



UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI-URCA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE - CCBS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA - DQB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOPROSPECÇÃO
MOLECULAR - PPBM

ENAIDE SOARES SANTOS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA SISTÊMICA E
TÓPICA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS DE *Licania
rigida* Benth (oiticica) EM CAMUNDONGOS**

CRATO – CE

2017

ENAIDE SOARES SANTOS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA SISTÊMICA E TÓPICA DO
EXTRATO HIDROALCOOLICO DAS FOLHAS DE *Licania rigida* Benth (oitica)
EM CAMUNDONGOS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri - URCA, como requisito para obtenção do título de Mestre em Bioprospecção Molecular.

Área de Concentração: Bioprospecção de Produtos Naturais; Linha de Pesquisa: Farmacologia de Produtos Naturais.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marta Regina Kerntopf

Co-orientador: Prof. Dr. Cícero Francisco Bezerra Felipe

CRATO – CE

2017

Esta Dissertação foi submetida como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Bioprospecção Molecular / Área de Concentração em Bioprospecção de Produtos Naturais, outorgado pela Universidade Regional do Cariri, e encontra-se à disposição dos interessados na Biblioteca Central da referida Universidade.

A citação de qualquer trecho desta Dissertação é permitida, desde que seja feita em conformidade com as normas da ética científica.

Enaide Soares Santos

Dissertação aprovada em: ____/____/____

Examinadores:

Prof^a. Dra. Marta Regina Kerntopf Mendonça
Universidade Regional do Cariri – URCA

Prof. Dr. Cícero Francisco Bezerra Felipe
Universidade Federal da Paraíba – UFPB

Prof^a. Dra. Maria Flaviana Bezerra Moraes Braga
Universidade Regional do Cariri – URCA

Prof^a. Dr^a. Francisca Adilfa Garcia
University of British Columbia, Vancouver – Canadá

Prof. Dr. José Galberto Martins da Costa
Universidade Regional do Cariri – URCA

Entrega o teu caminho ao senhor; confia nele, e ele tudo fará.

(Salmos 37, 5)

*Dedico este trabalho ao meu esposo, **Ildo dos Santos**, meu filho **Guilherme Soares** e a minha mãe **Cícera Soares**, pelo apoio, companheirismo e incentivo em minhas escolhas.*

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, primeiramente, pela vida que Ele me oferece, por sempre está comigo nas horas das dificuldades e tribulações, por ter me dado forças para prosseguir nos meus estudos e, hoje, por sua vontade, estar concluindo mais essa etapa da minha vida, o Mestrado. Todo louvor, honra e glória seja para Deus.

Ao meu esposo, **Francisco Ildo Furtado dos Santos**, por seu amor, atenção, dedicação e companheirismo, e ao nosso filho **Guilherme Soares Santos**, que enche a nossa vida de alegria e me ajuda a enxergar a vida de uma maneira mais simples e alegre. À minha mãe **Cícera Soares de Carvalho**, que sempre me ajuda e me apoia. Sem a minha querida mãezinha, não teria conseguido chegar até aqui. Muito obrigada!!!

À minha orientadora **Profa. Dra. Marta Regina Kerntopf**, pelo apoio, acolhimento e incentivo a pesquisa, pela confiança depositada em mim, pelos conselhos e ensinamentos que me tem passado, os quais me ajudaram a crescer. Além disso, por lutar com toda braveza pelo sucesso de seus alunos. Como costuma dizer “Eu me rejubilo com o sucesso de meus alunos”. E hoje só tenho a agradecer por tudo que fez por mim. Obrigada!!!

Ao meu co-orientador, **Prof. Dr. Cícero Francisco Bezerra Felipe**, por toda ajuda, pelo conhecimento que me transmitiu e o incentivo a pesquisa.

À **Profa. Francisca Adilfa de Oliveira Garcia**, pelos conhecimentos transmitidos, cuja distância não foi obstáculo. Por acreditar que eu conseguiria passar no mestrado e desenvolver um belo trabalho. Por muitos conselhos prestados e dedicação que teve comigo. Por sua amizade e carinho. Muito obrigada!

Ao **Prof. Dr. José Galberto Martins da Costa**, pela gentileza e atenção ao participar da banca de qualificação e defesa deste trabalho. Pelo apoio na conquista dos meus resultados do HPLC e por todo seu carinho que teve por nós quando ministrou sua disciplina de Química de Produtos Naturais.

A todos que fazem parte do Laboratório de Pesquisa de Produtos Naturais – LPPN, em especial a **DR^a Fabíola Fernandes Galvão Rodrigues**, pela amizade e colaboração com os

trabalhos realizados neste laboratório. E aos alunos de iniciação científica **Cícera Janaine Camilo, Wégila Davi e Jader Teófilo**.

À **Prof. Dr^a Maria Flaviana Bezerra Moraes Braga** pela atenção, auxílio e a gentileza em participar da banca de qualificação.

A todos do Laboratório de Microbiologia e Biologia Molecular (LMBM), em especial a **Saulo Relison**.

À **Dr.^a Roseli Barbosa**, exemplo de humildade, sabedoria e simpatia, e por estar sempre disponível a nos ajudar estar. Por ter a gentileza de participar da minha banca de qualificação.

Ao professor **Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes** por ter disponibilizado seu tempo, material e laboratório para que pudesse fazer os experimentos. Muito obrigada pelo seu apoio.

Ao Herbário Caririense Dárdano de Andrade Lima (HCDAL) na pessoa da **Dr.^a Maria Arlene Pessoa da Silva**.

Aos professores do **Programa de Pós-graduação em Bioprospecção Molecular**, por todo o conhecimento que repassado durante o mestrado (PPBM).

À minha amiga **Msc. Cícera Norma Fernandes Lima**, que é um exemplo de pessoa pacífica e perseverante. Acreditou em mim, mesmo quando duvidei de mim mesma. Levantou-me nas horas difíceis que pensei em cair. Foi um verdadeiro anjo de Deus na minha vida. Pelo encorajamento que me deu para seguir com meus estudos de farmácia e o mestrado. Agradeço por toda compreensão, alegria e ensinamentos!

Agradeço às pessoas que encontrei pelo caminho e que se tornaram bons amigos, **Denise Bezerra Correia, Maria de Fatima e Cícero Damon**. Obrigada por estarem comigo e torcerem por mim, por terem feito de momentos tristes, os mais felizes da minha passagem pelo mestrado. Por terem alegrado os meus dias e tornado tão prazeroso realizar trabalhos cansativos e enfadonhos. Com vocês, o trabalho se torna gratificante. Obrigada meus meninos!!!

Agradeço a **Álefe Brito Monteiro, Gilianderson de Araújo e Emmily Petícia do Nascimento** pela paciência e auxílio durante esse período de mestrado. À minha companheira de mestrado **Cícera Datiane de Moraes Oliveira Tintino**, que dividiu comigo as aulas, atividades e me ajudou com seus ensinamentos práticos nos testes de inflamação. Auxiliou-me pacientemente e, com toda dedicação, todos os protocolos realizados neste trabalho. Pessoa maravilhosa que agradeço muito pela ajuda.

Agradeço aos alunos de iniciação científica do Laboratório de Farmacologia dos Produtos Naturais, **Rosilaine de Lima, Andressa Gabrielli, Luanna Gomes, Joice Barbosa, Haielly Costa, Vitória Faustino, Isaac Moura Araújo, Sara Tavares, Ana Deiva Ferreira, Maisa Oliveira e Juliana da Silva** pelos momentos de descontração, pelo apoio na realização dos testes, finais de semana e feriados que passaram comigo realizando meu trabalho. Obrigada pessoal pela força.

Aos meus colegas que conheci durante o período do mestrado, pelo companheirismo, amizade e disponibilidade, **Tiago Feitosa Ribeiro, Luiz Pereira de Moraes, Cícero André Ferreira, Bruno Anderson Fernandes e Valéria Nunes Lima.**

À secretária do Mestrado, **Manuela Martins Fernandes**, por ser solícita e estar sempre à disposição para atender e ajudar aos alunos.

Ao motorista conhecido por Sr. **Brito**, que estava sempre alegre e disponível para levar os alunos nas coletas.

FUNCAP pelo apoio financeiro para a realização da pesquisa.

À **Universidade Regional do Cariri – URCA**, que me acolheu, e a todos que direta ou indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

...meus sinceros agradecimentos.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FLUXOGRAMA

RESUMO

ABSTRACT

INTRODUÇÃO	20
1 REFERENCIAL TEÓRICO	24
1.1 Definição de inflamação	24
1.1.1 INFLAMAÇÃO AGUDA E CRÔNICA.....	24
1.2 Inflamação cutânea	29
1.3 Farmacologia dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINES).....	30
1.3.1 MECANISMO DE AÇÃO DOS ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO ESTEROIDAI (AINES).....	31
1.3.2 EFEITOS COLATERAIS DO AINES	32
1.4 Farmacologia dos Glicocorticoides	33
1.4.1 MECANISMO DE AÇÃO DOS GLICOCORTICOIDES	33
1.4.2 EFEITOS COLATERAIS DOS GLICOCORTICOIDES.....	34
1.5 Família Chrysobalanaceae e o gênero <i>Licania</i>.....	34
1.6 <i>Licania rigida</i> (Oitica).....	36
1.7 Metabólitos secundários.....	37
1.7.1 COMPOSTOS FENÓLICOS	38
2 OBJETIVOS	42
2.1 Objetivo geral.....	42
2.2 Objetivos específicos.....	42
3 METODOLOGIA.....	44
3.1 Materiais.....	44
3.1.1 COLETAS DO MATERIAL E IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA.....	44
3.1.2 DROGAS E REAGENTES	45

3.1.3 ANIMAIS	46
3.2 Métodos	46
3.2.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO VEGETAL	46
3.2.2 PROSPECÇÃO QUÍMICA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS DE <i>Licania rigida</i>	47
3.2.3 QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS FENÓLICOS E FLAVONOIDES POR CLAE-DAD	48
3.2.4 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS	48
3.2.5 DETERMINAÇÃO DA DL ₅₀ E <i>Screening</i> HIPOCRÁTICO	51
3.2.6 MÉTODOS EXPERIMENTAIS PARA AVALIAÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA SISTÊMICA	52
3.2.6.1 Edema de pata induzido por carragenina ou dextrana.....	52
3.2.6.2 Edema de pata induzido por ácido araquidônico.....	53
3.2.6.3 Peritonite.....	53
3.2.6.4 Permeabilidade vascular por extravasamento de azul de evans	53
3.2.7 MÉTODOS EXPERIMENTAIS PARA AVALIAÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA TÓPICA.....	53
3.2.7.1 Edema de orelha induzido pela aplicação única de óleo de cróton.....	53
3.2.7.2 Edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton	54
3.2.7.3 Edema de orelha induzido pela injeção subcutânea de histamina.....	54
3.2.7.4 Edema de orelha induzido por ácido araquidônico	55
3.2.7.5 Edema de orelha induzido por capsaicina	55
3.2.7.6 Edema de orelha induzido por fenol.....	55
3.2.7.7 Quantificação do edema e do efeito inibitório médio.....	56
3.3 Análise estatística.....	56
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	58
4.1 Prospecção fitoquímica do Extrato Hidroalcoólico das folhas de <i>Licania rigida</i>	58
4.2 Quantificação de Ácidos fenólicos e Flavonoides pelo método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).....	59
4.3 Determinação da DL₅₀ e <i>Screening</i> Hipocrático	60
4.4 Atividade anti-inflamatória sistêmica	62
4.4.1 EDEMA DE PATA INDUZIDA POR CARRAGENINA.....	62
4.4.2 EDEMA DE PATA INDUZIDA POR DEXTRANA.....	65

4.4.3 EDEMA DE PATA INDUZIDA POR HISTAMINA	67
4.4.4 EDEMA DE PATA INDUZIDA POR ÁCIDO ARAQUIDÔNICO (AA).....	68
4.4.5 PERITONITE.....	69
4.4.5.1 Granulócitos e monócitos	70
4.4.6 AZUL DE EVANS	75
4.5 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA TÓPICA	77
4.5.1 EDEMA DE ORELHA AGUDO INDUZIDO PELA APLICAÇÃO ÚNICA DE ÓLEO DE CRÓTON 5%	77
4.5.2 EDEMA DE ORELHA INDUZIDO PELA APLICAÇÃO MÚLTIPLA DE ÓLEO DE CRÓTON	79
4.5.3 EDEMA DE ORELHA INDUZIDO POR HISTAMINA.....	82
4.5.4 EDEMA DE ORELHA INDUZIDO PELA APLICAÇÃO DE ÁCIDO ARAQUIDÔNICO	83
4.5.5 EDEMA DE ORELHA INDUZIDO PELA APLICAÇÃO DE CAPSAICINA	85
4.5.6 EDEMA DE ORELHA INDUZIDO PELA APLICAÇÃO DE FENOL.....	86
5 CONCLUSÃO.....	91
REFERÊNCIAS	97
ANEXOS	108
APÊNDICE	116

LISTA DE ABREVIATURA, SÍMBOLOS E SIGLAS

- AA - Ácido araquidônico
- AIES - Anti-Inflamatórios Esteroidais
- AINES - Anti-inflamatórios não Esteroidais
- AMPc - Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
- CAA - Células Apresentadoras de Antígenos
- CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
- CLAE - Cromatografia líquida de alta eficiência
- COXs - Ciclo-oxigenase
- Cys-LT1 - Receptor purinérgico
- DAD - Detector de arranjo de diodo
- DL₅₀ - Dose letal média
- EHFLR - Extrato Hidralcoólico de *Licania rigida* Benth
- HCDAL - Herbário Cariense Dárdano de Andrade - Lima
- ICMbio - Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
- IL-1 - Interleucina-1
- IL-6 - Interleucina-6
- K - kappa
- LFPN - Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais
- LOX - Lipooxigenase
- LTC₄ – Leucotrieno C₄
- LTD₄ – Leucotrieno D₄
- LTE₄ – Leucotrieno E₄
- MMA - Ministério do Meio Ambiente
- MS - Ministério da Saúde
- NO - óxido nítrico
- OD - Orelha direita
- OE - Orelha esquerda
- PAF - Fator de Ativação Plaquetária
- PG - Prostaglandinas
- RAM - Reações adversas a medicamentos
- RDC - Resolução da Diretoria Colegiada
- SNC - Sistema nervoso Central

TNF-a - Fator de necrose tumoral

Toll - (*Toll like*-Receptors) - Receptores Semelhantes ao Toll

TXA₂ –Tromboxano A₂

URCA - Universidade Regional do Cariri

v.o - via oral

Δ - delta

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Modificação enzimática da <i>L.histidina</i>	25
FIGURA 2. Mecanismos de migração dos leucócitos para o sítio inflamatório e ação das moléculas de adesão	26
FIGURA 3. Estrutura da Pele	29
FIGURA 4. Mecanismo de ação dos Anti-inflamatórios Não Esteroidais (AINES) e Glicocorticoides.....	32
FIGURA 5. Árvore da espécie <i>Licania rigida</i>	35
FIGURA 6. Espécie <i>Licania rigida</i>	37
FIGURA 7. Vias de biossíntese dos metabolitos secundários.....	38
FIGURA 8. Unidade estrutural representativa da classe dos flavonoides.....	39
FIGURA 9. Representantes estruturais de diversas classes de flavonoides.	40
FIGURA 10. Localização geográfica do local de coleta do material vegetal	44
FIGURA 11. Exsicata do material vegetal	45
FIGURA 12. Cromatograma por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD) do perfil de compostos fenólicos e flavonoides do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Licania rigida</i>	59
FIGURA 13. Efeito anti-inflamatório do Extrato Hidroalcoólico das Folhas de <i>Licania rigida</i> (EHFLR) no teste de edema de pata induzido por carragenina.	64
FIGURA 14. Efeito anti-inflamatório do Extrato Hidroalcoólico das folhas de <i>Licania rigida</i> no teste de edema de pata com dextrana.....	66
FIGURA 15. Efeito anti-inflamatório do Extrato Hidroalcoólico das folhas de <i>Licania rigida</i> no teste de edema de pata com Histamina.	67
FIGURA 16. Efeito anti-inflamatório do Extrato Hidroalcoólico das folhas de <i>Licania rigida</i> no teste de edema de pata com ácido araquidônico.....	69
FIGURA 17. Efeito do Extrato Hidroalcoólico das Folhas de <i>Licania rigida</i> (EHFLR) sobre a migração de Granulócitos e Monócitos no teste de peritonite induzida por carragenina.....	71
Figura 18. Efeito do Extrato Hidroalcoólico das Folhas de <i>Licania rigida</i> (EHFLR) sobre a migração de Linfócitos no teste de peritonite induzida por carragenina.	74
FIGURA 19. Efeito do Extrato Hidroalcoólico das Folhas de <i>Licania rigida</i> (EHFLR) sobre o extravasamento de azul de Evans no lavado peritoneal de camundongos	75
FIGURA 20. Efeito anti-inflamatório tópico do Extrato Hidroalcoólico das Folhas de <i>Licania rigida</i> (EHFLR) no teste de edema de orelha agudo induzido por óleo de cróton.	78

FIGURA 21. Curva tempo-resposta do efeito do Extrato Hidroalcoólico das Folhas de <i>Licania rigida</i> (EHFLR) por 9 dias sobre o edema de orelha induzido por óleo de cróton.	80
FIGURA 22. Efeito anti-inflamatório tópico do Extrato Hidroalcoólico das Folhas de <i>Licania rigida</i> (EHFLR) no teste de edema de orelha crônico induzido por óleo de cróton.....	81
Figura 23. Efeito anti-inflamatório tópico do Extrato Hidroalcoólico das Folhas de <i>Licania rigida</i> (EHFLR) no teste de edema de orelha induzido por Histamina.....	82
Figura 24. Efeito anti-inflamatório tópico do Extrato Hidroalcoólico das Folhas de <i>Licania rigida</i> (EHFLR) no teste de edema de orelha induzido por ácido araquidônico.	84
Figura 25. Efeito anti-inflamatório tópico do Extrato Hidroalcoólico das Folhas de <i>Licania rigida</i> (EHFLR) no teste de edema de orelha induzido por Capsaicina.....	85
Figura 26. Efeito anti-inflamatório tópico do Extrato Hidroalcoólico das Folhas de <i>Licania rigida</i> (EHFLR) no teste de edema de orelha induzido por Fenol	87

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Drogas e reagentes utilizados na pesquisa	46
TABELA 2. Grupos experimentais selecionados para avaliação da toxicidade aguda e screening hipocrático da administração oral do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Licania rigida</i>	52
TABELA 3. Prospecção química do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Licania rigida</i>	58
TABELA 4. Quantificação dos compostos fenólicos e flavonoides do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Licania rigida</i> por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	60
TABELA 5. Principais alterações comportamentais registradas em camundongos decorrentes da administração do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Licania rigida</i> (EHFLR) via oral ..	62
TABELA 6. Resultado em porcentagem do efeito anti-inflamatório do Extrato Hidroalcoólico das Folhas de <i>Licania rigida</i> (EHFLR), no teste de Peritonite	71
TABELA 7. Resultado em porcentagem do efeito anti-inflamatório do Extrato Hidroalcoólico das Folhas de <i>Licania rigida</i> (EHFLR), no teste de Peritonite	71
TABELA 8. Resultado em porcentagem do efeito anti-inflamatório do Extrato Hidroalcoólico das Folhas de <i>Licania rigida</i> (EHFLR), no teste de Peritonite.	74
TABELA 9. Resultado em porcentagem do efeito anti-inflamatório do Extrato Hidroalcoólico das Folhas de <i>Licania rigida</i> (EHFLR), no teste de Azul de Evans.....	76

LISTA DE FLUXOGRAMA

FLUXOGRAMA 1. Fluxograma da preparação do extrato vegetal	47
FLUXOGRAMA 2. Fluxograma dos métodos experimentais.....	50

RESUMO

A espécie *Licania rigida* Benth pertence à família (Chrysobalanaceae), popularmente conhecida como “oiticica” é muito utilizada na medicina popular no tratamento de diabetes e inflamações. Suas sementes apresentam ação antioxidante e antibacteriana, além de serem indicadas no tratamento de diarreias e na cicatrizante de feridas. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade anti-inflamatória sistêmica e tópica do extrato hidroalcoólico das folhas de *Licania rigida* em camundongos. O perfil químico quantitativo de ácidos fenólicos e flavonoides foram realizados pela técnica de Cromatografia líquida de Alta eficiência (CLAE), identificando a presença de ácidos fenólicos como ácido gálico, ácido clorogênico e ácido cafeico e os seguintes flavonoides epicatequina, rutina, quercetina, caempferol e catequina, revelando como constituintes principais desta análise o ácido clorogênico (1.16%) e Caempferol (0.81%). Foi verificado a DL₅₀ do extrato e seus efeitos em nível de Sistema Nervoso Central (SNC) através do *screening* hipocrático proposto por Malone, (1977). A DL₅₀ estimada foi ≥ 5000 e o *screening* hipocrático sugere que o extrato possivelmente atua promovendo efeitos estimulantes e não depressores do SNC. Foi investigada a ação anti-inflamatória sistêmica do extrato através dos modelos experimentais de edema de pata induzido por carragenina e dextrana. Os mecanismos de ação sistêmica foram elucidados pelos ensaios de edema de pata induzido por histamina e ácido araquidônico, peritonite e permeabilidade vascular. E seu efeito tópico foi analisado através do modelo de triagem edema de orelha induzido por óleo de cróton e seu mecanismo de ação elucidado nos modelos de edema de orelha induzido por histamina, ácido araquidônico, capsaicina e fenol. Quanto à atividade anti-inflamatória sistêmica e tópica, o EHFLR apresentou uma melhor resposta nos testes de triagem na dose de 25 mg/kg. A partir desses resultados, esta dose foi escolhida para avaliar o possível mecanismo de ação. O EHFLR demonstrou efeito antiedematogênico significativo sobre o edema de pata induzido por histamina e por ácido araquidônico na 3^o hora do teste com um percentual de inibição de 46,64% e 18,33%, respectivamente. O EHFLR também reduziu a permeabilidade vascular e migração leucocitária. Para avaliação tópica, o extrato apresentou um efeito anti-inflamatório significativo nos modelos agudo e crônico. Foi avaliado o mecanismo de ação por via tópica e o mesmo apresentou uma redução do edema nos modelos de edema de orelha induzido por ácido araquidônico e fenol, com percentual de redução do edema de 39,48% e 56%, respectivamente. O EHFLR não demonstrou redução significativa do edema na orelha do animal quando induzido por capsaicina e histamina. Conclui-se que o EHFLR exerce uma ação anti-inflamatória sistêmica, possivelmente por inibir a ação das aminas vasoativas, além de provavelmente intervir na via de metabolização do ácido araquidônico. Os resultados também sugerem que o extrato pode estar inibindo a migração e adesão leucocitária, evidenciada pela redução de neutrófilos e monócitos e desse modo, contribuindo para a redução do edema. O EHFLR também apresenta um efeito tópico possivelmente por agir inibindo a produção de metabólitos do ácido araquidônico, além de promover uma possível inibição da ação dos queratinócitos. Os resultados do trabalho mostraram que o EHFLR possui um potencial biotecnológico podendo ser uma ferramenta para estudos mais específicos e eficazes sobre efeito anti-inflamatório no desenvolvimento de futuros medicamentos no tratamento da inflamação.

Palavras - chave: *Licania rigida*. Inflamação. Flavonoides. Ácidos fenólicos.

ABSTRACT

The species *Licania rigida* Benth belongs to the family Chrysobalanaceae, popularly known as "oiticica" and widely used in folk medicine in the treatment of diabetes and inflammation. Its seeds have antioxidant and antibacterial action, besides being indicated in the treatment of diarrhea and wound healing. The objective of this work was to evaluate the systemic and topical anti-inflammatory activity of the hydroalcoholic extract of the leaves of *Licania rigida* in mice. The quantitative chemical profile of phenolic acids and flavonoids was performed by the High Efficiency Liquid Chromatography (HPLC), technique, identifying the presence of phenolic acids, such as gallic acid, chlorogenic acid and caffeic acid, and flavonoids e epicatechin, rutin, quercetin, caempferol And catechin, revealing chlorogenic acid (1.16%) and Caempferol (0.81%) as the main constituents of this analysis. The LD50 of the extract and its effects on the Central Nervous System (CNS) level were verified through the Hippocratic screening proposed by Malone, (1977). The estimated LD50 was ≥ 5000 and the Hipocratic screening indicated that the extract possibly acts to promote stimulant and non-depressant effects of the CNS. The systemic anti-inflammatory action of the extract was investigated through the experimental models of paw edema induced by carrageenan and dextran. The mechanisms of systemic action were elucidated by paw edema tests induced by histamine and arachidonic acid, peritonitis and vascular permeability. And its topical effect was analyzed through the crony oil-induced ear edema screening model and its elucidated mechanism of action in the ear edema models induced by histamine, arachidonic acid, capsaicin, and phenol. As for the systemic and topical anti-inflammatory activity, the EHFLR presented a better response in the 25 mg / kg screening tests. From these results, this dose was chosen to evaluate the possible mechanism of action. EHFLR demonstrated a significant anti-infective effect on histamine and arachidonic acid induced paw edema at the 3rd hour of the test with a percentage of inhibition of 46.64% and 18.33%, respectively. EHFLR also reduced vascular permeability and leukocyte migration. For topical evaluation, the extract presented a significant anti-inflammatory effect in the acute and chronic models. It was evaluated the mechanism of action by topical route, which presented a reduction of edema in the models of ear edema induced by arachidonic acid and phenol, with a percentage of edema reduction of 39.48% and 56%, respectively. EHFLR did not demonstrate a significant reduction of edema in the animal's ear when induced by capsaicin and histamine. It is concluded that EHFLR exerts a systemic anti-inflammatory action, possibly by inhibiting the action of vasoactive amines, besides probably intervening in the pathway of arachidonic acid metabolism. The results also suggest that the extract may be inhibiting leukocyte migration and adhesion, evidenced by the reduction of neutrophils and monocytes and thus, contributing to the reduction of edema. EHFLR also has a topical effect possibly by acting to inhibit the production of arachidonic acid metabolites, in addition to promoting a possible inhibition of the action of keratinocytes. The results of the study showed that the EHFLR has a biotechnological potential and can be a tool for more specific and effective studies on anti-inflammatory effect in the development of future medicaments in the treatment of inflammation.

Keywords: *Licania rigida*. Inflammation. Flavonoids. Phenolic acids.

INTRODUÇÃO



Fonte: Desenhado por NASCIMENTO, J.B. (2016)

INTRODUÇÃO

As plantas medicinais vêm sendo utilizadas desde os tempos remotos pela população como forma alternativa ou complementar aos medicamentos sintéticos (CALIXTO, 2003). Trata-se do uso diversificado que está relacionado a tradições vivenciadas e repassadas de geração a geração pelos povos ancestrais. Sua busca objetivava o tratamento, cura ou prevenção de doenças (MACIEL et al., 2002). Essas plantas são utilizadas desde as regiões mais pobres do país até grandes centros urbanos, sendo encontradas em feiras livres, mercados populares ou quintais residenciais (VEIGA JUNIOR, 2002).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) cerca de 90% da população mundial faz uso de plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde. No Brasil, essa porcentagem é de 82% (RAHMAN; SINGHAL, 2002; WHO, 2011). O uso dessas plantas foi disseminado principalmente pela cultura indígena (RODRIGUES; SIMONI, 2010).

O Brasil é um país rico em termos de biodiversidade, cujo território possui cinco principais biomas, Floresta Amazônica, Cerrado, Mata Atlântica, Pantanal e Caatinga. Ele apresenta-se como rica fonte de produtos terapêuticos (VEIGA JUNIOR; MELLO, 2008). A procura por plantas com finalidade terapêutica é decorrente da carência econômica e dificuldade de assistência médica ou farmacêutica vivida pela população (SCHENKEL; MENGUE; PETROVICK, 2004). Nos países desenvolvidos, também ocorre uma prática contínua da população em utilizar as plantas medicinais, por razões históricas e culturais, mesmo em um país que apresenta grande disponibilidade de medicamentos alopáticos (CALIXTO, 2003).

A busca por plantas medicinais despertou os pesquisadores e a indústria farmacêutica a investirem mais nas pesquisas de novos fármacos e investigarem substâncias envolvidas em sua ação terapêutica (CUNHA; SILVA; ROQUE, 2003; SOARES et al., 2006).

A ação terapêutica das plantas medicinais está relacionada à presença de alguns de seus constituintes, tais como flavonoides, alcaloides, terpenos, taninos, entre outros, que através de testes pré-clínicos, suas ações farmacológicas podem ser comprovadas. Por esse motivo, essas substâncias têm sido objeto de incessantes estudos envolvendo áreas multidisciplinares, que enriquecem os conhecimentos sobre a fonte medicinal natural (CECHINEL FILHO; YUNES, 1998).

As plantas medicinais contêm substâncias bioativas que podem apresentar benefícios à saúde e também efeito tóxico, quando usados de maneira errada (AMOROZO, 2002). Por

isso, sua ação terapêutica, bem como suas doses, devem ser devidamente esclarecidas e informadas (CARNEIRO et al., 2014).

É importante, portanto, que sejam feitas as seleções de espécies vegetais com estudos etnofarmacológicos, os quais auxiliam no desenvolvimento de novas pesquisas. A segurança de uma droga é fator determinante, por isso a preocupação com relação ao uso dessas plantas, que advém do fato de que muitas pessoas idealizam erroneamente que elas não apresentam toxicidade por serem “naturais”. Seus efeitos adversos, não obstante, podem ocorrer dos próprios constituintes da planta. A identificação errônea das espécies vegetais, forma incorreta de preparo e uso indiscriminado podem apresentar sérios riscos à saúde (BALBINO; DIAS, 2010).

Dentre os medicamentos mais comercializados mundialmente, cerca de 40% tem origem de fontes naturais, com 78% para medicamentos de ação antibacteriana e, 74%, de ação antitumoral desencadeadores dessa ação fitoterápica (SIANI; MICHELIS, 2005).

A fitoterapia é um tratamento realizado por meio de plantas (BETTEGA et al., 2011). Os chamados medicamentos “fitoterápicos” são preparações vegetais padronizadas que consistem em uma mistura complexa de algumas substâncias presentes na planta, as quais são preparadas adequadamente e posteriormente prescritas como manda à legislação vigente (DI STASI, 2007). Quando utilizados de forma correta, os fitoterápicos são eficazes e seguros. Os compostos fitoterápicos podem ser utilizados nas mais variadas fórmulas, como cápsulas, comprimidos, géis, pomadas, soluções aquosas, soluções hidroalcoólicas e infusões (FRANCISCO, 2010).

O mundo vegetal contribui para a farmacoterapia por ser uma fonte abundante de moléculas e genes extremamente importantes à farmacopeia (MACHADO; OLIVEIRA, 2014). Há, no entanto, poucos estudos que buscam validar o potencial farmacológico em algumas espécies vegetais, como ocorrem com as plantas do gênero *Licania*. Os relatos existentes sobre a espécie *Licania rigida*, por exemplo, resumem-se, na maioria das vezes, nas propriedades anti-inflamatórias e hipoglicemiantes (FARIAS et al., 2013).

A inflamação é definida como uma resposta de defesa de um tecido vivo vascularizado a um estímulo nocivo seja por micro-organismos, toxinas, células necróticas, entre outros, podendo também estar associado a doenças infecciosas, imunológicas, vasculares ou traumas (LARSEN; HENSON, 1983). O processo inflamatório desencadeia uma série de eventos, vasculares e celulares e, dependendo da persistência da lesão e sinais clínicos, podem ser caracterizados como uma inflamação aguda ou crônica (HENSON, 2005).

Existem diversas drogas sintéticas utilizadas no tratamento da inflamação. Entre elas,

estão os Anti-Inflamatórios Não Esteroidais (AINES) e os Glicocorticoides (AIES). Contudo, essas drogas apresentam alguns efeitos colaterais. Os AINES são inibidores da enzima ciclo-oxigenase (COX) e podem produzir reações adversas, como gastrite, úlceras gástricas, perfuração gastrointestinal, disfunção plaquetária, hemorragia e comprometimento renal (BATLOUNI, 2010). Já os Glicocorticoides causam alguns sintomas indesejáveis, como irritabilidade e insônia, que ocorrem com administrações curtas. Outros efeitos mais graves podem ser desencadeados com o uso contínuo dessa droga (PAULI et al., 2006).

Segundo Feitosa (2012), a espécie *Licania rigida* é utilizada com função medicinal em algumas regiões do Nordeste, com o uso de suas folhas, no tratamento de processos inflamatórios. Além disso, essa espécie é utilizada popularmente no tratamento de diarreia, epilepsia e malária.

Em outros estudos, feitos por Gomes e colaboradores, mostram que algumas espécies do gênero *Licania* são utilizadas no tratamento de inflamações do sistema reprodutor masculino e feminino, além do tratamento de verminoses. Costumam utilizá-las em forma de chás, a partir das suas folhas secas. Já as sementes, são utilizadas contra diarreias e para cicatrização de ferimentos.

Tendo como base as atividades demonstradas na literatura, suas propriedades anti-inflamatórias e poucos estudos relatando suas atividades biológicas correlacionadas com a sua composição química, surgiu o interesse no desenvolvimento deste trabalho, na intenção de agregar novas descobertas a respeito da ação do extrato hidroalcoólico das folhas de *Licania rigida* na inflamação sistêmica e tópica, na perspectiva de oferecer maiores subsídios para a complementação das informações científicas sobre a espécie, podendo, assim, descobrir nessa planta, um poderoso fitoterápico aliado ao desenvolvimento de novas terapias e, ao mesmo tempo, salientar a importância de sua conservação.

REFERENCIAL TEÓRICO



Fonte: Desenhado por NASCIMENTO, J.B. (2016).

1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 Definição de inflamação

A inflamação é uma resposta de defesa que ocorre após dano celular causado por micróbios, agentes físicos (radiação, trauma, queimaduras), químicos (toxinas, substâncias cáusticas), necrose tecidual ou reações imunológicas, cujo objetivo é promover a cura ou reparo tecidual. Trata-se de processo regulado por fatores pró e anti-inflamatórios (SILVA; MACEDO, 2011).

As células do sistema imunológico desenvolvem uma resposta de defesa contra micro-organismos infecciosos ou substância estranha logo após sofrer uma injúria tecidual. Essas células estão presentes em praticamente todos os tecidos do corpo (ABBAS et al., 2011), e, como resposta a injúria tecidual, a área inflamada revela os cinco sinais cardinais da inflamação, como rubor, calor, edema, dor e perda da função (CRUVINEL et al., 2010).

O processo inflamatório é benéfico e necessário para o organismo, uma vez que, em conjunto com a ação de hormônios e outras moléculas sinalizadoras, a inflamação é responsável pela regeneração e reparo das estruturas danificadas. Entretanto, se a inflamação ocorrer de forma prolongada e extensiva, pode tornar-se prejudicial ao organismo (CRUVINEL et al., 2010).

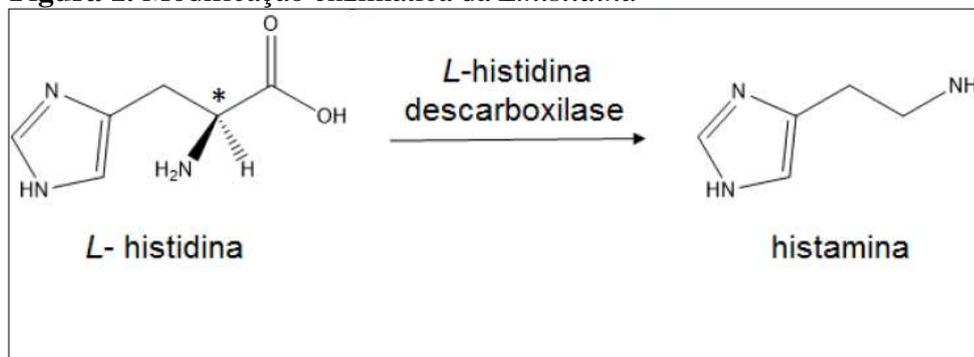
1.1.1 INFLAMAÇÃO AGUDA E CRÔNICA

O principal objetivo da resposta inflamatória gerada pelo sistema imunológico é remover o estímulo que desencadeou a resposta e iniciar rapidamente uma recuperação tecidual do local lesionado (CRUVINEL et al., 2010). Durante esse processo, ocorre o aumento da permeabilidade vascular e também do fluxo sanguíneo direcionado para o local da inflamação. Em decorrência da dilatação dos vasos e aumento da pressão hidrostática do local inflamado, ocorre o aparecimento do calor e do edema. Outro evento que ocorre é o rubor, devido à estase de hemácias, formando um exsudado de água e proteínas. Quando a resposta inflamatória não consegue recuperar a lesão, pode ocorrer a perda da função das células lesionadas (QUERICHELLI; RICCO, 2017).

Após a lesão tecidual, ocorre a evolução do processo inflamatório. Inicia-se com uma vasodilatação no local e aumento da permeabilidade capilar, devido à ação das aminas vasoativas (Histamina e Serotonina). A histamina é uma amina de baixo peso molecular

biossintetizada e armazenada principalmente nos mastócitos e basófilos a partir do aminoácido L-histidina (His) e seu grupo carboxila é removido pela ação da enzima L-histidina descarboxilase (Figura 1) (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMAN, 2012).

Figura 1. Modificação enzimática da *L.histidina*



Fonte: Adaptado de: Parsons e Ganellin (2006).

As ações fisiológicas da histamina são desempenhadas a partir de sua ligação com um de seus quatro receptores de membrana H₁R, H₂R, H₃R e H₄R, sendo esses acoplados à proteína G (GPCR) (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMAN, 2012). As funções realizadas pela histamina estão relacionadas à secreção de íons H⁺ a partir de células parietais gástricas para a formação de ácido clorídrico (HCl), modulação do ciclo de sono e vigília, respostas de hipersensibilidade, imunomodulação, manutenção do processo inflamatório, dentre outras (THURMOND; GERFAND; DUNFORD, 2008).

Os H₁R encontram-se presentes, predominante, no cérebro e nas células endoteliais, e estão relacionados ao papel da histamina frente a respostas alérgicas (THURMOND et al., 2004). Já os H₂R estão presentes principalmente nas células parietais da mucosa gástrica (BASMABUM et al., 2009), e são encarregados pela secreção de íons H⁺ para a formação do ácido clorídrico, levando à diminuição do pH gástrico (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMAN, 2012).

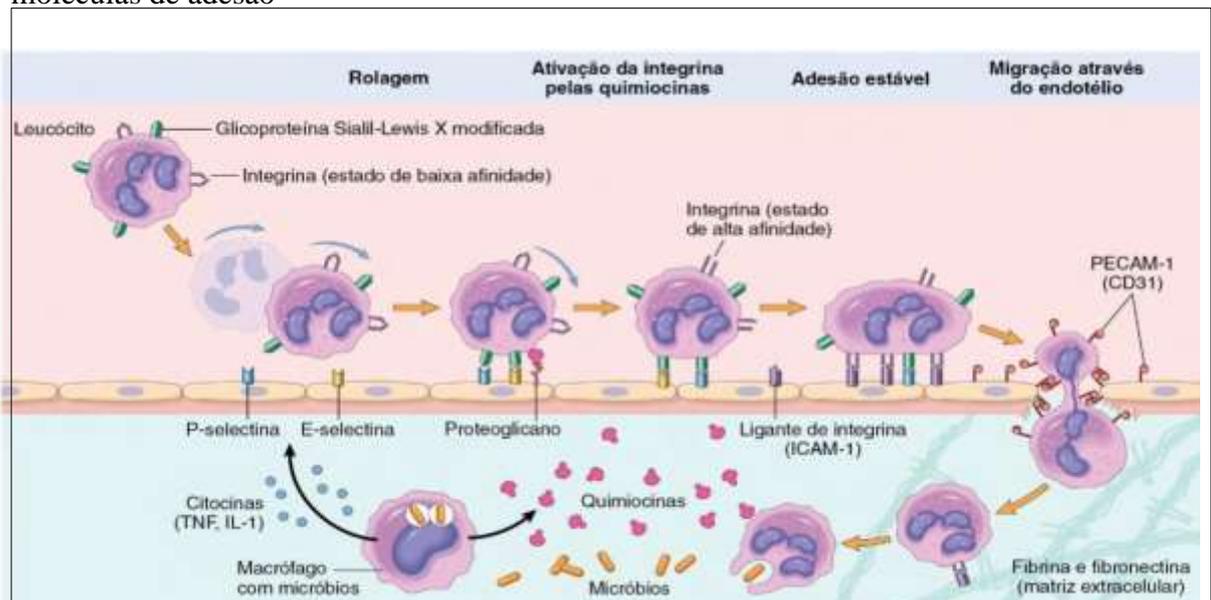
Os outros receptores histaminérgicos, H₃R e H₄R estão presentes, majoritariamente, no sistema nervoso central (SNC) e em células imunitárias, respectivamente, sendo que o primeiro, um auto-receptor pré-sináptico, controla a síntese e liberação de histamina que age como *feedback* negativo, e de outros neurotransmissores, como a 5-HT, dopamina e o ácido γ -aminobutírico (GABA), além de estar relacionado a desordens vestibulares, aos transtornos do ciclo sono-vigília e, ainda não bem estabelecido, há relatos do envolvimento deste receptor com aspectos da fisiopatologia de doenças, como Alzheimer e esquizofrenia (TILIGADA et

al., 2009). Já o segundo, o H₄R, promove efeitos de quimiotaxia induzida por histamina das células da linhagem hematopoiética (TILIGADA et al., 2009; KISS; KESERU, 2014).

O receptor H₄R, quando expresso na membrana das células imunitárias, como os linfócitos T e B, neutrófilos, células dendríticas, basófilos, monócitos e mastócitos, atua regulando eventos quimiotáticos induzidos por histamina, sendo, dessa forma, um alvo potencial para a pesquisa e desenvolvimento de novos protótipos a serem empregados no tratamento de doenças inflamatórias crônicas (KISS; KESERU, 2014).

A histamina e serotonina são liberadas por mastócitos e monócitos, respectivamente, e permitem o extravasamento de um exsudado rico em proteínas e água para o espaço extravascular. Para que os leucócitos possam migrar para o local da lesão e promover sua função de defesa, o endotélio é ativado, passando a expressar moléculas de superfície que promovem a aderência e migração dessas células para tecido, incluindo as moléculas de adesão, como as selectinas e integrinas (figura 2). Além disso, as aminas vasoativas ativam a síntese de óxido nítrico (NO), componentes do sistema complemento, do sistema de cininas e do sistema de coagulação. A interleucina-1 e o TNF- α são responsáveis por ativar as células do endotélio promovendo a produção das selectinas para, em seguida, iniciar o processo de adesão (PAIVA, 2013).

Figura 2. Mecanismos de migração dos leucócitos para o sítio inflamatório e ação das moléculas de adesão



Fonte: Totes (2011).

Logo no início do processo inflamatório, para que ocorra a resposta celular para defender o organismo do agente agressor, é necessário que esse antígeno seja apresentado. As

Células Apresentadoras de Antígenos (CAA) são os macrófagos teciduais e as células dendríticas. Quando se trata de um micro-organismo patógeno, o reconhecimento dá-se pelos receptores específicos de membrana denominados de Toll ou TLR (do inglês Tolllike-Receptors, ou receptores semelhantes ao Toll) presentes nas Células apresentadoras de antígenos (CAA). Os TLR interagem com estruturas específicas de membrana altamente conservadas em bactérias, vírus e fungos, denominadas de padrões moleculares associados ao patógeno (PAMP, do inglês Pathogen-Associated Molecular Patterns). Quando ocorre uma interação entre PAMP e TLR de macrófagos ou de células dendríticas, ocorre posteriormente uma transdução de sinais para ativar a liberação imediata de quimiocinas, que são responsáveis pela quimiotaxia de neutrófilos (KINDT; GOLDSBY; OSBORNE, 2008).

Na inflamação aguda, as primeiras células que chegam ao local inflamado são os polimorfos nucleares (neutrófilos e monócitos). Eles são recrutados para o local da lesão, para desempenharem um papel fundamental no desenvolvimento do processo inflamatório. Sua ação ocorre a partir da liberação de fatores solúveis de regulação, característica desta fase que são denominados de citocinas (QUERICHELLI; RICCO, 2017).

Citocinas são mediadores proteicos sintetizados a partir de uma resposta inflamatória ou antigênica. Elas participam da imunidade inata e adquirida, desempenhando um importante papel no combate ao processo inflamatório gerado, dentre elas, a de ativação e regulação das células inflamatórias, como os fagócitos mononucleares, neutrófilos e eosinófilos. Ela pode ser diferenciada em interferons (INF), quimiocinas e interleucinas (IL). O INF é uma citocina que desempenha um papel central na resposta inata e inflamatória por serem os mediadores iniciais de um processo inflamatório. Esta citocina é produzida por macrófagos e exerce sua função de fagocitose e destruição de células tumorais pela mediação de seus receptores TNFR1 e TNFR2 (CASTRO, 2011; OLIVEIRA et al., 2011).

A IL-1 é produzida inicialmente por macrófagos e monócitos, assim como por células não imunológicas, tais como fibroblastos e células endoteliais ativadas durante lesão celular, infecção, invasão e inflamação. Ela participa do processo inflamatório por induzir febre, ativar linfócitos e neutrófilos, indução a proliferação de células T, além de induzir a produção de várias citocinas importantes nesse processo. Possuem dois tipos conhecidos de subclasses IL-1 α e IL-1 β . A IL-1 α está associada a membranas celulares e age através de contatos celulares; já a IL-1 β , produz inflamação sistêmica através da ativação da ciclooxigenase (COX₂), com a formação de PGE₂, desencadeando a febre. Além disso, produz substância-P (SP), óxido nítrico e moléculas de adesão endotelial (WOLF et al., 2008).

A IL-6 é uma glicoproteína secretada por muitos tipos de células, como macrófagos, monócitos, eosinófilos e hepatócitos. É uma citocina pró-inflamatória que promove maturação e ativação de neutrófilos, macrófagos e diferenciação de células T citotóxicas exercendo propriedades anti-inflamatórias durante uma lesão (RAEBURN et al., 2002).

As quimiocinas são um tipo de citocinas quimiotáticas responsáveis pelo recrutamento de leucócitos em condições fisiológicas ou patológicas. São exemplo de família de quimiocinas as CXC e as CC, que são quimioatrativos para monócitos, basófilos, eosinófilos e linfócitos (RITTER; KORNER, 2002).

Outras moléculas envolvidas durante o processo inflamatório são os peptídeos do sistema complemento. Eles são liberados como produtos finais das cascatas enzimáticas proteolíticas. Os peptídeos C3a e C5a têm ação de ativarem os mastócitos para liberar histamina, que além de promover vasodilatação, também funcionam como substâncias quimioatrativas, recrutando leucócitos para o local inflamado. A C3b é uma opsonina que adere à superfície de micro-organismos para facilitar a fagocitose pelas células de defesa. De modo simultâneo a esse processo, também são produzidos mediadores lipídicos derivados do ácido araquidônico (AA) (KINDT; GOLDSBY; OSBORNE, 2008).

O ácido araquidônico é um ácido graxo bastante importante na produção dos eicosanoides, como os tromboxanos (TXA₂), leucotrienos (LTB₄, LTC₄, LTD₄, LTE₄) e prostaglandinas (PGE₂, PGD₂, PGF₂ α). Sua produção ocorre em consequência da ativação de fosfolipases, que hidrolisam os fosfolipídios constituintes da membrana celular liberando o ácido araquidônico, sofrendo ação da cicloxigenase (COX) e lipoxigenase (LOX) e gerando prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos. A função das prostaglandinas, durante o processo inflamatório, é induzir a febre, hiperalgesia e a vasodilatação (MESQUITA JR et al., 2008).

As prostaglandinas (PG) são produzidas em neurônios e vasos do SNC. Elas desempenham diversas funções importantes como reguladores do ciclo do sono e do despertar, da origem da febre e na transmissão da dor. Além disso, de promove a permeabilidade vascular, agregação plaquetária, cicatrização, entre outros (KAWAHARA et al., 2015).

Quando uma lesão afeta a membrana celular, a enzima fosfolipase A₂, que se encontra presente nos leucócitos e plaquetas, é ativada por citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina IL-1, levando à degradação dos fosfolipídios e, desse modo, resultando na produção de ácido araquidônico. Quando esse ácido é metabolizado, ocorre a formação dos leucotrienos, pela ação da enzima lipo-oxigenase, e também a formação das prostaglandinas,

prostaciclina e tromboxanos, pela ação da enzima ciclo-oxigenase (HILÁRIO; TERRERI; LEN, 2006).

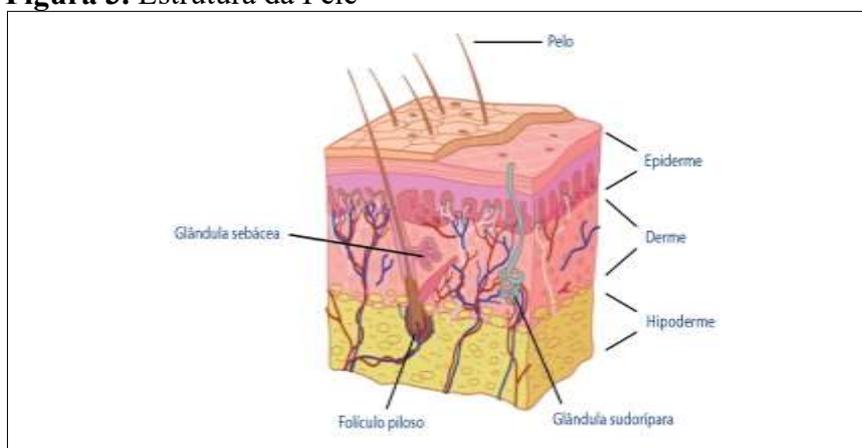
Durante a fase aguda da inflamação ocorre a reparação tecidual. Esse processo é caracterizado pela regeneração e organização do tecido. Ocorre uma substituição das células mortas ou lesadas por novas células, idênticas às originais, promovendo a restituição total e a funcionalidade do tecido (MESCHER; NEFF, 2005).

A transição para a fase inflamatória crônica é evidenciada pelo desenvolvimento da resposta humoral específica e da resposta imune celular. Ela é caracterizada por conter histologicamente um exsudado celular de macrófagos e linfócitos ao lado das áreas de regeneração tecidual (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005). Além disso, durante esse processo, ocorre a proliferação de vasos sanguíneos, fibrose e necrose tecidual (FIGIWARA; KOBAYASHI, 2005). Esse processo tem duração prolongada e pode levar de semanas ou até mesmo anos. Ele pode ser observado na fisiopatologia de algumas doenças, como artrite reumatoide e tuberculose (LUCETTI, 2010).

1.2 Inflamação cutânea

Para uma abordagem mais satisfatória sobre inflamação cutânea, é pertinente discorrer sobre a pele. Segundo Sampaio e Rivitti (2000), a pele é caracterizada como o maior órgão do corpo humano e tem 15% do peso corporal. Ela tem várias funções, e uma delas é a capacidade de promover o isolamento da estrutura interna do corpo com o meio externo, desenvolvendo uma função de proteção. A pele é dividida em três camadas: a epiderme (parte superior), a derme (parte intermediária) e a hipoderme (parte inferior), (figura 3).

Figura 3. Estrutura da Pele



Disponível em: < <http://livrozilla.com/doc/104699/a-pele-como-org%C3%A3o-estrutura--fisiologia-e-fun%C3%A7%C3%B5es> >. Acesso: 22 fev. 2017.

A pele é a primeira linha natural de defesa que o organismo possui. Ela o protege contra diversos microrganismos. A maioria das funções de defesa da epiderme localiza-se no estrato córneo, uma parte que limita a colonização por patógenos por possuir baixo teor de água, um pH ácido e ter lipídios e peptídeos antimicrobianos na superfície (ELIAS, 2007).

Dentre as células localizadas na epiderme, os queratinócitos são os principais tipos de células envolvidos na manutenção da integridade de sua estrutura. Elas expressam quimiocinas, citocinas e moléculas do complexo do sistema imunológico, que colaboram com o processo de reparação no tecido cutâneo. Outras células encontradas na epiderme são os melanócitos (responsável pela pigmentação da pele), células de Langerhans (captura o antígeno e funciona como CAA), células de Merckel (atua como mecanorreceptores). Na derme, ocorrem a passagem do fluxo sanguíneo, que permitem que ocorra a infiltração de células migratórias do processo de resposta de defesa inata ou imune e de cicatrização, importantes para a defesa da pele. A hipoderme é caracterizada como a camada mais profunda da pele e é composta, exclusivamente, por tecido adiposo. Desempenha a função de isolamento térmico para proteção mecânica do organismo, frente às pressões e traumas externos (SAMPAIO; RIVITTI, 2000).

Quando se tem uma injúria externa, o organismo começa a desenvolver um processo inflamatório local. Como resposta natural, esse processo começa a estimular a produção de citocinas pelos queratinócitos, que vão ajudar na defesa da pele contra o agente agressor. Após ruptura aguda da barreira epidérmica, começa a expressão de mediadores pró-inflamatórios, como a interleucina-1 (IL-1), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e interleucina-6 (IL6). Eles são potentes mitógenos epiteliais (substância que estimula a proliferação celular) e estimuladores da síntese de lipídios, fundamentais para o reparo da barreira cutânea. Entretanto, se a ruptura da barreira for prolongada, começará uma produção prolongada de citocinas, o que é prejudicial para o processo de defesa, desencadeando uma inflamação tópica crônica (PROKSCH; BRANDNER; JENSEN, 2008).

1.3 Farmacologia dos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs)

Os AINEs representam compostos orgânicos desencadeador de ação analgésica, antipirética e anti-inflamatória (LONGUI, 2007). São drogas de primeira escolha no tratamento de doenças reumáticas ou não reumáticas, como artrite reumatoide e osteoartrite, assim como nas sequelas de traumas, contusões e para tratamento pós-operatório. Dentre os fármacos mais utilizados na terapêutica dos processos inflamatórios estão os AINES e os

corticosteroides. Eles são divididos em fármacos seletivos da COX2 (Inflamatória) e fármacos não seletivos. São exemplos de AINES não seletivos o ácido acetilsalicílico, a indometacina, o naproxeno e seletivos Celecoxib, Rofecoxib (BATLOUNI, 2010).

1.3.1 MECANISMO DE AÇÃO DOS ANTI-INFLAMATÓRIOS NÃO ESTEROIDAIIS (AINES)

Esse mecanismo (figura 4) baseia-se na inibição de um grupo de enzimas denominadas ciclooxigenases (COXs), responsáveis pelo metabolismo do ácido araquidônico em prostaglandinas, o que confere a estes fármacos duas ações farmacológicas determinantes para o seu uso na inflamação. Os AINEs são usados no tratamento da dor leve e moderadas, devido as suas propriedades analgésicas serem prolongadas. Eles agem inibindo a enzima ciclooxigenase (COX1 e COX2) e, dessa forma, consegue diminuir a produção de prostaglandinas combatendo a inflamação e, conseqüentemente, dor e febre (HILÁRIO; TERRERI; LEN, 2006).

A cascata do ácido araquidônico dá-se quando os fosfolipídios sofrem ação da fosfolipase A2 dando origem ao ácido araquidônico, o qual é derivado ácido linoleico e sofre oxidação, sendo dividido em duas vias: a da ciclooxigenase (COX) e a da lipooxigenase (LOX).

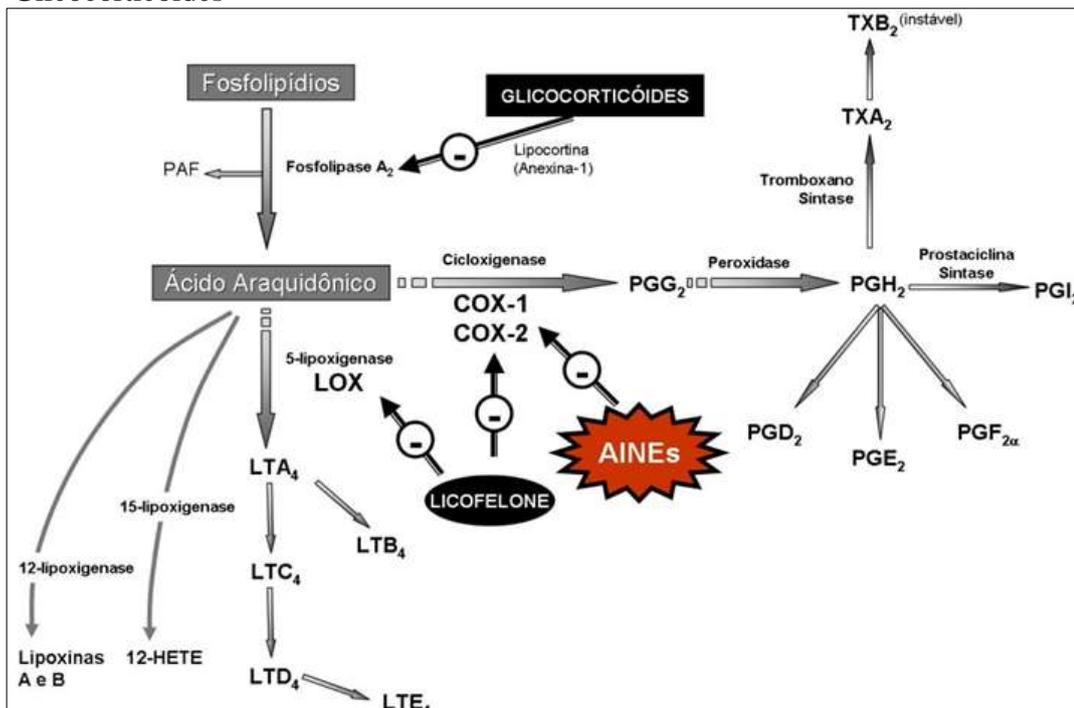
Sua ação anti-inflamatória e analgésica ocorre devido à inibição da síntese das prostaglandinas pró-inflamatórias que favorecem a vasodilatação prolongada, aumentam o fluxo sanguíneo e a ação de substâncias, como bradicinina, histamina e serotonina, que são capazes de aumentar a permeabilidade vascular e ativar as terminações nervosas (GONZÁLEZ, 2007).

A COX1 é denominada constitutiva e confere uma citoproteção epitelial gástrica e hemostasia local. Já a COX2, é induzida por citocinas, importantes para a formação de prostanoídes no processo inflamatório. De acordo com as funções fisiológicas das isoformas da COX, sabe-se que AINEs inibidores específicos da COX-2 impedem o processo inflamatório sem causar os efeitos colaterais gástricos resultantes da inibição da COX-1, (FELDMAN; MAHON, 2000). Os principais efeitos terapêuticos dos AINEs derivam da sua capacidade de inibir a produção de PG. A primeira enzima na via sintética das PG é a COX, que converte o AA nos intermediários PGG2 e PGH2, além de promover a produção de TXA2 (BRUNTON; CHABNER; KNOLLMANN, 2012).

A prostaglandina E2 (PGE2) esta predominantemente no tecido cutâneo, onde modula

vários eventos inflamatórios, como o aumento da permeabilidade vascular e vasodilatação, contribuindo, assim, na formação do edema e na adesão e diapedese dos neutrófilos e monócitos (LEE, 2003).

Figura 4. Mecanismo de ação dos Anti-inflamatórios Não Esteroidais (AINEs) e Glicocorticoides



Fonte: Tavares (2012).

1.3.2 EFEITOS COLATERAIS DOS AINEs

Os efeitos adversos que os AINEs apresentam muitas vezes são decorrentes do seu mecanismo de ação. Os AINEs não seletivos geram inibição da síntese de prostaglandinas, as quais apresentam grande importância para uma série de atividades fisiológicas que mantêm a homeostasia do organismo. Eles diminuem a produção do muco estomacal e o torna susceptível a ação do ácido clorídrico, produzido pelas células parietais do estômago, podendo gerar dores e, posteriormente, lesões gástricas e hemorrágicas. Os AINEs também geram diminuição da síntese de tromboxano A2 e impedem que ocorra agregação plaquetária. São contraindicados com anticoagulantes, ou outros medicamentos, que também prejudiquem o processo de agregação plaquetária. Deve-se ter, pois, cuidado com o uso de AINEs em casos de dengue, que é uma doença que reduz a atividade das plaquetas, visto que o uso nessas condições acarretaria uma hemorragia no paciente (BATLOUNI, 2010).

Essa classe de medicamentos não é indicada em pacientes asmáticos. Isso se deve ao fato de que os AINEs, ao inibir a COX e impedir a conversão de ácido-araquidônico em prostaglandinas, passam a acumular o ácido-araquidônico, que se desvia para a via da lipooxigenase e se converte em leucotrieno. Os leucotrienos (principalmente LTC₄, LTD₄ e LTE₄) ativam receptores Cys-LT₁ presentes nas vias aéreas e na musculatura lisa brônquica. Isso gera a exacerbação na produção de muco e contração da musculatura lisa brônquica. Logo, aumenta-se o risco de precipitação de crise asmática em pessoas com asma. (VARALDA; MOTTA, 2009).

1.4 Farmacologia dos Glicocorticoides

Os glicocorticoides são anti-inflamatórios esteroidais bastante utilizados no tratamento de dor e inflamação. Eles são capazes de interferir no processo inflamatório, minimizando os danos e desconforto provocados durante este processo (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009). Esse grupo de fármaco caracteriza-se como esteroides lipofílicos, muito utilizados em tratamento de rejeição de transplantes e processos imunológicos. São exemplos de glicocorticoides a dexametasona e hidrocortisona. Elas exercem a inibição do processo inflamatório nas manifestações agudas ou crônicas (ANTONOW; MONTEIRO; SANTOS, 2007).

Os glicocorticoides estão envolvidos em diversas funções fisiológicas do organismo. O cortisol ou hidrocortisona é o principal glicocorticoide natural circulante no ser humano. Sua síntese é regulada pelo hormônio adrenocorticotrófico (ACTH), secretado pela hipófise anterior em resposta à liberação, pelo hipotálamo. O hormônio antidiurético (ADH), a ocitocina e as catecolaminas podem influenciar o ritmo circadiano da secreção de ACTH. O próprio cortisol atua sobre os receptores dos glicocorticoides presentes no hipotálamo e na hipófise por meio de mecanismo de feedback, inibindo a liberação de CRH e ACTH. Além disso, em situações de ansiedade, dor excessiva, infecções, traumatismos graves, entre outros traumas, os corticosteroides são secretados pela região cortical das glândulas suprarrenais e atuam reduzindo a expressão da COX₂ e aumentando os níveis de histaminas e interleucinas (ANT et al., 2008).

1.4.1 MECANISMO DE AÇÃO DOS GLICOCORTICOIDES

A atividade anti-inflamatória dessa classe de fármaco ocorre devido a sua capacidade

de controlar a expressão gênica favorecendo a inibição da fosfolipase-A2 e, desse modo, interrompe a cascata do ácido araquidônico. Como consequência, ocorre uma interrupção na propagação da dor e da inflamação. Essa classe de medicamentos apresentam importantes efeitos anti-inflamatórios e imunossupressores no tratamento de numerosos distúrbios inflamatórios, alérgicos e hematológicos (BRUNTON; LAZO; PARKER, 2007).

Os glicocorticoides também possuem efeitos nas respostas imunológicas e inflamatórias. Na frequência das infecções, assim como sua severidade, leva ao uso crônico de glicocorticoides decorrentes da supressão das respostas imunológica e inflamatória. As alterações da resposta inflamatória são devido à inibição da produção de agentes vasoativos, do movimento de leucócitos e da função de células imunocompetentes no local da inflamação (SKINNER, 2005).

1.4.2 EFEITOS COLATERAIS DOS GLICOCORTICOIDES

O uso contínuo dos glicocorticoides frequentemente desencadeia efeitos colaterais severos e muitas vezes irreversíveis, incluindo a atrofia cutânea, hipertricose, alterações no processo de cicatrização, hiperglicemia e Síndrome de Cushing (PAULI et al., 2006).

A Síndrome Cushing é uma reação adversa clássica resultante do uso crônico de glicocorticoides, presente em paciente que apresentam como sintomas: uma redistribuição da gordura corporal, “cara de lua”, crescimento aumentado de pelos, acne, insônia e aumento do apetite (HARVEY; CHAMPE, 1998). Além disso, passa a ter hipertensão, hiperlipidemia e intolerância à glicose, (Síndrome Metabólica). Esta doença, quando não tratada, tem taxa de mortalidade quatro vezes maior por complicações vasculares (PAULI et al., 2006).

Outros efeitos colaterais desencadeados pelos glicocorticoides são osteoporose, úlceras pépticas, hipertensão, diabetes, artrite, insuficiência cardíaca, glaucoma e outros (ANTONOW; MONTEIRO; SANTOS, 2016).

1.5 Família Chrysobalanaceae e o gênero *Licania*

A família Chrysobalanaceae possui 17 gêneros, *Acioa*, *Atuna*, *Bafodeya*, *Chrysobalanus*, *Couepia*, *Dactyladenia*, *Exellodendron*, *Grangeria*, *Hirtella*, *Hunga*, *Kostermanthus*, *Licania*, *Magnistipula*, *Maranthes*, *Neocarya*, *Parinari* e *Trichocarya* e 525 espécies, dentre elas a espécie *licania rigida*, objeto de estudo deste trabalho (FEITOSA; XAVIER; PERRELLI, 2012). As plantas desta família são do tipo lenhoso, arbustivo ou

arbóreo, e podem ser encontradas nas regiões tropicais e subtropicais, principalmente nos trópicos da América Latina e África (YAKANDAWALA; MORTON; PRANCE, 2010).

Elas apresentam, como características botânicas, folhas inteiras, duras, de disposição alterna, dísticas, com estípulas (figura 5). Suas flores são pequenas e, em geral, branco-esverdeadas, cíclicas, zigomorfas, diclamídeas, com receptáculo desenvolvido. As sépalas e pétalas livres, geralmente, pentâmeros; ovário súpero, unilocular, em geral, com um só óvulo e fruto drupáceo. Na região do Cerrado brasileiro e nas matas da Amazônia ocorrem espécies arbóreas do gênero *Licania*, algumas delas conhecidas como oiticicas produtoras de óleo. As espécies do Cerrado apresentam-se com troncos muito retorcidos. As espécies dos gêneros *Licania* e *Moquilea* são popularmente conhecidas como oiti, no Nordeste do Brasil (FEITOSA; XAVIER; PERRELLI, 2012).

Figura 5. Árvore da espécie *Licania rigida*



Fonte: Arquivo pessoal.

As espécies desta família são bastante utilizadas pela população para diversas finalidades, dentre elas, para malária, epilepsia, diarreia, inflamações e diabetes. Esse gênero é conhecido por ter uma maior quantidade de espécies utilizadas para fins terapêuticos e profiláticos (CALIXTO, 2003). Miranda e colaboradores (2002) mostraram em seus estudos

que a espécie *Licania tomentosa*, pertencente a esta família, apresenta também uma atividade inibitória para o vírus herpes-simples.

Mesmo com o relato popular da atividade terapêutica desta planta, ainda não são muitas as confirmações científicas sobre a ação farmacológica das plantas desse gênero. Desse modo, as espécies desse gênero podem ser promissoras para estudos pré-clínicos e confirmatórios de suas ações mais reportadas pela população como o tratamento para diabetes e potentes anti-inflamatórios naturais (FEITOSA; XAVIER; PERRELLI, 2012).

1.6 *Licania rigida* (Oiticica)

A espécie *Licania rigida* (Benth) pertence à família Chrysobalanaceae, conhecida popularmente como “oiticica”, pode ser encontrada nos estados do Piauí, Rio Grande do Norte, Ceará (típica de matas ciliares do Sertão nordestino) e Paraíba.

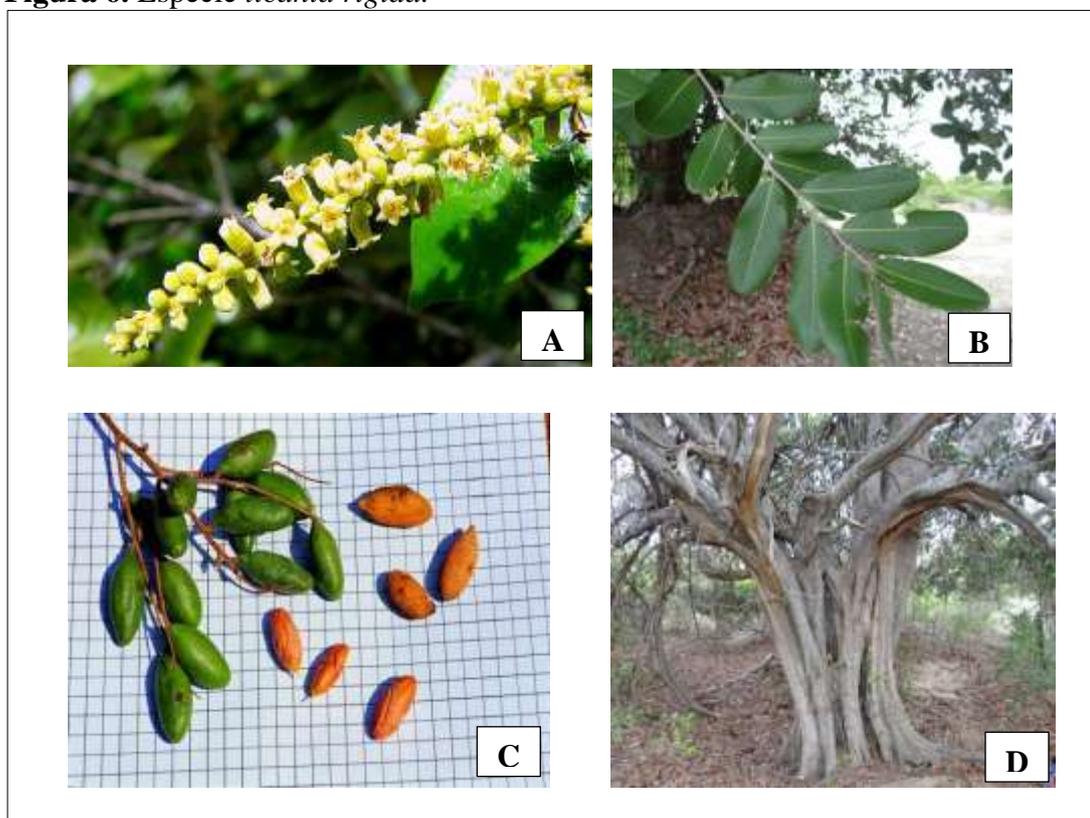
Apresenta-se como uma planta de copa densa e tronco curto, com altura de aproximadamente 15 metros. Possui folhas simples com cor esbranquiçadas na face inferior delas. Tem inflorescência paniculada com frutos drupas de forma oblonga e, às vezes, arredondados, contendo uma única semente. Esta planta é oriunda do Brasil, encontrada a 50 até 500 m de altitude, nos aluviões marginais dos rios e riachos. Sua ramificação aparece pouco acima do chão e a copa pode atingir até 15 ou 20 m de circunferência. Ela armazena nutrientes em seu caule e raízes na forma de água, hidratos de carbono, ácidos orgânicos entre outras substâncias (MAIA, 2004).

Os frutos da oiticica possuem uma forma ovoide, alongada, podendo medir de 4 a 6 cm de comprimento (figura 6). Seu peso é de cerca de 4 a 7 g, em média, com espessura de até 2 cm de diâmetro (DINIZ et al., 2008). Segundo Beltrão e Oliveira (2008), suas amêndoas possuem uma composição mineral com teores de cálcio (Ca), fósforo (P), sódio (Na), potássio (K). A oiticica é perene e, comumente, ela esverdeada e com ótima produção de sementes, de onde se extrai um alto teor de óleo, aproximando-se de 54% de óleo na amêndoa. O óleo extraído desta planta é utilizado como biodiesel e sabão; além disso, a indústria farmacêutica utiliza-o na produção de cosméticos (VIEIRA et al., 2010). A época de colheita dos frutos sucede entre os meses de dezembro a fevereiro (QUEIROGA et al., 2013).

O óleo de oiticica contém, em sua composição, compostos químicos, como ácidos licânico (70 a 80%), linolênicos (10 a 12%), com pequenas quantidades de ácido oleico, palmítico e esteárico. Devido a essas características, ganha destaque no mercado industrial,

com sua capacidade secativa para a fabricação de tintas em automóveis e outras (SILVA et al., 2014).

Figura 6. Espécie *Licania rigida*.



*A- Flores; B-Folhas; C-frutos; D-Árvore.

Disponível em: < <http://livrozilla.com/doc/104699/a-pele-como-org%C3%A3o.-estrutura--fisiologia-e-fun%C3%A7%C3%B5es> . Acesso: 22 fev. 2017.

A oiticica é muito utilizada na medicina popular. Suas folhas são utilizadas no tratamento de diabetes e inflamações (ALVES; NASCIMENTO, 2010). Já as sementes desta espécie, segundo estudos de Farias et al. (2013) apresentam ação antioxidante e antibacteriana para *Staphylococcus aureus*, além de terem uma ação terapêutica contra diarreias e na cicatrizante de ferimentos. A casca seca desta planta desempenha uma ação antidiarreica e antiespasmódica. Essa atividade, possivelmente, deve-se à presença de taninos, flavonoides e saponinas e quinonas em sua composição (GOMES et al., 2006).

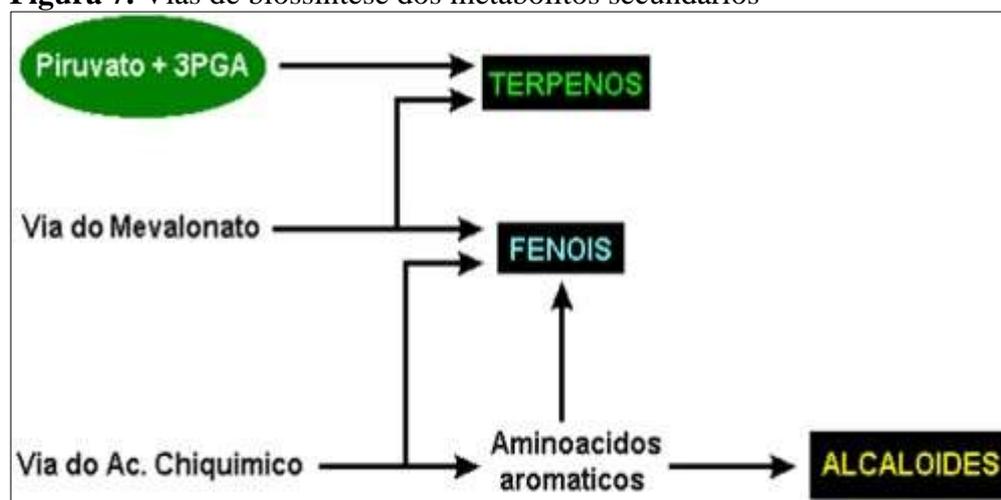
1.7 Metabólitos secundários

São substâncias produzidas pelas plantas em resposta às suas interações com o ambiente e com os demais organismos vivos, podendo atuar como proteção para parte

reprodutiva da planta. Também, atuam como polinizadores e disseminadores de sementes (SILVA, 2013). Existem três grupos de metabólitos secundários que são muito importantes na natureza por ter ação na defesa contra estresses bióticos e abióticos. São eles: compostos fenólicos, terpenos e alcalóides (TAIZ; ZEIGER, 2009).

Apesar destas substâncias terem origem distintas, todas desempenham uma função essencial para as plantas (figura 7). Os compostos fenólicos têm derivação do ácido chiquímico e do ácido mevalônico. Os terpenos são produzidos a partir do ácido mevalônico (no citoplasma) ou do piruvato e 3-fosfoglicerato (no cloroplasto). Já os alcalóides são provenientes de aminoácidos aromáticos (triptofano, tirosina), os quais são derivados do ácido chiquímico e de aminoácidos alifáticos (ornitina, lisina) (PERES, 2004).

Figura 7. Vias de biossíntese dos metabólitos secundários



Fonte: Peres (2005).

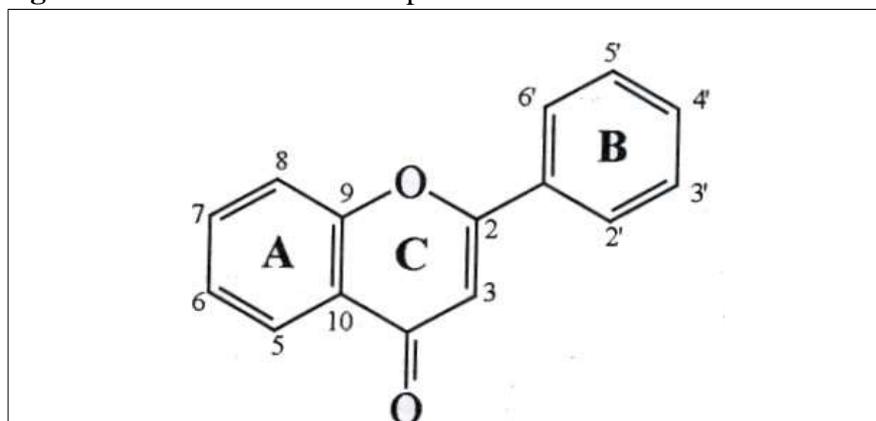
1.7.1 COMPOSTOS FENÓLICOS

Os compostos fenólicos originam-se do metabolismo secundário das plantas, essenciais para seu crescimento e reprodução. Eles têm a capacidade de se originar em meio a estresse, como radiações UV, infecções e ferimentos (NACZK; SHAHIDI, 2004). Estas substâncias são largamente encontradas na natureza e podem estar presente em todo o vegetal ou somente em uma parte localizada da planta (SOARES, 2002). Quimicamente, esses compostos possuem pelo menos um anel aromático, em que um hidrogênio é substituído por um grupamento hidroxila (OH-). A maioria desses compostos encontra-se complexado a carboidratos (mono e polissacarídeos), proteínas e outros componentes vegetais (ROBBINS,

2003), resultando em uma grande diversidade de compostos fenólicos na natureza (BALASUNDRAM; SUNDRAM; SAMMAN, 2006).

Os flavonoides constituem um dos principais grupos dos compostos fenólicos. São metabólitos secundários encontrados abundantemente em frutas e vegetais. Suas funções estão relacionadas à defesa contra vírus, bactérias e fungos, e na atração de polinizadores (SIMÕES et al., 2010). Estes compostos apresentam uma estrutura química formada por C6-C3-C6, que consiste de dois anéis aromáticos (A e B) unidos por um anel heterocíclico oxigenado (C) (Figura 8). As substituições dos anéis A e B é que originam diferentes compostos desta classe (ANGELO; JORGE, 2007).

Figura 8. Unidade estrutural representativa da classe dos flavonoides



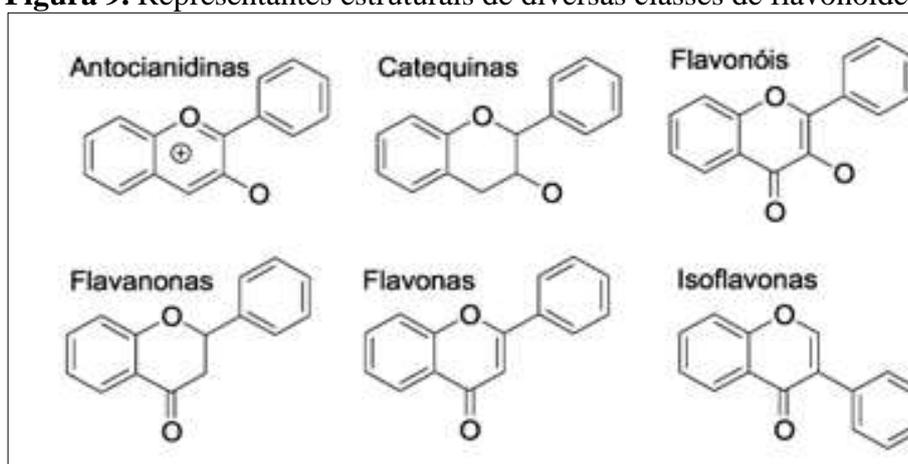
Fonte: Simões et al. (2010).

Os flavonoides apresentam diversidades estruturais e são subdivididas em classes de acordo com o grau de oxidação e substituição do seu anel (PIETA, 2000). São exemplos de flavonoides as antocianidinas, flavonas, flavonois, achados largamente na natureza (figura 9). Em pequenas quantidades, têm-se as auronas, calconas e isoflavonas, representando essa classe. São amplamente distribuídos pelo reino vegetal e desempenham diversas ações biológicas, dentre elas, a capacidade de agir sobre a inflamação e sobre o sistema imunológico (SOARES, 2002).

A atividade anti-inflamatória promovida pelos flavonoides ocorre devido a sua ação moduladora de células envolvidas com o processo inflamatório. Elas atuam inibindo a proliferação de linfócitos T, a produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1), modula a atividade das enzimas da via do ácido araquidônico (fosfolipase A2, ciclo-oxigenase e lipooxigenase, além de modularem a enzima formadora de óxido nítrico (iNOS) (CAZAROLLI et al., 2008).

A quercetina e catequina são tipos de flavonoides que, de acordo com alguns estudos, inibem algumas funções desencadeadas pelos neutrófilos, os quais contribuem para o processo inflamatório. Além disso, apresentam-se como inibidores da agregação plaquetária e são capazes de dispersar trombos plaquetários pré-formados. O efeito antioxidante dos flavonoides pode estar relacionado com sua ação antitrombótica e vasoprotetora por possuírem habilidades de se ligarem à membrana de plaquetas e eliminar radicais livres. Os flavonoides também atuam na liberação de ácido araquidônico dos fosfolípidios presentes nas membranas celulares, por ação da fosfolipase A2. Esta classe de metabólitos secundários está presentes na dieta humana e são consumidos diariamente em fontes específicas, como vinho tinto, chá preto, cerveja, frutas (maçã, uva, morango), vegetais (cebola, couve, vagem, brócolis), grãos, nozes, sementes e especiarias (SILVA et al., 2002).

Figura 9. Representantes estruturais de diversas classes de flavonoides



Fonte: Simões et al. (2010).

OBJETIVOS



2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade anti-inflamatória sistêmica e tópica do extrato hidroalcoólico das folhas de *Licania rigida* Benth (oiticica) em camundongos

2.2 Objetivos específicos

- Preparar o extrato das folhas de *Licania rigida*;
- Quantificar ácidos fenólicos e flavonoides presentes no extrato pela técnica da Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE);
- Identificar os efeitos tóxicos do extrato hidroalcoólico das folhas de *Licania rigida* (EHFLR), assim como sua dose letal média (DL50);
- Estudar o efeito anti-inflamatório sistêmico do EHFLR através dos modelos de edema de pata, peritonite e permeabilidade vascular;
- Identificar seu possível mecanismo de ação através do modelo de edema de pata induzido por histamina e ácido araquidônico;
- Avaliar o efeito anti-inflamatório sistêmico do EHFLR sobre a migração de leucócitos no modelo de peritonite e permeabilidade vascular;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória do EHFLR por via tópica através do modelo de edema de orelha;
- Sugerir os possíveis mecanismos de ação anti-inflamatória do EHFLR por via tópica.

METODOLOGIA



Fonte: Desenhado por NASCIMENTO, J.B. (2016)

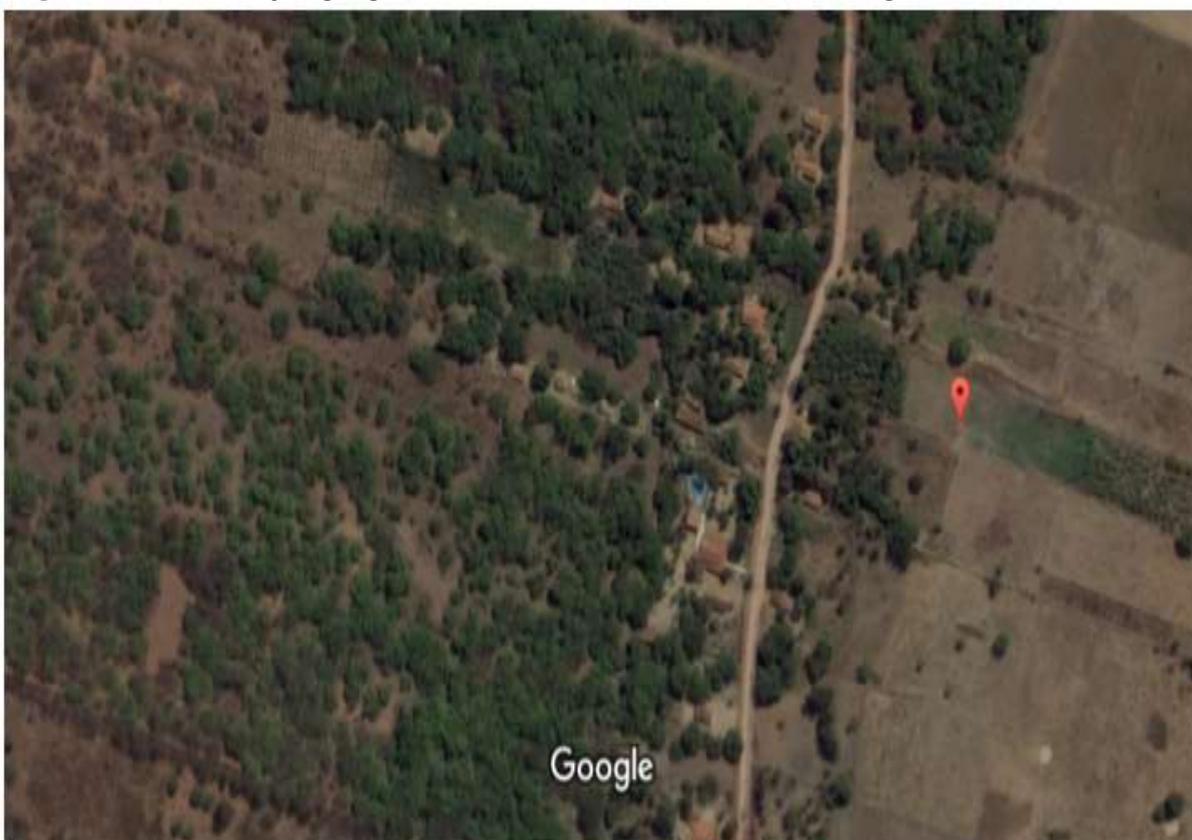
3 METODOLOGIA

3.1 Materiais

3.1.1 COLETAS DO MATERIAL E IDENTIFICAÇÃO BOTÂNICA

O material vegetal (folhas de *Licania rigida*) foi coletado no Sítio Coqueiro, no município de Missão Velha, Ceará, à orientação Sul “07°17’29.8” e a oeste “039°10’42.4” e altitude de aproximadamente 377 metros (figura 10), estando de acordo com a Instrução Normativa n° 154/2009, sob licença n° 54896-1 do Ministério do Meio Ambiente (MMA)/ Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade (ICMbio) (Anexo A).

Figura 10. Localização geográfica do local de coleta do material vegetal



Fonte: *Google Earth*. Acesso em: 26 de fevereiro de 2016.

Uma amostra representativa da espécie (figura 11) contendo o fruto foi encaminhada para identificação junto ao Herbário Caririense Dárdano de Andrade Lima (HCDAL) da Universidade Regional do Cariri – URCA, catalogada sob o registro de n°12.544 (Anexo B).

Figura 11. Exsicata do material vegetal



Fonte: Santos (2014).

3.1.2 DROGAS E REAGENTES

Todas as drogas e reagentes obtidas estão listados na tabela 1, as quais foram submetidas a condições de armazenamento conforme as informações dos fabricantes.

Tabela 1. Drogas e reagentes utilizados na pesquisa

DROGAS E REAGENTES	PROCEDÊNCIA
Acetona	(Dinâmica, Brasil)
Ácido araquidônico	(Dinâmica, Brasil)
Carragenina	(Sigma-Aldrich, USA)
Fenol 10%	(Sigma-Aldrich, USA)
Azul de Evans	(Sigma-Aldrich, USA)
Indometacina	(Merck Sharp & Dohme, Brasil)
Capsaicina	(Dinâmica, Brasil)
Óleo de cróton	(Sigma, USA)

3.1.3 ANIMAIS

Para a realização dos experimentos, foram utilizados nos ensaios camundongos (*Mus musculus*), albinos, cepa Swiss, adultos, machos, com massa corpórea entre 20-30g provenientes do Biotério do Programa de Pós-graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri, mantidos ambientalizados por no mínimo 24 horas em caixas plásticas forradas com serragem. Os animais receberam água e ração *ad libitum* e foram mantidos em ambiente controlado com ciclo de 12 horas claro/escuro, bem como temperatura (22 ± 2 °C) e umidade (70%).

O trabalho foi realizado de acordo com as normas de Bioética reconhecidas pela lei Federal: 11.794/08, que regulamenta o uso de animais para procedimentos científicos, bem como cria as comissões de ética para uso de animais em instituições de pesquisa (GOODWIN; BUNNEY, 1971).

O projeto foi submetido e aprovado pela Comissão de Experimentação e Uso de Animais (CEUA) da Universidade Regional do Cariri – URCA, sob parecer de processo nº 00030/2016.2 (Anexo C).

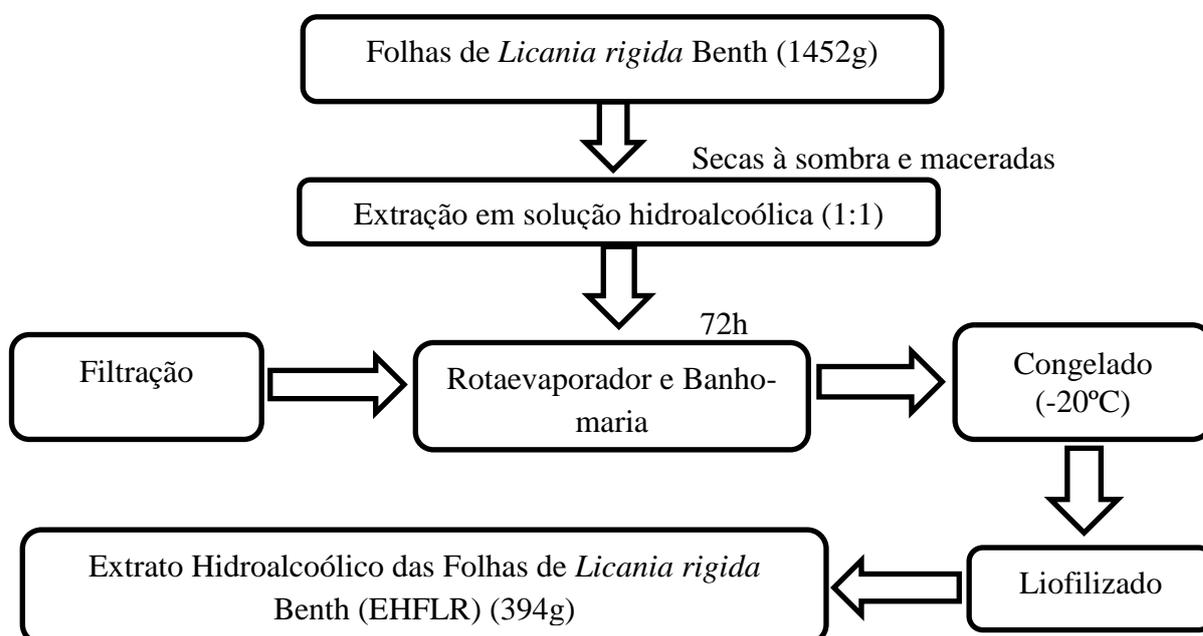
Com o fim dos experimentos, os animais foram eutanasiados e acondicionados em sacos plásticos sob refrigeração – 20°C e posteriormente recolhidos pela Flamax-Ambiental Serviços e Transportes LTDA.

3.2 Métodos

3.2.1 OBTENÇÃO DO EXTRATO VEGETAL

As folhas secas de *Licania rigida* (1452 g) foram previamente trituradas em partes menores com o objetivo de aumentar a superfície de contato com o solvente extrator. Logo após foram submetidas à extração exaustiva em etanol e água (1:1), à temperatura ambiente, por 72 h. Em seguida, a solução extrativa foi filtrada e submetida à destilação em um evaporador rotativo para retirar o etanol. A solução resultante foi congelada e submetida à liofilização para obter o EHFLR (Extrato Hidroalcoólico das Folhas de *Licania rigida*) (fluxograma 1) com rendimento de 27,14%.

Fluxograma 1. Fluxograma da preparação do extrato vegetal.



3.2.2 PROSPECÇÃO QUÍMICA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS DE *Licania Rigida*.

O extrato foi submetido a testes químicos qualitativos de acordo com a metodologia de Matos (1997). Os testes foram baseados na observação visual da mudança colorimétrica e/ou acúmulo de precipitado após a adição de reagentes específicos para cada classe química presente no extrato.

3.2.3 QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS FENÓLICOS E FLAVONOIDES POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA (CLAE-DAD)

A análise cromatográfica foi realizada no Laboratório de Química Analítica, Departamento de Química Industrial da Universidade Federal de Santa Maria.

A CLAE foi realizada em um aparelho *Shimadzu Prominence LC-20AT*, com bombas alternadas ao desgaseificador DGU 20A5, integrador SPD-M20A Detector de Arranjo de Diodo (DAD) e solução de software SP1 LC 1,22.

As análises cromatográficas de fase reversa foram realizadas em condições de gradiente usando coluna C_{18} (4,6 mm x 250 mm) embaladas com partículas de 5 μ m de diâmetro; na fase móvel, utilizou-se água contendo 2% de ácido acético (A) e acetonitrila (B), e o gradiente de composição era: 5% (B) durante 2 min; 25% (B) até 10 min; 40, 50, 60, 70 e 80% (B) a cada 10 min; seguindo o método descrito por Bitencourt et al. (2016) com pequenas modificações. O extrato de *Licania rigida* e a fase móvel foram filtrados em membrana de 0,45 μ m (Millipore), desgaseificados por banho ultrassônico, sendo o extrato analisado em concentração de 15 mg/mL. A taxa de fluxo foi de 0,6 mL/min e o volume de injeção foi de 40 μ L. As soluções padrões foram preparadas na fase móvel de HPLC em intervalo de concentração de 0,030 a 0,500 mg/mL. A quantificação foi realizada pela integração dos picos utilizando o método padrão a 254 nm para ácido gálico, 280 nm para catequina e epicatequina, 326 nm para ácidos clorogênicos e cafeicos e 365 para quercetina, rutina, caempferol. Os picos de cromatográficos foram confirmados comparando com o tempo de retenção dos padrões de referência e os espectros DAD (200 a 600 nm). Todas as análises cromatográficas foram realizadas em temperatura ambiente e em triplicata.

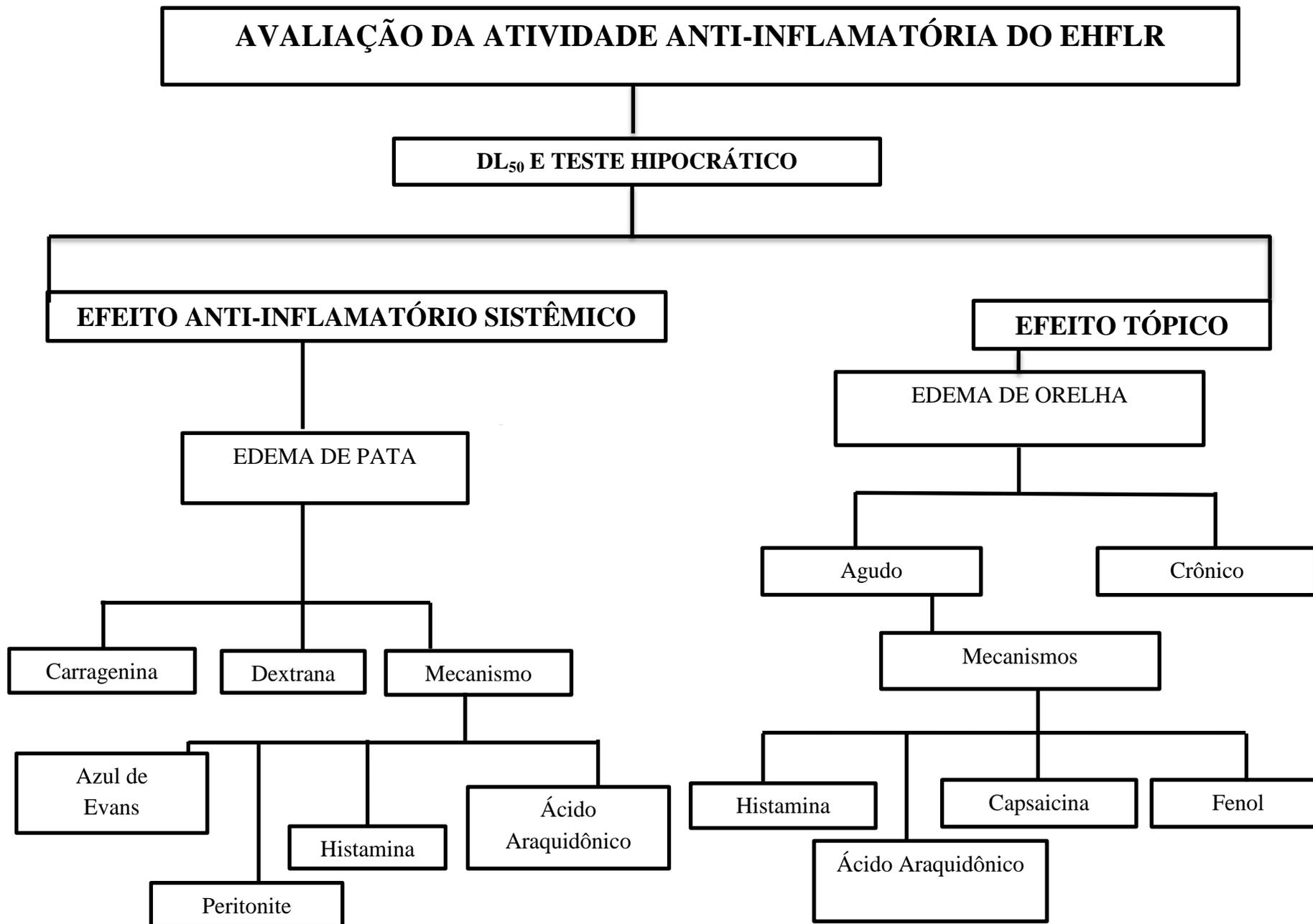
3.2.4 PROTOCOLOS EXPERIMENTAIS

Os Protocolos experimentais foram realizados em um mesmo horário para padronização (9 h às 17 h), no Laboratório de Farmacologia de Produtos Naturais (LFPN) da URCA, em condições controladas de temperatura ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) e em um ambiente silencioso, com baixa incidência de luz (lâmpada vermelha de 15 W), simulando o ambiente natural do animal, com vistas a evitar alterações comportamentais dos animais. Em cada protocolo, eles foram divididos em grupos, 24 h antes da realização dos experimentos. Os animais foram separados por caixas, cada uma contendo seis animais, exceto no teste da DL_{50} (4 animais por grupo). Inicialmente foi investigada a toxicidade e DL_{50} do EHFLR. A DL_{50} serviu como parâmetro na escolha das doses utilizadas neste trabalho, sendo a maior dose correspondente a 10% da DL_{50} . Após, foram executados protocolos referentes à atividade anti-inflamatória sistêmica e tópica do material vegetal (Fluxograma 2). Os animais receberam tratamento com

salina, a droga de referência e EHFLR, todos por (v.o), volume de 0,1 mL/10g de peso corporal do camundongo, depois de passarem de 3 a 4 horas de jejum (MONTANA; AZEVEDO, 2004).

O grupo tratado com salina foi denominado de grupo controle, recebendo solução fisiológica a 0,9%. O grupo controle positivo, foi administrado à droga padrão com eficácia comprovada, administrada por via oral, variando em função do teste, e o EHFLR em doses diferenciadas, de acordo com o teste realizado, todos administrados por via oral.

Estudos sobre a toxicidade com plantas do gênero *Licania* foram feitos utilizando a via oral (PESSOA, 2015) o que, também, influenciou a escolha da via administrada nessa pesquisa. Todas as doses do extrato foram diluídas em água destilada. Após 1 h de cada tratamento, as cobaias foram submetidas aos experimentos descritos a seguir (figura15).



3.2.5 DETERMINAÇÃO DA DL₅₀ e *Screening* HIPOCRÁTICO

A DL₅₀ do extrato hidralcoólico de *Licania rigida* (EHFLR) por via oral seguiu uma adaptação da diretriz OECD 2008 (*Organisation for Economic Cooperation and Development*) para o teste de classe de dose aguda tóxica (*Acute Toxic Class Method* - OECD 425, 2008) e com base nas diretrizes da Portaria 116/96, do Ministério da Saúde, para avaliação da toxicidade aguda de substâncias químicas e estudos de toxicidade de dose única de novas drogas, além de se enquadrar nas exigências da Resolução da Diretoria Colegiada – RDC, nº 17, de 24 de fevereiro 2000, da ANVISA/MS.

Iniciou-se essa avaliação a partir da determinação da DL₅₀, que forneceu subsídio para determinar as doses a serem utilizadas na pesquisa. Concomitante à determinação da DL₅₀, foi feito o *screening* hipocrático de acordo com a tabela de Malone (1977), objetivando identificar o perfil farmacológico do extrato e seus efeitos no sistema nervoso central (SNC). Para isso, foi separado grupos de animais (n=4), os quais foram tratados por via oral (v.o), com salina (solução fisiológica 0,9%-0,1 mL/10g) e EHFLR (1,75, 5,5, 17,5, 55, 175, 550, 2000 e 5000 mg/kg) (Tabela 2). O extrato foi administrado na sequência, da dose maior para a menor. Os animais foram observados em intervalos regulares após a administração de 10, 20, 30 min; depois, passou-se a serem observados em 1, 2, 4 h. A partir de então, diariamente, até o décimo quarto dia. Todos os sinais de toxicidade, a época do aparecimento, intensidade, duração e coloração da urina, diâmetro da pupila, diarreia, ereção da cauda, fasciculações, grunhinhos, aumento ou diminuição da micção, midríase, orelha (cianótica, hiperêmica ou pálida), passividade, reação de fuga, sialorreia, tremor da cauda, lacrimejamento, sudorese e coma, além de morte. Observações comportamentais sistemáticas através do *screening* hipocrático também foram realizadas. A intensidade do evento foi tabulado de 0, + e ++, correspondendo, respectivamente a: efeito ausente, efeito presente, efeito presente intenso. As alterações foram registradas em protocolo impresso com a lista de sinais a serem investigados (Anexo D).

Tabela 2. Grupos experimentais selecionados para avaliação da toxicidade aguda e screening hipocrático da administração oral do extrato hidroalcoólico das folhas de *Licania rigida*.

GRUPOS (N=4)	TRATAMENTO – VIA (Administração aguda- v.o)
I	Salina (solc.fisiol. 0,9%-0,1mL/10g)
II	EHFLR 2000 mg/kg
III	EHFLR 550 mg/kg
IV	EHFLR 175 mg/kg
V	EHFLR 55 mg/kg
VI	EHFLR 17,5 mg/kg
VII	EHFLR 5,5 mg/kg
VIII	EHFLR 1,75 mg/kg

Doses substâncias utilizadas para a análise.

3.2.6 MÉTODOS EXPERIMENTAIS PARA AVALIAÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA SISTÊMICA

3.2.6.1 Edema de pata induzido por carragenina ou dextrana

Inicialmente os animais foram separados em 5 grupos, cada um contendo 6 camundongos, sendo avaliados as medidas basais das patas no hidropetismômetro. Uma hora antes da aplicação dos agentes inflamatórios (0,1 mL de carragenina 1% (p/v), e 0,1 mL de dextrana 0,1% (p/v), os animais foram tratados, por via oral, com EHFLR nas doses de 25, 50, 100 mg/kg, indometacina (10 mg/kg, diluída em água destilada) para edema de pata induzido por carragenina e com prometazina (6 mg/kg) para edema de pata induzida por dextrana, em volume final de 0,1mL/100g de peso do animal. Uma hora após o tratamento, foi administrado uma injeção do agente flogístico (20µL) na região intraplantar da pata direita traseira do animal e igual volume de solução salina na pata esquerda. O volume em mL da pata foi medido imediatamente após intervalos de 1, 2, 3 e 4h da injeção de carragenina e, imediatamente, após a administração de dextrana e solução salina, a cada hora até completar 4h (CARVALHO; LEMÔNICA, 1998).

3.2.6.2 Edema de pata induzido por Ácido Araquidônico

Os animais foram divididos em dois grupos, cada um contendo seis animais. Os camundongos foram pré-tratados por via oral com salina 0,9%, indometacina 10 mg/kg e o EHFLR nas doses de 25 mg/kg, 1h antes da injeção do agente flogístico. Foi administrado uma injeção intra-plantar de 20 µL de AA a 1% na pata direita traseira do animal e veículo na

pata esquerda. O volume da pata foi medido utilizando um pletismómetro, que registrou o volume da pata de cada animal durante 15 min, 30 min, 45 min e 60 min após a aplicação (KUNNAJA; WONGPALEE; PANTHONG, 2014).

3.2.6.3 Peritonite Induzida por Carragenina

Os animais foram divididos em quatro grupos de seis animais. Três grupos foram tratados com dexametasona 5 mg/kg, salina 0,9% e EHFLR na concentração de 25 mg/kg, todos por via oral, e o grupo naive, que não recebeu tratamento nem indução de carragenina.

Uma hora após tratamento, os animais receberam uma injeção intraperitoneal de carragenina. Passados 4h, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e receberam uma injeção de PBS heparinizado (3 mL) no peritônio. Em seguida, foi realizada uma leve massagem no abdome e uma amostra do lavado peritoneal foi analisada no aparelho de ABX Micros 60 (LAPA et al., 2008). O parâmetro avaliado foi à contagem de diferencial de leucócitos.

3.2.6.4 Permeabilidade vascular por extravasamento de Azul de Evans

Os animais foram divididos em grupo de 6 animais, tratados com salina 0,9%, dexametasona 5 mg/kg e EHFPC (25 mg/mL), sendo que um grupo não recebeu nenhum tratamento, o grupo naive. Após 60 min, os animais receberam uma injeção intraperitoneal de carragenina a 1%. Em seguida, foi administrado 200 µL de Azul de Evans pela via intraocular e, após 4 h, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e administrado 3 mL de solução tampão de PBS e o fluido peritoneal coletado para análise. Em seguida as amostras foram centrifugadas por 2 min a 6000 rpm, para posterior leitura do sobrenadante por espectroscopia (LAPA et al., 2008).

3.2.7 MÉTODOS EXPERIMENTAIS PARA AVALIAÇÃO ANTI-INFLAMATÓRIA TÓPICO

3.2.7.1 Edema de orelha induzido pela aplicação única de óleo de cróton

Esse modelo é utilizado para avaliar a atividade de agentes anti-inflamatórios de uso tópico. O TPA (acetato de tetradecanoil-forbol) é um dos componentes responsáveis pela

ação irritante do óleo de cróton que, ao ser aplicado no animal, parece desencadear a ação exercida entre outros mediadores, pelos produtos da ciclooxigenase, histamina e serotonina (LAPA et al., 2008). Grupos de seis animais tiveram suas orelhas direitas tratadas com 20 μ L de salina, dexametasona 4 mg/mL e EHFLR (5, 25, 50, 100, 200, 400 e 500 mg/mL), por via tópica. Após 60 min, para absorção, foi aplicado 20 μ L de óleo de cróton 5% (v/v) em acetona na orelha direita para indução do edema e 20 μ L do veículo acetona na orelha esquerda. O edema foi avaliado 6 horas após a aplicação do óleo de cróton (TUBARO et al., 1985). Para isso, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e as orelhas foram cortadas (fragmentos de 6 mm de diâmetro), para medida do edema (TUBARO et al., 1985).

3.2.7.2 Edema de orelha induzido pela aplicação múltipla de óleo de cróton

O processo inflamatório crônico foi induzido pela aplicação de 20 μ L de óleo de cróton 5% (v/v) em acetona em dias alternados. Foram separados camundongos Swiss (n = 6/grupo), que ficaram sendo observados durante 9 dias. O tratamento foi feito com o EHFLR nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg e a dexametasona (4 mg/mL) por via tópica durante 4 dias (2 vezes ao dia). A partir do 5º (quinto) dia do experimento, o edema foi avaliado diariamente através de medição da espessura da orelha direita por um paquímetro. No 9º (nono) dia do experimento, os animais foram eutanasiados e círculos de 6 mm de tecido das orelhas foram coletados para avaliação do edema (STANLEY et al., 1991).

3.2.7.3 Edema de orelha induzido pela injeção subcutânea de histamina

O modelo de edema de orelha induzido por histamina visa à avaliação do efeito do EHFLR na reação de hipersensibilidade imediata. No teste, foram usados camundongos (n=6/grupo) que foram tratados topicamente com 20 μ L de salina 0,9%, Prometazina (6 mg/mL), e a dose de 25 mg/kg do extrato. Os animais foram anestesiados com cloridrato de quetamina (0,02 mL, i.p.) e cloridrato de xilazina (0,01 mL, i.p.). Após 30 min, foi administrado um volume de 5 μ L de uma solução de histamina (100 mg/mL de salina), via intradérmica, na região ventral da orelha direita dos camundongos com o auxílio de uma agulha hipodérmica, enquanto que a orelha esquerda foi submetida ao mesmo volume de salina, também via intradérmica. Logo após 2h desse procedimento, os animais foram eutanasiados e retirados discos de suas orelhas para análise do edema (BRAND et al., 2002).

3.2.7.4 Edema de orelha induzido por Ácido Araquidônico

Esse modelo avalia o processo inflamatório pela produção de eicosanoides que são mediadores da inflamação (prostaglandinas e leucotrienos). Os AINEs (anti-inflamatórios não-esteroidais) são drogas que demonstram redução significativa no percentual de inflamação induzido neste modelo. No teste, foram utilizados camundongos (n=6/grupo). Os animais tiveram suas orelhas direitas tratadas topicamente com 20 µL de solução salina 0,9%, indometacina (10 mg/mL), e o EHFLR (25 mg/kg). Após 15 min para absorção, foi aplicado 20 µL de ácido araquidônico (0,1 mg/µL) diluído em acetona na orelha direita e 20 µL do veículo acetona na orelha esquerda. Após 1 hora, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical para a retirada de discos de 6 mm de diâmetro das orelhas para avaliação do edema (CRUMMEY et al., 1987).

3.2.7.5 Edema de orelha induzido por Capsaicina

A capsaicina induz a liberação de vários mediadores pró-inflamatórios neurogênicos, como a substância P e taquicinas, quando é aplicada por via tópica, promovendo vasodilatação e vermelhidão, como resposta inflamatória imediata e posteriormente a formação de edema. Nesse teste, foram utilizados camundongos (n=6/grupo) que tiveram suas orelhas direitas tratadas com 20 µL de salina 0,9%, Dexametasona (4 mg/mL), e o extrato na dose de 25 mg/kg. Após 1h para absorção, foram aplicados 20 µL de capsaicina (0,01 mg/µL) diluída em acetona na orelha direita e 20 µL do veículo acetona na orelha esquerda. Após 30 min (pico máximo do edema), os animais foram eutanasiados para a remoção de discos de 6 mm de diâmetro das orelhas para análise do edema (GÁBOR; RAZGA, 1992).

3.2.7.6 Edema de orelha induzido por Fenol

Esse modelo experimental permite desencadear uma inflamação no animal semelhante à dermatite de contato irritativa quando é aplicado topicamente um agente irritante como o fenol. Foram separados camundongos (n=6/grupo), os quais receberam tratamento de suas orelhas direitas topicamente, com 20 µL de solução salina 0,9%, Dexametasona (4 mg/mL), e 25 mg/kg do EHFLR. Após 60 min para a absorção, administrou-se 20 µL de fenol 10% (v/v) na orelha direita do camundongo e 20 µL do veículo acetona na orelha esquerda. Passados 1

hora desse procedimento, os animais foram eutanasiados para a retirada dos discos de 6 mm de diâmetro de suas orelhas para análise do edema (GÁBOR, 2000).

3.2.7.7 Quantificação do edema de orelha e do efeito inibitório médio

A quantificação do edema foi realizado após a obtenção dos discos de 6 mm de diâmetro da orelha de cada animal: um da orelha direita (tratada com agente flogístico) e outro da orelha esquerda (tratada com veículo do agente flogístico). Cada disco obtido teve sua massa mensurada em uma balança analítica. O edema de orelha, expresso em percentual de aumento da massa da orelha, foi calculado utilizando a fórmula: onde $M(od)$ é a massa em gramas do disco obtido da orelha direita e $M(oe)$ é a massa em gramas do disco obtido da orelha esquerda: Percentual do edema (%) = $M(od) - M(oe) / M(oe) \times 100$.

3.3 Análise estatística

Para análise estatística, foi empregado o programa “*Software GraphPad Prism*” versão 5.0, e os dados foram expressos como média \pm erro padrão da média (E.P.M). Para comparação de procedimentos, foi utilizado ANOVA, de uma via ou de duas vias, seguindo-se do teste de Bonferroni para ambos os casos. Foram consideradas diferenças significativas valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO



Fonte: Desenhado por NASCIMENTO, J.B. (2016).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Prospecção química do extrato hidroalcoólico das folhas de *Licania rigida* (EHFLR)

O extrato hidroalcoólico das folhas de *Licania rigida* obteve rendimento de 27,14%. A base para o cálculo foi a relação entre a massa do extrato isento de solvente e o material vegetal seco submetido à extração.

Os testes químicos realizados com o EHFLR permitiram identificar a presença e ausência de algumas classes de metabólitos secundários demonstrados na Tabela 3.

Tabela 3. Prospecção química do extrato hidroalcoólico das folhas de *Licania rigida*

METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	EHFLR
Antocianidinas	Ausente
Antocianinas	Ausente
Auronas	Presente
Catequinas	Presente
Chalconas	Presente
Flavonas	Presente
Flavonóis	Presente
Flavononas	Presente
Leucoantocianidina	Presente
Taninos catéquicos	Presente
Xantonas	Presente
Alcalóides	Ausente

As classes químicas identificadas nessa análise assemelham-se, em parte, com os resultados obtidos por Lonrenze (2002), que ao avaliar o perfil químico da mesma espécie identificaram a presença de ácidos graxos, taninos, terpenos e flavonoides. Braca e colaboradores (2003) também demonstram que estudos químicos das espécies desse gênero apresentam principalmente flavonoides em sua composição, corroborando com o presente estudo que compartilha da presença de diversos tipos de flavonoides.

Outros estudos realizados por Castilho, Oliveira e Kaplan (2005) compartilham em parte dos mesmos achados ao revelar que espécies do gênero *Licania*, apresentam como principais classes de metabólitos secundários, os flavonoides e triterpenos (não identificados do presente trabalho). Esta classe de metabólitos encontra-se amplamente distribuída em todo o reino vegetal, possuindo muitas ações biológicas, dentre elas a ação antitumoral, antiúlcera, antioxidante, antiviral e anti-inflamatória (COUTINHO et al., 2009).

Braca e colaboradores. (2002) realizaram essa análise com diferentes espécies do gênero *Licania* (*L. apetalada*, *L. licaniaeflora*, *L. densiflora*, *L. heteromorpha*, *L. pittieri*, *L.*

pyrifolia e *L. carii*), e mostraram que as mesmas possuíam a presença de alguns derivados dos flavonoides como caempferol, quercetina e miricetina.

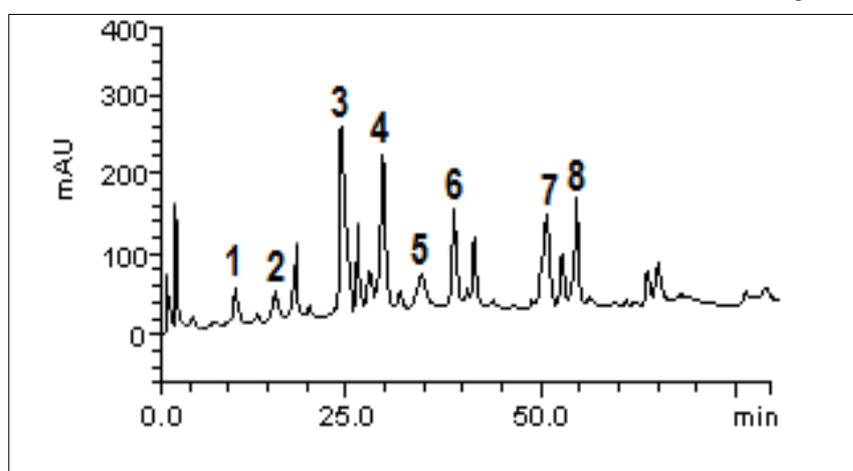
Os metabolitos secundários, embora não sejam necessariamente essenciais para o organismo produtor, garantem vantagens para sua sobrevivência e para a perpetuação da espécie em seu ecossistema (SIMÕES et al., 2010). Sendo que o modo evolutivo dessas substâncias, explica a provável diversidade de atividades biológicas dos vegetais e seus metabólitos (COLETA, 2008).

Segundo Villas-Bôas (2007), a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é uma técnica mais apropriada para investigar esses compostos. Trata-se de uma técnica de separação que possui um alto desempenho para quantificar e detectar a presença desses compostos em um período menor de tempo. O EHFLR foi submetido à análise quantitativa de alguns metabolitos secundários, especificamente à quantidade de flavonoides.

4.2 Quantificação de Ácidos fenólicos e Flavonoides por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE/DAD)

A análise quantitativa do EHFLR foi realizada pelo método do CLAE, apresentando como resultado a presença de ácidos fenólicos (ácido gálico, clorogênico, cafeico) e flavonoides (epicatequina, rutina, quercetina e caempferol e catequina) (figura 12) sendo também quantificados (Tabela 4).

Figura 12. Cromatograma por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE-DAD) do perfil de compostos fenólicos e flavonoides do extrato hidroalcoólico das folhas de *Licania rigida*



*Ácido gálico (pico 1), catequina (pico 2), ácido clorogênico (pico 3), ácido cafeico (pico 4), epicatequina (pico 5), Rutina (pico 6), quercetina (pico 7) e caempferol (pico 8).

Tabela 4. Quantificação dos compostos fenólicos e flavonoides do extrato hidroalcoólico das folhas de *Licania rigida* por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Compostos	Extrato Hidroalcoólico	
	mg/g	%
Ácido gálico	4.29 ± 0.01 ^a	0.42
Catequina	0.18 ± 0.01 ^b	0.01
Ácido Clorogênico	11.65 ± 0.03 ^c	1.16
Ácido cafeico	4.37 ± 0.04 ^a	0.43
Epicatequina	2.03 ± 0.02 ^d	0.20
Rutina	0.86 ± 0.05 ^e	0.08
Quercetina	4.39 ± 0.02 ^a	0.43
Caempferol	8.15 ± 0.01 ^f	0.81

*Os resultados são expressos em média ± desvio padrão de três determinações. Médias seguidas por letras diferem pelo teste de Tukey a $p < 0,001$.

Esses dados corroboram com o trabalho de Bezerra (2011) que realizou essa técnica para identificar os compostos das folhas da mesma espécie e obteve como resultado a presença de flavonoides, entre eles campferol, epicatequina e quercetina.

Outro estudo realizado por Bezerra (2011) utilizando a técnica CLAE na quantificação de metabólitos secundários das raízes, caules, folhas e flores da mesma espécie, onde foram identificadas e isoladas substâncias inéditas das folhas de *Licania rigida* como os seguintes flavonoides: afzelina, miricetina-3-raminosídeo e miricetina-3-glicosídeo.

Os flavonoides possuem diversas atividades biológicas atribuídas a essa classe de polifenóis. A importância farmacológica dos flavonoides tem relação, entre outras funções, na atividade anti-inflamatória (YOON; BAEK, 2005).

4.3 Determinação da DL₅₀ e Screening Hipocrático

De acordo com os resultados apresentados na técnica de CLAE o EHFLR apresenta substâncias com importantes efeitos anti-inflamatórios, no entanto, como não há na literatura relatos específicos acerca da toxicidade do extrato hidroalcoólico das folhas de *Licania rigida* e sua ação sobre o SNC, se fez necessário, antes de iniciar os ensaios experimentais, avaliar sua toxicidade aguda pela determinação da dose letal 50% (DL₅₀) concomitantemente ao

screening hipocrático. Com base nessa dose determinar as doses seguras a serem usadas na pesquisa.

O teste de toxicidade aguda e a dose letal mediana (DL_{50}) é um dos primeiros testes realizados a fim de se obter a dose tóxica de qualquer substância vegetal. Concomitante ao teste de toxicidade aguda foi realizado o *screening* hipocrático, onde os animais tratados com o EHFLR, por via oral (v.o), nas doses de 1,75, 5,5, 17,5, 55, 175, 550, 2000 e 5000 mg/kg, não apresentaram nenhum efeito depressor do Sistema Nervoso Central (SNC). No entanto, todas as doses analisadas, mostraram que o extrato apresenta possível efeito estimulador do SNC. A dose de 1,75 mg/kg não apresentou diferença em relação ao grupo controle (salina), entre os intervalos variados. De acordo com a tabela de Malone, aparentemente, o EHFLR apresentou partir da dose de 17,5 mg/mL, características indicativas para estimulação do SNC (Tabela 5), por apresentar sinais como o aumento da frequência respiratória, reação de fuga e aumento da motilidade (BRASIL, 2004).

Apesar de o extrato apresentar alguns que caracterizam uma toxicidade, o mesmo não desencadeou mortes em nenhum grupo observado. A partir desse resultado percebeu-se que o extrato possui uma $DL_{50} \geq 5.000$ mg/kg quando administrado por via oral em camundongos. Estudos realizados por Pessoa (2015) mostra que as sementes desta espécie apresenta uma toxicidade aguda quando observado em extrato etanólico de *Licania rigida* (EHFLR). O presente estudo também não apresentou mortes em camundongos, quando avaliada em uma dose ainda maior, obtendo uma $DL_{50} \geq 5.000$ mg/kg.

De acordo com Silva (2015) o extrato das folhas de *Licania rigida* e *Licania tomentosa* não induzem alterações bioquímicas e nem toxicidade oral, no teste da DL_{50} . Esse estudo não revelou nenhuma morte durante os 14 dias de observação, em que foi observado até a dose de 2000 mg/kg e obteve uma $DL_{50} \geq 2000$ mg/kg. Tal fato corrobora como o presente trabalho que avaliou a dose letal do EHFLR e obteve resultados semelhantes ao não evidenciar mortes durante o mesmo período de acompanhamento. O presente estudo verificou até a dose de 5000mg/kg no intuito de analisar uma margem maior de segurança da droga, de acordo com as normas éticas. Concomitantemente ao teste da DL_{50} foi realizado o *screening* hipocrático através da tabela adaptada de Malone. Este teste fornece uma estimativa quantitativa de toxicidade aguda da substância, possibilitando avaliar algumas manifestações clínicas e toxicológicas que o extrato possa apresentar. Trata-se de um suporte para iniciar experimentos pré-clínicos dispondo do conhecimento da segurança de uma droga (BRASIL, 2004). Os resultados dos efeitos tóxicos do EHFLR são descritos na tabela 6.

Tabela 5. Principais alterações comportamentais registradas em camundongos decorrentes da administração do extrato hidroalcoólico das folhas de *Licania rigida* (EHFLR) via oral

GRUPOS	TEMPO (min) / EFEITOS OBSERVADOS EM CAMUNDONGOS						
	10	20	30	60	120	180	240
SALINA	-	-	-	-	-	-	-
EHFLR 1,75	-	-	-	-	-	-	-
EHFLR 5,5	-	-	-	-	-	-	-
EHFLR 17,5	(+) AM	(++) AM	(+) AM	(+) AM	-	-	-
EHFLR 55	(+) AM	(+) AM	(+) AFR	-	-	-	-
EHFLR 175	(+) AM	(++) AM	-	-	-	-	-
EHFLR 550	(++) AM	(++) AM	(+) AM	-	-	-	-
EHFLR 2000	(++) AM	(+) AM	(+) AFR	-	-	-	-
EHFLR 5000	(++) AM	(+) AM	(++) AM	(+) AFR	(+)AFR	(+)AM	(++)AM

*Ausência de Alterações Comportamentais (-); Presença de alterações comportamentais (+); Alterações comportamentais intensificadas (++); Aumento da Motilidade (AM); Aumento da Frequência Respiratória (AFR); Extrato Hidroalcoólico das Folhas de *Licania rigida* (EHFLR).

O fato de que o extrato apresenta alguns efeitos tóxicos, mas esses não proporcionam mortes em animais, pode ser explicado pela via de administração, uma vez que a mesma foi realizada por via oral. Quando uma droga é administrada por via oral sofre metabolização hepática de primeira passagem proporcionando uma baixa toxicidade sistêmica (PEREIRA, 2007; GOODMAN; GILMAN, 2012).

Com o *screening* hipocrático foi possível perceber que o extrato não apresenta sinais de depressão do Sistema Nervoso Central (SNC), mas apenas sinais excitatórios.

O presente estudo apoia e corrobora com os de Stopper e colaboradores (2005), que descrevem a importância de estudar a toxicidade dos vegetais, uma vez que os mesmos podem evidenciar efeitos tóxicos que em sua maioria são negligenciados pela sociedade. Ao avaliar a toxicidade do EHFLR, comprovou-se que o preparo vegetal não está isento de toxicidades ao ser testado em animais, no entanto, por não evidenciar efeitos bruscos de toxicidade, nem mortes nos animais, este foi utilizado em doses menores que 10% da DL_{50} . Essas doses corresponderam a 25, 50, 100, 200 e 500 mg/kg. As doses menores correspondentes a 1, 5, 10 mg/kg, não apresentaram atividade significativa em testes pilotos, por isso não foram expressos no presente trabalho.

4.4 Atividade anti-inflamatória sistêmica

4.4.1 EDEMA DE PATA INDUZIDA POR CARRAGENINA

A injeção intraplantar de carragenina a 1% na pata traseira direita dos animais 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 drogas (GILLIGAN et al., 1994). O edema inflamatório induzido pela carragenina é resultante da ação sequencial e integra vários mediadores inflamatórios. Para medir o volume das patas, cada uma delas é imersa até o maléolo lateral em um hidropletismômetro digital modelo descrito por Winter et al. (1962).

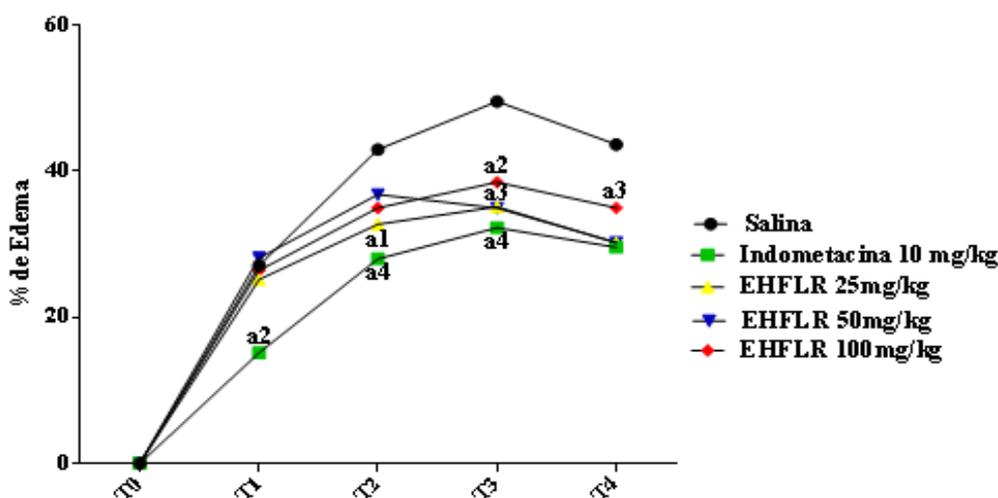
A atividade anti-inflamatória do EHFLR foi analisada através da redução do edema da pata induzido por carragenina, comparando-os ao grupo controle. O teste foi observado nas seguintes horas: 1^a, 2^a, 3^a e 4^a hora. Após a administração da carragenina 1% na pata direita traseira do animal ocorre um processo inflamatório agudo resultante da liberação de mediadores pró-inflamatório. Após a administração de carragenina há extravasamento de proteínas plasmáticas e recrutamento de neutrófilos para o local inflamado. De início é observado a liberação de aminas vasoativas caracterizando a fase inicial da inflamação e posteriormente na fase tardia são liberadas citocinas e prostaglandinas, em especial PGE2 no processo inflamatório. Esse processo é intensificado durante a 3^o hora do teste, caracterizado como o pico máximo de inflamação (GILLIGAN et al., 1994).

Após esse tempo, a inflamação vai reduzindo sua resposta e conseqüentemente o edema, o que justifica a escolha em enfatizar os valores estatísticos do presente trabalho ao pico da 3^o hora. A porcentagem e o volume do edema referente à 1^a, 2^a e 4^a do teste de edema de pata induzido por carragenina, dextrana, histamina e ácido araquidônico de cada dose estão ilustrados no (APÊNDICE A, B, C, D) respectivamente.

A administração do EHFLR foi realizada nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg por via oral (v.o). Os resultados mostram que o extrato foi capaz de reduzir o edema induzido pela carragenina 1% na terceira hora do teste, em todas as doses analisadas, mostrando significância estatística com um percentual de 29,09%; ($35,1 \pm 2,1$), 29,4%; ($34,9 \pm 3,6$) e 22,26%; ($38,5 \pm 0,9$) respectivamente, em relação ao grupo controle (Figura 13).

A indometacina é um fármaco da classe dos anti-inflamatórios não-esteróides, que inibem a cicloxigenase, reduzindo a biossíntese de prostaglandina (FARSAM et al., 2000). Como esperado, a indometacina foi eficaz em reduzir o edema significativamente em todos os tempos analisados, enfatizando o percentual de inibição apresentado na terceira hora (34,89%; $32,2 \pm 1,9$).

Figura 13. Efeito anti-inflamatório do Extrato Hidroalcoólico das Folhas de *Licania rigida* (EHFLR) no teste de edema de pata induzido por carragenina (Apêndice E-Coluna Estatística; *E1 Analyse*).



As colunas representam a média \pm erro padrão da média (EPM), analisados através da ANOVA de duas vias, seguido por Bonferroni. Utilizando camundongos machos swiss adulto ($n = 6$). Valores significativos de $a_1 = p < 0,05$; $a_2 = p < 0,01$; $a_3 = p < 0,0001$; $a_4 = p < 0,0001$ vs salina. Indometacina (10 mg/kg) e o EHFLR (25, 50 e 100 mg/kg). Todos administrados por via oral (v.o) 60 min antes da injeção subplantar de carragenina.

Estudos clássicos de Mendez et al. (1995) mostram que as folhas de outra espécie do mesmo gênero *Licania pyrifolia* apresentou efeito anti-inflamatório e hipoglicemiante tendo em sua composição química a presença de caempferol e quercetina. Este resultado vai de encontro aos achados químicos da *Licania rigida* avaliada no presente estudo que também compartilha de substâncias químicas semelhantes. De forma semelhante, Santos e colaboradores (2006) mostram que o ácido clorogênico pertencente às espécies dessa família desempenhou inibição do edema de pata desencadeado pela carragenina em ratos. Esse efeito corrobora com o presente trabalho que realizou o mesmo teste em camundongos e demonstrou o mesmo efeito sobre a redução do edema possivelmente por altos níveis desse composto em sua composição química.

Estudos de Krakauer (2002) revelam que o ácido clorogênico atua inibindo a secreção de citocinas e derivados do ácido araquidônico, além da expressão do óxido nítrico (NO) que é um importante vasodilatador. Além disso, atua sobre a expressão de moléculas de adesão, importantes para o processo de transmigração dos polimorfos nucleares. Esses estudos condizem com os resultados do presente trabalho que mostram uma ação efetiva do EHFLR na redução do edema, uma vez que o mesmo possui esses dois constituintes majoritários em sua composição química. Desse modo, o extrato possivelmente pode estar agindo de forma semelhante na inibição de citocinas e derivados do AA.

4.4.2 EDEMA DE PATA INDUZIDA POR DEXTRANA

A dextrana, é um polissacarídeo utilizado em testes de inflamação por promover a liberação de histamina e serotonina dos mastócitos durante a formação do edema. Essas substâncias alteram o tônus e a permeabilidade vascular do vaso, contribuindo para o extravasamento de fluidos (ANDRADE et al., 2007).

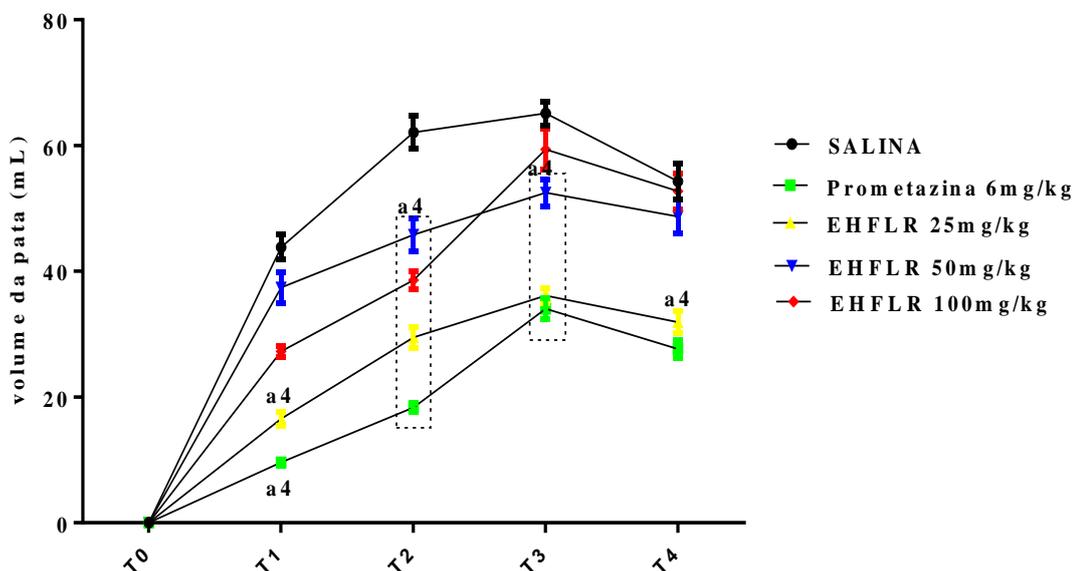
Os resultados mostram que o EHFLR reduziu o edema induzido por dextrana de forma significativa na dose de 25mg/kg (Figura 14) em todos os tempo analisados, apresentando um percentual de inibição do edema na terceira hora de 44,51%; ($36,1 \pm 1,1$). A dose de 25 mg/kg apresentou-se estatisticamente significativa a partir da terceira hora, com um percentual de inibição 19,3%; ($52,5 \pm 2,1$) e a dose de 100 mg/kg não apresentou uma inibição significativa do edema ($59,4 \pm 3,2$).

A prometazina 6 mg/kg, utilizada como droga padrão foi capaz de inibir o edema a partir da primeira hora de avaliação até a quarta hora apresentando um percentual de redução do edema na terceira hora de 47,7%; ($34,1 \pm 1,5$), quando comparado com o grupo que recebeu apenas solução salina ($65,1 \pm 1,9$).

Semelhantemente ao edema de pata induzido por carragenina, a indução do edema com dextrana provoca aumento na permeabilidade vascular, porém, quando o agente flogístico é a dextrana, esse aumento ocorre devido à desgranulação dos mastócitos e liberação das aminas vasoativas. Além disso, a dextrana promove um rápido extravasamento de fluido com poucas proteínas e células, diferentemente da indução do edema por carragenina (BADILLA et al., 2007). Segundo a Sociedade Brasileira de Plantas Mediciniais (2003), a resposta edematogênica quando induzido com dextrana, é mais curta.

O extrato possui em sua composição várias substâncias químicas que podem agir por vários mecanismos e atingir uma resposta farmacológica. Os resultados demonstram que o EHFLR apresenta uma possível ação antiedematogênica a partir da primeira hora de avaliação, apresenta-se com um potencial anti-inflamatório nos dois modelos de inflamação. Desse modo, os testes posteriores para avaliar o mecanismo de ação do extrato foi analisada com a dose mínima e mais efetiva de 25 mg/kg.

Figura 14. Efeito anti-inflamatório do Extrato Hidroalcoólico das Folhas de *Licania rigida* (EHFLR) no teste de edema de pata com dextrana (Apêndice F-Coluna Estatística; F1 Analyse).



As colunas representam a média \pm erro padrão da média (EPM), analisados através da ANOVA de duas vias seguido por Bonferroni. Utilizando camundongos machos swiss adulto ($n = 6$). Valores significativos de $a_1 = p < 0,05$; $a_2 = p < 0,01$; $a_3 = p < 0,001$; $a_4 = p < 0,0001$ vs salina. Indometacina (10 mg/kg) e o EHFLR (25, 50 e 100 mg/kg). Todos administrados por via oral (v.o) 60 min antes da injeção subplantar de dextrana.

Segundo Gaiind e Gupta (1972) o extrato bruto aquoso liofilizado das folhas de *Bryophillum calycinum* possuem em sua composição química a presença de flavonóides que desempenham atividade anti-inflamatória sobre o modelo de edema de pata induzido por dextrana em ratos na dose de 0,5 g/kg. No presente estudo o EHFLR apesar de pertencer à família e espécie diferente, apresenta diversos flavonoides como componentes majoritários semelhantemente a espécie citada e pode justificar o efeito apresentados em nossos resultados no momento do pico da inflamação desencadeado pela dextrana. Mostrando que o extrato pode estar atuando na redução da expressão de citocinas e liberação de histamina e serotonina, assim como a droga padrão prometazina.

A prometazina pertence à classe dos anti-histamínicos que promovem um efeito anti-inflamatório, possivelmente por diminuir a expressão de aminas vasoativas e desse modo contribuindo para a diminuição do edema (CHEN et al., 2003; SIMONS, 2002).

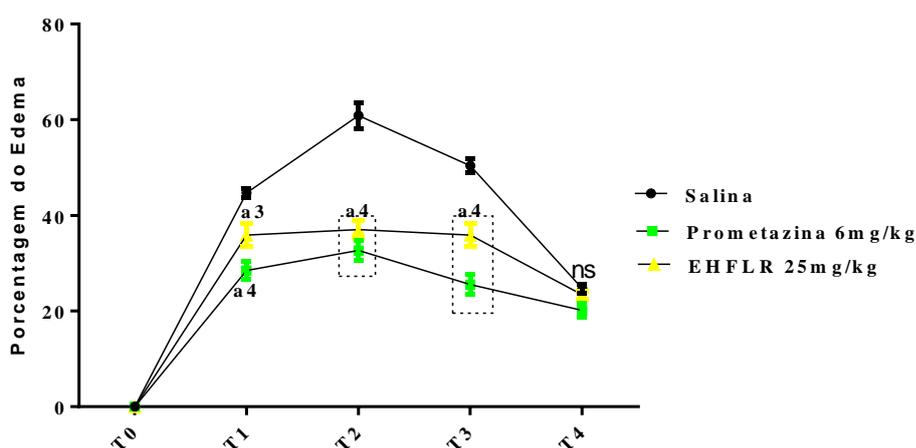
4.4.3 EDEMA DE PATA INDUZIDA POR HISTAMINA

As aminas vasoativas estão disponíveis em reservas pré-formadas para serem liberadas no momento do processo inflamatório. A histamina é considerada o principal mediador na fase inicial após a lesão, aumentando a permeabilidade vascular e atuando sobre a microcirculação (RANG et al., 2007). A serotonina, outra substância envolvida nesse processo, induz o edema e extravasamento do plasma durante uma inflamação aguda, sendo liberada principalmente pelos mastócitos e plaquetas (TING et al., 2007).

A dose de 25mg/kg do EHFLR reduziu o edema na pata no animal de forma significativa em todos os tempos analisados, tendo um maior percentual de inibição na terceira hora $46,64\%$; $(35,8 \pm 2,4)$. Corroborando com os resultados no modelo de edema de pata induzido por dextrana.

A prometazina 6 mg/kg, reduziu o edema de forma significativa como já se esperava (droga anti-histamínica) em todas as horas analisadas, com um percentual de inibição do edema de $49,26\%$; $(25,5 \pm 2,1)$, quando comparado com o grupo controle (Figura 15).

Figura 15. Efeito anti-inflamatório do Extrato Hidroalcoólico das Folhas de *Licania rigida* (EHFLR) no teste de edema de pata com Histamina (Apêndice G-Coluna Estatística; G1 Analyse).



As colunas representam a média \pm erro padrão da média (EPM), analisados através da ANOVA de duas vias seguido por Bonferroni. Utilizando camundongos machos swiss adulto ($n = 6$). Valores significativos de $a_1 = p < 0,05$; $a_2 = p < 0,01$; $a_3 = p < 0,001$; $a_4 = p < 0,0001$ vs salina. Prometazina (6 mg/kg) e o EHFLR (25 mg/kg). Todos administrados por via oral (v.o) 60 min antes da injeção subplantar de Histamina.

A espécie *Aniba riparia* (Ness) possui flavonoides em sua composição química e foi testado o efeito anti-inflamatório de seu componente majoritário em modelo de edema de pata

induzido por histamina, resultando em um efeito antiedematogênico dessa espécie ao mostrar redução do edema na pata do animal (CARVALHO, 2011). Esse fato corrobora em partes com o presente trabalho que apesar de utilizar espécie de família distinta, por existir flavonoides na composição de ambas, estas desempenham a função anti-inflamatória em modelos experimentais semelhantes.

4.4.4 EDEMA DE PATA INDUZIDA POR ÁCIDO ARAQUIDÔNICO (AA)

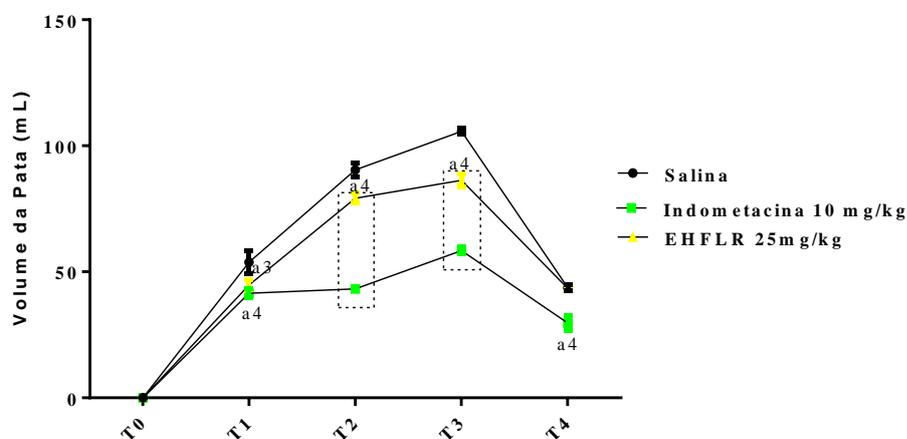
O ácido araquidônico (AA) é um ácido graxo que desempenha uma importante função na fisiologia celular. Ele é liberado quando há lesão a partir de fosfolípidos de membrana através da enzima fosfolipase A2, que pode ser ativada por diversos estímulos químicos, inflamatórios ou traumáticos, além de ativarem citocinas pró-inflamatórias (HILÁRIO; TERRERI; LEN, 2006).

Em resposta a algum estímulo, a fosfolipase hidrolisa os fosfolípidos de membrana, liberando ácido araquidônico. O ácido araquidônico dará origem a mediadores inflamatórios pela via das cicloxigenases (COX), produzindo prostaglandinas (PGs), prostaciclina (PI) e tromboxanos (TXs), e pela via das lipoxigenases (LOX), levando a formação de leucotrienos (LTs). O conjunto dessas células é denominado prostanóides e possuem um papel fundamental no processo inflamatório (CASTRO, 2011).

Após 60 min da aplicação do AA a 1% na pata dos camundongos, foi realizada uma análise para identificar o possível efeito antiedematogênico do extrato. Os resultados mostram que o EHFLR apresentou uma redução significativa do edema na dose analisada (25mg/kg) em todos os tempos, com exceção do último. Apresentando um percentual de inibição mais significativo após 60min de análise 18,33%; ($86,3 \pm 2,6$).

A Indometacina 10 mg/kg, utilizada como droga padrão inibiu o edema a partir dos primeiros min de avaliação, tendo um percentual de redução do edema em 60min de 44,71%; ($58,4 \pm 1,3$) em comparação ao grupo salina (Figura 16).

Figura 16. Efeito anti-inflamatório do Extrato Hidroalcoólico das Folhas de *Licania rigida* (EHFLR) no teste de edema de pata com ácido araquidônico (Apêndice H-Coluna Estatística; H1 Analyse).



As colunas representam a média \pm erro padrão da média (EPM), analisados através da ANOVA de duas vias seguido por Bonferroni. Utilizando camundongos machos swiss adulto ($n = 6$)./ Valores significativos de $a_1 = p < 0,05$; $a_2 = p < 0,01$; $a_3 = p < 0,001$; $a_4 = p < 0,0001$ vs salina. Indometacina (10 mg/kg) e o EHFLR (25 mg/kg). Todos administrados por via oral (v.o) 60 min antes da injeção subplantar de Ácido araquidônico.

Os anti-inflamatórios não-esteroidais, como a indometacina, inibem a Ciclooxigenase, reduzindo a biossíntese de prostaglandinas, diminuindo o processo inflamatório (MURI; SPOSITO; METSAVAHT, 2009). No presente estudo, o extrato testado apresentou ação semelhante àquela da indometacina, utilizada como droga padrão, em duas e três horas após a administração da carragenina. Os resultados deste modelo corroboram com os resultados do edema de pata induzido por carragenina que inibiu o edema na terceira hora da inflamação com uma melhor eficácia na dose de 25 mg/kg.

4.4.5 PERITONITE

Em continuidade ao estudo da atividade anti-inflamatória do EHFLR foi realizado o teste de peritonite induzido por carragenina, objetivando verificar se a atividade anti-edematogênica do extrato era concernente a inibição do recrutamento leucocitário.

A peritonite é um modelo de inflamação que permite avaliar a migração de leucócitos para a cavidade peritoneal durante um processo inflamatório (BOZZA et al., 1994). Os neutrófilos denominados de polimorfonucleares (PMN), bem como os macrófagos são as principais células fagocíticas do sistema imune. Durante o processo inflamatório os

neutrófilos são recrutados para o foco inflamatório desempenhando uma função de defesa para o organismo (MARZOCCHI-MACHADO; LUCISANO-VALIM, 1997).

A inflamação foi induzida neste ensaio pela administração intraperitoneal de carragenina no peritônio do camundongo. Após quatro horas da administração de carragenina foram feitas as análises do lavado peritoneal. Este modelo avalia uma inflamação aguda, permitindo a quantificação de leucócitos que migram para a cavidade peritoneal. Essa migração ocorre sob ação de agentes quimiotáticos, principalmente leucotrienos e interleucinas (BROOKS; DAY, 1991).

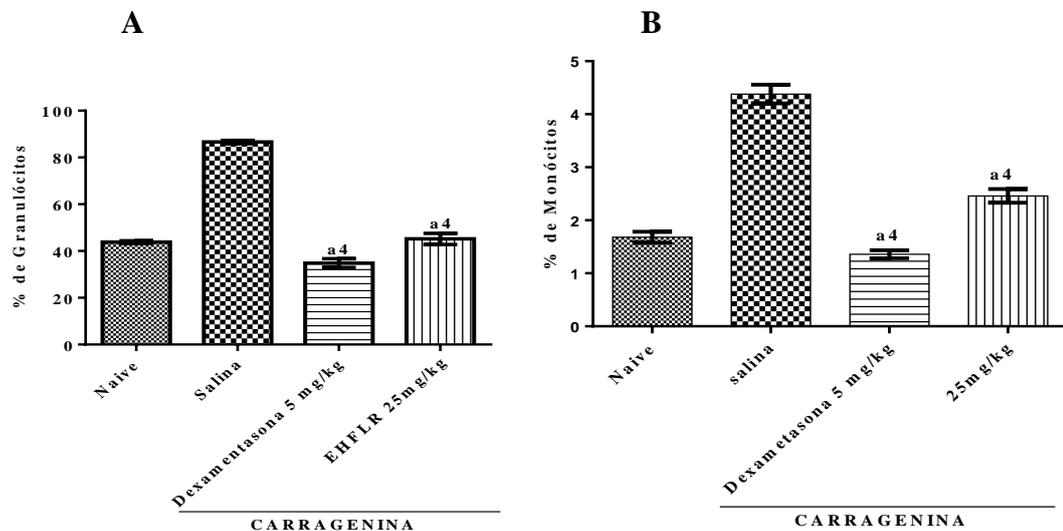
O processo de migração e passagem dos leucócitos para o local inflamado é dependente da expressão de moléculas de adesão (E, P, e L-selectinas). Essas moléculas regulam a adesão leucocitária que medeiam mediada por imunoglobulinas e β -2-integrinas. Esse evento é determinado pela ação de mediadores quimiotáticos como fragmentos peptídicos do sistema complemento (C3a, C4a e C5a), histamina, leucotrienos, prostaglandinas, tromboxano e o PAF (WAGNER; ROTH, 2000).

4.4.5.1 Granulócitos e Monócitos

O extrato reduziu a migração dos polimorfos nucleares de forma significativa. A redução do recrutamento de granulócitos para o local inflamado obteve um percentual de redução de 47,8% ($45,20 \pm 2,37$) em relação ao grupo controle ($86,60 \pm 0,70$) (Tabela 6). Da mesma forma, o extrato promoveu a redução da migração dos monócitos (Tabela 7), obtendo um percentual de redução na migração dessas células de 43,83% ($2,46 \pm 0,12$) em relação ao grupo controle ($4,38 \pm 0,17$), (Figura 17).

A dexametasona 5mg/kg apresentou significância estatística na redução da migração das duas células, Neutrófilos e Monócitos com um percentual de redução de 59,29% ($34,82 \pm 1,87$) e 68,94% ($1,36 \pm 0,07$), respectivamente. A dexametasona pertence a classe dos glicocorticoides que atuam inibindo a fosfolipase A₂ e desse modo interferindo na expressão das enzimas inflamatórias. Ela foi escolhida como droga padrão para este modelo por interferir o recrutamento de neutrófilos, diferentemente dos AINES que não afetam a mobilização dos mesmos (RANG et al., 2007).

Figura 17. Efeito do Extrato Hidroalcoólico das Folhas de *Licania rigida* (EHFLR) sobre a migração de Granulócitos e Monócitos no teste de peritonite induzida por carragenina (Apêndice I e J - Coluna Estatística; I1 e J1 Analyse).



As colunas representam a média \pm erro padrão da média (EPM), analisados através da ANOVA de uma via seguido por Bonferroni. Utilizando camundongos machos swiss adulto ($n = 6$). Valores significativos de $a_1 = p < 0,05$; $a_2 = p < 0,01$; $a_3 = p < 0,001$; $a_4 = p < 0,0001$ vs salina. Dexamentasona (5 mg/kg) e o EHFLR (25 mg/kg). Todos administrados por via oral (v.o) 60 min antes da injeção subplantar de carragenina. (A) Percentual de Granulócitos e (B) percentual de Monócitos.

Tabela 6. Resultado em porcentagem do efeito anti-inflamatório do Extrato Hidroalcoólico das Folhas de *Licania rigida* (EHFLR), no teste de Peritonite.

Tratamento		Granulócitos	
		média \pm E.P.M/ Inibição (%)	
Salina	(Grupo controle)	86,60 \pm 0,70	-
Naive	(Branco)	43,80 \pm 0,58	-
EHFLR	25 mg/kg	45,20 \pm 2,37	47,8%
Dexametasona	5 mg/kg	34,82 \pm 1,87	59,79%

*Os valores são médias \pm EPM de 6 animais por grupo. Análises estatísticas obtidas pela análise de Variância (ANOVA). Extrato Hidroalcoólico das Folhas de *Licania rigida* (EHFLR)

Tabela 7. Resultado em porcentagem do efeito anti-inflamatório do Extrato Hidroalcoólico das Folhas de *Licania rigida* (EHFLR), no teste de Peritonite.

Tratamento		Monócitos	
		média \pm E.P.M/ Inibição (%)	
Salina	(Grupo controle)	4,38 \pm 0,17	-
Naive	(Branco)	1,68 \pm 0,10	-
EHFLR	25 mg/kg	2,46 \pm 0,12	43,83%
Dexametasona	5 mg/kg	1,36 \pm 0,07	68,94%

*Os valores são médias \pm EPM de 6 animais por grupo. Análises estatísticas obtidas pela análise de Variância (ANOVA). Extrato Hidroalcoólico das Folhas de *Licania rigida* (EHFLR).

A inflamação induzida por carragenina envolve a migração celular e a exsudação plasmática. Esse processo é mediado pela produção de mediadores inflamatórios tais como histamina, serotonina, bradicinina, óxido nítrico, interleucina (IL) -1 β e IL-6, factor de necrose tumoral (TNF) e prostaglandinas. A ação desses mediadores leva ao processo de recrutamento leucocitário, onde as principais células recrutadas durante uma inflamação aguda são os neutrófilos e monócitos (SALVEMINI et al., 1996), relata que além desses mediadores a prostaglandina E2 é uma das principais prostaglandinas responsáveis pela migração celular e desenvolvimento do edema na pata do animal. Esse edema é melhor visualizado a partir de três horas do teste devido a um processo intenso da inflamação que ocorre nesse período pela ativação da COX₂ (RIBEIRO et al., 2015).

Nesse modelo o extrato atuou de forma semelhante à dexametasona (fármaco imunossupressor), inibindo a migração de leucócitos induzida pela injeção de carragenina na dose de 25 mg/kg. Isso sugere que a ação do EHFLR na redução da migração celular esteja associada com a inibição da biossíntese do mediador inflamatório mencionado anteriormente.

A ação farmacológica do extrato pode estar relacionada à presença de constituintes químicos que possuem efeitos já descritos na literatura, sendo característicos em algumas espécies dessa família. Essas substâncias fazem parte da classe dos polifenóis derivados metabolicamente pela via do ácido chiquímico. São largamente encontrados nos reino vegetal, possuindo ação farmacológica no combate a hipertensão e diabetes, tumores e processos inflamatórios.

Li e colaboradores (2007) demonstraram em seus estudos que o chá verde possui efeito anti-inflamatório em camundongos por protegê-los contra a endotoxina letal LPS durante seus experimentos. Os autores relatam que esta atividade pode está relacionada aos seus constituintes químicos, onde um deles são as catequinas. Esse fato corrobora com o presente estudo que possui a mesma substância química e que apesar de avaliar o efeito anti-inflamatório em modelos diferentes, atuou de modo semelhante na inibição e redução do processo inflamatório induzido em camundongos.

Além disso, Carvalho et al. (2005) descreve que a atividade biológica dos flavonoides está relacionada principalmente, com a inibição de mediadores inflamatórios. Isso justifica os resultados do presente estudo que mostra em vários modelos de inflamação que o EHFLR possivelmente atua de modo sistêmico diminuindo a expressão das aminas vasoativas, na inibição da enzima cicloxigenase, além disso, reduzindo a quimiotaxia dos polimorfonucleares para o local da inflamação.

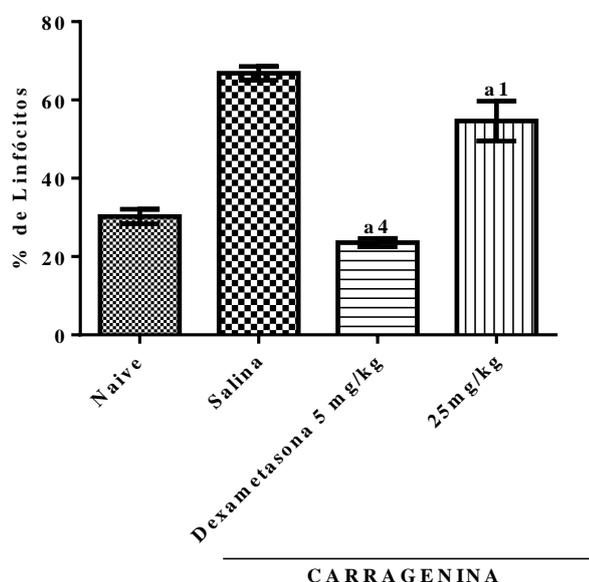
Os leucócitos são as principais células efetoras participantes da inflamação aguda. A resposta imune é mediada pelos polimorfonucleares e os macrófagos, enquanto os linfócitos são células que se encontram presentes na resposta adaptativa (KREIMER1 *et al*, 2005). Linfócitos são glóbulos brancos presentes no sangue. Eles desempenham um papel importante na defesa do corpo contra a invasão ou proliferação de qualquer agente estranho como vírus, bactéria, toxina ou fungo (COELHO *et al.*, 2005). A presença dessas células na resposta tecidual é característico de uma inflamação crônica, uma vez que esse processo é desencadeado por um período mais longo. A migração dessas células para o local afetado proporciona a ativação de moléculas ativas como as citocinas (ESTRADA *et al.*, 2011). Essas células desempenham um papel bastante importante durante o processo inflamatório por ativar a expressão das moléculas de adesão, contribuindo dessa forma, para a migração e ativação de leucócitos, além de serem responsáveis pela expressão de gene que codificam enzimas como a COX₂, fosfolipase A₂ e iNOS (WITKAMP; MONSHOUWER, 2000).

O resultado para a contagem de linfócidos mostra que houve uma redução do percentual destas células na dose analisada, apresentando uma redução do potencial de inibição dessas células de 18,26% ($54,60 \pm 5,0$). O grupo Naive não recebeu nenhum tratamento ou indução ($30,22 \pm 1,8$). Este grupo é um controle padrão para avaliar a efetividade do teste (Tabela 8).

A dexametasona desempenhou um efeito estatisticamente significativo, reduzindo esse percentual em 64,73% ($23,56 \pm 1,0$) em relação ao grupo controle ($66,80 \pm 1,7$) (Figura 18).

Os resultados mostram que a administração de carragenina levou a formação de um infiltrado celular expressivo de leucócitos, e que o pré tratamento com o EHFLR semelhantemente a dexametasona, usada como droga padrão, causou uma diminuição do número de leucócitos na cavidade peritoneal quando comparado ao grupo controle. Segundo Saleh e Medeiros, (1999) os polimorfos nucleares são as principais células a migrarem para o peritônio na fase inicial da inflamação.

Figura 18. Efeito do Extrato Hidroalcoólico das Folhas de *Licania rigida* (EHFLR) sobre a migração de Linfócitos no teste de peritonite induzida por carragenina (Apêndice K - Coluna Estatística; K 1 Analyse).



As colunas representam a média \pm erro padrão da média (EPM), analisados através da ANOVA de uma via seguido por Bonferroni. Utilizando camundongos machos swiss adulto (n = 6). Valores significativos de $a_1 = p < 0,05$; $a_2 = p < 0,01$; $a_3 = p < 0,001$; $a_4 = p < 0,0001$ vs salina. Dexamentasona (5 mg/kg) e o EHFLR (25 mg/kg). Todos administrados por via oral (v.o) 60 min antes da injeção subplantar de carragenina.

Tabela 8. Resultado em porcentagem do efeito anti-inflamatório do Extrato Hidroalcoólico das Folhas de *Licania rigida* (EHFLR), no teste de Peritonite.

Tratamento		Linfócitos	
		média \pm E.P.M/ Inibição (%)	
Salina controle)	(Grupo controle)	66,80 \pm 1,7	-
Naive	(Branco)	30,22 \pm 1,8	-
EHFLR	25 mg/kg	56,60 \pm 5,0	18,26%
Dexametasona	5 mg/kg	64,73 \pm 1,0	64,73%

*Os valores são médias \pm EPM de 6 animais por grupo. Análises estatísticas obtidas pela análise de Variância (ANOVA). Extrato Hidroalcoólico das Folhas de *Licania rigida* (EHFLR).

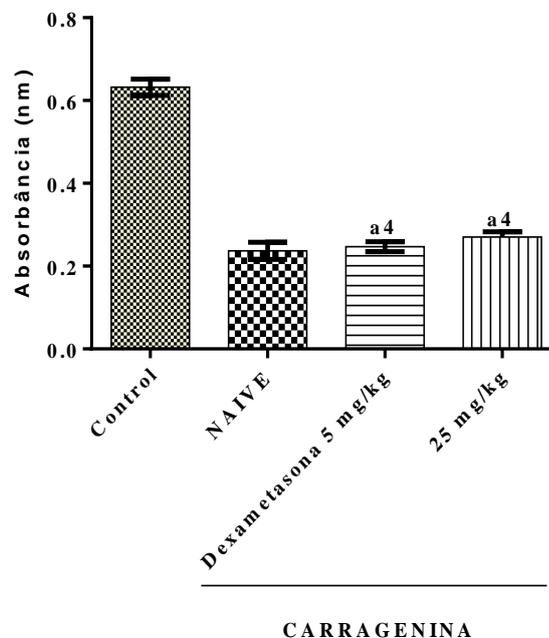
De acordo com os resultados apresentados, o EHFLR apresenta uma ação anti-inflamatória ao inibir de forma significativa na dose de 25 mg/kg a migração de leucócitos no líquido peritoneal, sugerindo uma ação na inibição da expressão de citocinas.

4.4.6 AZUL DE EVANS

Este teste permite avaliar quantitativamente a permeabilidade vascular durante um processo inflamatório. Essa avaliação é feita através da administração intravenosa do corante azul de evans, o qual desempenha uma forte afinidade pela albumina, o que permite o avaliar a permeabilidade vascular. Se o endotélio encontra-se lesionado, conseqüentemente maior será a concentração de albumina no lavado peritoneal (JANCAR et al., 1988).

De acordo com a (figura 19), os resultados mostram que o EHFLR inibiu o aumento da permeabilidade vascular induzida por carragenina em um percentual de 57,14% ($0,27 \pm 0,013$), em relação ao grupo controle ($0,63 \pm 0,019$). O grupo Naive é representado pelo grupo de animais que não receberam tratamento, nem mesmo foi induzido uma injúria tecidual. Ele serve de parâmetro pra assegurar que os animais estão em boas condições de uso e evitar resultados falsos negativos. A dexametasona reduziu o processo de permeabilidade vascular com um percentual de inibição de 61,90% ($0,24 \pm 0,015$) em relação ao controle (tabela 9).

Figura 19. Efeito do Extrato Hidroalcoólico das Folhas de *Licania rigida* (EHFLR) sobre o extravasamento de azul de Evans no lavado peritoneal de camundongos (Apêndice L - Coluna Estatística; L 1 Analyse).



As colunas representam a média \pm erro padrão da média (EPM), analisados através da ANOVA de uma via seguido por Bonferroni. Utilizando camundongos machos swiss adulto ($n = 6$). Valores significativos de $a_1 = p < 0,05$; $a_2 = p < 0,01$; $a_3 = p < 0,001$; $a_4 = p < 0,0001$ vs salina. Dexametasona (5 mg/kg) e o EHFLR (25 mg/kg). Todos administrados por via oral (v.o) 60 min antes da injeção subplantar de carragenina.

Tabela 9. Resultado em porcentagem do efeito anti-inflamatório do Extrato Hidroalcoólico das Folhas de *Licania rigida* (EHFLR), no teste de Azul de Evans.

Tratamento		Azul de Evans	
		média ± E.P.M/ Inibição (%)	
Salina	(Grupo controle)	0,63 ± 0,019	-
Naive	(Branco)	0,23 ± 0,020	-
EHFLR	25 mg/kg	0,27 ± 0,013	57,14%
Indometacina	10 mg/kg	0,24 ± 0,015	61,90%

*Os valores são médias ± EPM de 6 animais por grupo. Análises estatísticas obtidas pela análise de Variância (ANOVA). Extrato Hidroalcoólico das Folhas de *Licania rigida* (EHFLR).

Os resultados demonstram que o EHFLR reduziu a permeabilidade vascular, conseqüentemente por inibir a liberação de mediadores pro-inflamatórios, estimulados pela indução de carragenina. Desse modo, diminuindo o extravasamento de proteínas para o local inflamado.

No modelo de peritonite, por exemplo, os resultados aparecem significantes na inibição do recrutamento dessas células para o lugar inflamado, o que corrobora com o presente modelo, que ao avaliar essa inibição confirma a ação farmacológica do EHFLR que foi capaz de inibir a migração de neutrófilos e monócitos para a cavidade peritoneal provavelmente através da redução da vasodilatação dos capilares da membrana peritoneal, bem como inibindo a formação de edema induzidos por outros agentes experimentados no presente estudo como, dextrana e histamina no modelo de edema de pata.

Ferreira (2011) testou a atividade anti-inflamatória do extrato metanólico das partes aéreas da *Cleome spinosa*, rica em flavonoides, no teste de pleurisia induzida por carragenina em camundongos. Esse teste promove uma migração leucocitária e extravasamento proteico para cavidade pleural. Como resultado ele percebeu que seu extrato inibi essa ação e reduz a concentração dos leucócitos de modo significavelmente. Tais relatos corroboram, em parte, com os resultados demonstrados no presente estudo, que apesar de se tratar de espécies diferentes, elas possuem compostos químicos semelhantes, sugerindo que essa ação seja oriunda dos mesmo.

Todos os resultados aqui apresentados mostram que o EHFLR apresentam perspectivas favoráveis para o conhecimentos científico da espécie *L. rigida*, visto que, a mesma possuem dados escassos na literatura não só da especie em estudo, mas também do gênero *Licania*.

4.5 Atividade anti-inflamatória Tópica

4.5.1 EDEMA DE ORELHA AGUDO INDUZIDO PELA APLICAÇÃO ÚNICA DE ÓLEO DE CRÓTON 5%

Após analisar os efeitos do EHFLR em modelos de inflamação sistêmica, seguiu-se o estudo para avaliar seus efeitos anti-inflamatórios tópicos, assim como seu possível mecanismo de ação.

O efeito anti-inflamatório tópico do EHFLR foi determinado através do modelo de edema de orelha induzido por diferentes agentes irritantes como o Óleo de cróton, Ácido araquidônico, Histamina, Capsaicina e Fenol. Essas substâncias promovem uma ação edematogênica por mecanismos distintos.

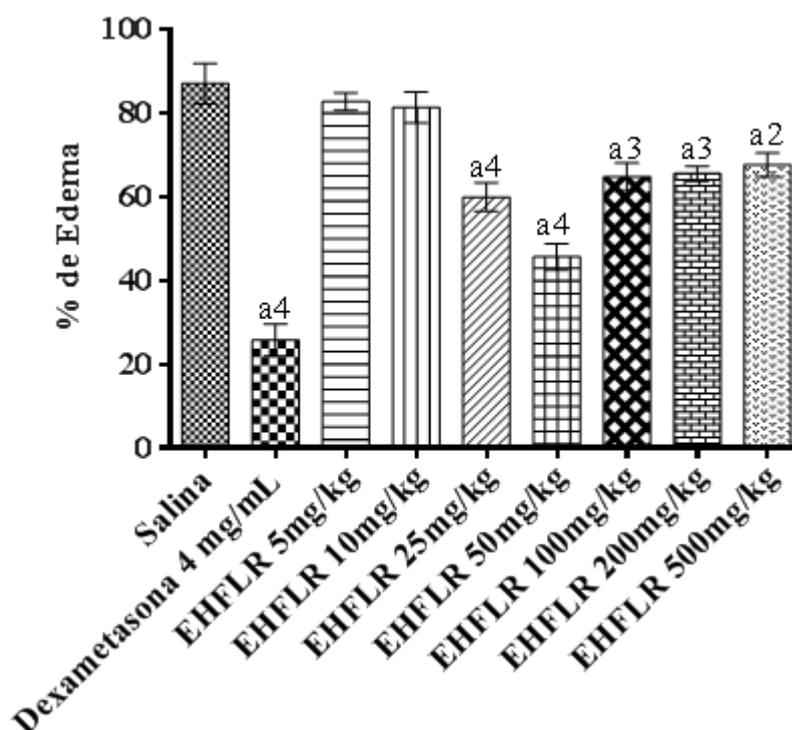
Segundo Medeiros e colaboradores (2009), o óleo de cróton é bastante utilizado em ensaios de inflamação. Sua aplicação tópica é um método que permite avaliar a atividade dos AINES ou os anti-inflamatórios esteroidais. O óleo possui como principal agente irritante o acetato de tetradecanoil-forbol (TPA), possuindo uma ação exercida por produtos da cicloxigenase, histamina, serotonina, entre outros mediadores. O TPA induz uma resposta inflamatória por ativar diretamente a proteína cinase C (PKC), que desencadeia a ativação da fosfolipase A2, induzindo a expressão da COX-2 e ativação da LOX e desse modo, ativa a síntese e liberação de mediadores pró-inflamatórios (MURAKAWA et al., 2006).

Após 6 horas da administração do óleo de cróton, observou-se que o extrato obteve um resultado significativo em reduzir o edema e o eritema na orelha do animal. A análise foi feita em comparação ao grupo controle. O percentual de inibição do edema foi de 25,55% ($64,78 \pm 3,28$; $p < 0,001$) na dose de 100 mg/kg; 24,72% ($65,50 \pm 1,75$; $p < 0,001$) na dose de 200 mg/kg e 22,31% ($67,60 \pm 2,7$; $p < 0,01$) na dose de 500 mg/kg em comparação com a salina ($87,02 \pm 4,83$). A dose de 25 e 50 mg/kg, apresentou um melhor efeito com um percentual de inibição de 31,14% ($59,92 \pm 3,43$; $p < 0,0001$) e 47,5% ($45,63 \pm 3,18$; $p < 0,0001$), respectivamente.

A Dexametasona 4 mg/mL reduziu o edema provocado pelo óleo de cróton com uma maior significância em 70,45% ($25,71 \pm 3,8$; $p < 0,0001$).

As doses de 5 ($87,02 \pm 4,83$) e 10 ($82,74 \pm 2,08$) mg/kg não demonstraram significância na redução do edema de orelha. Já as doses de 25, 50 e 100 mg/kg apresentou um efeito anti-inflamatório observado na figura 20.

Figura 20. Efeito anti-inflamatório tópico do Extrato Hidroalcoólico das Folhas de *Licania rigida* (EHFLR) no teste de edema de orelha agudo induzido por óleo de cróton (Apêndice M - Coluna Estatística; M 1 Analyse).



As colunas representam a média \pm erro padrão da média (EPM), analisados através da ANOVA de uma via seguido por Bonferroni. Utilizando camundongos machos swiss adulto ($n = 6$). Valores significativos de $a_1 = p < 0,05$; $a_2 = p < 0,01$; $a_3 = p < 0,001$; $a_4 = p < 0,0001$ vs salina. Dexametasona (4 mg/mL) e o EHFLR (5, 10, 25, 50, 100, 200, 500 mg/kg). Todos administrados por via oral (v.o), 60 min antes da injeção subplantar do óleo de cróton.

O extrato avaliado em modelos de inflamação tópica também apresenta uma melhor resposta anti-edematogênica na dose de 25 e 50 mg/kg e uma resposta semelhante entre as doses de 100, 200 e 500 mg/kg, em relação ao grupo controle. Desse modo, segue-se com a avaliação do mecanismo de ação tópica com a dose de 25 mg/kg, tendo em vista ser a menor dose efetiva.

O TPA parece induzir também a expressão de citocinas pró-inflamatórias nos tecidos queratinizados da pele, desencadeando o processo inflamatório tópico (PASSOS *et al.*, 2013; REDONDO *et al.*, 1997). Os Glicocorticoides atuam inibindo o edema gerado a partir do bloqueio da ação de enzimas pró-inflamatório (CARLSON *et al.*, 1985).

Os resultados mostram que o efeito anti-edematogênico do extrato está ocorrendo possivelmente pela presença de seus componentes químicos. Um composto marcante da espécie é o ácido clorogênico pertencente a classe de compostos fenólicos. Essas substâncias possuem ação antioxidante e anti-inflamatória (SPENCER *et al.*, 2008). Segundo Archivio e

colaboradores (2007) esses compostos atuam na modulação da atividade de enzimas como a lipoxigenase e cicloxigenase, assim como fazendo interações receptores e vias de transdução de sinais.

Motta e colaboradores (2013) realizaram o mesmo teste em camundongos com as folhas de *Mucuna pruriens* (L.), as quais, apresentam componentes químicos semelhantes à espécie em estudo e observaram que esta planta uma atividade anti-inflamatória na dose de 100 mg/ kg , o que corrobora com os achados do presente estudo que testou a mesma dose, obtendo efeito semelhante.

Após a realização da triagem sobre o efeito anti-inflamatório agudo, seguiu-se com experimentos que investigassem também seu possível efeito diante de uma inflamação crônica.

4.5.2 EDEMA DE ORELHA INDUZIDO PELA APLICAÇÃO MÚLTIPLA DE ÓLEO DE CRÓTON

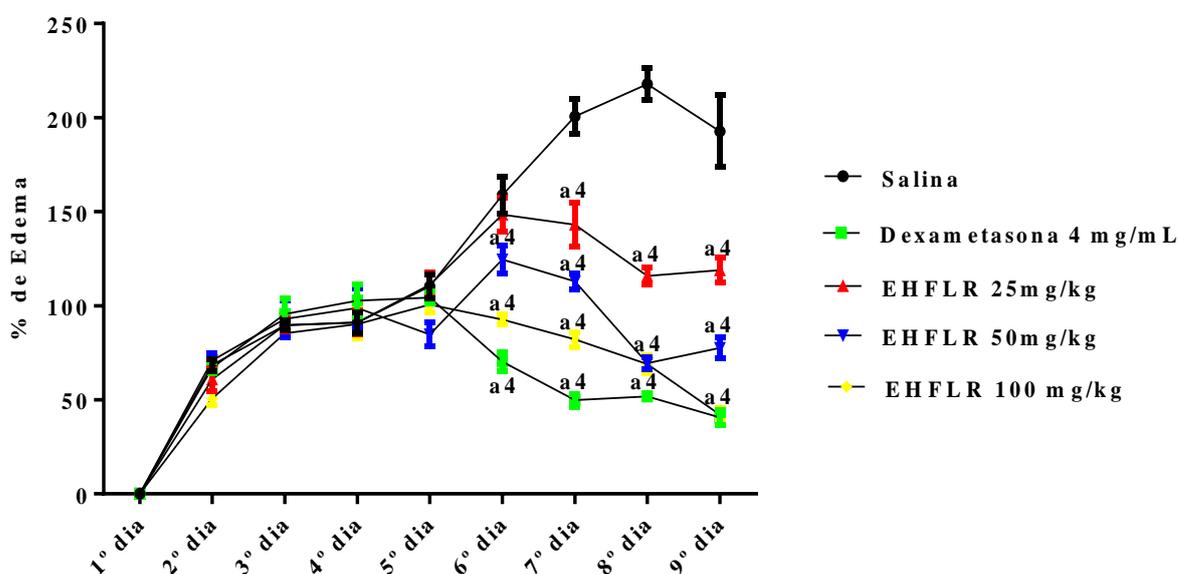
Diferentemente da aplicação única de óleo de cróton que fornece dados sobre o processo inflamatório agudo, a aplicação múltipla de óleo de cróton, em dias alternados, avalia a atividade antiedematogênica assemelhando-se a uma inflamação crônica. Esse modelo promove uma reação inflamatória de forma persistente acompanhada do aumento da massa das orelhas. Também ocorre uma intensa migração de neutrófilos, macrófagos e principalmente de linfócitos T (CD4+ e CD8+) (STANLEY et al.,1991).

As doses testadas foram 25, 50 e 100 mg/kg que obtiveram um percentual de inibição do edema de 6,4% ($111,1 \pm 6,4$); 21,5% ($84,6 \pm 6,4$) e 41,59% ($100,5 \pm 3,9$), respectivamente no primeiro dia de tratamento. No segundo dia de tratamento o percentual de inibição dessas doses foram de 28,69% ($148,4 \pm 8,9$); 43,7% ($124,5 \pm 7,2$) e 59,09% ($92,7 \pm 2,8$) respectivamente, em relação ao grupo controle. No terceiro dia de tratamento o extrato nas doses testadas diminuiu o edema com um percentual de inibição de 46,79% ($143,1 \pm 11,4$); 68,08% ($112,9 \pm 4,4$) e 68,74% ($82,1 \pm 3,9$), respectivamente. No quarto dia de tratamento observou-se um percentual de inibição do edema de 38,28% ($115,8 \pm 4,3$); 59,75% ($69,5 \pm 3,1$) e 78,15% ($69,9 \pm 4,6$) respectivamente, em comparação ao grupo salina. No nono dia, foi avaliado o edema final pela pesagem da massa das orelhas dos animais.

A dexametasona apresentou uma ação antiedematogênica significativa em todos os dias de tratamento com um percentual de inibição de 55,68% ($104 \pm 3,2$), 75,16% ($70,3 \pm 5,1$), 76,24% ($49,8 \pm 3,4$) e 78,95% ($51,7 \pm 1,4$), respectivamente quando comparados ao grupo

controle (salina). Esse efeito é confirmado através dos dois modelos de edema tópico apresentados no presente trabalho (agudo e crônico), que mostram que a dexametasona teve redução significativa, com um maior ação antiedematogênica em comparação ao grupo controle, demonstrados na figura 21.

Figura 21. Curva tempo-resposta do efeito do Extrato Hidroalcoólico das Folhas de *Licania rigida* (EHFLR) por 9 dias sobre o edema de orelha induzido por óleo de cróton (Apêndice N - Coluna Estatística; N 1 Analyse).



As colunas representam a média \pm erro padrão da média (EPM), analisados através da ANOVA de duas vias seguido por Bonferroni. Utilizando camundongos machos swiss adulto ($n = 6$). Valores significativos de $a_1 = p < 0,05$; $a_2 = p < 0,01$; $a_3 = p < 0,001$; $a_4 = p < 0,0001$ vs salina. Dexametasona (4 mg/mL) e o EHFLR (25, 50 e 100mg/kg). Todos administrados por via oral (v.o), 60 min antes da injeção subplantar do óleo de cróton.

No final do experimento caracterizado ao nono dia, as orelhas dos camundongos foram cortadas e pesadas. Os resultados mostraram que o extrato apresenta uma ação atiedematogênica ao apresentar um percentual de inibição do edema nas doses 25, 50 e 100 mg/kg de 33,65% ($84,86 \pm 6,01$); 43,95% ($71,68 \pm 3,15$); 55,085($57,45 \pm 3,53$) respectivamente, em relação ao grupo controle ($127,9 \pm 1,91$). A Dexametasona 4 mg/mL reduziu o edema com uma maior significância em 58,63% ($52,91 \pm 3,59$).

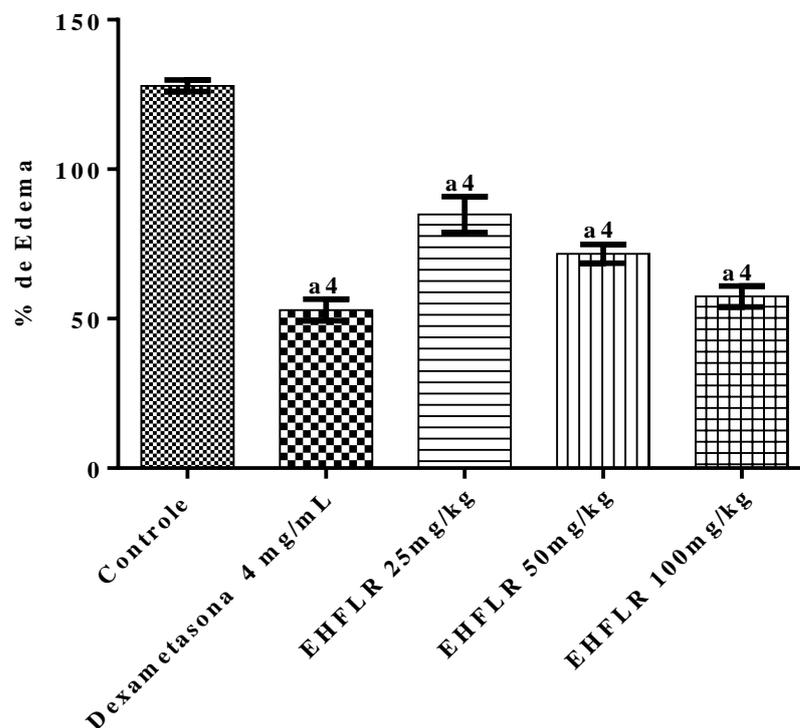
A avaliação das massas das orelhas (Figura 22) confirmam os resultados apresentados no gráfico da curva tempo/resposta mostrados na figura 18.

Diferentemente da aplicação única de óleo de cróton que fornecem dados quanto à atividade antiedematogênica de uma substância num processo inflamatório agudo, a aplicação

múltipla de óleo de cróton, em dias alternados, avalia essa atividade num processo inflamatório previamente estabelecido, assemelhando-se a uma inflamação crônica. A aplicação múltipla de óleo de cróton na orelha do animal promove uma reação inflamatória persistente acompanhada do aumento da massa das orelhas. Desse modo, ocorre uma intensa migração de leucócitos para o local inflamado.

Crummey e colaboradores (1987) relatam em seus estudos que a aplicação local de óleo de cróton para estimular o processo inflamatório, promove uma vasodilatação imediata e eritema nos 5 primeiros minutos, seguida por desenvolvimento de edema após 40-60 minutos e até 1 hora. Esse processo foi evidenciado no primeiro dia da indução do óleo de cróton. A partir do quinto dia em que os animais começaram a ser tratado, esse edema foi reduzindo e consequentemente o processo inflamatório local.

Figura 22. Efeito anti-inflamatório tópico do Extrato Hidroalcoólico das Folhas de *Licania rigida* (EHFLR) no teste de edema de orelha crônico induzido por óleo de cróton (Apêndice O- Coluna Estatística; O 1 Analyse).



As colunas representam a média \pm erro padrão da média (EPM), analisados através da ANOVA de uma via seguido por Bonferroni. Utilizando camundongos machos swiss adulto ($n = 6$). Valores significativos de $a_1 = p < 0,05$; $a_2 = p < 0,01$; $a_3 = p < 0,001$; $a_4 = p < 0,0001$ vs salina. Dexametasona (4 mg/mL) e o EHFLR (25, 50 e 100mg/kg). Todos administrados por via oral (v.o), 60 min antes da injeção subplantar do óleo de cróton.

Uma vez realizada a triagem para o efeito anti-inflamatório na forma aguda e crônica, foram realizados experimentos que melhor caracterizam os possíveis mecanismos pelos quais o extrato está agindo diante de uma inflamação aguda.

4.5.3 EDEMA DE ORELHA INDUZIDO POR HISTAMINA

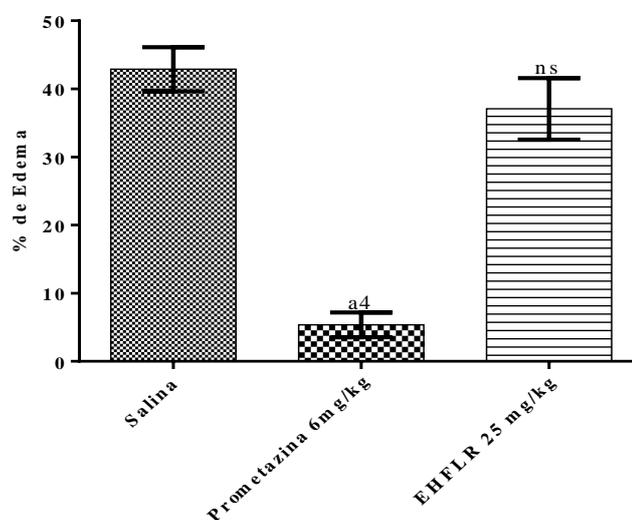
Para se avaliar a influência da histamina em um processo inflamatório por via tópica seguiu-se com o modelo de edema de orelha induzido por essa substância.

Esse modelo consiste em avaliar o efeito do extrato frente a uma hipersensibilidade imediata. A histamina é uma amina vasoativa liberada pelos mastócitos e desempenham um importante papel na alteração do tônus e permeabilidade vascular, com ação vasodilatadora, o que contribui para um extravasamento de líquidos (KINDT; GOLDSBY; OSBORNE, 2008). Os glicocorticoides apresentam redução do edema nesse modelo, o que se confirma com a ação anti edematogênica do extrato no grupo tratado com dexametasona.

No entanto, notou-se que o EHFLR não desempenhou uma ação anti-inflamatória tópica, apresentando um percentual de inibição não significativo estatisticamente de 13,52% ($37,08 \pm 4,52$; $p \geq 0,05$) em relação ao grupo controle ($42,88 \pm 3,25$) (Figura 23).

A Dexametasona 4 mg/mL, demonstrou um efeito estatisticamente significativo ao apresentar um percentual de inibição do edema de 87,52% ($5,35 \pm 1,82$) em relação ao grupo controle que recebeu apenas salina.

Figura 23. Efeito anti-inflamatório tópico do Extrato Hidroalcoólico das Folhas de *Licania rigida* (EHFLR) no teste de edema de orelha induzido por Histamina (Apêndice P - Coluna Estatística; P 1 Analyse).



As colunas representam a média \pm erro padrão da média (EPM), analisados através da ANOVA de uma via seguido por Bonferroni. Utilizando camundongos machos swiss adulto ($n = 6$). Valores significativos de $a_1 = p < 0,05$; $a_2 = p < 0,01$; $a_3 = p < 0,001$; $a_4 = p < 0,0001$ vs salina. Prometazina (6 mg/mL) e o EHFLR (25 mg/kg). Todos administrados por via oral (v.o), 60 min antes da injeção subplantar de Histamina.

Os resultados mostram que o mecanismo de ação pelo qual o EHFLR desempenha uma ação anti-inflamatória tópica não está associado à inibição da resposta imediata expressa pelas aminas vasoativas, sugerindo que seu possível mecanismo seja pela inibição das enzimas pró-inflamatórias. Desse modo, segue-se com a investigação usando outro modelo de inflamação tópica que é o edema de orelha induzido por ácido araquidônico.

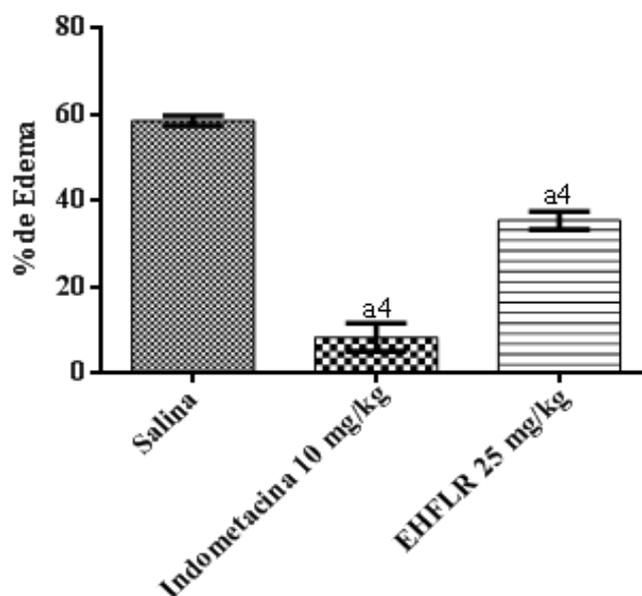
4.5.4 EDEMA DE ORELHA INDUZIDO PELA APLICAÇÃO DE ÁCIDO ARAQUIDÔNICO

Nesse modelo é utilizada a administração tópica do ácido araquidônico na orelha do animal. Este ácido é o precursor de eicosanoides inflamatórios que induzem a vasodilatação, quimiotaxia, aderência leucocitária e agregação plaquetária, originando um edema visível (MARCHIONNI; PAGNONCELLI; REIS 2006). Sua indução também desencadeia a síntese de prostaglandina PGE_2 que aumenta a resposta vascular contribuindo para a formação de edema (OPAS et al., 1985).

Os resultados mostram que o EHFLR aplicado por via tópica demonstrou redução significativa no percentual de inibição do edema de orelha após 1 hora em contato com ácido araquidônico, comparada com o grupo controle que recebeu apenas com salina. Seu percentual inibitório foi de 39,48% ($35,40 \pm 2,11$) (Figura 24).

A indometacina também aplicada topicamente, demonstraram resultados estatisticamente significativos com um percentual de redução de 85,70% ($8,36 \pm 3,25$), em relação ao grupo controle ($58,50 \pm 1,16$; $p < 0,0001$). Nesse modelo a indometacina é a mais indicada por se tratar de uma droga pertencente à classe dos AINES. Segundo Feldman e Mahon (2000), a indometacina, assim como a maioria dos AINES inibe de forma variável as duas isoformas da COX em suas dosagens terapêuticas. Além disso, antagonizam os receptores de PG, o que contribui para a redução da permeabilidade capilar, edema e vermelhidão (FELDMAN; MAHON, 2000).

Figura 24. Efeito anti-inflamatório tópico do Extrato Hidroalcoólico das Folhas de *Licania rigida* (EHFLR) no teste de edema de orelha induzido por ácido araquidônico (Apêndice Q-Coluna Estatística; Q1 Analyse).



As colunas representam a média \pm erro padrão da média (EPM), analisados através da ANOVA de uma via seguido por Bonferroni. Utilizando camundongos machos swiss adulto ($n = 6$). Valores significativos de $a_1 = p < 0,05$; $a_2 = p < 0,01$; $a_3 = p < 0,001$; $a_4 = p < 0,0001$ vs salina. Indometacina (10 mg/mL) e o EHFLR (50 mg/kg). Todos administrados por via oral (v.o), 60 min antes da injeção subplantar de Ácido araquidônico.

Lee (2003), afirmam que os flavonoides, principalmente rutina e quercetina também atuam como inibidores do processo inflamatório por via semelhante a dos AINES. Esse fato vai de encontro com o presente estudo que apresenta um mesmo efeito, possivelmente pela presença dessas substâncias em sua composição química.

Outro estudo realizado com modelo semelhante ao do presente trabalho foi de Saraiva (2009), o qual avalia o efeito anti-inflamatório tópico de uma espécie da família Caryocaraceae, que apesar de pertencer a família diferente da espécie aqui analisada, compartilha em partes de seus componentes químicos, onde em seus estudos mostra que em seus estudos sua espécie, assim como o EHFLR não apresentam efeito anti-inflamatório quando induzido o edema com histamina. Sugerindo que semelhantemente a espécie estudada por Saraiva, o EHFLR não possui ação anti-inflamatória tópica, relacionadas com a via da histamina.

4.5.5 EDEMA DE ORELHA INDUZIDO PELA APLICAÇÃO DE CAPSAICINA

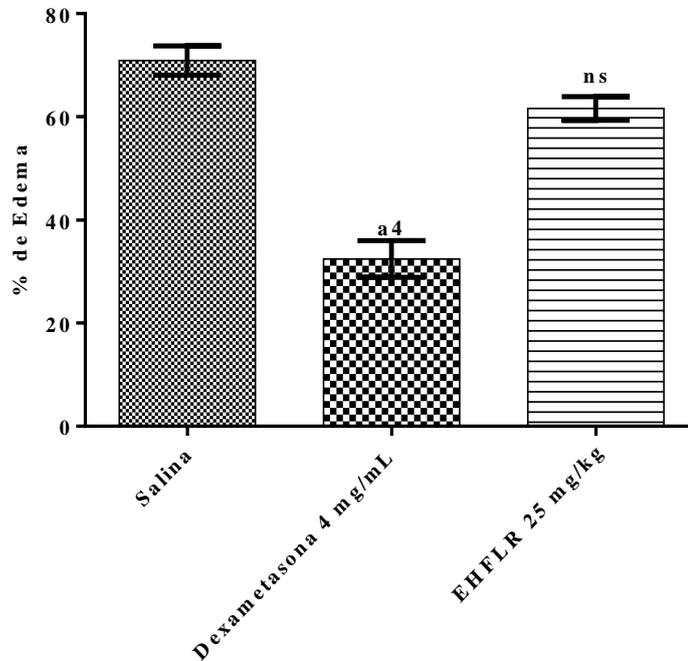
A capsaicina possui em estrutura química 8-metil-N-vanilil-6-nonenamida. Trata-se de um alcaloide extremamente irritante e está presente em plantas do gênero *Capsicum* (pimentas). Elas são responsáveis pelo sabor picante dos frutos dessas espécies (INOUE; NAGATA; KOSHIHARA, 1995).

A aplicação tópica dessa substância causa uma sensibilização nos receptores vaniloides (TRPV1), localizados em fibras nociceptivas do tipo A δ e C sendo responsáveis pela transmissão nociceptiva da dor até o SNC. Essa substância também promove a liberação de neuropeptídeos como os relacionados ao gene da calcitonina (CGRP), substância P (SP), desencadeando a inflamação (RICHARDSON; VASKO, 2006). Esse estímulo aumenta a resposta inflamatória neurogênica imediata, caracterizada por vasodilatação das arteríolas, aumento do fluxo sanguíneo e em consequência um extravasamento plasmático e sensibilização a dor (GÁBOR, 2000).

O EHFLR demonstrou nesse modelo de inflamação tópica que não houve redução significativa no percentual de inibição do edema de orelha após 30 min após o contato com a capsaicina com um percentual de inibição do edema de 24,83% ($61,63 \pm 2,3$) (Figura 25) comparada com o grupo controle ($70,91 \pm 2,85$).

A dexametasona demonstrou resultados estatisticamente significativos com um percentual de redução de 54,23% ($32,45 \pm 3,55$) em relação ao grupo controle.

Figura 25. Efeito anti-inflamatório tópico do Extrato Hidroalcoólico das Folhas de *Licania rigida* (EHFLR) no teste de edema de orelha induzido por Capsaicina (Apêndice R - Coluna Estatística; R 1 Analyse).



As colunas representam a média \pm erro padrão da média (EPM), analisados através da ANOVA de uma via seguido por Bonferroni. Utilizando camundongos machos swiss adulto ($n = 6$). Valores significativos de $a_1 = p < 0,05$; $a_2 = p < 0,01$; $a_3 = p < 0,001$; $a_4 = p < 0,0001$ vs salina. Dexametasona (4 mg/mL) e o EHFLR (25 mg/kg). Todos administrados por via oral (v.o), 60 min antes da injeção subplantar de Capsaicina.

De acordo com os resultados acima o EHFLR não demonstrou efeito anti-inflamatório quando induzido por capsaicina.

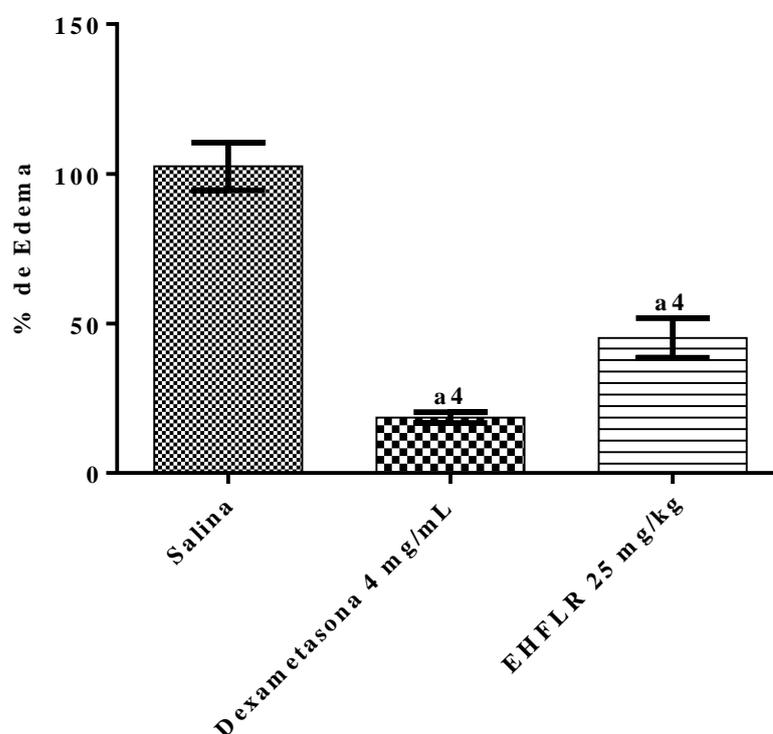
4.5.6 EDEMA DE ORELHA INDUZIDO PELA APLICAÇÃO DE FENOL

O fenol ou ácido carbólico (C_6H_5OH) caracteriza-se como cristais em forma de agulhas e possui uma coloração que varia de incolor a rosado. Essa substância torna-se líquida quando aquecida, e a partir daí libera um vapor inflamável passando a mostrar-se uma coloração escura na presença da luz (VELASCO et al., 2004). O modelo de edema orelha induzido por fenol tem como objetivo simular uma dermatite de contato e dessa forma avaliar a ação da droga testada sobre os mediadores químicos produzidos pelos queratinócitos. Após do contato do fenol com a pele ocorre a liberação desses mediadores ($IL-1\alpha$, $TNF-\alpha$ e $IL-8$) e consequentemente uma irritação primária de contato na pele (LIM; PARK; KIM, 2004).

Essas citocinas produzidas atuam diferentemente do mecanismo que ocorre na inflamação induzida pelo óleo de cróton. O processo inflamatório nesse modelo causa uma ruptura na membrada plasmática dos queratinócitos resultando na liberação da citocina IL-1 α pré-formada. Além disso, outros mediadores inflamatórios participam desse processo como os EROS (Espécie reativa de oxigenio) formados por consequência do estresse oxidativo e metabólitos do AA (MURRAY et al., 2007).

O EHFLR demonstrou uma redução significativa no percentual de inibição do edema na orelha de camundongos após 1 hora da aplicação tópica de fenol 10% (v/v) em acetona em 56% ($18,55 \pm 1,8$; $p < 0,0001$), quando comparados com o grupo controle que foram tratados apenas com salina (Figura 26). A dexametasona foi significante em reduzir o edema com um percentual de 81,90% ($45,10 \pm 6,6$; $p < 0,0001$) em relação ao grupo controle ($102,5 \pm 7,9$).

Figura 26. Efeito anti-inflamatório tópico do Extrato Hidroalcoólico das Folhas de *Licania rigida* (EHFLR) no teste de edema de orelha induzido por Fenol (Apêndice S - Coluna Estatística; S 1 Analyse).



As colunas representam a média \pm erro padrão da média (EPM), analisados através da ANOVA de uma via seguido por Student-Newmans-Keuls. Utilizando camundongos machos swiss adulto ($n = 6$). Valores significativos de $a_1 = p < 0,05$; $a_2 = p < 0,01$; $a_3 = p < 0,001$; $a_4 = p < 0,0001$ vs salina. Dexametasona (4 mg/mL) e o EHFLR (50 mg/kg). Todos administrados por via oral (v.o), 60 min antes da injeção subplantar de Fenol.

De acordo com os modelos de inflamação tópica testados, observa-se que o EHFLR demonstra uma ação anti-inflamatória semelhantemente aos fármacos que atuam inibindo a produção de metabólitos do ácido araquidônico, assim como os AINES. Dessa forma, o extrato age possivelmente atuando na inibição da produção dos eicosanóides sugerindo que o extrato possivelmente poderá ser usado em dermatites irritativas de pele.

CONCLUSÕES



Fonte: Desenhado por NASCIMENTO, J.B. (2016).

5 CONCLUSÕES

- O extrato hidroalcoólico das folhas de *Licania rigida* (EHFLR) apresentou vários constituintes químicos oriundos do metabolismo secundário que são: ácidos (clorogênico, cafeico e gálico), epicatequina, rutina, quercetina e caempferol.
- O EHFLR não exibiu toxicidade relevante, sendo a DL₅₀ por via oral superior a 5000 mg/kg em camundongos por via oral.
- O EHFLR apresentou efeito anti-inflamatório sistêmico em modelos de triagem como edema de pata induzida por carragenina e dextrana.
- Percebeu-se que o extrato pode estar agindo possivelmente por inibir a ação das aminas vasoativas, além de provavelmente intervir na via de metabolização do ácido araquidônico.
- O EHFLR apresentou uma redução da migração leucocitária no modelo de peritonite e permeabilidade vascular, indicando que sua ação está vinculada a inibição da produção de eicosanoides e citocinas. Desse modo, inibindo a migração e adesão leucocitária, evidenciada pela redução de neutrófilos e monócitos no lavado peritoneal.
- O EHFLR também apresentou uma possível ação anti-inflamatória tópica em modelos de triagem como o edema de orelha agudo e crônico.
- O mecanismo de ação por via tópica do EHFLR parece estar relacionado à inibição da produção de metabólitos do ácido araquidônico;
- A aplicação do extrato em dermatites de contato irritativas demonstrou ser eficaz pela redução de edema induzido por fenol;
- Os resultados obtidos sugerem potencial biotecnológico do EHFLR, podendo ser uma ferramenta estudos mais específicos e eficazes sobre o efeito anti-inflamatório na construção de futuros medicamentos no tratamento de inflamação.

PRODUÇÕES CIENTÍFICAS DURANTE O PERÍODO DO MESTRADO

ARTIGOS PUBLICADOS

- **SANTOS, E. S.**; SANTOS, F. I. F. ; CARVALHO, E. S. ; FERNANDES, C. N.; LACERDA, G. M. ; DELMONDES, G. A. ; LEMOS, I. C. S. ; ALVES, D. A. ; KERNTOPF, M. R. ; CABRAL, F. R. . Pregnant women with syphilis: a epidemiological assessments. Imperial Journal of Interdisciplinary Research, v. 3, p. 990-993, 2017.
- MENEZES, C. D. A. ; GARCIA, F. A. O. ; VIANA, G. S. B. ; PINHEIRO, P. G. ; FELIPE, C. F. B. ; ALBUQUERQUE, T.R. ; Moreira, A.C. ; GARCIA, T. R. ; CAVALCANTE, M R. ; **SANTOS, E. S.** ; SILVA, T.F. ; COUTINHO, H. D. M. ; MENEZES, I. R. A. . *Murraya paniculata* (L.) (Orange jasmine): Potential Nutraceutical with Ameliorative Effect in Alloxan-Induced Diabetic Rats. PHYTOTHERAPY RESEARCH **JCR**, v. 32, p. 915, 2017.
- LIMA, VALÉRIA N. ; OLIVEIRA-TINTINO, CÍCERA D.M. ; **SANTOS, ENAIDE S.** ; MORAIS, LUÍS P. ; TINTINO, SAULO R. ; FREITAS, THIAGO S. ; GERALDO, YURI S. ; PEREIRA, RAIMUNDO L.S. ; CRUZ, RAFAEL P. ; MENEZES, IRWIN R.A. ; COUTINHO, HENRIQUE D.M. . Antimicrobial and enhancement of the antibiotic activity by phenolic compounds: Gallic acid, caffeic acid and pyrogallol. Microbial Pathogenesis **JCR**, v. 99, p. 56-61, 2016.
- LEMOS, I. C. S. ; DELMONDES, G. A. ; SANTOS, A. D. F. ; **SANTOS, E. S.** ; OLIVEIRA, D. R. ; FIGUEIREDO, P. R. L. ; ALVES, D. A. ; BARBOSA, R. ; MENEZES, I. R. A. ; COUTINHO, HENRIQUE D.M. ; KERNTOPF, M. R. ; FERNANDES, G. P. . ETHNOBIOLOGICAL SURVEY OF PLANTS AND ANIMALS USED FOR THE TREATMENT OF ACUTE RESPIRATORY INFECTIONS IN CHILDREN OF A TRADITIONAL COMMUNITY IN THE MUNICIPALITY OF BARBALHA, CEARÁ, BRAZIL. African Journal of Traditional Complementary and Alternative Medicines **JCR**, v. 13, p. 166-175, 2016.
- DE CARVALHO, JOSÉ; VIANA, GLAUCE; DA COSTA, JOSÉ ; MARQUES, THYCIARA ; MOREIRA, ALISSON ; DE SOUSA, ÚRSULA ; LACERDA, JOÃO ; **SANTOS, ENAIDE** ; MOREIRA, ÍTALO ; LOPES, MARIA ; DE SOUZA, MARIA . Morinda citrifolia l. treatments (noni) reduce glycemia in the model of alloxan-induced diabetes in rats. Diabetology & Metabolic Syndrome **JCR**, v. 7, p. A45, 2015.

APRESENTAÇÃO DE TRABALHOS:

- CORREIA, D. B. ; ROSA, A. G. S. ; ALENCAR, C. D. C. ; COSTA, M. H. N. ; HONORATO, R. L. ; MONTEIRO, A. B. ; LIMA, C. N. F. ; **SANTOS, E. S.** ; TINTINO, S. R. ; KERNTOPF, M. R. . AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MICROBIOLÓGICA E CITOPROTETORA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS DE *Licania rigida* Benth (oiticica). In: Reunião Regional da SBPC, 2017, crato. Anais da Reunião Regional da SBPC URCA- CRATO/CE, 2017.
- ARAUJO, I. M.; **SANTOS, E. S.**; ALENCAR, C. D. C.; SOUSA, J. P.; LEMOS, I. C. S.; MONTEIRO, A. B. ; KERNTOPF, M. R. . Efeito Anticonvulsivante das Folhas de *Annona coriacea* Mart. possivelmente via complexo receptor GABA_A/canal de cloreto. In: Congresso Regional da Sociedade Brasileira de Biofísica, 2017, Fortaleza. Anais do Congresso Regional da Sociedade Brasileira de Biofísica, 2017.
- **SANTOS, E. S.**; CARLOS, M.; LOPES, M. J. P.; VIANA, G. S. B.; GARCIA, F. A. O. . AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DO DECOCTO DA RAIZ DE *Myracrodruon urundeuva* FR. ALL. CULTIVADA (AROEIRA-DO-SERTÃO). In: XVI Semana de Iniciação Científica da FMJ, 2016, Juazeiro do Norte. Anais da XVI Semana de Iniciação Científica da FMJ, 2016.
- **SANTOS, E. S.**; DELMONDES, G. A.; KERNTOPF, M. R.; LIMA, L. A.; ROSA, A. G. S. . ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E MODULADORA DOS EXTRATOS ETANÓLICO E HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS DE *Licania rígida* EM BACTÉRIAS MULTIRRESISTENTES. In: XIX Semana de Iniciação Científica da URCA, 2016, crato. Anais da XIX Semana de Iniciação Científica da URCA, 2016.
- CORREIA, D. B.; SOUSA, M. F.; **SANTOS, E. S.**; KERNTOPF, M. R. . ANÁLISE DA TOXICIDADE DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS DE *LICANIA RÍGIDA BENTH* SOBRE A *ARTEMIA SALINA*,. In: XIX Semana de Iniciação Científica da URCA, 2016. Anais da XIX Semana de Iniciação Científica da URCA, 2016.
- ALENCAR, C. D. C.; HONORATO, R. L.; SOUZA, J. S.; **SANTOS, E. S.**; KERNTOPF, M. R. . AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DE *LICANIA RIGIDA BENTH* (OITICICA) EM ROEDORES. In: XIX Semana de Iniciação Científica da URCA, 2016. Anais da XIX Semana de Iniciação Científica da URCA, 2016.
- SOUSA, M. F.; CAMILO, C. J.; LIMA, C. N. F.; **SANTOS, E. S.**; KERNTOPF, M. R. . ANÁLISE TOXICOLÓGICA DO EXTRATO DAS FOLHAS DE *DUGUETIA*

FURFURACEA SOBRE ARTEMIA SALINA. In: XIX Semana de Iniciação Científica da URCA, 2016. Anais da XIX Semana de Iniciação Científica da URCA, 2016.

- CORREIA, D. B. ; VERAS, H. N. H. ; **SANTOS, E. S.** ; KERNTOPF, M. R. ; CORREIA, D. B. . JOGO DA MEMÓRIA COMO MÉTODO DO PROCESSO DE ENSINO E APRENDIZAGEM NO ENSINO DE HEMATOLOGIA BÁSICA PARA DISCENTES STRICTO SENSU DA UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI - URCA. In: XIX Semana de Iniciação Científica da URCA, 2016. Anais da XIX Semana de Iniciação Científica da URCA, 2016.
- MACHADO, S. T. S. ; NASCIMENTO, J. B. ; CORREIA, D. B. ; **SANTOS, E. S.** ; KERNTOPF, M. R. . PLANTAS MEDICINAIS: CONHECIMENTO EMPÍRICO SOBRE A AÇÃO FARMACOLÓGICA DA LICANIA RÍGIDA (OITICICA). In: XIX Semana de Iniciação Científica da URCA, 2016, crato. Anais da XIX Semana de Iniciação Científica da URCA, 2016.
- **SANTOS, E. S.**; MACIEL, I. F. F. ; MENDES, R. C. ; LIMA, C. N. F. . AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS DO MEDICAMENTO GENÉRICO DIPIRONA SÓDICA. In: Semana Nacional de Ciencia e tecnologia - Luz, Ciência e Vida, 2015, crato. Anais da Semana Nacional de Ciencia e tecnologia, 2015.
- MACIEL, I. F. F. ; **SANTOS, E. S.** ; MACEDO, I. ; LOPES, M. J. P. ; GARCIA, T. R. ; CARVALHO, P. M. M. . AS EXPERIÊNCIAS NO ESTÁGIO DE FARMÁCIA NO SISTEMA ÚNICO DE SAÚDE(SUS). In: Semana Nacional de Ciencia e tecnologia - Luz, Ciência e Vida, 2015, crato. Anais da Semana Nacional de Ciencia e tecnologia, 2015.
- GOMES, A. D. S. ; **SANTOS, E. S.** ; LIMA, C. N. F. ; VANDESMET, V. C. S. ANÁLISE MICROBIOLÓGICA EM EQUIPAMENTOS ATLÉTICOS DE ACADEMIAS NA CIDADE DE CRATO-CE. In: Semana Nacional de Ciencia e tecnologia - Luz, Ciência e Vida, 2015, crato. Anais da Semana Nacional de Ciencia e tecnologia, 2015.
- **SANTOS, E. S.**; GONCALVES, A. C. G.; DANTAS, W. F.; LELIS, C.. ABORDAGEM DO SETOR DE CONTROLE MICROBIOLÓGICO DE UMA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA EM BARBALHA CEARÁ. 2016.

CURSOS DE CURTA DURAÇÃO MINISTRADOS

- **SANTOS, E. S.; KERNTOPF, M. R.** Hematologia Básica e Técnica de coleta de sangue venoso. 2017.
- **SANTOS, E. S.; KERNTOPF, M. R.;** Vivenciando rotinas de um laboratório de farmacologia cirúrgica, manuseio de vidrarias e utilização de equipamentos. 2017.
- **SANTOS, E. S.; KERNTOPF, M. R.** Práticas laboratoriais em imuno-bioquímica e rotina ambulatorial em doenças crônico-degenerativas. 2017.
- **SANTOS, E. S.; KERNTOPF, M. R.** Hematologia com ênfase em leucemia e interpretação de hemograma. 2017.
- **SANTOS, E. S.; KERNTOPF, M. R.** Aplicação de vias de administração nas linhas de nocicepção e inflamação. 2016.

REFERÊNCIAS



REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K. et al. **Imunologia celular e molecular**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.
- ALVES, J. J. A.; NASCIMENTO, S. S. Levantamento fitogeográfico das plantas medicinais nativas do cariri paraibano. **Revista Geográfica Acadêmica**, v. 4, n. 2, p. 73-85, 2010.
- AMOROZO, M. C. M. A perspectiva etnobotânica na conservação de biodiversidade. In: XIV CONGRESSO DA SOCIEDADE BOTÂNICA DE SÃO PAULO. **Anais...**São Paulo: Rio Claro, 2002, p. 1-2.
- ANDRADE, S. F. et al. 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.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos: uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.
- ANTI, S. M. A. et al. Antiinflamatórios hormonais: glicocorticóides. **Einstein**, v. 6, n. Supl 1, p. S159-S65, 2008.
- ANTONOW, D. R.; MONTEIRO, G. A.; SANTOS, A. M.C. Glicocorticoides: uma meta-análise. **Disciplinarum Scientia| Saúde**, v. 8, n. 1, p. 51-68, 2016.
- ARCHIVIO, M. et al. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. **Annali-Istituto Superiore di Sanita**, v. 43, n. 4, p. 348, 2007.
- BADILLA, B. et al. Determination of topical anti-inflammatory activity of the essential oil and extracts of *Lippia alba* (Mill.) NE Brown (Verbenaceae), using the model of mouse ear edema induced by TPA and AA. **Pharmacognosy Magazine**, v. 3, n. 11, p. 139, 2007.
- BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, n. 1, p. 191-203, 2006.
- BALBINO, E. E.; DIAS, M. F. Farmacovigilância: um passo em direção ao uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos. **Rev. Bras. Farmacogon.**, v. 20, n. 6, p. 292-100, dez. 2010.
- BASMABUM, A. I. et al. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. **Cell**, v. 139, p. 267-284, 2009
- BATLOUNI, M. **Anti-inflamatórios Não Esteroides**: efeitos cardiovasculares, cerebrovasculares e renais. São Paulo: Instituto Dante Pazzanese de Cardiologia, 2010.
- BELTRÃO, N. E. M.; OLIVEIRA, M. I. P. **Oleaginosas potenciais do nordeste para a produção de biodiesel**. Campina Grande: Embrapa Algodão, 2008.
- BETTEGA, P. V. C. et al. Fitoterapia: dos canteiros ao balcão da farmácia. **Archives of Oral Research**, v. 7, n. 1, p. 89-97, jan./abr. 2011.

BEZERRA, J. N. S. Estudo Fitoquímico de *Licania rigida* Benth (Chrysobalanaceae). 2011. 157 f. Tese (Doutorado em Química) - Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

BOZZA, P. T. et al. Lipopolysaccharide-induced pleural neutrophil accumulation depends on marrow neutrophils and platelet-activating factor. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 270, n. 3, p.143-9, 1994.

BRACA, A. et al. **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 30, p. 271, 2002.

BRAND, C. et al. Tea tree oil reduces histamine-induced oedema in murine ears. **Inflammation Research**, v. 51, p. 283289, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde, 2004.

BRACA, Alessandra et al. Chemical and biological studies on *Licania* genus. **Studies in natural products chemistry**, v. 28, p. 35-67, 2003.

BROOKS, P. M.; DAY, R.O. Nonsteroidal antiinflammatory drugs—differences and similarities. **New England Journal of Medicine**, v. 324, n. 24, p. 1716-1725, 1991.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. (Orgs.). **As bases farmacológicas de Goodman e Gilman**. Porto Alegre: AMGH, 2012.

BRUNTON, L. L.; LAZO, J. S.; PARKER, K. L. **Goodman e Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica**. 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, 2007.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Cienc. Cult.**, v. 55, n. 3, p. 37-9, 2003.

CARLSON, R. et al. Modulation of mouse ear edema by cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitors and other pharmacologic agents. **Agents Actions**, v. 17, p. 197-204, 1985.

CARNEIRO, F. M. et al. Tendências dos estudos com Plantas Medicinais no Brasil. **Rev. Soc. Sab. Prát. Educ.**, v. 3, n. 2, p. 44-75, 2014.

CARVALHO, M. G. et al. Chromones from *Licania arianae* (Chrysobalanaceae). **Natural Product Research**, v. 19, n. 1, p. 7-12, 2005.

CARVALHO, W.A.; LEMÔNICA, L. Mecanismos Celulares e Moleculares da Dor Inflamatória. Modulação Periférica e Avanços Terapêuticos. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 48, p. 137-158, 1998.

CASTILHO, R. O.; OLIVEIRA, R. R.; KAPLAN, M. A. C. Licanolide, a new, triterpene lactone from *licania tomentosa*. **Fitoterapia**, v. 76, n. 6, p. 562-6, set. 2005.

- CASTRO, R. A. **Avaliação do potencial analgésico e antiinflamatório do composto pirazólico 1,5- difenil-3-hidrazinopirazol (a) – DHP**. 2011. 82f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2011.
- CECHINEL FILHO, V. C.; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade . **Química nova**, v. 1, n. 1,1998.
- CHEN, C. et al. P-glycoprotein limits the brain penetration of nonsedating but not sedating H1-antagonists. **Drug Metabolism and Disposition**, v. 31, n. 3, p. 312-318, 2003.
- COELHO, L. P. et al. Antinociceptive properties of ethanolic extract and fractions of *Pterodon pubescens* Benth. seeds. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, n. 1, p. 109-116, 2005.
- COLETA, M. **Caracterização fitoquímica e neurofarmacológica de plantas usadas na medicina tradicional pelas suas propriedades sedativas**. 2008. 309p. Tese (Doutorado - Área de Concentração em Farmacognosia e Fitoquímica) - Universidade de Coimbra, Coimbra, 2008.
- COUTINHO, H. D. M. et al. In vitro phototoxic activity of *Eugenia jambolana* L. and *Hyptis martiusii* Benth. **Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology**, v. 96, n. 1, p. 63-65, 2009.
- COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Rev. Virtual Química**, v. 1, n. 3, p.241-256 jul./set. 2009.
- CRUMMEY, A. et al. Inhibition of arachidonic acid-induced ear oedema as a model for assessing topical antiinflammatory compounds. **Agents Actions**, v. 20, p. 69-76, 1987.
- CRUVINEL, W. M. C. et al. Sistema imunitário – parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Rev. Bras. Reumatologia**, v. 50, n. 4, p. 434-461, 2010.
- CUNHA, P.; SILVA, A. P.; ROQUE, O. R. **Plantas e produtos vegetais em fitoterapia**. Lisboa: Calouste Gulbenkian, 2003.
- DI STASI, L.C. **Plantas medicinais: verdades e mentiras: o que os usuários e os profissionais de saúde precisam saber**. São Paulo: UNESP, 2007.
- DINIZ, F. O. et al. Influência da luz e temperatura na germinação de sementes de oiticica (*Licania rigida*, Benth). **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 39, n. 3, p. 476-480, 2008.
- ELIAS, P. M. The skin barrier as an innate immune element. **Seminars in Immunopathology**, v. 29, p. 3-14, 2007.
- ESTRADA, H. A. et al. Antiinflamatória de productos Naturales. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinas y Aromáticas**, v. 10,p. 182-217, 2011.

FARIAS, D. F. et al. Antibacterial, antioxidante, and anticholinesterase activities of plant seed extractes from brazilian semiarid region. **Biomed Reserach international**, v. 2, p. 510736, jan. 2013.

FEITOSA, E. A.; XAVIER, H. S.; PERRELLI, K. Chrysobalanaceae: Tradicional uses, Phytochemistry and Pharmacology. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 5, p.1181-1186, 2012.

FEITOSA, E. A. **Caracterização botânica, prospecção fitoquímica e atividades biológicas preliminares de *Hirtella racemosa* Lam.(Chrysobalanaceae)**. 2012. 181f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, 2012.

FELDMAN, M.; MAHON, A. T. Do cyclooxygenase-2 inhibitors provide benefits similar to those of traditional nonsteroidal anti-inflammatory drugs, with less gastrointestinal toxicity?. **Annals of Internal Medicine**, v. 132, n. 2, p. 134-143, 2000.

FERREIRA, R. T. **Efeito antinociceptivo e anti-inflamatório do extrato metanólico das partes aéreas da *Cleome spinosa* Jacq.(St. hil.)(mussambê) e de compostos flavonoides isolados**. 2011. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2011.

FIGIWARA, N.; KOBAYASHI, K.; Macrophages in inflammation. Current drug targets. **Inflammation and Allergy**, v. 4, n. 3, p. 281-286, 2005.

FRANCISCO, K. S. F. Fitoterapia: Uma opção para o tratamento odontológico. **Revista Saúde**, v. 4, n.1, p. 18-24, 2010.

GÁBOR, M. **Mouse ear inflammation models and their pharmacological applications**. Budapeste: Akadémiai Kiadó, 2000.

GÁBOR, M.; RAZGA, Z. Development and inhibition of mouse ear oedema induced with capsaicin. **Agents Actions**, v. 36, p. 83-86, 1992.

GAIND, K. N.; GUPTA, R. L. Alkanes, alkanols, triterpenes and sterols of *Kalanchoe pinnata*. **Phytochemistry**, v. 11, n. 4, p. 1500-1502, 1972.

GILLIGAN, J. P. et al. Modulation of carrageenan-induced hind paw edema by substance P. **Inflammation**, v. 18, n. 3, p. 285-292, 1994.

GOMES, M. L. et al. Usos medicinais e compositor química das folhas de *Licania macrophylla* Benth. (Chrysobalanaceae). **Rev. Bras. Farm.**, v. 87, n. 1, 2006.

GONZÁLEZ, C. Á. **Guía farmacológica de analgésicos**. Espanha: Arán Ediciones, 2007.

GOODWIN, F. K.; BUNNEY, W. E. Depressions followins reserpine: a reevaluation. **Sem Psychiatry**, v. 3, p. 435-48, 1971.

HARVEY, R. A.; CHAMPE, P. **Farmacologia Ilustrada**. Porto Alegre: Artmed, 1998.

- HENSON, P. M. Dampening inflammation. **Nature Immunology**, v. 6, n. 12, p. 1179-1181, 2005.
- HILÁRIO, M. O. E.; TERRERI, M. T.; LEN, C. A. Antiinflamatórios não-hormonais: inibidores da ciclooxigenase 2. **Jornal de Pediatria**, v. 82, n. 5, p. 206-212, 2006.
- INOUE, H.; NAGATA, N.; KOSHIHARA, Y. Profile of capsaicin-induced mouse ear oedema as neurogenic inflammatory model: Participation of serotonin in capsaicin-induced mouse ear edema. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 69, p. 61-68, 1995.
- JANCAR, S. et al. Immune complex induced pancreatitis: effect of BN 52021, a selective antagonist of platelet-activating factor. **Prostaglandins**, v. 35, n. 5, p. 757-770, 1988.
- KAWAHARA, K. et al. Prostaglandin E 2-induced inflammation: Relevance of prostaglandin E receptors. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1851, n. 4, p. 414-421, 2015.
- KINDT, T. J.; GOLDSBY, R. A.; OSBORNE, B. A. **Imunologia de Kuby**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008.
- KISS, R.; KESERU, G. M. Novel histamine H4 receptor ligands and their potential therapeutic applications: na update. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 24, n. 11, p. 1-13, 2014.
- KRAKAUER, T. The polyphenol chlorogenic acid inhibits staphylococcal exotoxin-induced inflammatory cytokines and chemokines. **Immunopharmacology and immunotoxicology**, v. 24, n. 1, p. 113-119, 2002.
- KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Robbins e Cotran: Patologia-bases patológicas das doenças**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.
- KUNNAJA, P.; WONGPALEE, S. P.; PANTHONG, A. Evaluation of anti-inflammatory, analgesic, and antipyretic activities of the ethanol extract from *Murdannia loriformis* (Hassk.) Rolla Rao et Kammathy. **BioImpacts: BI**, v. 4, n. 4, p. 183, 2014.
- LAPA, A. J. et al. **Plantas medicinais- métodos de avaliação da atividade farmacológica**. São Paulo: SBPC, 2008.
- LARSEN, G. L.; HENSON, P. M. Mediators of inflammation. **Annual Review of Immunology**, v. 1, n. 1, p. 335-359, 1983.
- LEE, P. Pharmacology of drugs used to treat osteoarthritis in veterinary practice. **Inflammopharmacology**, v. 11, n. 4, p. 385-399, 2003.
- LI, W. et al. A major ingredient of green tea rescues mice from lethal sepsis partly by inhibiting HMGB1. **Plos One**, v. 2, n. 11, p. 1153, 2007.
- LIM, H.; PARK, H.; KIM, H.P. Inhibition of contact dermatitis in animal models and suppression of proinflammatory gene expression by topically applied flavonoid, wogonin. **Archives of Pharmacological Research**, v. 27, n. 4, p. 442-448, 2004.

LONGUI, C. A. Corticoterapia: minimizando efeitos colaterais. **Jornal de Pediatria**, v. 83, n. 5, p. 163-171, 2007.

LUCETTI, D. L. **Avaliação das atividades anti-inflamatória e antinociceptiva do acetato de lupeol isolado de *Himatanthus drácticus* (MART) Plumel Apocynaceae (Janaguba)**. 2010. 101f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, 2010.

MACHADO, A.C.; OLIVEIRA, R.C. Medicamentos Fitoterápicos na odontologia: evidências e perspectivas sobre o uso da aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva* Allemão). **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v. 16, n. 2, p. 283-289, 2014.

MACIEL, M. A. M. et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MAIA, G. N. **Caatinga: Árvores e arbustos e suas utilidades**. São Paulo: D & Z, 2004.

MALONE, M. H. Pharmacological approaches to natural product and evaluating. In: WASNER, H.; WALFF, L. P. **Natural products and plant drugs with pharmacological biological or terapeutic activity**. Berlin: Spring Verlag, 1997, p. 23-56.

MARCHIONNI, A. M. T.; PAGNONCELLI, R. M.; REIS, S. R. A. Influência do meloxicam e da dexametasona no processo inflamatório e no reparo tecidual. **Revista Odonto Ciência**, PUCRS, v. 21, n. 51, jan./mar. 2006.

MARZOCCHI-MACHADO, C. M.; LUCISANO-VALIM, Y. M. Clearance de imunocomplexos: papel do complemento e dos polimorfonucleares neutrófilos. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 30, n. 2, p. 234-242, 1997.

MATOS, F. J. A. **Introdução à fitoquímica Experimental**. 2. ed. Fortaleza: UFC, 1997.

MENEZES-DE-LIMA, O. et al. Lipoxin A 4 inhibits acute edema in mice: implications for the anti-edematogenic mechanism induced by aspirin. **Prostaglandins e Other lipid Mediators**, v. 80, n. 3, p. 123-135, 2006.

MESCHER, A. L.; NEFF, A. W. Regenerative capacity and the developing immune system. **Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.**, n. 93, p. 39–66, 2005.

MESQUITA JR, D. et al. Aspectos celulares e moleculares da inflamação. **Sinopse de Reumatologia**, São Paulo, p. 66 - 81, ago. 2008.

MENDEZ, J. et al. Phytochequimal investigations of licania genus. Flavonoids and Triterpenoids and Triterpenoids fron licania pittiere. **Pharmaceutica Acta Helvetiae**, v. 70, n. 3, p. 23-226, 1995.

MEDEIROS, R. et al. Reduced skin inflammatory response in mice lacking inducible nitric oxide synthase. **Biochemical Pharmacology**, v. 78, p. 390-395, 2009.

MIRANDA, M. M. F. S. et al. Anti-herpes simplex vírus efect of a seed extract from the tropical plant *Licania tomentosa* (Benth) Fritsch (Chrysobalanaceae). **Phytomedicine**

International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology, v. 9, n. 7, p. 641-5, out. 2002.

MONTANA, F. P.; AZEVEDO, M. G. P. Drup administration: advantages and disadvantages of different ways. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, n. 20, 2013.

MOTTA, E. V. S. et al. Atividades antioxidante, antinociceptiva e anti-inflamatória das folhas de *Mucuna pruriens* (L.) DC. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 15, n. 2, p. 264-272, 2013.

MURAKAWA, M. et al. Involvement of necrosis factor (TNF)- α in phorbol ester 12-o-tetradecaoylphorbol-13-acetate (TPA)-induced skin edema in mice **Biochemical Pharmacology**, v. 71, p.1331-1336, 2006.

MURRAY, A. R. et al. Phenol-induced in vivo oxidative stress in skin: evidence for enhanced free radical generation, thiol oxidation, and antioxidant depletion. **Chemical Research Toxicology**, v. 20, n. 12, p. 1769-1777, 2007.

MURI, Estela Maris Freitas; SPOSITO, Maria Matilde M.; METSAVAHT, Leonardo. Antiinflamatórios não-esteroidais e sua farmacologia local. **Acta fisiátrica**, v. 16, n. 4, p. 186-190, 2009.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal Chromatography**, v. 1, n. 10, p. 95-111, 2004.

NATUREZA BELA. **Oiticica - Licania Rigida**. 2014. Disponível em: <<https://belezadacaatinga.blogspot.com.br/2014/09/oiticica-licania-rigida.html>>. Acesso em: 20 jan. 2017.

OLIVEIRA, C. M. B. et al. Citocinas e dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 61, n. 2, p. 255 – 265, 2011.

PAIVA, D. C. C. **Atividade anti-inflamatória e antinociceptiva do extrato hidroalcoólico da entrecasca de pseudobombax marginatum (st. hill) rob. proveniente da caatinga potiguar**. 2013. Dissertação (Mestrado Mestre em Ciências Naturais) - Faculdade de Ciências Exatas e Naturais da Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, MOSSORÓ – RN, 2013.

PARSONS, M. E.; GANELLIN, C. R. Histamine and its receptors. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, p. 127-135, 2006.

PASSOS, G. F. et al. O papel da PKC/ sinalização ERK1/ 2 em o efeito anti-inflamatório de euphol triterpeno tetracíclico sobre a inflamação da pele induzido por TPA em ratos. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 698, p. 413-420, 2003.

PAULI, J. R. et al. Glicocorticóides e síndrome metabólica: aspectos favoráveis do exercício físico nesta patofisiologia. **Rev. Port. Cien. Desp.**, v. 6, n. 2, p. 217-228, 2006.

- PERES, L. E. P. **Metabolismo secundário das plantas**. 2005. Disponível em: <<http://www.oleos essenciais.org/metabolismo-secundario-das-plantas/#introducao>> . Acesso em: 24 fev. 2017.
- PERES, L. E. P. **Metabolismo Secundário**. São Paulo: Universidade de São Paulo, 2004.
- PEREIRA, M. M. Constituintes químicos e estudo biológico de *aspidosperma nitidum* (Apocynaceae). **Rev. Bras. Planta Med.**, Botucatu, v. 8, p. n. 3, p. 1 – 8, 2007.
- PESSOA, I. P. **Caracterização Química, Atividade antioxidante e segurança de uso de sementes de licania rigida BENTH**. 2015. 92f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2015.
- PIETA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1035-1042, 2000.
- PROKSCH, E.; BRANDNER, J. M.; JENSEN, J. M. The skin: an indispensable barrier. **Experimental Dermatology**, v. 17, p. 1063-1072, 2008.
- QUEIROGA, V. P. et al. Composição química e mineral de amêndoas de oiticica em três tempos de armazenamento . **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Mossoró – RN - Brasil, v. 8, n. 2, p. 173 – 177, abr./ jun. 2013.
- QUERICHELLI , A. F. A.; RICCO, G. A. L. A. **É proibida a utilização total ou parcial deste resumo sem prévia autorização**. 2017. Disponível em: <www.disciplinas.famerp.br/patologia> . Acesso: 20 fev. 2017.
- RAEBURN, C. D. et al. Cytokines for surgeons. **The American Journal of Surgery**, v. 183, n. 3, p. 268-273, 2002.
- RAHMAN, S. Z.; SINGHAL, K. C. Problems in pharmacovigilance of medicinal products of herbal origin and means to minimize them. **Uppsalla Reports**, v.17, 2002.
- RANG, H. P. et al. **Farmacologia**. 6. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.
- REDONDO, P. et al. Differential modulation of IL-8 and TNF-alpha expresión in human keratinocytes by buflomedil chlorhydrate and pentoxifylline. **Experimental Dermatology**, v. 6, p. 186-194, 1997.
- RIBEIRO, D. et al. Proinflammatory pathways: the modulation by flavonoids. **Medicinal Research Reviews**, v. 35, n. 5, p. 877-936, 2015.
- RICHARDSON, J. D.; VASKO, M. R. Cellular mechanisms of neurogenic inflammation. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 302, n. 3, p. 839-845, 2006.
- RITTER, U.; KÖRNER, H. Divergent expression of inflammatory dermal chemokines in cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 24, n. 6, p. 295-301, 2002.

ROBBINS, R. J. Phenolic Acids in Foods: An Overview of Analytical Methodology. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 10, p. 2866-2887, 2003.

RODRIGUES, A. G.; SIMONI, C. Plantas Medicinais no contexto de políticas públicas. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v. 31, n. 255, p.7-12, mar./abr. 2010.

SALVEMINI, D. et al. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. **British Journal of Pharmacology**, v. 118, n. 4, p. 829-838, 1996.

SAMPAIO, S. A. P.; RIVITTI, E. A. **Dermatologia**. 2 ed. São Paulo: Arte Médica, 2000.

SCHENKEL, E. P.; MENGUE, S.S.; PETROVICK, P. R. **Cuidados com os medicamentos**. 4. ed. Porto Alegre: UFRGS, 2004.

SCHMITTA, E. M. M. et al. Genotoxic activity of four metabolites of the soy isoflavone daidzein. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 542, p. 43-48, 2003.

SIANI, A. C.; MICHILES, E. Medicamentos de origem vegetal: cenário atual de desenvolvimento, produção e mercado. **Fármacos e Medicamentos**, v. 37, p. 14-18, 2005.

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

SILVA, A. A. L. et al. Avaliação das propriedades físico-químicas do óleo de semente verde de oiticica e produção do seu biodiesel, utilizando iodo como catalisador. **Química Ciência, Tecnologia e Sociedade**, v. 3, n. 2, 2014.

SILVA, C. M. A. **Metabólitos secundários de plantas do semi-árido de Pernambuco – uma inovação no controle de fitopatógenos**. 2013. 109f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.

SILVA, F. O. C.; MACEDO, D. V. Exercício físico, processo inflamatório e adaptação: uma visão geral. **Revista Brasileira de Cineantropometria e Desempenho Humano**, v. 13, n. 4, p. 320–328, 2011.

SILVA, G. A. **Avaliação de atividades farmacológicas e toxicidade de plantas medicinais do semiárido do Nordeste brasileiro**. 2015. 190f. Tese (Doutorado em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2015.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: Da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2010.

SIMONS, F. E. R. **Histamine and H1-antihistamines in allergic disease**. 2. ed. New York: Marcel Dekker, 2002.

SOARES, A. K. A. et al. Avaliação da segurança clínica de um fitoterápico contendo Mikania glomerata, Grindelia robusta, Copaifera officinalis, Myroxylon toluifera, Nasturtium

officinale, própolis e mel em voluntários saudáveis. **Rev. Bras. Farmacogn**, v. 16, p. 447-454, 2006.

SOARES, S. E. Phenolic acids as antioxidants. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71-81, 2002.

SPENCER, J. P. E. et al. Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: strengths, limitations and application in nutrition research. **British Journal of Nutrition**, v. 99, n. 01, p. 12-22, 2008.

STANLEY, P. L. et al. Mouse skin inflammation induced by multiple topical application of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. **Journal of Pharmacological and Biophysiological Research**, v. 4, n. 4, 1991.

STOCKER, R.; KEANEY, J. F. Role of oxidative modifications in atherosclerosis. **Physiological Reviews**, v. 84, n. 4, p. 1381-1478, 2004.

STRUMEYER, D. H.; MALIN, M. J. Condensed tannins in grain sorghum: isolation, fractionation, and characterization. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **Washington DC**, v. 23, n. 5, p. 909-914, 1975.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed. 2009.

TAVARES, M. S. **Influência do cortisol na coagulação sanguínea**. 2012. Disponível em: <<https://corticoides.wordpress.com/2012/06/01/influencia-do-cortisol-na-coagulacao-sanguinea/>>. Acesso: 23 fev. 2017.

TEAM, R. C. R. **A language and environment for statistical computing**. Austria: R Foundation for Statistical Computing, 2014.

THURMOND, R. L.; GERFAND, E. W.; DUNFORD, P. J. The role of histamine H1 and H4 receptors in allergic inflammation: The search for new antihistamines. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 7, p. 41-53, 2008.

THURMOND, R. L. et al. A potent and selective histamine H4 receptor antagonist with anti-inflammatory properties. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 309, n. 1, p. 404-413, 2004.

TILIGADA, E. et al. Histamine H3 and H4 receptors as novel drug targets. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 18, n. 10, p. 1519-1532, 2009.

TJALSEN, A. et al. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, v. 51, p.5-17. 1992.

TOTES, R. **Inflamação: eventos essenciais**. 2011. Disponível em: <<https://pt.slideshare.net/raytostes/aula-de-inflamacao>>. Acesso: 21 fev. 2017.

TUBARO, A. et al. The croton oil test revisited. **Agents Actions**, v. 17, p. 347-349, 1985.

UNIVERSIDADE CASTELO BRANCO. **A pele como órgão, estrutura, fisiologia e funções**. 2017. Disponível em: < <http://livrozilla.com/doc/104699/a-pele-como-org%C3%A3o.-estrutura--fisiologia-e-fun%C3%A7%C3%B5es> > . Acesso: 22 fev. 2017.

VARALDA, D. B.; MOTTA, A. A. Reações adversas aos anti-inflamatórios não esteroidais. **Rev. Bras. Alerg. Immunopatol**, v. 32, p. 27-33, 2009.

VEIGA JUNIOR, V. F. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Rev. Bras. Farmacogn**, v. 18, n. 2, p. 308-13, 2002.

VEIGA JUNIOR, V. F.; MELLO, J. C. As monografias sobre plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 464-471, 2008.

VILLAS-BÔAS, L. B. **Estudo dos constituintes químicos ansiolíticos e sedativos de Passiflora actínia Hook., Passifloraceae**. 2017. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, 2007.

VIEIRA, J. M. A. et al. Caracterização físico-química e reológica do óleo de oiticica para produção de biodiesel. IV CONGRESSO BRASILEIRO DE MAMONA E I SIMPÓSIO INTERNACIONAL DE OLEAGINOSAS ENERGÉTICAS, 1, 2010, João Pessoa. Inclusão Social e Energia: **Anais...** Campina grande: Embrapa Algodão, 2010. p. 55-59.

VELASCO, M. V. R. et al. Rejuvenescimento da pele por peeling químico: enfoque no peeling de fenol Facial skin rejuvenation by chemical peeling: focus on phenol peeling. **An. Bras. Dermatol.**, v. 79, n. 1, p. 91-99, 2004.

WAGNER, J. G.; ROTH, R. A. Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. **Pharmacological Reviews**, Bethesda, v. 52, n. 3, p. 349-374, 2000.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **The world medicine situation 2011: traditional medicines: global situation, issues and challenges**. Geneva: WHO, 2011.

WITKAMP, R.; MONSHOUWER, M, Signal transduction in inflammatory processes, current and future therapeutic targets: a mini review. **Veterinary Quarterly**, v. 22, n. 1, p. 11-6, 2000.

YAKANDAWALA, D.; MORTON, C. M.; PRANCE, G. T. Phylogenetic Relationships of the Chrysobalanaceae inferred from chloroplast, nuclear, and morphological data. **Ann Missouri Bot. Gard**, v. 97, p. 259-281, 2010.

YOON, Joo-Heon; BAEK, Seung Joon. Molecular targets of dietary polyphenols with anti-inflammatory properties. **Yonsei Medical Journal**, v. 46, n. 5, p. 585-596, 2005.

ANEXOS



ANEXO A



Ministério do Meio Ambiente - MMA
 Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio
 Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 54896-1	Data da Emissão: 12/07/2016 12:11	Data para Revalidação*: 11/08/2017
* De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

Dados do titular

Nome: Enaide Soares Santos	CPF: 014.374.333-32
Título do Projeto: AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA DE <i>Licania rígida</i> Benth (órtica) EM ROEDORES	
Nome da Instituição : Universidade Regional do Cariri	CNPJ: 06.740.864/0001-26

Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	coleta das folhas de <i>Licania rígida</i>	08/2016	07/2017

Observações e ressalvas

1	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passado, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
2	Esta autorização NÃO exime o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, possessor ou morador do área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
3	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
4	A autorização para envio ao exterior de material biológico não consignado deverá ser requerida por meio do endereço eletrônico www.ibama.gov.br (Serviços on-line - Licenças para importação ou exportação de flora e fauna - CITES e não CITES).
5	O titular de licença ou autorização e os membros de sua equipe deverão apelar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição <i>in situ</i> .
6	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
7	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em www.mma.gov.br/gen .
8	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DATAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infra-estrutura da unidade.

Outras ressalvas

1	Portar a autorização nas atividades de coleta e transporte do material biológico. Comunicar à APA Chapada do Araripe o início das atividades de coleta. A coleta em propriedades privadas necessita de autorização dos proprietários.
---	---

Locais onde as atividades de campo serão executadas

#	Município	UF	Descrição do local	Tipo
1		CE	ÁREA DE PROTEÇÃO AMBIENTAL CHAPADA DO ARARIPE	UC Federal

Atividades X Táxons

#	Atividade	Táxons
1	Coleta/transporte de material botânico, fúngico ou microbiológico	<i>Licania rígida</i>

Este documento (Autorização para atividades com finalidade científica) foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet (www.icmbio.gov.br/sisbio).

Código de autenticação: 42268788



Página 1/3

ANEXO B



Herbário Caririense Dárdano de Andrade – Lima
Universidade Regional do Cariri - URCA

Número de Herbário

Remetente: Nº 16.2016

HERBÁRIO CARIENSE DÁRDANO DE ANDRADE-LIMA (HCDAL/URCA)
Contato: Dra. Maria Arlene Pessoa da Silva (herbario@urca.br)
Universidade Regional do Cariri - URCA
Departamento de Ciências Biológicas
Rua: Cel. Antonio Luiz, 1161
Campus Pimenta
Crato – Ceará - Brasil
CEP: 63.105-100

Destinatário: Data: 20.09.2016

Contato: Enaldo Soares Santos
Universidade Regional do Cariri
Laboratório de Farmacologia e Química Molecular

Nº Amostras: 01 Tipo de Operação: Número de Herbário

Nº HERBÁRIO	NOME POPULAR	FAMÍLIA	NOME CIENTÍFICO	RESPONSÁVEL	
01	12.344	Oititeira	<i>Chrysobalanaceae</i>	<i>Eleania rigida</i> Benth.	Ana Moraes Mendonça


 Dra. Maria Arlene Pessoa da Silva
 Curadora do HCDAL

ANEXO C



UNIVERSIDADE REGIONAL DO CARIRI - URCA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COMISSÃO DE EXPERIMENTAÇÃO E USO DE ANIMAIS
Rua Cel. Antonio Luis 1101, Pimenta
Fones: (088) 3102.1291 / Fax: (088) 3102.1291
CEP 83105-000 – Crato - CE - Brasil
propp@urca.br - www.urca.br/ceua



DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o projeto intitulado "AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DE *Licania rigida* Benth (oiticeia) EM ROEDORES" Processo N.º 00030/2016.2 foi **APROVADO** pela Comissão de experimentação e Uso de Animais – CEUA/URCA.

Roseli Barbosa
Presidente do CEUA/URCA

CRATO-CE
2016

	Diminuída								
	Coloração								
	3. Diarreia								
	4. Contorção abdominal								
	5. Reação de fuga								
	6. Passividade								
	7. Agressividade								
	8. Grunhidos								
	9. Sialorréia								
	10. Fasciculações								
	11. Midríase								
	12. Ereção de cauda								
	13. Tremor de cauda								
	14. Piloereção								
	15. Amontoados no canto (Hipotermia)								
	16. Cromodaciorréia								
	17. Secreção brônquica								
	18. Sudorese (sinal colinérgico)								
	19. Letargia								
	20. Coma								

APÊNDICE



Fonte: Desenhado por NASCIMENTO, J.B. (2016).

Apêndice A. Resultado em porcentagem do efeito anti-inflamatório do Extrato Hidroalcoólico das Folhas de *Licania rigida* (EHFLR), no modelo de edema de pata induzido com carragenina em relação ao grupo controle.

Tratamento	Carragenina			
	Inibição (%)/ media \pm E.P.M			
	T1	T2	T3	T4
Salina (controle)	(27,1 \pm 1,1)	(43,1 \pm 3,9)	(49,5 \pm 2,6)	(43,7 \pm 1,2)
25 mg/kg EHFLR	7% (25,2 \pm 2,6)	23,8% (32,7 \pm 1,8)	29,1%(35,1 \pm 2,1)	30,77% (30,2 \pm 3,5)
50 mg/kg EHFLR	1% (28,1 \pm 6)	14,32%(36,8 \pm 3,8)	29,4(34,9 \pm 3,6)	30,73(30,2 \pm 2,9)
100 mg/kg Indometacina -	2,4%(26,4 \pm 4,9)	18,62%(35,1 \pm 3,3)	22,26(38,5 \pm 0,9)	19,88(35,1 \pm 0,8)
10mg/mL	44,1%(15,1 \pm 3,5)	34,82(28,1 \pm 6,0)	34,89(32,2 \pm 1,9)	32,17(29,6 \pm 2,9)

*Os valores são médias \pm EPM de 6 animais por grupo. Análises estatísticas obtidas pela análise de Variância (ANOVA) de duas vias. Tempo (1,2,3,4); Extrato Hidroalcoólico das Folhas de *Licania rigida* (EHFLR).

Apêndice B. Resultado em porcentagem do efeito anti-inflamatório do Extrato Hidroalcoólico das Folhas de *Licania rigida* (EHFLR), no modelo de edema de pata induzido com Dextrana em relação ao grupo controle.

Tratamento	Dextrana			
	Inibição (%) / média ± E.P.M			
	T1	T2	T3	T4
Salina (controle)	(43,8± 1,9)	(62,0± 2,5)	(65,1 ± 1,9)	(54,3 ± 2,8)
EHFLR 25 mg/kg	62,3% (16,5± 1,1)	52,4% (29,4± 1,6)	44,5% (36,1 ± 1,1)	41,2% (31,9± 1,8)
EHFLR 50 mg/kg	14,7% (37,3±2,4)	26,19% (45,8 ± 2,6)	19,3% (52,5± 2,1)	10,3% (48,7±2,7)
EHFLR 100 mg/kg	37,8% (27,2± 0,9)	37,8% (38,5±1,3)	8,7% (59,4± 3,2)	2,9% (52,7±2,8)
Prometazina - 6mg/mL	78,1% (9,6±0,4)	70,4% (18,3±0,6)	47,7% (34,1±1,5)	49,17% (27,6 ± 1,4)

*Os valores são médias ± EPM de 6 animais por grupo. Análises estatísticas obtidas pela análise de Variância (ANOVA). Tempo (1,2,3,4); Extrato Hidroalcoólico das Folhas de *Licania rigida* (EHFLR)

Apêndice C. Resultado em porcentagem do efeito anti-inflamatório do Extrato Hidroalcoólico das Folhas de *Licania rigida* EHFLR, no modelo de edema de pata induzido com Histamina em relação ao grupo controle.

Tratamento	Histamina			
	Inibição (%) / média ± E.P.M			
	T1	T2	T3	T4
Salina (controle)	(44,6± 0,8)	(60,8± 2,7)	(50,3 ± 1,5)	(24,6 ± 0,8)
EHFLR 25 mg/kg Prometazina - 6mg/mL	19,71%(35,8±2,4) 36,29% (28,4±1,8)	39,14% (37,0 ± 1,8) 46,26% (32,7±2,1)	46,64% (35,8±2,4) 49,26% (25,5± 2,1)	5,34% (23,3±0,8) 18,42% (20,1±1,3)

*Os valores são médias ± EPM de 6 animais por grupo. Análises estatísticas obtidas pela análise de Variância (ANOVA). Tempo (1,2,3,4); Extrato Hidroalcoólico das Folhas de *Licania rigida* (EHFLR).

Apêndice D. Resultado em porcentagem do efeito anti-inflamatório do Extrato Hidroalcoólico das Folhas de *Licania rigida* (EHFLR), no modelo de edema de pata induzido com Ácido araquidônico em relação ao grupo controle.

Tratamento	Ácido araquidônico			
	Inibição (%) / media ± E.P.M			
	T1	T2	T3	T4
Salina (controle)	(53,7± 4,6)	(90,4± 2,7)	(105,7 ± 1,2)	(43,7 ± 1,2)
EHFLR 25 mg/kg Indometacina - 10mg/mL	16,83% (44±2,1) 22,85% (41,4±1,7)	12,49% (79,1 ± 2,0) 52,22% (43,2±0,4)	18,33% (86,3±2,6) 44,71% (58,4± 1,3)	-% (43,4±1,1) 32,17% (29,6±2,9)

*Os valores são médias ± EPM de 6 animais por grupo. Análises estatísticas obtidas pela análise de Variância (ANOVA). Tempo (1,2,3,4); Extrato Hidroalcoólico das Folhas de *Licania rigida* (EHFLR).

APÊNDICE E - Coluna estatística da redução do edema de pata induzido por carragenina

TRATAMENTO	TEMPO	A			B			C			TRATAMENTO	TEMPO	D			E		
		Mean	SEM	N	Mean	SEM	N	Mean	SEM	N			Mean	SEM	N	Mean	SEM	N
		salina			indometacina 10 mg/kg			25mg/kg					50mg/kg			100mg/kg		
1	T0	0.000	0.000	6	0.000	0.000	6	0.000	0.000	6	1	T0	0.000	0.000	6	0.000	0.000	6
2	T1	27.122	1.126	6	15.172	3.537	6	25.222	2.646	6	2	T1	28.157	6.075	6	26.456	4.934	6
3	T2	43.016	3.925	6	28.039	6.020	6	32.779	1.838	6	3	T2	36.851	3.840	6	35.004	3.325	6
4	T3	49.587	2.603	6	32.289	1.923	6	35.163	2.134	6	4	T3	34.998	3.655	6	38.546	0.992	6
5	T4	43.705	1.292	6	29.640	2.905	6	30.253	3.555	6	5	T4	30.270	2.927	6	35.015	0.850	6
6											6							
7											7							

APÊNDICE E1 - *Analyse* do teste de edema de pata induzido por carragenina

2way ANOVA Multiple comparisons		A	B	C	D
		Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C	Data Set-D
		Y	Y	Y	Y
19	50mg/kg vs. 100mg/kg	0.0	-8.741 to 8.741	No	ns
20					
21	T1				
22	salina vs. indometacina 10 mg/kg	11.95	3.209 to 20.69	Yes	**
23	salina vs. 25mg/kg	1.900	-6.841 to 10.64	No	ns
24	salina vs. 50mg/kg	-1.035	-9.776 to 7.706	No	ns
25	salina vs. 100mg/kg	0.6662	-8.075 to 9.408	No	ns
26	indometacina 10 mg/kg vs. 25mg/kg	-10.05	-18.79 to -1.309	Yes	*
27	indometacina 10 mg/kg vs. 50mg/kg	-12.99	-21.73 to -4.244	Yes	***
28	indometacina 10 mg/kg vs. 100mg/kg	-11.28	-20.03 to -2.543	Yes	**
29	25mg/kg vs. 50mg/kg	-2.935	-11.68 to 5.806	No	ns
30	25mg/kg vs. 100mg/kg	-1.234	-9.975 to 7.507	No	ns
31	50mg/kg vs. 100mg/kg	1.701	-7.040 to 10.44	No	ns
2way ANOVA Multiple comparisons		A	B	C	D
		Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C	Data Set-D
		Y	Y	Y	Y
32					
33	T2				
34	salina vs. indometacina 10 mg/kg	14.98	6.236 to 23.72	Yes	****
35	salina vs. 25mg/kg	10.24	1.495 to 18.98	Yes	*
36	salina vs. 50mg/kg	6.165	-2.576 to 14.91	No	ns
37	salina vs. 100mg/kg	8.012	-0.7291 to 16.75	No	ns
38	indometacina 10 mg/kg vs. 25mg/kg	-4.741	-13.48 to 4.001	No	ns
39	indometacina 10 mg/kg vs. 50mg/kg	-8.812	-17.55 to -0.07076	Yes	*
40	indometacina 10 mg/kg vs. 100mg/kg	-6.965	-15.71 to 1.777	No	ns
41	25mg/kg vs. 50mg/kg	-4.072	-12.81 to 4.670	No	ns
42	25mg/kg vs. 100mg/kg	-2.224	-10.97 to 6.517	No	ns
43	50mg/kg vs. 100mg/kg	1.847	-6.894 to 10.59	No	ns
44					
45	T3				
46	salina vs. indometacina 10 mg/kg	17.30	8.556 to 26.04	Yes	****
47	salina vs. 25mg/kg	14.42	5.682 to 23.16	Yes	***
48	salina vs. 50mg/kg	14.59	5.847 to 23.33	Yes	***
49	salina vs. 100mg/kg	11.04	2.299 to 19.78	Yes	**
50	indometacina 10 mg/kg vs. 25mg/kg	-2.874	-11.62 to 5.867	No	ns
51	indometacina 10 mg/kg vs. 50mg/kg	-2.709	-11.45 to 6.032	No	ns
52	indometacina 10 mg/kg vs. 100mg/kg	-6.257	-15.00 to 2.484	No	ns
53	25mg/kg vs. 50mg/kg	0.1651	-8.576 to 8.906	No	ns
54	25mg/kg vs. 100mg/kg	-3.383	-12.12 to 5.359	No	ns
55	50mg/kg vs. 100mg/kg	-3.548	-12.29 to 5.193	No	ns
56					

Continua...

Continuação...

57	T4				
58	salina vs. indometacina 10 mg/kg	14.06	5.323 to 22.81	Yes	***
59	salina vs. 25mg/kg	13.45	4.711 to 22.19	Yes	***
60	salina vs. 50mg/kg	13.43	4.694 to 22.18	Yes	***
61	salina vs. 100mg/kg	8.690	-0.05102 to 17.43	No	ns
62	indometacina 10 mg/kg vs. 25mg/kg	-0.6124	-9.354 to 8.129	No	ns
63	indometacina 10 mg/kg vs. 50mg/kg	-0.6297	-9.371 to 8.112	No	ns
64	indometacina 10 mg/kg vs. 100mg/kg	-5.374	-14.12 to 3.367	No	ns
65	25mg/kg vs. 50mg/kg	-0.01736	-8.759 to 8.724	No	ns
66	25mg/kg vs. 100mg/kg	-4.762	-13.50 to 3.979	No	ns
67	50mg/kg vs. 100mg/kg	-4.745	-13.49 to 3.997	No	ns
68					

Conclusão.

APÊNDICE F-1 - Análise do teste de edema de pata induzido por dextrana

2way ANOVA Multiple comparisons		A	B	C	D
		Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C	Data Set-D
		Y	Y	Y	Y
1	Within each row, compare columns (simple effects within rows)				
2					
3	Number of families	5			
4	Number of comparisons per family	10			
5	Alpha	0.05			
6					
7	Bonferroni's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary
8					
9	T0				
10	SALINA vs. Prometazina 6mg/kg	0.0	-6.845 to 6.845	No	ns
11	SALINA vs. 25mg/kg	0.0	-6.845 to 6.845	No	ns
12	SALINA vs. 50mg/kg	0.0	-6.845 to 6.845	No	ns
13	SALINA vs. 100mg/kg	0.0	-6.845 to 6.845	No	ns
14	Prometazina 6mg/kg vs. 25mg/kg	0.0	-6.845 to 6.845	No	ns
15	Prometazina 6mg/kg vs. 50mg/kg	0.0	-6.845 to 6.845	No	ns
16	Prometazina 6mg/kg vs. 100mg/kg	0.0	-6.845 to 6.845	No	ns
17	25mg/kg vs. 50mg/kg	0.0	-6.845 to 6.845	No	ns
18	25mg/kg vs. 100mg/kg	0.0	-6.845 to 6.845	No	ns
19	50mg/kg vs. 100mg/kg	0.0	-6.845 to 6.845	No	ns
20					
21	T1				
22	SALINA vs. Prometazina 6mg/kg	34.24	27.39 to 41.08	Yes	****
23	SALINA vs. 25mg/kg	27.32	20.48 to 34.17	Yes	****
24	SALINA vs. 50mg/kg	6.444	-0.4015 to 13.29	No	ns
25	SALINA vs. 100mg/kg	16.58	9.737 to 23.43	Yes	****
26	Prometazina 6mg/kg vs. 25mg/kg	-6.916	-13.76 to -0.07122	Yes	*
27	Prometazina 6mg/kg vs. 50mg/kg	-27.79	-34.64 to -20.95	Yes	****
28	Prometazina 6mg/kg vs. 100mg/kg	-17.66	-24.50 to -10.81	Yes	****
29	25mg/kg vs. 50mg/kg	-20.88	-27.72 to -14.03	Yes	****
30	25mg/kg vs. 100mg/kg	-10.74	-17.58 to -3.894	Yes	***
31	50mg/kg vs. 100mg/kg	10.14	3.293 to 16.98	Yes	***
32					

Continua...

Continuação...

2way ANOVA Multiple comparisons		A	B	C	D
		Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C	Data Set-D
		Y	Y	Y	Y
32					
33	T2				
34	SALINA vs. Prometazina 6mg/kg	43.74	36.89 to 50.58	Yes	****
35	SALINA vs. 25mg/kg	32.59	25.75 to 39.44	Yes	****
36	SALINA vs. 50mg/kg	16.26	9.416 to 23.11	Yes	****
37	SALINA vs. 100mg/kg	23.49	16.65 to 30.34	Yes	****
38	Prometazina 6mg/kg vs. 25mg/kg	-11.15	-17.99 to -4.300	Yes	***
39	Prometazina 6mg/kg vs. 50mg/kg	-27.48	-34.32 to -20.63	Yes	****
40	Prometazina 6mg/kg vs. 100mg/kg	-20.25	-27.09 to -13.40	Yes	****
41	25mg/kg vs. 50mg/kg	-16.33	-23.18 to -9.487	Yes	****
42	25mg/kg vs. 100mg/kg	-9.101	-15.95 to -2.256	Yes	**
43	50mg/kg vs. 100mg/kg	7.231	0.3860 to 14.08	Yes	*
44					
45	T3				
46	SALINA vs. Prometazina 6mg/kg	31.06	24.22 to 37.91	Yes	****
47	SALINA vs. 25mg/kg	29.00	22.15 to 35.84	Yes	****
48	SALINA vs. 50mg/kg	12.59	5.750 to 19.44	Yes	****
49	SALINA vs. 100mg/kg	5.705	-1.140 to 12.55	No	ns
50	Prometazina 6mg/kg vs. 25mg/kg	-2.067	-8.912 to 4.778	No	ns
51	Prometazina 6mg/kg vs. 50mg/kg	-18.47	-25.31 to -11.62	Yes	****
52	Prometazina 6mg/kg vs. 100mg/kg	-25.36	-32.20 to -18.51	Yes	****
53	25mg/kg vs. 50mg/kg	-16.40	-23.25 to -9.555	Yes	****
54	25mg/kg vs. 100mg/kg	-23.29	-30.14 to -16.45	Yes	****
55	50mg/kg vs. 100mg/kg	-6.890	-13.73 to -0.04468	Yes	*
56					
57	T4				
58	SALINA vs. Prometazina 6mg/kg	26.67	19.82 to 33.51	Yes	****
59	SALINA vs. 25mg/kg	22.41	15.56 to 29.25	Yes	****
60	SALINA vs. 50mg/kg	5.602	-1.243 to 12.45	No	ns
61	SALINA vs. 100mg/kg	1.581	-5.264 to 8.426	No	ns
62	Prometazina 6mg/kg vs. 25mg/kg	-4.260	-11.11 to 2.585	No	ns
63	Prometazina 6mg/kg vs. 50mg/kg	-21.07	-27.91 to -14.22	Yes	****
64	Prometazina 6mg/kg vs. 100mg/kg	-25.09	-31.93 to -18.24	Yes	****
65	25mg/kg vs. 50mg/kg	-16.81	-23.65 to -9.961	Yes	****
66	25mg/kg vs. 100mg/kg	-20.83	-27.67 to -13.98	Yes	****
67	50mg/kg vs. 100mg/kg	-4.021	-10.87 to 2.824	No	ns

Conclusão.

APÊNDICE G-1 *Analyse* do Teste de Edema de Pata induzido por Histamina

2way ANOVA Multiple comparisons		A	B	C	D
		Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C	Data Set-D
		Y	Y	Y	Y
1	Within each row, compare columns (simple effects within rows)				
2					
3	Number of families	5			
4	Number of comparisons per family	3			
5	Alpha	0.05			
6					
7	Bonferroni's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary
8					
9	T0				
10	salina vs. prometazina 6mg/kg	0.0	-4.741 to 4.741	No	ns
11	salina vs. 25mg/kg	0.0	-4.741 to 4.741	No	ns
12	prometazina 6mg/kg vs. 25mg/kg	0.0	-4.741 to 4.741	No	ns
13					
14	T1				
15	salina vs. prometazina 6mg/kg	16.22	11.48 to 20.96	Yes	****
16	salina vs. 25mg/kg	8.806	4.065 to 13.55	Yes	***
17	prometazina 6mg/kg vs. 25mg/kg	-7.411	-12.15 to -2.670	Yes	**
2way ANOVA Multiple comparisons		A	B	C	D
		Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C	Data Set-D
		Y	Y	Y	Y
18					
19	T2				
20	salina vs. prometazina 6mg/kg	28.16	23.42 to 32.90	Yes	****
21	salina vs. 25mg/kg	23.82	19.08 to 28.56	Yes	****
22	prometazina 6mg/kg vs. 25mg/kg	-4.336	-9.077 to 0.4046	No	ns
23					
24	T3				
25	salina vs. prometazina 6mg/kg	24.81	20.07 to 29.55	Yes	****
26	salina vs. 25mg/kg	14.48	9.740 to 19.22	Yes	****
27	prometazina 6mg/kg vs. 25mg/kg	-10.33	-15.07 to -5.593	Yes	****
28					
29	T4				
30	salina vs. prometazina 6mg/kg	4.550	-0.1907 to 9.291	No	ns
31	salina vs. 25mg/kg	1.321	-3.419 to 6.062	No	ns
32	prometazina 6mg/kg vs. 25mg/kg	-3.229	-7.969 to 1.512	No	ns

APÊNDICE H1 *Analyse* do Teste de Edema de Pata induzido por Ácido Araquidônico

2way ANOVA Multiple comparisons		A	B	C	D
		Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C	Data Set-D
		Y	Y	Y	Y
1	Within each row, compare columns (simple effects within rows)				
2					
3	Number of families	5			
4	Number of comparisons per family	3			
5	Alpha	0.05			
6					
7	Bonferroni's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary
8					
9	T0				
10	salina vs. indometacina 10 mg/kg	0.0	-5.686 to 5.686	No	ns
11	salina vs. 25mg/kg	0.0	-5.686 to 5.686	No	ns
12	indometacina 10 mg/kg vs. 25mg/kg	0.0	-5.686 to 5.686	No	ns
13					
14	T1				
15	salina vs. indometacina 10 mg/kg	12.29	6.605 to 17.98	Yes	****
16	salina vs. 25mg/kg	9.046	3.360 to 14.73	Yes	***
17	indometacina 10 mg/kg vs. 25mg/kg	-3.246	-8.932 to 2.441	No	ns
2way ANOVA Multiple comparisons		A	B	C	D
		Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C	Data Set-D
		Y	Y	Y	Y
18					
19	T2				
20	salina vs. indometacina 10 mg/kg	47.24	41.55 to 52.93	Yes	****
21	salina vs. 25mg/kg	11.30	5.616 to 16.99	Yes	****
22	indometacina 10 mg/kg vs. 25mg/kg	-35.94	-41.62 to -30.25	Yes	****
23					
24	T3				
25	salina vs. indometacina 10 mg/kg	47.27	41.58 to 52.95	Yes	****
26	salina vs. 25mg/kg	19.38	13.69 to 25.06	Yes	****
27	indometacina 10 mg/kg vs. 25mg/kg	-27.89	-33.57 to -22.20	Yes	****
28					
29	T4				
30	salina vs. indometacina 10 mg/kg	14.06	8.378 to 19.75	Yes	****
31	salina vs. 25mg/kg	0.2507	-5.436 to 5.937	No	ns
32	indometacina 10 mg/kg vs. 25mg/kg	-13.81	-19.50 to -8.128	Yes	****

APÊNDICE I - Coluna Estatística do teste de peritonite - Contagem de Granulócitos

Col. stats		A	B	C
		Salina	Dexametasona 5 mg/kg	EHFLR 25mg/kg
		Y	Y	Y
1	Number of values	5	5	5
2				
3	Minimum	84.20	30.00	40.00
4	25% Percentile	85.10	30.60	40.95
5	Median	86.90	35.00	42.20
6	75% Percentile	87.95	38.95	50.95
7	Maximum	88.00	39.00	51.00
8				
9	Mean	86.60	34.82	45.20
10	Std. Deviation	1.570	4.198	5.316
11	Std. Error of Mean	0.7021	1.877	2.378
12				
13	Lower 95% CI of mean	84.65	29.61	38.60
14	Upper 95% CI of mean	88.55	40.03	51.80
15				
16	Sum	433.0	174.1	226.0

APÊNDICE I 1 Analyse do Teste de peritonite - Contagem de Granulócitos

1way ANOVA Multiple comparisons					
1	Number of families	1			
2	Number of comparisons per family	2			
3	Alpha	0.05			
4					
5	Bonferroni's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary
6					
7	Salina vs. Dexamentasona 5 mg/kg	51.78	45.28 to 58.28	Yes	****
8	Salina vs. EHFLR 25mg/kg	41.40	34.90 to 47.90	Yes	****

APÊNDICE J - Coluna Estatística do teste de peritonite - Contagem de Monócitos

Col. stats		A	B	C	D
		Naive	salina	Dexametasona 5 mg/kg	25mg/kg
		Y	Y	Y	Y
1	Number of values	5	5	5	5
2					
3	Minimum	1.400	3.900	1.100	2.200
4	25% Percentile	1.450	4.000	1.200	2.250
5	Median	1.700	4.400	1.400	2.300
6	75% Percentile	1.900	4.750	1.500	2.750
7	Maximum	1.900	4.900	1.500	2.900
8					
9	Mean	1.680	4.380	1.360	2.460
10	Std. Deviation	0.2280	0.3962	0.1673	0.2881
11	Std. Error of Mean	0.1020	0.1772	0.07483	0.1288
12					
13	Lower 95% CI of mean	1.397	3.888	1.152	2.102
14	Upper 95% CI of mean	1.963	4.872	1.568	2.818
15					
16	Sum	8.400	21.90	6.800	12.30

APÊNDICE J1 Analyse do Teste de peritonite - Contagem de Monócitos

1way ANOVA Multiple comparisons					
1	Number of families	1			
2	Number of comparisons per family	2			
3	Alpha	0.05			
4					
5	Bonferroni's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary
6					
7	salina vs. Dexametasona 5 mg/kg	3.020	2.536 to 3.504	Yes	****
8	salina vs. 25mg/kg	1.920	1.436 to 2.404	Yes	****

APÊNDICE K - Coluna Estatística do teste de peritonite - Contagem de Linfócitos

Col. stats		A	B	C
		Salina	Dexametasona 5 mg/kg	25mg/kg
		Y	Y	Y
1	Number of values	5	5	5
2				
3	Minimum	60.00	20.60	40.00
4	25% Percentile	63.20	21.00	43.20
5	Median	68.80	24.80	58.80
6	75% Percentile	69.40	25.50	63.90
7	Maximum	69.80	26.00	68.80
8				
9	Mean	66.80	23.56	54.60
10	Std. Deviation	4.007	2.397	11.39
11	Std. Error of Mean	1.792	1.072	5.094
12				
13	Lower 95% CI of mean	61.82	20.58	40.46
14	Upper 95% CI of mean	71.78	26.54	68.74
15				
16	Sum	334.0	117.8	273.0

APÊNDICE K1 *Analyse* do Teste de peritonite - Contagem de Linfócitos

1way ANOVA Multiple comparisons					
1	Number of families	1			
2	Number of comparisons per family	2			
3	Alpha	0.05			
4					
5	Bonferroni's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary
6					
7	Salina vs. Dexametasona 5 mg/kg	43.24	31.73 to 54.75	Yes	****
8	Salina vs. 25mg/kg	12.20	0.6915 to 23.71	Yes	*

APÊNDICE L Coluna estatística do Teste de Azul de Evans

Col. stats		A	B	C	D
		Control	NAIVE	Dexametasona 5 mg/kg	25 mg/kg
		Y	Y	Y	Y
1	Number of values	6	6	6	6
2					
3	Minimum	0.5608	0.1750	0.2175	0.2417
4	25% Percentile	0.5950	0.1975	0.2199	0.2455
5	Median	0.6290	0.2225	0.2472	0.2629
6	75% Percentile	0.6740	0.2965	0.2743	0.2902
7	Maximum	0.7028	0.3010	0.2760	0.3292
8					
9	Mean	0.6321	0.2368	0.2470	0.2701
10	Std. Deviation	0.04864	0.05050	0.03001	0.03184
11	Std. Error of Mean	0.01986	0.02061	0.01225	0.01300
12					
13	Lower 95% CI of mean	0.5810	0.1838	0.2155	0.2367
14	Upper 95% CI of mean	0.6831	0.2898	0.2785	0.3035
15					
16	Sum	3.792	1.421	1.482	1.621

APÊNDICE L 1 *Analyse* do Teste de Azul de Evans

1way ANOVA Multiple comparisons					
1	Number of families	1			
2	Number of comparisons per family	2			
3	Alpha	0.05			
4					
5	Bonferroni's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary
6					
7	Control vs. Dexametasona 5 mg/kg	0.3850	0.3307 to 0.4393	Yes	****
8	Control vs. 25 mg/kg	0.3619	0.3076 to 0.4162	Yes	****

APÊNDICE M- Coluna Estatística da redução do edema de orelha induzido pela aplicação única de óleo de cróton

Col. stats		A	B	C	D	E	F	G	H
		salina	dexametasona	5mg/kg	10mg/kg	25mg/kg	50mg/kg	100mg/kg	200mg/kg
		Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
1	Number of values	6	6	6	6	6	6	6	6
2									
3	Minimum	64.09	12.62	77.30	68.99	50.36	36.25	56.72	61.11
4	25% Percentile	81.29	18.64	78.68	72.68	51.67	37.82	58.14	62.02
5	Median	90.18	24.77	80.90	82.58	60.76	45.26	61.97	65.04
6	75% Percentile	94.31	34.68	88.94	87.34	67.59	53.26	73.82	67.97
7	Maximum	97.35	37.86	89.42	95.15	68.10	56.52	76.47	73.29
8									
9	Mean	87.02	25.71	82.74	81.32	59.92	45.63	64.78	65.50
10	Std. Deviation	11.83	9.311	5.117	9.091	8.402	7.797	8.042	4.306
11	Std. Error of Mean	4.831	3.801	2.089	3.711	3.430	3.183	3.283	1.758
12									
13	Lower 95% CI of mean	74.60	15.94	77.37	71.78	51.10	37.45	56.34	60.98
14	Upper 95% CI of mean	99.44	35.49	88.11	90.86	68.73	53.82	73.22	70.02
15									
16	Sum	522.1	154.3	496.4	487.9	359.5	273.8	388.7	393.0

APÊNDICE M 1 *Analyse* do Teste de Edema de orelha induzido pela única aplicação do óleo de cróton

1way ANOVA Multiple comparisons					
2	Number of comparisons per family	8			
3	Alpha	0.05			
4					
5	Bonferroni's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary
6					
7	salina vs. dexametasona	61.30	47.79 to 74.82	Yes	****
8	salina vs. 5mg/kg	4.277	-9.238 to 17.79	No	ns
9	salina vs. 10mg/kg	5.694	-7.821 to 19.21	No	ns
10	salina vs. 25mg/kg	27.10	13.59 to 40.62	Yes	****
11	salina vs. 50mg/kg	41.38	27.87 to 54.90	Yes	****
12	salina vs. 100mg/kg	22.24	8.722 to 35.75	Yes	***
13	salina vs. 200mg/kg	21.52	8.002 to 35.03	Yes	***
14	salina vs. 500mg/kg	19.42	5.902 to 32.93	Yes	**

APÊNDICE N – Coluna estatística da curva tempo-resposta do EHFLR em modelo crônico de edema de orelha

ID	Dia	A			B			C			ID	Dia	D			E		
		Mean	SEM	N	Mean	SEM	N	Mean	SEM	N			Mean	SEM	N	Mean	SEM	N
		Salina			Dexametasona 4 mg/kg			EHFLR 25mg/kg					EHFLR 50mg/kg			EHFLR 100 mg/kg		
1	1º dia	0.000	0.000	6	0.000	0.000	6	0.000	0.000	6	1	1º dia	0.000	0.000	6	0.000	0.000	6
2	2º dia	68.444	3.267	6	67.072	2.842	6	60.886	6.094	6	2	2º dia	70.998	3.989	6	50.698	3.774	6
3	3º dia	89.642	2.741	6	95.512	8.534	6	89.663	3.472	6	3	3º dia	93.021	9.743	6	85.308	0.939	6
4	4º dia	90.976	5.699	6	102.668	8.397	6	91.153	6.522	6	4	4º dia	98.883	10.398	6	90.267	7.806	6
5	5º dia	110.295	6.360	6	104.372	3.237	6	111.173	6.468	6	5	5º dia	84.642	6.492	6	100.559	3.969	6
6	6º dia	158.765	9.757	6	70.357	5.113	6	148.481	8.926	6	6	6º dia	124.597	7.298	6	92.731	2.837	6
7	7º dia	200.658	9.116	6	49.832	3.490	6	143.076	11.453	6	7	7º dia	112.963	4.407	6	82.089	3.957	6
8	8º dia	217.848	8.347	6	51.760	1.438	6	115.896	4.369	6	8	8º dia	69.523	3.185	6	68.947	4.648	6
9	9º dia	192.754	19.097	6	40.571	3.911	6	118.956	6.662	6	9	9º dia	77.573	5.737	6	42.111	3.317	6

APÊNDICE N 1– *Analyse* da curva tempo-resposta do EHFLR em modelo crônico de edema de orelha

2way ANOVA Multiple comparisons		A	B	C	D
		Data Set-A	Data Set-B	Data Set-C	Data Set-D
		Y	Y	Y	Y
1	Within each row, compare columns (simple effects within rows)				
2					
3	Number of families	9			
4	Number of comparisons per family	10			
5	Alpha	0.05			
6					
7	Bonferroni's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% Ci of diff.	Significant?	Summary
8					
9	1º dia				
10	Salina vs. Dexametasona 4 mg/kg	0.0	-14.79 to 14.79	No	ns
11	Salina vs. EHLR 25mg/kg	0.0	-14.79 to 14.79	No	ns
12	Salina vs. EHFLR 50mg/kg	0.0	-14.79 to 14.79	No	ns
13	Salina vs. EHLR 100 mg/kg	0.0	-14.79 to 14.79	No	ns
14	Dexametasona 4 mg/kg vs. EHLR 25mg/kg	0.0	-14.79 to 14.79	No	ns
15	Dexametasona 4 mg/kg vs. EHFLR 50mg/kg	0.0	-14.79 to 14.79	No	ns
16	Dexametasona 4 mg/kg vs. EHLR 100 mg/kg	0.0	-14.79 to 14.79	No	ns
17	EHLR 25mg/kg vs. EHFLR 50mg/kg	0.0	-14.79 to 14.79	No	ns
18	EHLR 25mg/kg vs. EHLR 100 mg/kg	0.0	-14.79 to 14.79	No	ns
19	EHFLR 50mg/kg vs. EHLR 100 mg/kg	0.0	-14.79 to 14.79	No	ns
20					
21	2º dia				
22	Salina vs. Dexametasona 4 mg/kg	1.373	-13.42 to 16.16	No	ns
23	Salina vs. EHLR 25mg/kg	7.558	-7.232 to 22.35	No	ns
24	Salina vs. EHFLR 50mg/kg	-2.554	-17.34 to 12.24	No	ns
25	Salina vs. EHLR 100 mg/kg	17.75	2.956 to 32.54	Yes	**
26	Dexametasona 4 mg/kg vs. EHLR 25mg/kg	6.185	-8.604 to 20.97	No	ns
27	Dexametasona 4 mg/kg vs. EHFLR 50mg/kg	-3.926	-18.72 to 10.86	No	ns
28	Dexametasona 4 mg/kg vs. EHLR 100 mg/kg	16.37	1.584 to 31.16	Yes	*
29	EHLR 25mg/kg vs. EHFLR 50mg/kg	-10.11	-24.90 to 4.678	No	ns
30	EHLR 25mg/kg vs. EHLR 100 mg/kg	10.19	-4.601 to 24.98	No	ns
31	EHFLR 50mg/kg vs. EHLR 100 mg/kg	20.30	5.510 to 35.09	Yes	**

(Continuação) APÊNDICE N 1– *Analyse* da curva tempo-resposta do EHFLR em modelo crônico de edema de orelha

32					
33	3º dia				
34	Salina vs. Dexametasona 4 mg/kg	-5.870	-20.66 to 8.919	No	ns
35	Salina vs. EHLR 25mg/kg	-0.02159	-14.81 to 14.77	No	ns
36	Salina vs. EHFLR 50mg/kg	-3.379	-18.17 to 11.41	No	ns
37	Salina vs. EHLR 100 mg/kg	4.333	-10.46 to 19.12	No	ns
38	Dexametasona 4 mg/kg vs. EHLR 25mg/kg	5.848	-8.941 to 20.64	No	ns
39	Dexametasona 4 mg/kg vs. EHFLR 50mg/kg	2.491	-12.30 to 17.28	No	ns
40	Dexametasona 4 mg/kg vs. EHLR 100 mg/kg	10.20	-4.586 to 24.99	No	ns
41	EHLR 25mg/kg vs. EHFLR 50mg/kg	-3.357	-18.15 to 11.43	No	ns
42	EHLR 25mg/kg vs. EHLR 100 mg/kg	4.355	-10.43 to 19.14	No	ns
43	EHFLR 50mg/kg vs. EHLR 100 mg/kg	7.713	-7.077 to 22.50	No	ns
44					
45	4º dia				
46	Salina vs. Dexametasona 4 mg/kg	-11.69	-26.48 to 3.097	No	ns
47	Salina vs. EHLR 25mg/kg	-0.1764	-14.97 to 14.61	No	ns
48	Salina vs. EHFLR 50mg/kg	-7.907	-22.70 to 6.883	No	ns
49	Salina vs. EHLR 100 mg/kg	0.7097	-14.08 to 15.50	No	ns
50	Dexametasona 4 mg/kg vs. EHLR 25mg/kg	11.52	-3.274 to 26.31	No	ns
51	Dexametasona 4 mg/kg vs. EHFLR 50mg/kg	3.785	-11.00 to 18.57	No	ns
52	Dexametasona 4 mg/kg vs. EHLR 100 mg/kg	12.40	-2.388 to 27.19	No	ns
53	EHLR 25mg/kg vs. EHFLR 50mg/kg	-7.730	-22.52 to 7.059	No	ns
54	EHLR 25mg/kg vs. EHLR 100 mg/kg	0.8861	-13.90 to 15.68	No	ns
55	EHFLR 50mg/kg vs. EHLR 100 mg/kg	8.616	-6.173 to 23.41	No	ns
56					
57	5º dia				
58	Salina vs. Dexametasona 4 mg/kg	5.923	-8.866 to 20.71	No	ns
59	Salina vs. EHLR 25mg/kg	-0.8779	-15.67 to 13.91	No	ns
60	Salina vs. EHFLR 50mg/kg	25.65	10.86 to 40.44	Yes	****
61	Salina vs. EHLR 100 mg/kg	9.736	-5.053 to 24.53	No	ns
62	Dexametasona 4 mg/kg vs. EHLR 25mg/kg	-6.801	-21.59 to 7.988	No	ns
63	Dexametasona 4 mg/kg vs. EHFLR 50mg/kg	19.73	4.941 to 34.52	Yes	**
64	Dexametasona 4 mg/kg vs. EHLR 100 mg/kg	3.813	-10.98 to 18.60	No	ns
65	EHLR 25mg/kg vs. EHFLR 50mg/kg	26.53	11.74 to 41.32	Yes	****
66	EHLR 25mg/kg vs. EHLR 100 mg/kg	10.61	-4.176 to 25.40	No	ns
67	EHFLR 50mg/kg vs. EHLR 100 mg/kg	-15.92	-30.71 to -1.128	Yes	*
68					

Continua...

Continuação...

69	6º dia				
70	Salina vs. Dexametasona 4 mg/kg	88.41	73.62 to 103.2	Yes	****
71	Salina vs. EHLR 25mg/kg	10.28	-4.505 to 25.07	No	ns
72	Salina vs. EHFLR 50mg/kg	34.17	19.38 to 48.96	Yes	****
73	Salina vs. EHLR 100 mg/kg	66.03	51.24 to 80.82	Yes	****
74	Dexametasona 4 mg/kg vs. EHLR 25mg/kg	-78.12	-92.91 to -63.33	Yes	****
75	Dexametasona 4 mg/kg vs. EHFLR 50mg/kg	-54.24	-69.03 to -39.45	Yes	****
76	Dexametasona 4 mg/kg vs. EHLR 100 mg/kg	-22.37	-37.16 to -7.585	Yes	***
77	EHLR 25mg/kg vs. EHFLR 50mg/kg	23.88	9.095 to 38.67	Yes	****
78	EHLR 25mg/kg vs. EHLR 100 mg/kg	55.75	40.96 to 70.54	Yes	****
79	EHFLR 50mg/kg vs. EHLR 100 mg/kg	31.87	17.08 to 46.66	Yes	****
80					
81	7º dia				
82	Salina vs. Dexametasona 4 mg/kg	150.8	136.0 to 165.6	Yes	****
83	Salina vs. EHLR 25mg/kg	57.58	42.79 to 72.37	Yes	****
84	Salina vs. EHFLR 50mg/kg	87.70	72.91 to 102.5	Yes	****
85	Salina vs. EHLR 100 mg/kg	118.6	103.8 to 133.4	Yes	****
86	Dexametasona 4 mg/kg vs. EHLR 25mg/kg	-93.24	-108.0 to -78.45	Yes	****
87	Dexametasona 4 mg/kg vs. EHFLR 50mg/kg	-63.13	-77.92 to -48.34	Yes	****
88	Dexametasona 4 mg/kg vs. EHLR 100 mg/kg	-32.26	-47.05 to -17.47	Yes	****
89	EHLR 25mg/kg vs. EHFLR 50mg/kg	30.11	15.32 to 44.90	Yes	****
90	EHLR 25mg/kg vs. EHLR 100 mg/kg	60.99	46.20 to 75.78	Yes	****
91	EHFLR 50mg/kg vs. EHLR 100 mg/kg	30.87	16.08 to 45.66	Yes	****
92					
93	8º dia				
94	Salina vs. Dexametasona 4 mg/kg	166.1	151.3 to 180.9	Yes	****
95	Salina vs. EHLR 25mg/kg	102.0	87.16 to 116.7	Yes	****
96	Salina vs. EHFLR 50mg/kg	148.3	133.5 to 163.1	Yes	****
97	Salina vs. EHLR 100 mg/kg	148.9	134.1 to 163.7	Yes	****
98	Dexametasona 4 mg/kg vs. EHLR 25mg/kg	-64.14	-78.93 to -49.35	Yes	****
99	Dexametasona 4 mg/kg vs. EHFLR 50mg/kg	-17.76	-32.55 to -2.973	Yes	**
100	Dexametasona 4 mg/kg vs. EHLR 100 mg/kg	-17.19	-31.98 to -2.398	Yes	*
101	EHLR 25mg/kg vs. EHFLR 50mg/kg	46.37	31.58 to 61.16	Yes	****
102	EHLR 25mg/kg vs. EHLR 100 mg/kg	46.95	32.16 to 61.74	Yes	****
103	EHFLR 50mg/kg vs. EHLR 100 mg/kg	0.5755	-14.21 to 15.36	No	ns
104					
105	9º dia				
106	Salina vs. Dexametasona 4 mg/kg	152.2	137.4 to 167.0	Yes	****
107	Salina vs. EHLR 25mg/kg	73.80	59.01 to 88.59	Yes	****
108	Salina vs. EHFLR 50mg/kg	115.2	100.4 to 130.0	Yes	****
109	Salina vs. EHLR 100 mg/kg	150.6	135.9 to 165.4	Yes	****
110	Dexametasona 4 mg/kg vs. EHLR 25mg/kg	-78.38	-93.17 to -63.60	Yes	****
111	Dexametasona 4 mg/kg vs. EHFLR 50mg/kg	-37.00	-51.79 to -22.21	Yes	****
112	Dexametasona 4 mg/kg vs. EHLR 100 mg/kg	-1.539	-16.33 to 13.25	No	ns
113	EHLR 25mg/kg vs. EHFLR 50mg/kg	41.38	26.59 to 56.17	Yes	****
114	EHLR 25mg/kg vs. EHLR 100 mg/kg	76.85	62.06 to 91.63	Yes	****
115	EHFLR 50mg/kg vs. EHLR 100 mg/kg	35.46	20.67 to 50.25	Yes	****

Conclusão.

APÊNDICE O - Coluna Estatística da redução da massa das orelhas em modelo crônico de edema de orelha

	Col. stats	A	B	C	D	E
		Controle	Dexametasona 4 mg/mL	EHFLR 25mg/kg	EHFLR 50mg/kg	EHFLR 100mg/kg
		Y	Y	Y	Y	Y
1	Number of values	6	6	6	6	6
2						
3	Minimum	121.3	38.53	56.71	62.94	41.55
4	25% Percentile	123.6	43.72	78.40	63.63	52.00
5	Median	128.1	57.32	86.64	72.16	59.07
6	75% Percentile	132.3	59.35	96.39	77.33	64.25
7	Maximum	133.9	59.54	97.56	83.75	65.76
8						
9	Mean	127.9	52.91	84.86	71.68	57.45
10	Std. Deviation	4.687	8.803	14.73	7.734	8.659
11	Std. Error of Mean	1.913	3.594	6.014	3.157	3.535
12						
13	Lower 95% CI of mean	123.0	43.67	69.40	63.56	48.36
14	Upper 95% CI of mean	132.8	62.15	100.3	79.79	66.53
15						
16	Sum	767.5	317.5	509.2	430.1	344.7

APÊNDICE O 1 - *Analyse* da redução da massa das orelhas em modelo crônico de edema de orelha

1way ANOVA Multiple comparisons					
1	Number of families	1			
2	Number of comparisons per family	4			
3	Alpha	0.05			
4					
5	Bonferroni's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary
6					
7	Controle vs. Dexametasona 4 mg/mL	75.01	60.24 to 89.77	Yes	****
8	Controle vs. EHFLR 25mg/kg	43.05	28.29 to 57.81	Yes	****
9	Controle vs. EHFLR 50mg/kg	56.24	41.48 to 71.00	Yes	****
10	Controle vs. EHFLR 100mg/kg	70.47	55.71 to 85.23	Yes	****

**APÊNDICE P - Coluna Estatística da redução do edema de orelha induzido por
Histamina**

Col. stats		A	B	C
		Salina	Prometazina 6mg/kg	EHFLR 25 mg/kg
		Y	Y	Y
1	Number of values	7	7	7
2				
3	Minimum	30.00	1.143	28.08
4	25% Percentile	36.96	1.818	29.73
5	Median	44.89	3.871	34.00
6	75% Percentile	50.86	9.146	36.22
7	Maximum	54.29	14.37	63.39
8				
9	Mean	42.88	5.352	37.08
10	Std. Deviation	8.599	4.822	11.96
11	Std. Error of Mean	3.250	1.823	4.522
12				
13	Lower 95% CI of mean	34.93	0.8917	26.01
14	Upper 95% CI of mean	50.84	9.812	48.14
15				
16	Sum	300.2	37.46	259.5

APÊNDICE P 1 - *Analyse* da redução do edema de orelha induzido por Histamina

1way ANOVA Multiple comparisons					
1	Number of families	1			
2	Number of comparisons per family	2			
3	Alpha	0.05			
4					
5	Bonferroni's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary
6					
7	Salina vs. Prometazina 6mg/kg	37.53	25.83 to 49.23	Yes	****
8	Salina vs. EHFLR 25 mg/kg	5.808	-5.890 to 17.51	No	ns

APÊNDICE Q - Coluna Estatística da redução do edema de orelha induzido por Ácido Araquidônico

Col. stats		A	B	C
		salina	Indometacina 10 mg/kg	50mg/kg
		Y	Y	Y
1	Number of values	6	6	6
2				
3	Minimum	55.07	1.626	29.13
4	25% Percentile	56.55	1.953	31.75
5	Median	58.26	6.802	34.52
6	75% Percentile	59.97	13.36	38.99
7	Maximum	63.64	22.67	44.44
8				
9	Mean	58.50	8.369	35.40
10	Std. Deviation	2.857	7.983	5.170
11	Std. Error of Mean	1.166	3.259	2.111
12				
13	Lower 95% CI of mean	55.50	-0.008060	29.98
14	Upper 95% CI of mean	61.50	16.75	40.83
15				
16	Sum	351.0	50.21	212.4

APÊNDICE Q 1- *Analyse* da redução do edema de orelha induzido por Ácido Araquidônico

1way ANOVA Multiple comparisons					
1	Number of families	1			
2	Number of comparisons per family	2			
3	Alpha	0.05			
4					
5	Bonferroni's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary
6					
7	salina vs. Indometacina 10 mg/kg	50.13	41.89 to 58.38	Yes	****
8	salina vs. 50mg/kg	23.10	14.86 to 31.34	Yes	****
9					

APÊNDICE R - Coluna Estatística da redução do edema de orelha induzido por Capsaicina

Col. stats		A	B	C
		Salina	Dexametasona 4 mg/mL	EHFLR 25 mg/kg
		Y	Y	Y
1	Number of values	6	6	6
2				
3	Minimum	64.04	15.67	52.21
4	25% Percentile	64.51	26.51	57.76
5	Median	70.30	36.93	62.72
6	75% Percentile	77.20	37.46	64.63
7	Maximum	79.84	37.61	69.50
8				
9	Mean	70.91	32.45	61.63
10	Std. Deviation	6.981	8.700	5.640
11	Std. Error of Mean	2.850	3.552	2.303
12				
13	Lower 95% CI of mean	63.58	23.32	55.71
14	Upper 95% CI of mean	78.24	41.58	67.55
15				
16	Sum	425.5	194.7	369.8

APÊNDICE R 1- *Analyse* da redução do edema de orelha induzido por Capsaicina

1way ANOVA Multiple comparisons					
1	Number of families	1			
2	Number of comparisons per family	2			
3	Alpha	0.05			
4					
5	Bonferroni's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?	Summary
6					
7	Salina vs. Dexametasona 4 mg/mL	38.46	28.09 to 48.84	Yes	****
8	Salina vs. EHFLR 25 mg/kg	9.280	-1.094 to 19.65	No	ns

APÊNDICE S - Coluna Estatística da redução do edema de orelha induzido por Fenol

Col. stats		A	B	C
		Salina	Dexametasona 4 mg/mL	EHFLR 25 mg/kg
		Y	Y	Y
1	Number of values	6	6	6
2				
3	Minimum	85.56	15.48	26.67
4	25% Percentile	87.57	15.71	31.35
5	Median	93.36	17.02	43.57
6	75% Percentile	125.8	20.88	56.53
7	Maximum	130.0	27.27	72.73
8				
9	Mean	102.5	18.55	45.10
10	Std. Deviation	19.47	4.486	16.22
11	Std. Error of Mean	7.947	1.831	6.621
12				
13	Lower 95% CI of mean	82.05	13.85	28.08
14	Upper 95% CI of mean	122.9	23.26	62.12
15				
16	Sum	614.9	111.3	270.6

APÊNDICE S 1 - *Analyse* da redução do edema de orelha induzido por Fenol

1way ANOVA Multiple comparisons				
1	Number of families	1		
2	Number of comparisons per family	2		
3	Alpha	0.05		
4				
5	Bonferroni's multiple comparisons test	Mean Diff.	95% CI of diff.	Significant?
6				Summary
7	Salina vs. Dexametasona 4 mg/mL	83.93	62.57 to 105.3	Yes
8	Salina vs. EHFLR 25 mg/kg	57.38	36.03 to 78.74	Yes

