores endógenos como bradicinina, serotonina, histamina, substância P e prostaglandinas, que estimulam os neurônios nociceptivos periféricos que são sensíveis a analgésicos narcóticos e anti-inflamatórios não esteroidais, AINES (COLLIER et al., 1968; DERAEDT et al., 1980). As contorções abdominais, observadas em ratos e camundongos, após a injeção intraperitoneal do agente nociceptivo, o ácido acético, caracterizam-se por

contração e rotação do abdômen, seguida pela extensão de uma ou ambas as patas traseiras. A contagem do número de contorções ocorridas em um intervalo de tempo pré-determinado é tomada como índice da resposta nociceptiva (LAPA et al., 2007).

Nos testes de contorções abdominais, observado na tabela 4, verificou-se que todas as doses testadas do FAT-Ap foram capazes de diminuir o aparecimento das contorções abdominais nos camundongos, apresentando estatisticamente alta significância ($p < 0,001$), sugerindo um alto potencial analgésico. Quando confrontado com o resultado apresentado pelo controle positivo (dipirona 500 mg) percebe-se que a FAT-Ap apresentou em todas as doses, inibição de contorções bem próximas ao controle, com destaque para a dose de 30mg/kg que apresentou a maior porcentagem de inibição.

Tabela 4- Efeito antinociceptivo da FAT-Ap sobre o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético.

Tratamentos	Número de contorções durante 20 minutos	Inibição (%)
Salina	40±13,02	--
Dipirona	1,33±1,75***	96,67***
FAT 10 mg	9,33±9,0***	76,67***
FAT 20 mg	9,83±7,1***	75,42***
FAT 30 mg	6,33±7,1***	84,17***

Os resultados estão expressos como média±d.p. (n=5). Análise de variância de uma via (ANOVA) seguido do post teste de Tukey, * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. A ausência de asteriscos demonstra que os dados não foram significativos.

Diminuição de contorções abdominais em camundongos também foram observadas em estudos utilizando o EET-Ap. Onde, verificou-se que todas as doses testadas (62, 5mg/kg, 125 mg/kg e 250 mg/kg) do EET-Ap inibiram em 100% o aparecimento das contorções abdominais nos camundongos, sugerindo um alto potencial analgésico. (MESSIADES, 2014).

Lins (2016), realizou o isolamento e identificação de dois alcaloides indólicos monoterpênicos da classe dos plumeranos, retirados da fração de alcaloides totais (FAT-Ap):

15-methoxypirifolidina e 15-methoxyaspidospermina, corroborando com dados da literatura e servindo como base para fundamentar os estudos farmacológicos, que por sua vez associam a presença de alcaloides indólicos à várias atividades biológicas, entre elas anti-inflamatória e antinociceptiva.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados descritos neste estudo demonstraram que as frações de alcaloides totais da espécie *A. pyrifolium* apresenta forte caráter anti-inflamatório e antinociceptivo, nos teste de peritonite induzida por carragenina e contorção induzida por ácido acético, ambos realizados em camundongos.

Quanto ao estudos de toxicidade aguda, a FAT-Ap apresentou indícios de toxicidade, sendo seu uso condicionado à determinação de doses seguras.

Deste modo, as frações de alcaloides totais da planta *A. pyrifolium* Mart. apresenta-se como uma fonte promissora para um futuro desenvolvimento de medicamento com atividades anti-inflamatória e antinociceptiva.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, U. P.; MEDEIROS, P. M.; ALMEIDA, A. L. S.; MONTEIRO, J. M. M.; NETO, E. M. F. L.; MELO, J. G.; SANTOS, J. P. Medicinal plants of the *caatinga* (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **Journal of Ethnopharmacology**. Ed. 114.; p. 325-354. 2007.
- ALMEIDA, R.N.; FALCÃO, A.C.G.M.; DINIZ, R.S.T.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; POLARI, R.N.; BARBOSA-FILHO, J.M.; AGRA, M.F.; DUARTE, J.C.; FERREIRA, C.D.; ANTONIOLLI, A.R.; ARAÚJO, C.C. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no Sistema Nervoso Central e alguns dados experimentais. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 80, p. 72-76, 1999.
- ASSIS, T.S; MEDEIROS, R.M.T; ARAÚJO, J.A.S; DANTAS, A.F.M; CORREA, F.R. Intoxicações por plantas em ruminantes e equídeos no Sertão Paraibano, **Pesq. Vet. Bras.** 29(11):919-924, novembro 2009.
- ANDRADE, S.F.; CARDOSO, L.G.; BASTOS, J.K. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of extract, fractions and populnic acid from bark wood of *Austroplenckia populnea*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.109, n. 3, p. 464-471, 2007.
- BARROS, F.E.V.; SOUSA, M.G.T.; COSTA, J.L.; OLEA, R.S.G.; FREIRE, S.M.F.; BORGES, A.C.R.; BORGES, M.O.R. Avaliação das atividades analgésica e antiinflamatória do extrato metanólico de *Calotropis procera*, R. Br. (ciúme). **Infarma**, v.16, n.9-10, p.60-64, 2004.
- BARBOSA-FILHO, J.M.; PIUVEZAM, M.R.; MOURA, M.D.; SILVA, M.S.; LIMA, K.B.; CUNHA, E.V.L.; FECHINE, I.M.; TAKEMURA, O.S. Anti-inflammatory activity of alkaloids: A twenty-century review. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.1, p.109-139, 2006.
- BRAGA, R. Plantas do Nordeste, especialmente do Ceará. 3ª ed. Fortaleza: ESAM, 1976. 25. Tigre CB. **Silvicultura para as matas xerófilas**. Fortaleza: DNOCS, 1968.
- BRASIL. **Ministério da Saúde**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Resolução – RE nº90/2004. Normas para estudos toxicológicos de produtos fitoterápicos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Poder Executivo, Brasília, DF, 16 de março de 2004.

BRASIL. **Ministério da Saúde**. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. p.60. Brasília, 2006.

BRASIL. **Ministério da Saúde**. Portal da Saúde: Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. 2009.

BRASIL. **Farmacopéia Brasileira**. 5ª ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010.

BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira. 1ª ed. Brasília: Anvisa, 2011.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos- Brasília, DF, 31 de janeiro de 2013-versão 2.

BRITO, S. C. D. Os efeitos do marco regulatório sobre a competitividade da cadeia produtiva de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Fundação Universidade Federal de Tocantins TO**.p. 96, 2010.

CARVALHO, C.; ALVES, N.C.; MONTEIRO, A.C.; PELÓGIA, N.C.C. Efeito antinociceptivo e anti-inflamatório do *Agaricus blazei* Murill em ratos submetidos ao teste da formalina modificado. **Revista Dor**, v.12, n.1, p.50-53, 2011.

CUNHA, L.C.; MELO, D.F.A.; PEREIRA, M.E.; MELO, D.S.; PARENTE, L.L.; SILVA, M.A.C.; CONCEIÇÃO, E.D.; GONZAGA, L.Q.S. Avaliação da toxicidade aguda do extrato aquoso de *Apeiba tibourbou* Aubl (Tiliaceae), em camundongos e ratos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.34, n.3, p.357-352, 2013.

COLLIER, H.O. et al. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**, v. 32, p. 295-310, 1968.

DANTAS, I. C. **O raizeiro**. 1ª ed. Campina Grande/Paraíba: EDUEP, 2007.

DALLEGRAVE, E. Toxicidade reprodutiva do herbicida glifosato – Roundup® em ratos *Wistar*. 225 f. Tese (Doutorado) – **Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul**, 2003.

DERAEDT, R. et al. Release of prostaglandins E and F in an algogenic reaction and its inhibition. **European Journal of Pharmacology**, v. 61, p. 17-24, 1980.

FERREIRA, F.V; PINTO, A.C. A fitoterapia no mundo atual. **Quím.Nova**, vol. 33 no. 9, 2010.

GAUTAM, R.; JACK, S.M. 2009. Recent developments in anti-inflammatory natural products. **Medicinal Research Reviews**, v.29, p.767-820.

GENÉ, E.; CALVET, X.; MORÓN, A.; IGLESIAS, M.L. 2009. Recommendations for the use of anti-inflammatory drugs and indications for gastrointestinal protection in emergency departments. **Emergências**, v.21, p.295-300.

GOODMAN, L.S.; GILMAN, A.G.; RALL, T.W.; SCHLEIFER, L.S. **The Pharmacological Basis of Therapeutics**, 442-443, 1996.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non inflammatory pain. **Pain** 30(1): 103 – 14, 1987.

IVERSEN, P.O.; NICOLAYSEN, G. Water-for life. **Tidsskrift for den Norske Laegeforening**, v.123, p.3402-3405, 2003.

JACOME RLP, OLIVEIRA AB, RASLAN DS, WAGNER H. Chemical constituents and chromatographic profile of the stem bark of *Aspidosperma parvifolium* A. DC (“pau-pereira”). **Quim. Nova**. 2004; 27 (26): 897-900.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; BEER, E.J . Acetic acid for analgesic screening. **Fed. Proc.**, v. 18, 412, 1959.

LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; CASTRO, M. S.; LIMA, T. C. M. Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais. **Ed. Lagoa**, Florianópolis: 2003.

LAPA, A.J. et al. Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais. 5.ed. São Paulo: **Setor de Produtos Naturais, Departamento de Farmacologia, UNIFESP/EPM**, 2007. 119 p.

LIMA, M.C.J.S.; SOTO-BLANCO, B. Poisoning in goats by *Aspidosperma pyriforme* Mart.: Biological and cytotoxic effects. **Toxicon**, v. 55, n. 1, p. 320- 324, 2010.

LINS, F. S. V. **Constituintes Químicos e Avaliação Toxicofarmacológica de *Aspidosperma pyriforme* Mart. (APOCYNACEAE)**. Dissertação de Mestrado. Campina Grande-PB: UEPB, 2016.

MARTINS, MA; BASTOS L; TONUSSI, CF. Formalin injection into knee joints of rats: pharmacologic characterization of a deep somatic nociceptive model. *J Pain*. 7(2): 100 – 107, 2006.

MEDZHITOV, R. 2008. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature*, v.454, p.428–435.

MESSIADES, D. M. da S. **Estudo das Propriedades Biológicas, Fitoquímicas e Toxicológicas de *Aspidosperma pyrifolium* Mart.** Dissertação de Mestrado. Campina Grande-PB: UEPB, 2014.

MORAES, M.E.A.; SANTANA, G.S.M. Aroeira-do-sertão: um candidato promissor para o tratamento de úlceras gástricas. *Funcap*, v. 3, p. 5-6, 2001.

RANDOLPH, BC.; PETERS, MA.; Analgesic effectiveness of ketorolac compared to meperidine in the rat formalin test. *Anesth Prog*. 44(1): 11 – 16, 1997.

RANG HP, DALE MM, RITTERR JM, FLOWER RJ, Henderson G. *Farmacologia*. 7a ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**. 2012. 808 pp.

RAZA, M. AL-SHABANAH O.A.; EL-HADIYAH T.M.; AL-MAJED A.A. Effect of prolonged vigabatrin treatment of hematological and biochemical parameters in plasm, liver and kidney of Swiss albino mice. *Scientia Phamraceutica*, v. 70, p. 135-145, 2002.

SANTOS, M.V.; CARVALHO, C.B.; FAN, L.C.B.; MAGALHÃES, H.M. Variação circadiana dos leucócitos, fibrinogênio e plaquetas no sangue de cães submetidos a processo inflamatório, tratados com escina. *Ciência Rural*, v.25, n.1, p.67-70, 1995.

SANTOS, P. B. **Contribuição ao estudo químico, bromatológico e atividade biológica de *Angico Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan. Var. *cebil* (Gris.) Alts e Pereiro**

Aspidosperma pyrifolium Mart. 2010. 46f. Dissertação (Zootecnia) – Universidade Federal de Campina Grande, Campina Grande, Paraíba.

SILVA, FC; SARAIVA, SGL; JÚNIOR, RGO; ALMEIDA, JRGS, Modelos experimentais para avaliação da atividade antinociceptiva de produtos naturais: uma revisão. **Rev. Bras. Farm.** 94 (1): 18-23, 2013.

SILVA, DM; RIET- CORREA, F; Medeiros, RMT, OLIVEIRA, OF. Plantas tóxicas para ruminantes e equídeos no Seridó Ocidental e Oriental do Rio Grande do Norte. **Pesq. Vet. Bras.**, 2006; 26 (4): 223-236.

TEO, S.; STIRLING, D.; THOMAS, S.; HOBERMAN, A.; KIORPES, A.; KHETANI, V. 90-day oral gavage toxicity study of d-methylphenidate and d,l-methylphenidate in Sprague Dawley rats. **Toxicology**, v.179, p. 183-196, 2002.

THOMAZZI, S. M.; SILVA, C. B.; SILVEIRA, D. C. R.; VASCONCELLOS, C. L. C.; LIRA, A. F.; CAMBUI, E. V. F.; ESTEVAM, C. S.; ANTONIOLLI, A. R. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Bowdichia virgilioides* (sucupira). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, p. 451 - 456, 2010.

VALADARES, M.C, Acute toxicity evaluation: strategies post “DL50 test era”, **Revista Eletrônica de Farm**, V. 3, P. 93-98, 2006.

ZHANG, C. X.; DAI, Z. R.; CAI, Q. X. Anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of *Sipunculus nudus* L. extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 3, p.1177 - 1182, 2011.

ZIMMENANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**, v.16, p.109-110, 1983.

ZOLLNER, T.; SCHWARZ, M.; Herbal Reference Standards: applications, definitions and regulatory requirements. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.23, n.1, p.1-21, 2013.