

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS
UNIFAL- MG

CLARICE DE CARVALHO VELOSO

AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DO EXTRATO
HIDROALCOÓLICO DAS FLORES DE *Pyrostegia venusta*
(KER.) MIERS

Alfenas-MG
2010

CLARICE DE CARVALHO VELOSO

**AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DO EXTRATO
HIDROALCOÓLICO DAS FLORES DE *Pyrostegia venusta*
(KER.) MIERS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas-MG para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Área de concentração: Obtenção e avaliação da atividade biológica de insumos farmacêuticos.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Giusti-Paiva

Alfenas-MG
2010

CLARICE DE CARVALHO VELOSO

**AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DO EXTRATO
HIDROALCOÓLICO DAS FLORES DE *Pyrostegia venusta*
(KER.) MIERS**

A banca examinadora abaixo-assinada aprova a dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas.

Orientador: Prof. Dr. Alexandre Giusti-Paiva

Aprovada em: ___/___/___

Prof. Dr.

Instituição:

Assinatura:

Prof. Dr.

Instituição:

Assinatura:

Prof. Dr.

Instituição:

Assinatura:

A meus pais, Mário e Edneuda,
A meus irmãos, José Mário e Rogério,
Obrigada!

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela conquista alcançada.

Pela extensão da minha vida, reconheço os exemplos de meus pais, Mário e Edneuda, o apoio dos meus irmãos, José Mário e Rogério, que juntos ensinaram-me a voar com os pés no chão.

Deste trabalho, tenho pela confiança, conhecimento, amizade e apoio em meu desenvolvimento acadêmico, gratidão especial ao meu orientador professor Alexandre.

Agradeço aos professores Roseli, Carina e Giovani, pelo aprendizado adquirido durante o estágio docente. Obrigada!

Aos professores Jalile, Bento e Marcelo Henrique por contribuírem no conhecimento adquirido durante esses dois anos de estudo.

Aos professores Giovani e Andrea, pelo apoio e sugestões para o refinamento do trabalho. Agradeço a vocês pelo aceite ao convite de participação da minha banca de dissertação.

Às amigas Flávia, Luciana e Ana Paula, pelo amor fraterno. Aos amigos e colegas Michael, Fabiana, Maria Ângela, Lidiane, Kriss e Aline pela amizade e pela companhia. Serei eternamente grata a todos vocês.

Ao Daniel, pelo amor, carinho e incentivo durante a trajetória.

À Layla, Andressa, Lidiane, Danielle, Samuel e Gabriel pela colaboração na concretização desse trabalho.

Aos técnicos, José e Marina, por toda a ajuda prestada durante a execução dos experimentos.

*“Para ser grande, sê inteiro: nada teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és no mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda brilha, porque alta vive.”*

Ricardo Reis

RESUMO

Pyrostegia venusta (Ker.) Miers (Bignoniaceae) é nativa do Cerrado Brasileiro e popularmente conhecida como “cipó-de-são-joão.” Na medicina tradicional brasileira, a *Pyrostegia venusta* é usada como tônico geral, bem como para o tratamento de diarreia, vitiligo, tosse e doenças comuns do sistema respiratório relacionadas à infecções, tais como bronquite, gripe e resfriado. Este estudo foi conduzido para avaliar os efeitos do extrato hidroetanólico das flores de *Pyrostegia venusta* (EHPv) no comportamento doentio induzido por lipopolissacarídeo em camundongos, avaliar as propriedades anti-inflamatórias e analgésicas do EHPv e o seu perfil fitoquímico. Para avaliar os efeitos do extrato hidroetanólico de *Pyrostegia venusta* administrado oralmente no comportamento doentio induzido por lipopolissacarídeo, os camundongos foram submetidos aos testes de nado forçado e campo aberto. O EHPv foi usado para avaliar os efeitos anti-inflamatórios e analgésicos usando os testes de edema de pata induzido por carragenina e peritonite; os testes de lambida de pata induzida por formalina e contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos albinos Swiss, respectivamente. A administração de lipopolissacarídeo (LPS, 100µg/kg, i.p.) aumentou o tempo que o animal permaneceu boiando no nado forçado e diminuiu a atividade locomotora no campo aberto. O pré-tratamento com EHPv nas doses de 100 e 300 mg/kg, v.o., atenuou as alterações comportamentais induzidas pelo LPS nos testes de nado forçado e campo aberto. Este efeito foi similar ao pré-tratamento com dexametasona (1mg/kg), um fármaco esteroide que inibe as respostas imunes e inflamatórias, incluindo a produção de citocinas. O EHPv nas doses de 30-300 mg/kg v.o., claramente demonstrou efeitos anti-inflamatórios pela redução do edema de pata induzido por carragenina e inibiu o recrutamento de leucócitos dentro da cavidade peritoneal. Os extratos testados nas doses de 30-300 mg/kg, v.o., claramente demonstraram atividade antinociceptiva nos testes de formalina e contorções abdominais induzidas por ácido acético. O extrato de *Pyrostegia venusta*

atenuou os comportamentos exploratórios e como depressivos, demonstrou ação anti-inflamatória e antinociceptiva em camundongos e nenhuma aparente toxicidade aguda na administração oral. Então, nossos resultados suportam prévias indicações do uso dessas plantas nas terapias tradicionais e sugerem que essas plantas podem ser usadas no tratamento de desordens que induzem o comportamento doentio, tais como gripe e resfriado.

Palavras-chave: *Pyrostegia venusta*. Comportamento doentio. Efeito anti-inflamatório e analgésico.

ABSTRACT

Pyrostegia venusta (Ker.) Miers (Bignoniaceae) is native to the Brazilian Cerrado and popularly known as “cipó-de-são-joão.” In traditional Brazilian medicine, the *Pyrostegia venusta* are used as a general tonic as well as a treatment for diarrhea, vitiligo, cough, and common diseases of the respiratory system related to infections, such as bronchitis, flu and cold. This study was conducted to evaluate the effects of a hydroethanolic extract to flowers of *Pyrostegia venusta* (PvHE) on sickness behavior induced by lipopolysaccharide in mice, to evaluate the anti-inflammatory and analgesic properties of the PvHE and its phytochemical profile. To evaluate the effects of orally administered *Pyrostegia venusta* hydroethanolic extract on lipopolysaccharide-induced sickness behavior, mice were submitted to the forced swim test (FST) and the open field test. The PvHE was used to evaluate the anti-inflammatory and analgesic effects using carrageenan-induced paw oedema/peritonitis and acetic acid-induced writhing/formalin-induced paw licking tests in Swiss albino mice respectively. Lipopolysaccharide (LPS, 100 µg/kg, i.p.) administration increased the time spent floating in the FST and depressed locomotor activity in the open field. Pretreatment with PvHE at test doses of 100 and 300 mg/kg, p.o. attenuated the behavioral changes induced by LPS in the FST and open field test. This effect was similar to pretreatment with dexamethasone (1 mg/kg), which is a steroidal drug that inhibits immune and inflammatory responses, including cytokine production. The PvHE at test doses of 30-300 mg/kg p.o. clearly demonstrated anti-inflammatory effects by reduced paw edema induced by carrageenan and inhibited leukocyte recruitment into the peritoneal cavity. The extracts are tested in doses of 30-300 mg/kg, p.o. clearly demonstrated antinociceptive activity in acetic acid-induced writhing and formalin tests. The extract of *Pyrostegia venusta* attenuated the depressive-like and exploratory behaviors induced by lipopolysaccharide and demonstrated anti-inflammatory and antinociceptive action in mice and no apparent acute toxicity on oral administration. Thus, our results supported previous claims of the usefulness of these plants in traditional therapies and suggest that these plants may

be useful in the treatment of disorders that induced sickness behavior, such as flu and cold.

Key-words: *Pyrostegia veusta*. Sickness behavior. Anti-inflammatory and antinociceptive effects.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	<i>Pyrostegia venusta</i> (Ker.) Miers.....	19
Figura 2-	Distribuição das espécies de <i>Pyrostegia</i>	20

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1	Família e gênero da espécie <i>Pyrostegia venusta</i>	16
2.2	Comportamento doentio induzido por citocinas: Uma resposta neuroimune como consequência da ativação da imunidade inata.....	21
2.3	Mediadores Inflamatórios e Transmissão Nociceptiva.....	25
3	OBJETIVO GERAL.....	29
3.1	Objetivos específicos.....	29
4	RESULTADOS.....	30
4.1	Artigo 01: Miers <i>Pyrostegia venusta</i> attenuate the sickness behavior induced by lipopolysaccharide in mice.....	31
4.2	Artigo 02: Anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of hydroethanolic extract of flowers of <i>Pyrostegia venusta</i> (Ker.) Miers.....	36
5	CONCLUSÕES.....	58
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	59

1 INTRODUÇÃO

Desde os primórdios da civilização, a procura pelo tratamento das principais doenças que acometem a humanidade tem sido uma preocupação constante da população. Essa informação é facilmente comprovada pelos inúmeros registros encontrados nas primeiras civilizações que habitaram a terra. Basicamente, os recursos terapêuticos utilizados pelos nossos ancestrais concentravam-se nos recursos da natureza, notadamente nas plantas, animais e minerais. Com certeza, a principal contribuição para o desenvolvimento da terapêutica moderna foi a utilização das plantas medicinais, inicialmente pelos Egípcios e que depois foi alastrando para outras regiões do mundo. Há registros do uso de muitas plantas medicinais, como a papoula (*Papaver somniferum*), maconha (*Cannabis sativa*), babosa (*Aloe vera*), dentre outras, há milhares de anos antes de Cristo. Contudo, foi somente no século XIX que se iniciou a procura pelos princípios ativos presentes nas plantas medicinais, criando assim, os primeiros medicamentos com as características que nós os conhecemos atualmente (CALIXTO; SIQUEIRA JR, 2008).

O Brasil possui a maior biodiversidade do mundo, compreendendo mais de 50.000 espécies de plantas superiores (20-22% do total existente no planeta). Em função disso e, sobretudo pela grande tradição do uso das plantas medicinais pela medicina popular no Brasil, o interesse pelos estudos das propriedades medicinais das plantas, vem sendo explorado extensivamente pelos pesquisadores brasileiros e, mais recentemente, pela indústria farmacêutica, interessada em desenvolver novos medicamentos (CALIXTO; SIQUEIRA JR, 2008).

O cerrado brasileiro, conhecido por Savana Neotropical, representa uma das maiores regiões biogeográficas do mundo, com mais de 7000 espécies de plantas vasculares nativas (MENDONÇA et al.,1998). É um típico ecossistema do centro e sudeste do Brasil e representa o segundo maior bioma da América do Sul depois das florestas tropicais. Abrangia inicialmente um quarto do Brasil, sendo um ecossistema altamente ameaçado devido a introdução da agricultura intensiva de

soja e criação de gado nessa área nas últimas duas ou três décadas (BLATT et al., 1998). As espécies vegetais encontradas no Cerrado têm sido usadas pelas comunidades locais para o tratamento de várias doenças e o potencial para encontrar moléculas promissoras para várias aplicações já tem sido demonstrado em diversos modelos biológicos (ESPINDOLA et al., 2004; De MESQUITA et al., 2005a, 2005b; RODRIGUES et al., 2005; De MESQUITA et al., 2007; De MESQUITA et al., 2009; MELO; SILVA et al., 2009).

Entre as inúmeras espécies vegetais de interesse medicinal, encontram-se as plantas da família Bignoniaceae, a qual compreende aproximadamente 120 gêneros e 800 espécies. A espécie *P. venusta*, pertencente a esse gênero, é conhecida popularmente como “Cipó-de-São-João” e nativa do Cerrado Brasileiro (DOS SANTOS; BLATT, 1998). Na medicina tradicional brasileira, as partes aéreas da *P. venusta* são usadas principalmente na infusão ou decocção. Elas são administradas oralmente como tônico e tratamento de vitiligo, diarreia, tosse e doenças comuns do sistema respiratório relacionadas a infecções, tais como bronquite, gripe e resfriado (FERREIRA et al., 2000; SCALON et al., 2008; CARDOSO et al., 2009).

Baseado na informação etnofarmacológica da *Pyrostegia venusta*, este estudo foi conduzido para a investigação dos efeitos anti-inflamatório, antinociceptivo e comportamental do extrato hidroetanólico das flores de *P. venusta* nos testes de edema de pata induzido por carragenina, peritonite, contorções abdominais induzidas por ácido acético, lambida da pata induzida por formalina, nado forçado e campo aberto, respectivamente.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Família e gênero da espécie *Pyrostegia venusta*

De acordo com Souza e Lorenzi (2005), a família BIGNONIACEAE possui distribuição pantropical e compreende cerca de 120 gêneros e 800 espécies. No Brasil, ocorrem cerca de 50 gêneros e 350 espécies. Esta é uma família com grande potencial ornamental e são cultivadas entre nós plantas como a tulipa-africana (*Spathodea campanulata*), a sete-léguas (*Podranea ricasoliana*), os ipês (principalmente pertencentes ao gênero *Tabebuia*, mas também *Sparathosperma*, *Tecoma* e *Cybistax*) e o jacarandá-mimoso (*Jacaranda mimosifolia*).

Destacam-se como plantas nativas, o ipê ou pau-d'arco (*Tabebuia* spp.), a caixeta (*Tabebuia cassinoides*), que pode formar grandes agrupamentos em áreas alagáveis litorâneas, e as carobas (*Jacaranda* spp.). Lianas desta família, incluindo os gêneros *Arrabidaea*, *Anemopaegma* e *Pithecoctenium*, são muito comuns nas bordas das florestas e a flor-de-são-joão (*Pyrostegia venusta*) ocorre também como invasora de culturas. Nos cerrados é relativamente comum um arbusto de flores amarelas, conhecido pelo nome popular de bolsa de pastor (*Zeyheria montana*) (SOUZA; LORENZI, 2005).

As plantas desta família são árvores, arbustos ou lianas, geralmente com gavinhas. As folhas são de disposição oposta, raramente verticiladas ou alternas, em geral compostas, sem estípulas. Inflorescência cimosas ou racemosas, mais frequentemente paniculada. As flores são vistosas, diclamídeas, bissexuadas, zigomorfas. Cálice pentâmero, gamossépalo, prefloração imbricada. Corola bilabiada, pentâmera, gamopétala, prefloração imbricada. Quatro estames, didínamos, com estaminódio, epipétalos, anteras rimosas. Disco nectarífero geralmente presente. Ovário súpero, bicarpelar, bilocular ou raramente unilocular, com placentação axial ou raramente parietal, placenta bipartida, geralmente pluriovulado. Fruto capsular loculicida ou septicida, raramente baga, sementes em geral aladas (SOUZA; LORENZI, 2005).

Pyrostegia C. Presl é um gênero de quatro espécies da família Bignoniaceae (Bignoniaceae). O gênero é nativo da América do Sul tropical, sendo a *P. venusta*

(Ker Gawl.) Miers, uma planta ornamental. Como a maioria dos membros da família Bignoniaceae, todas as espécies do gênero *Pyrostegia* são lianas trepadeiras apresentando folhas compostas, quatro estames e semente bialada. Três das espécies (*P. cinera*, *P. dichotoma* e *P. venusta*) são aparentemente polinizadas por beija-flores e possuem flores vermelho-alaranjadas (raramente amarelas). A quarta espécie (*P. millingtonioides*), que é provavelmente a mais polinizada, é fortemente perfumada e apresenta corola branca (POOL, 2008).

A espécie *P. cinera* Bureau ex K. Schum é encontrada no Brasil em campinas próximas a Manaus, estado do Amazonas. Floresce no período de maio a julho e novembro, produzindo frutos em novembro. A *P. dichotoma* Miers ex Schum é encontrada na Guiana, Suriname, Venezuela, Colômbia, Peru, Bolívia e Amazônia do Brasil. Na Colômbia, floresce em janeiro; na Guiana e Suriname em fevereiro, setembro e outubro; na Venezuela em março; e no Peru, Bolívia e Brasil de junho a outubro. A espécie *P. millingtonioides* é encontrada no Brasil, nos estados do Pará e Maranhão e floresce no período de julho a agosto. A *P. venusta* (Ker Gawl.) Miers é encontrada no Atlântico e sul do Brasil, do Piauí ao Rio Grande do Sul, sul do Paraguai e nordeste da Argentina (POOL, 2008). É encontrada em áreas do cerrado, que é um típico ecossistema do centro e sudeste do Brasil. Além disso, é invasora de pastos, sendo também encontrada nas orlas das matas, nos campos, no litoral e na beira das estradas (DE SAMPAIO, 1991 citado por FERREIRA et al., 2000). O período de florescência é de junho a setembro, e de produção de frutos de julho a dezembro. No Brasil, é conhecida popularmente como cipó-de-são-joão, cipó caititu, cipó tingá, dedo de moça (POOL, 2008).

A *P. venusta* possui ampla distribuição no Brasil, do sul ao nordeste, com exceção do norte. Na medicina tradicional brasileira, as partes aéreas da *P. venusta* são usadas principalmente na infusão ou decocção. Elas são administradas oralmente como tônico e tratamento de vitiligo, diarreia, tosse e doenças comuns do sistema respiratório relacionadas a infecções, tais como bronquite, gripe e resfriado (LORENZI, 1982; FERREIRA et al., 2000; SCALON et al., 2008; CARDOSO et al., 2009).

Houve motivação em se estudar a química de Bignoniaceae quando comprovou-se as diversas atividades biológicas e farmacológicas do lapachol

(prenilnaftoquinona) e de vários de seus produtos de transformações biossintéticas ou químicas (GOTTLIEB; MORS, 1980 citado por SANTOS; BLATT, 1997), sendo o gênero *Tabebuia* o mais estudado (GOTTLIEB, 1982 citado por SANTOS; BLATT, 1997).

Os vegetais superiores sintetizam e acumulam uma grande diversidade de compostos fenólicos, cujo papel no metabolismo da planta não está inteiramente elucidado (JULKUNEN-TIITO, 1985 citado por SANTOS; BLATT, 1997). Os fenóis vegetais são numerosos e variados, estando representados em quase todas as classes de metabólitos secundários (SMITH, 1976 citado por SANTOS; BLATT, 1997). Os taninos, como classe individual, têm sido os compostos fenólicos mais estudados em ecologia química, depois de fenóis totais, os quais têm merecido maior atenção (SANTOS; BLATT, 1997). As flavonas e flavonóis presentes nas folhas, são os principais pigmentos de absorção de luz UV por apresentarem sistemas conjugados (HARBONE, 1977 citado por SANTOS; BLATT, 1997).

A literatura registra estudo químico das folhas de *P. venusta* baseada em flavonóides. Em um estudo, realizado por Santos e Blatt (1997), foram realizadas análises quantitativas de flavonóides, fenóis solúveis e taninos de folhas de *P. venusta* coletadas na mata e no cerrado, a fim de verificar a influência desses biócoros na sua produção. Não houve diferenças significativas entre as plantas de mata e cerrado, sugerindo que a espécie não apresenta plasticidade fenotípica baseada nesses caracteres, considerando as diferenças de solo dos locais de coleta. Além disso, não foram detectados taninos nas folhas desta espécie. Em um outro estudo, flavonas e glicosídeos de flavonas foram obtidos das folhas de cinco espécies da família Bignoniaceae. Observou-se um predomínio de flavonóis sobre as flavonas em todas as amostras analisadas (BLATT et al., 1998).

Os flavonóides têm sido reconhecidos como responsáveis por atividade antialérgica, antiinflamatória, antiviral, antiproliferativa e anticancerígena (FERREIRA et al., 2000). Além disso, foi observada atividade antioxidante, como inibidores de xantina oxidase e eliminadores de superóxidos (COS et al., 1998).

A literatura registra estudo fitoquímico do extrato etanólico das raízes de *P. venusta*, sendo identificadas quatro substâncias, alantoína, os esteróides β -sitosterol e 3- β -O- β -D-glicopiranosil-sitosterol e a flavona hesperedina (FERREIRA et

al., 2000). Das flores, já foram isolados β -sitosterol, *n*-hentriacontano, 7-*O*- β -D-glicopiranosilacetina e *meso*-inositol (DUBEY; MISRA, 1976 citado por FERREIRA et al., 2000). A flavona acetina, aglicona de 7-*O*- β -D-glicopiranosilacetina, revelou atividade antiinflamatória, protetora capilar e espasmolítica (BUCKINGHAM et al., 1994 citado por FERREIRA et al., 2000). Há achados que revelam que o *meso*-inositol inibe a formação de adenoma (WATTENBERG, 1995 citado por FERREIRA et al., 2000). A composição e a concentração dos constituintes carotenóides maiores em extratos de pétalas frescas e secas de flores da *P. venusta*, foram quantificados. Neste estudo, foram encontrados seis carotenóides maiores, o β -caroteno, β -criptoxantina, neoxantina, luteína, violaxantina e zeaxantina, sendo a luteína o principal componente, seguido pelo β - caroteno. O conteúdo de luteína (mg/kg) nos extratos de pétalas secas foi cerca de 2,6 a 2,9 vezes maior do que nos extratos de pétalas frescas (TINOI et al., 2006).

Do extrato etanólico das raízes, foram identificadas quatro substâncias, alantoína, os esteróides β - sitosterol e 3- β -*O*- β -D-glicopiranosilsterol e a flavona hesperedina (FERREIRA et al., 2000).



Figura 1: *Pyrostegia venusta* (Ker.) Miers

Fonte: VELOSO (2010)

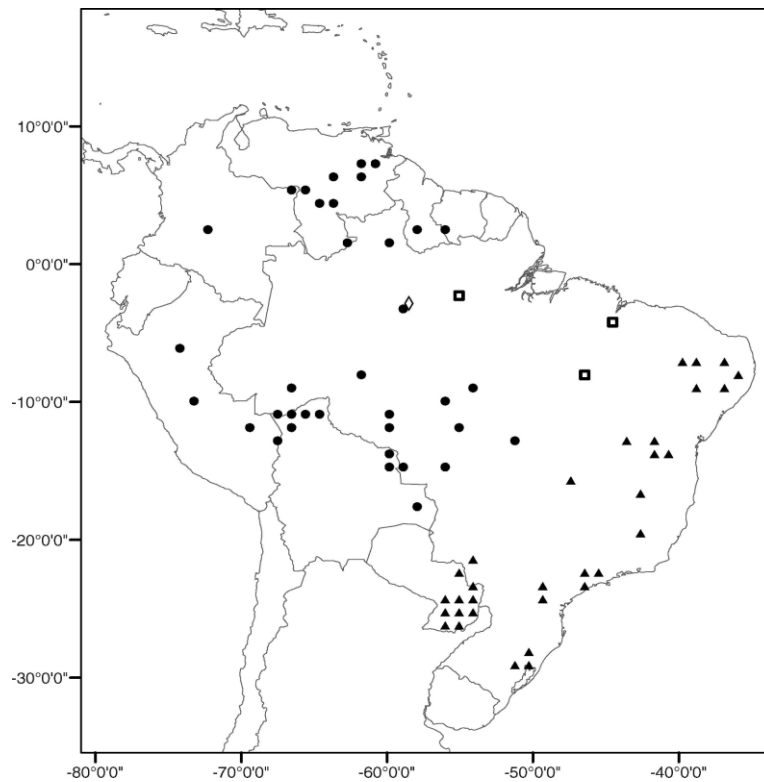


Figura 2: Distribuição das espécies de *Pyrostegia*, excluindo as espécies cultivadas e aparentemente as naturalizadas. *Pyrostegia cinerea* Bureau ex K. Schum. (◊), *P. dichotoma* Miers ex K. Schum. (●), *P. millingtonioides* Sandwith (◻), and *P. venusta* (Ker Gawl.) Miers (▲).
 Fonte : POOL (2008, p. 499).

Diante do uso popular da espécie no tratamento de doenças inflamatórias do trato respiratório, foi proposta a avaliação da atenuação do comportamento doentio em camundongos previamente tratados com o extrato hidroetanólico das flores de *P.venusta*. É descrito na literatura que durante infecção bacteriana ou viral, há ativação de macrófagos e produção de mediadores inflamatórios tais como citocinas (KELLEY et al., 2003; DANTZER, 2009). A exposição à endotoxinas ou citocinas provoca sintomas neuropsicológicos coletivamente referidos como comportamento doentio. Alguns desses sintomas incluem anedonia, fadiga, letargia, depressão, sono e anorexia (DANTZER, 2009). Os aparatos utilizados para avaliar o comportamento doentio foram: campo aberto, que consiste na avaliação da atividade locomotora dos animais, e nado forçado, que é um teste comumente usado para avaliar a atividade depressiva e antidepressiva, consistindo na marcação do tempo em que o animal permaneceu boiando.

2.2 Comportamento doentio induzido por citocinas: Uma resposta neuroimune como consequência da ativação da imunidade inata

A inflamação e as respostas inflamatórias são moduladas por uma comunicação bidirecional entre o sistema neuroendócrino e o sistema imune. O sistema nervoso central sinaliza o sistema imune através de vias hormonais e neuronais, através do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal e sistema nervoso autonômico. Os mediadores imunes e citocinas podem atravessar a barreira hemato-encefálica, ou sinalizar indiretamente através do nervo vago ou segundos mensageiros. Assim, doenças como a depressão e sintomas como a febre, estão relacionadas à sinalização das citocinas, que são produzidas nos sítios inflamatórios no cérebro (ESKANDARI et al., 2003).

O *sickness behavior* (comportamento doentio) é descrito como um conjunto de alterações comportamentais em decorrência de um processo infeccioso provocado por vírus ou por bactéria, caracterizado por redução de apetite, dores na musculatura e articulações, mal-estar, fadiga e febre (DANTZER, 2009).

O microrganismo infeccioso ao invadir o corpo, encontra a primeira linha de células de defesa (células do sistema imune inato) que são representadas pelos monócitos, macrófagos e pelas células de *Kupffer* do fígado. As células fagocitárias expressam receptores *Toll-like* (TLRs) na sua superfície que em contato com o patógeno, produzem citocinas pró-inflamatórias, que incluem principalmente a interleucina 1 (IL-1 α e IL-1 β), IL-6 e fator de necrose tumoral α (TNF- α). Essas células expressam receptores TLR4s que reconhecem o lipopolissacarídeo (LPS), presente na parede celular de bactérias gram-negativas (DANTZER, 2009).

O LPS se liga ao TLR4, levando à produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 α e IL-1 β), que são capazes de induzir a própria síntese e a síntese de outras citocinas (TNF- α e IL-6), dessa forma, potencializando sua ação, ou levando à produção de citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e IL-1Ra, que é o antagonista específico de receptores de IL-1), antagonizando sua ação (DANTZER, 2009).

Há trabalhos que mostram que a administração periférica de LPS, IL-1 β ou TNF- α , mimetizam todos os sintomas que caracterizam o estado doentio, tais como: febre, ativação do eixo hipotálamo-hipófise-adrenal (HAA), redução da ingestão de

comida e outras atividades comportamentais, e a retirada do meio físico e social (DANTZER, 2008 citado por DANTZER, 2009).

Assim, esses achados experimentais indicam que as citocinas pró-inflamatórias medeiam os sinais clínicos da resposta do hospedeiro à infecção. As alterações fisiológicas e comportamentais que ocorrem no estado doente são mediadas no SNC (DANTZER, 2009).

Têm sido propostos dois mecanismos pelos quais a IL-1 e outras citocinas agem no cérebro: uma rota neural representada pelos neurônios aferentes primários e uma rota humoral.

A primeira hipótese, a de que as citocinas agem indiretamente no SNC por ativar neurônios aferentes, foi baseada no reconhecimento de que o calor e a dor, que são sinais de inflamação, requerem processos sensoriais, o que implica que os mediadores inflamatórios liberados no local da lesão ou infecção são capazes de sinalizar o cérebro. Quando LPS ou citocinas são injetados dentro da cavidade abdominal, há indução de inflamação no peritônio. Uma das principais rotas de sensibilidade visceral é representada pelas vias aferentes do nervo vago. Essas vias contêm macrófagos e células dendríticas no seu revestimento perineural, que expressam na membrana TLRs e produzem IL-1 β em resposta à injeção intraperitoneal de LPS (GOEHLER et al., 1999 citado por DANTZER, 2009). Neurônios sensoriais do nervo vago expressam receptores para IL-1, e a IL-1 β que estimulam a atividade sensorial vagal (EK et al., 1998 citado por DANTZER, 2009).

Além da rápida comunicação neuroimune descrita acima, há a rota humoral que envolve a produção de citocinas pró-inflamatórias pelas células fagocíticas que estão localizadas nos órgãos circumventriculares e nas células endoteliais dos vasos do cérebro, em resposta aos patógenos ou citocinas. Isto leva à produção local de citocinas e intermediários moleculares, tais como prostaglandinas (PGE₂) e óxido nítrico. A PGE₂ representa o principal mediador da febre induzida por citocina e da ativação do eixo HHA. Há relatos que o pré-tratamento com inibidores da ciclooxigenase (COX-2) atenua a febre e a ativação do eixo HHA (RIVEST et al., 2000; ROMANOVSKY, 2000 citado por DANTZER, 2009). A COX-2 e a prostaglandina E sintase são expressas nas células endoteliais dos vasos sanguíneos e macrófagos perivascularres. São induzidas após a administração

intravenosa de IL-1 β , levando à produção de PGE2. A PGE2 se difunde dentro do parênquima cerebral e age nos receptores neuronais EP3 ou EP4 no tronco encefálico e estruturas neurais hipotalâmicas que estão envolvidas no controle da atividade do eixo HHA e na regulação da temperatura corporal. Estas áreas incluem o núcleo catecolaminérgico do tronco encefálico, o núcleo paraventricular do hipotálamo e a área pré-óptica ventromedial (DANTZER, 2009).

De Paiva et al., 2010, avaliou a possível participação das prostaglandinas no comportamento doentio induzido por lipopolissacarídeo. Foi observado que a administração de LPS via intraperitoneal aumentou o tempo que o animal permaneceu imóvel no teste de suspensão pela cauda e o tempo que o animal permaneceu boiando no teste de nado forçado. Além disso, diminuiu a atividade locomotora no campo aberto e o número de transições entre os compartimentos escuro e claro. O pré-tratamento com nimesulida, indometacina ou dexametasona atenuou as alterações comportamentais nos testes citados acima, fornecendo a evidência que a síntese de prostaglandinas é necessária para as alterações dos comportamentos exploratório e como depressivo.

A ingestão reduzida de leite açucarado induzida por LPS e IL-1 está associada com a indução de COX-2 no endotélio cerebral (DUNNA et al., 2006). Este comportamento de redução de preferência à sacarose é conhecido por anedonia. Estes pesquisadores administraram IL-1 β e LPS via intraperitoneal. Observou-se que a IL-1 β e o LPS aumentaram a expressão de COX-2 no cérebro com consequente redução da ingestão alimentar e de leite açucarado.

Swiergiel and Dunn (2007) avaliaram os efeitos da IL-1 β e LPS nos testes de labirinto em cruz elevado e campo aberto. Neste estudo, foi observado que tanto a IL-1 β quanto o LPS induziram diminuições nas entradas nos braços abertos e fechados, indicando decréscimo na atividade geral. Tanto a IL-1 β e o LPS diminuíram o número de linhas cruzadas na periferia, bem como no número de vezes que o animal levantou-se e executou o processo de higienização. Então, os resultados sugerem uma redução da atividade locomotora dos animais nos testes de campo aberto e labirinto em cruz elevado.

Dunn e Swiergiel (2005) avaliaram os efeitos da interleucina-1 β e do LPS nos testes de suspensão pela cauda e nado forçado em camundongos. Esses dois

testes são os mais usados comumente para avaliar a atividade depressiva e antidepressiva. Neste experimento, foi observado que ambos, IL-1 β e LPS, podem induzir comportamento como depressivo nos testes de suspensão pela cauda e nado forçado, pois houve um aumento no tempo de imobilidade e no tempo que o animal permaneceu boiando. De forma paralela, foi observada redução na ingestão alimentar e na atividade no campo aberto. Portanto, os efeitos observados nos testes de nado forçado e suspensão pela cauda podem ser atribuídos a uma redução na atividade locomotora, não fornecendo suporte para o efeito depressivo.

No presente trabalho, o pré-tratamento nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg do extrato hidroetanólico das flores de *Pyrostegia venusta* em camundongos, atenuou o comportamento doentio induzido por LPS nos testes de nado forçado e campo aberto. Estes resultados foram análogos aos efeitos do pré-tratamento da dexametasona, uma droga esteroidal, que inibe as respostas imunes e inflamatórias, incluindo a produção de citocinas e prostaglandinas (EDDLESTON et al., 2007; WANG et al., 2008; YANG et al., 2009). Os resultados indicam que o EHPv contém princípios ativos responsáveis por esses efeitos, e suportam o uso da *P. venusta* no tratamento de doenças inflamatórias respiratórias, como gripe e resfriado.

Diante dos resultados obtidos, avaliamos as propriedades anti-inflamatórias através dos testes de peritonite e edema de pata induzido por carragenina; e antinociceptivas através dos testes de contorções abdominais induzidas por ácido acético e lambida de pata por injeção intraplantar de formalina.

2.3 Mediadores Inflamatórios e Transmissão Nociceptiva

Sabe-se que os mediadores inflamatórios, representados pelas citocinas, prostaglandinas, cininas e neurocininas, estão envolvidos na fisiopatologia da dor e são responsáveis pela sensibilização dos nociceptores dos aferentes primários da dor. Assim, dois grupos de mediadores inflamatórios são igualmente importantes na transmissão nociceptiva: aqueles que promovem uma sensibilização dos nociceptores (hiperalgesia), e outro que ativa os nociceptores sensibilizados. As citocinas, destacando-se as interleucinas IL-1, IL-2, IL-6 e IL-8 como as mais importantes, e as prostaglandinas seriam os principais representantes do primeiro grupo e as cininas (bradicinina) do segundo. A sensibilização dos nociceptores, que está associada com a dor inflamatória, é descrita como o decréscimo do limiar nociceptivo. Esta diminuição do limiar nociceptivo pode corresponder a um estado clínico conhecido como hiperalgesia, que é melhor definida em modelos animais como hipernocicepção, porque a percepção da dor em animais não é óbvia (CARVALHO; LEMÔNICA; 1998; VILLARREAL et al., 2009).

Destacam-se como produtos de danos teciduais e da inflamação: prótons extracelulares, ácido araquidônico e outros metabólitos de lipídeos, serotonina, bradicinina, nucleotídeos e NGF (fator de crescimento do nervo). Cada um desses fatores pode alterar a excitabilidade neuronal diretamente por interagir com canais de íons na superfície celular, ou se ligar a receptores metabotrópicos e mediar seus efeitos através da cascata de segundos mensageiros (WOOLF; SALTER, 2000).

Há descrito na literatura, que o monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) tem papel na sensibilização dos nociceptores induzida por um estímulo inflamatório (ALEY; LEVINE, 1999; CUNHA et al., 1999). O aumento do AMPc é frequentemente associado com a ativação da proteína cinase A em diferentes tipos de células (ALBERTS et al., 2002). Além disso, tem sido demonstrado que a proteína cinase A participa na hipernocicepção inflamatória (CUNHA et al., 1999). Galdino et al., 2010, demonstrou que a via endógena NO/GMPc/KATP participa na antinocicepção induzida no exercício aeróbico, pois já foi observado aumento dos níveis de nitrato após o exercício (PEREZ et al., 2002).

A ativação do nociceptor não somente transmite mensagens aferentes para a medula espinhal dorsal, e desta para o cérebro, mas também inicia o processo de inflamação neurogênica. Os nociceptores liberam neurotransmissores, notavelmente a substância P e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, induzindo vasodilatação, extravasamento de plasma, bem como a ativação de células não neuronais, como neutrófilos e mastócitos (JULIUS; BASBAUM, 2001).

Os sistemas sensoriais têm o papel de informar ao cérebro sobre o estado do meio externo e interno do organismo. A dor é uma percepção, que é detectada pelo sistema nociceptivo, o qual é um componente de controle de resposta à homeostase. A dor foi definida pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) como “uma experiência sensorial e emocional desagradável que é associada a lesões reais ou potenciais ou descrita em termos de tais lesões”. O termo nociceptivo refere-se ao potencial do estímulo em produzir lesão tecidual e reação do organismo (LE BARS et al., 2001).

As fibras que inervam regiões da cabeça e corpo possuem seus corpos celulares localizados nos gânglios da raiz dorsal e trigeminais e são categorizadas em três principais grupos baseado nos critérios anatômico e funcional. Assim, as fibras A β e A α são mielinizadas e de grande diâmetro e detectam estímulo inócuo aplicado sobre a pele, músculo e articulações, não contribuindo dessa maneira para a dor. São fibras que apresentam uma rápida velocidade de condução. As fibras de médio e pequeno diâmetro são pouco mielinizadas e não-mielinizadas, fibras A δ e C respectivamente, apresentam baixa velocidade de condução e que constituem a maioria dos nociceptores. As fibras A δ e C são responsáveis por mediar a primeira fase (rápida) e a segunda fase (lenta) da dor, respectivamente. Ambas detectam estímulo químico, mecânico e térmico (BASBAUM; JESSELL, 2000).

Os nociceptores são capazes de detectar uma ampla faixa de modalidades de estímulos, incluindo aqueles de natureza química e física. Essa característica os distingue dos neurônios sensoriais de outros sistemas. Além disso, um único tipo de estímulo pode interagir com múltiplos nociceptores, capacitando a célula em integrar a informação e responder com mudanças complexas no meio fisiológico (RAJA et al., 1999).

A aplicação de um estímulo elétrico tem as vantagens de ser quantificável, reproduzível e não-invasivo e de produzir sinais aferentes sincronizados. Entretanto, apresenta sérias desvantagens. Primeira, a estimulação elétrica não é um tipo natural de estímulo como aqueles encontrados pelos animais no seu meio. Além disso, o estímulo elétrico intenso excita uma fração de fibras não-diferenciais periféricas, incluindo as fibras de grande diâmetro, que não estão implicadas diretamente na nocicepção, bem como finas fibras A δ e C, que medeiam sensações de frio e calor, bem como informação nociceptiva. O calor é o estímulo mais seletivo dos receptores cutâneos. Consequentemente, categorias específicas de axônios periféricos, incluindo fibras termo sensitivas e nociceptivas, podem ser excitadas. Entretanto, o fraco poder calórico dos estimuladores que são geralmente usados (lâmpadas radiantes) tem sido uma limitação deste método (LE BARS et al., 2001).

Respostas produzidas por estímulo mecânico nocivo são formadas em relação à intensidade e/ou duração do estímulo, de reflexos através de vocalizações. Tem a desvantagem de ativar mecanorreceptores e nociceptores, não sendo um estímulo específico. A estimulação química envolve a administração de agentes algogênicos, que são substâncias capazes de produzir a dor. É importante a diferenciação entre o estímulo nociceptivo e estímulo algogênico. O primeiro é caracterizado por ativar nociceptores, capaz de lesar o tecido, e o segundo capaz de produzir a dor, mas não provoca dano tecidual (e como tal não pode ser chamado de estímulo nocivo). Representam uma forma de estimulação lenta ou muito lenta, o que o diferencia das outras formas de estímulo, mas são também progressivos e de longa duração. Os modelos de dor visceral ou peritoneal em animais envolvem a administração de agentes algogênicos (LE BARS et al., 2001; YEOMANS, 1996).

No presente trabalho, foi avaliada a propriedade anti-inflamatória através dos testes de edema de pata e peritonite. O teste de edema de pata induzido por carragenina é um modelo amplamente empregado para o *screening* de compostos anti-inflamatórios. O modelo experimental exhibe alto grau de reprodutibilidade. Em camundongos, a resposta inflamatória induzida pela carragenina é caracterizada por uma resposta bifásica com marcada formação de edema resultante da rápida produção de vários mediadores inflamatórios, tais como histamina, bradicinina e serotonina (primeira fase), que é subsequentemente sustentada pela liberação de

prostaglandinas e óxido nítrico (segunda fase) com pico às 3 horas, produzidas pelas isoformas induzíveis de COX (COX-2) e óxido nítrico sintase (iNOS), respectivamente (SEIBERT et al., 1994).

A peritonite consiste na migração leucocitária para a cavidade peritoneal induzida por lipopolissacarídeo. Os neutrófilos são uma classe de células sanguíneas, que são parte do sistema imune e um dos cinco maiores tipos de leucócitos. A neutrofilia é um dos sinais da inflamação e quando o LPS, o maior componente da parede celular de bactérias Gram-negativas, é administrado, observa-se um recrutamento de neutrófilos do sangue para os tecidos (BOZZA et al., 1994). *In vivo*, o LPS pode interagir com diferentes receptores de superfície de macrófagos, especialmente o complexo receptor 2 CD14/*Toll*, levando a eventos de sinalização intracelular e consequente secreção de mediadores inflamatórios tais como interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral α (TNF α), que é um fator quimiotático essencial para a neutrofilia (YANG et al., 1998).

Para a avaliação da atividade antinociceptiva, foram utilizados os testes de contorções abdominais induzidas por ácido acético e formalina. O teste de contorções é um modelo utilizado para avaliar a potencial atividade analgésica de drogas. Tem sido sugerido que o ácido acético atua liberando mediadores endógenos que estimulam os neurônios nociceptivos (COLLIER et al., 1968). É um modelo de dor visceral e a biossíntese de prostaglandinas desempenham um papel importante no mecanismo nociceptivo (DUARTE et al., 1988). Este é um método sensível à drogas anti-inflamatórias não-esteroidais, e aos narcóticos e a outras drogas de ação central (COLLIER et al., 1968; SANTOS et al., 1998).

O teste de formalina consiste em duas fases: aguda e tardia (HUNSKAAR; HOLE, 1987). A primeira fase e a segunda fase do teste da formalina tem propriedades diferenciais e, portanto, este teste é útil não apenas para avaliar as substâncias analgésicas, mas também para elucidar o mecanismo de analgesia (SHIBATA et al., 1989). A fase inicial, denominada dor não-inflamatória, é um resultado da estimulação direta de nociceptores e reflete a dor central; na segunda fase, a denominada dor inflamatória, é caracterizada pela inflamação local com liberação de mediadores inflamatórios e hiperalgesia (HUNSKAAR; HOLE, 1987).

3 OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi verificar se o extrato hidroetanólico das flores de *Pyrostegia venusta* apresenta propriedades farmacológicas usando protocolos experimentais com camundongos.

3.1 Objetivos específicos

Avaliar o efeito anti-inflamatório, antinociceptivo e comportamental do extrato hidroetanólico das flores de *Pyrostegia venusta* em camundongos.

4 RESULTADOS

Conforme descrito nas normas do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, artigo 22, a critério do orientador e do discente, a dissertação poderá ser apresentada sob a forma de 01 (um) volume contendo: uma revisão da literature, 1 artigo científico (número mínimo), tendo o mestrando como primeiro autor, representativo dos resultados obtidos no desenvolvimento da pesquisa proposta no programa.

No presente trabalho, os resultados serão apresentados a seguir, um artigo publicado e outro artigo submetido no *Journal of Ethnopharmacology*.

Provided for non-commercial research and education use.
Not for reproduction, distribution or commercial use.



This article appeared in a journal published by Elsevier. The attached copy is furnished to the author for internal non-commercial research and education use, including for instruction at the authors institution and sharing with colleagues.

Other uses, including reproduction and distribution, or selling or licensing copies, or posting to personal, institutional or third party websites are prohibited.

In most cases authors are permitted to post their version of the article (e.g. in Word or Tex form) to their personal website or institutional repository. Authors requiring further information regarding Elsevier's archiving and manuscript policies are encouraged to visit:

<http://www.elsevier.com/copyright>



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Ethnopharmacology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jethpharm

Ethnopharmacological communication

Pyrostegia venusta attenuate the sickness behavior induced by lipopolysaccharide in miceClarice C. Veloso^a, Andressa D. Bitencourt^a, Layla D.M. Cabral^a, Lidiane S. Franqui^a, Danielle F. Dias^b, Marcelo H. dos Santos^b, Roseli Soncini^a, Alexandre Giusti-Paiva^{a,*}^a Laboratory of Physiology, Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Alfenas, MG, 37130-000 Alfenas, MG, Brazil^b Laboratory of Phytochemistry and Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Alfenas, MG, Alfenas-MG, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 April 2010

Received in revised form 9 July 2010

Accepted 30 July 2010

Available online 18 August 2010

Keywords:

Bignoniaceae

Depressive-like behavior

Forced swim test

ABSTRACT

Aim of the study: *Pyrostegia venusta* (Ker.) Miers (Bignoniaceae) is native to the Brazilian Cerrado and popularly known as “cipó-de-são-joão.” In traditional Brazilian medicine, the *Pyrostegia venusta* are used as a general tonic as well as a treatment for diarrhea, vitiligo, cough, and common diseases of the respiratory system related to infections, such as bronchitis, flu and cold. This study was conducted to evaluate the effects of a hydroethanolic extract of flowers of *Pyrostegia venusta* on sickness behaviors induced by lipopolysaccharide in mice.

Materials and methods: To evaluate the effects of orally administered *Pyrostegia venusta* hydroethanolic extract (PvHE) on lipopolysaccharide-induced sickness behaviors, mice were submitted to the forced swim test (FST) and the open field test.

Results: Lipopolysaccharide (LPS, 100 µg/kg, i.p.) administration increased the time spent floating in the FST and depressed locomotor activity in the open field. Pretreatment with PvHE at test doses of 100 and 300 mg/kg, p.o. attenuated the behavioral changes induced by LPS in the FST and open field test. This effect was similar to pretreatment with dexamethasone (1 mg/kg), which is a steroidal drug that inhibits immune and inflammatory responses, including cytokine production.

Conclusion: The extract of *Pyrostegia venusta* attenuated the depressive-like and exploratory behaviors induced by lipopolysaccharide. Thus, our results supported previous claims of the usefulness of these plants in traditional therapies and suggest that these plants may be useful in the treatment of disorders that induced sickness behavior, such as flu and cold.

© 2010 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The Brazilian Cerrado (neotropical savanna) is one of the major biogeographic regions of the world with more than 7000 native species of vascular plants (Mendonça et al., 1998). Many of these plants are commonly used by people living in the Cerrado area as natural remedies to treat several illnesses (Blatt et al., 1998; Mendonça et al., 1998).

Pyrostegia venusta (Ker.) Miers is native to the Brazilian Cerrado and popularly known as “cipó-de-são-joão” or flame vine (Dos Santos and Blatt, 1998; Cardozo et al., 2009). In traditional Brazilian medicine, the aerial parts of *Pyrostegia venusta* are mainly used in an infusion or decoction. They are administered orally as a general tonic and to treat diarrhea, vitiligo, cough, and common diseases

of the respiratory system related to infections, such as bronchitis, flu and cold (Ferreira et al., 2000; Scalón et al., 2008; Cardozo et al., 2009). The immunological response triggered during bacterial and viral infection induces macrophage activation and production of inflammatory mediators such as cytokines (Kelley et al., 2003; Dantzer, 2009). Exposure to endotoxins or cytokines provokes a number of neuropsychological symptoms collectively referred to as ‘flu-like syndrome’ or sickness behavior. Some of these symptoms include anhedonia, fatigue, lethargy, depression, sleepiness and anorexia (Dantzer, 2009).

Based on ethnopharmacological information of the *Pyrostegia venusta*, the aim of this work was to evaluate the effects of a hydroethanolic extract of flowers of *Pyrostegia venusta* on sickness behavior induced by lipopolysaccharide in mice. These effects were measured using the forced swim test and the open field test, which are well-accepted tests to evaluate depressive-like and exploratory behaviors (Dunn and Swiergiel, 2005; Frenois et al., 2007; Swiergiel and Dunn, 2007).

* Corresponding author. Tel.: +55 35 3299 1303, fax: +55 35 3299 1063.
E-mail address: agiustipaiva@gmail.com (A. Giusti-Paiva).

2. Material and method

2.1. Plant material

Pyrostegia venusta (Ker.) Miers (Bignoniaceae) were collected in Alfenas, Minas Gerais, Brazil. Dr. G. Alves-da-Silva, Department of Pharmacy of Federal University of Alfenas, identified the plant, and the voucher specimen is deposited at the Herbarium of Federal University of Alfenas-MG.

2.2. Preparation of the plant extracts and reference drugs

The flowers of *Pyrostegia venusta* were dried in an oven at 40 °C and powdered. The *Pyrostegia venusta* hydroethanolic extract (PvHE) was obtained by maceration in 50% hydro-alcoholic solution for 48 h, at room temperature, and this procedure was repeated twice. The PvHE was concentrated on a rotary evaporator and then dried with a spray dryer (Büchi Mini Spray Dryer B-290). The yield of the PvHE was 6.0%. The residues were used for determining bioactivity.

The PvHE were administered in 30, 100, and 300 mg/kg doses after being suspended in vehicle (1% sodium carboxymethylcellulose suspension in distilled water). Dexamethasone in vehicle was used as reference drugs. Test drugs were orally administered in an equivalent volume of 10 ml/kg body weight of the animal.

2.3. Analysis of PvHE by high performance liquid chromatography (HPLC)

The high performance liquid chromatography analysis of PvHE was performed in Shimadzu LC-100 equipment using a C18 column Shimadzu CLC-ODS (250–4.6 mm) with a 5- μ m particle size. The mobile phases consisted of eluent A (0.5 mM/l aqueous acetic acid) and eluent B (methanol/acetic acid 0.1%). The gradient (A:B) utilized was the following: 0–5 min (10:90); 20 min (0:100); 30 min (0:100), with a solvent flow rate of 1.2 ml/min, at 254 nm, and the injection volume of 20 μ l at concentration of 1 mg/ml. LC solution software was used for data collection.

2.4. Animals

Adult male Swiss mice (22–28 g) were obtained from the Central Animal Facility of the Federal University of Alfenas and housed under controlled light (12:12 h light–dark cycle; lights on at 6:00 am) and temperature conditions (23 \pm 1 °C) with access to water and food ad libitum. The animals were allowed to habituate to the housing facilities for at least 1 week before the experiments began.

2.5. Experimental procedures

In the animal room, each mouse was removed from its cage, gently weighed, injected intraperitoneally, and returned to its home cage. Mice were pretreated with PvHE (30, 100 and 300 mg/kg, p.o.), dexamethasone (1 mg/kg, i.p.) or vehicle 30 min before injections of lipopolysaccharide (LPS) serotype 026:B6 (100 μ g/kg, i.p.) or saline (0.9% NaCl). The behavioral tests were performed 120 min later. LPS was purchased from Sigma–Aldrich Co. and dissolved in sterile isotonic saline.

2.5.1. Forced swim test (FST)

This test was performed according to the method developed by Porsolt et al. for mice. Mice ($n=12$ per group) were placed in a vertical glass cylinder (26 cm high, 12 cm in diameter) filled with 25 °C water to a depth of 16 cm. The water depth was chosen so that

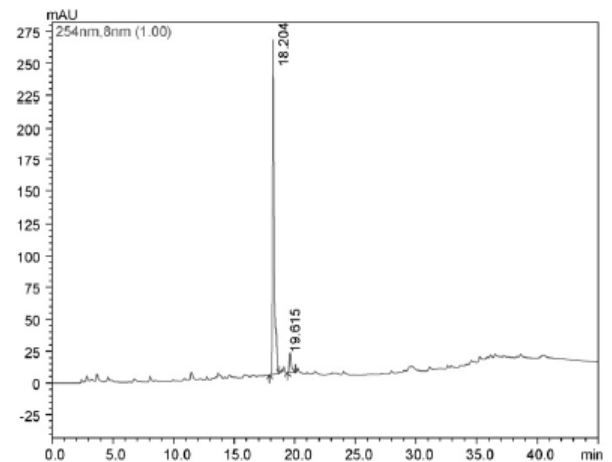


Fig. 1. High performance liquid chromatography profiles of *Pyrostegia venusta* hydroethanolic extract traced at 254 nm.

animals must swim or float without their hind limbs or tail touching the bottom. For testing, each mouse was placed in the cylinder for 6 min and the duration of floating (i.e., the time during which mice made only the smallest movements necessary to keep their heads above water) was scored. Based on a suggestion by Porsolt et al. (1997), we only analyzed and presented the data scored during the last 4 min (Dunn and Swiergiel, 2005).

2.5.2. Open field behavioral test

Locomotor activity was quantified for 5 min in an open field, which was a white Plexiglas box 60 cm \times 60 cm with its floor divided into 16 squares. Previous studies have indicated that this period was sufficient to indicate differences between treatment groups. Furthermore, if the test was longer than 5 min, the mice habituated to the apparatus, thereby decreasing differences between groups. Four squares were defined as the center, and the 12 squares along the walls were considered the periphery.

Each mouse ($n=10$ per group) was gently placed in the exact center of the box, and activity was scored as a line crossing when a mouse removed all four paws from one square and entered another. Line crossings among the central four squares and the peripheral 12 squares of the open field were counted separately (Dunn and Swiergiel, 2005).

2.6. Statistical analysis

The data obtained were analyzed using the GraphPad software program Version 4.0 and expressed as mean \pm S.E.M. Statistically significant differences among groups were calculated by the application of an analysis of variance (ANOVA) followed by the Bonferroni test. p Values less than 0.05 ($p < 0.05$) were considered significant.

3. Results

3.1. HPLC analysis

In HPLC/DAD analysis, with UV absorbance monitored at 254 nm and showed a compound as principal constituent at 18.2 min (78.2%, Fig. 1) with UV band at 285 and 332, and was identified as the flavonoid acacetin-7-O-glycoside (Mabry et al., 1970).

3.2. Activity in the forced swim test

There was a significant increase in the immobility period 120 min after administration of LPS ($F_{5,49} = 13.21$; $p < 0.0001$; Fig. 2) in mice pretreated with vehicle. Pretreatment with PvHE (30–300 mg/kg) significantly reversed the LPS-mediated increase in the immobility period during the FST ($p < 0.05$).

3.3. Locomotor activity in the open field

LPS significantly decreased the number of line crossings in the center ($F_{5,45} = 2.861$, $p = 0.026$; Fig. 3A) and in the periphery ($F_{5,45} = 6.147$, $p = 0.0003$; Fig. 3B) as well as the total number of line crossings ($F_{5,45} = 5.414$, $p = 0.0007$; Fig. 3C). LPS also decreased the number of rears ($F_{5,45} = 2.98$, $p = 0.0223$; Fig. 3D). Post hoc analysis indicated that pretreatment with PvHE (30, 100 and 300 mg/kg) significantly reversed LPS-induced decreases in locomotor activity in the open field ($p < 0.05$).

4. Discussion

Sickness behavior is the expression of a motivational state

triggered by activation of the peripheral innate immune system, which is characterized by a reduction in locomotor activity and exploratory behaviors. In the present study, LPS administration increased the time spent floating in the FST and depressed locomotor activity in the open field. These effects are characteristic of treatments that have been shown to induce depression, and an accompanying deficit in locomotor activity would likely affect performance in the FST. The mechanisms underlying sickness behaviors have not been fully elucidated, but studies have suggested the involvement of cytokines and prostaglandins, which are secreted in response to infections and endotoxemia (Kelley et al., 2003; Harden et al., 2008; Dantzer, 2009).

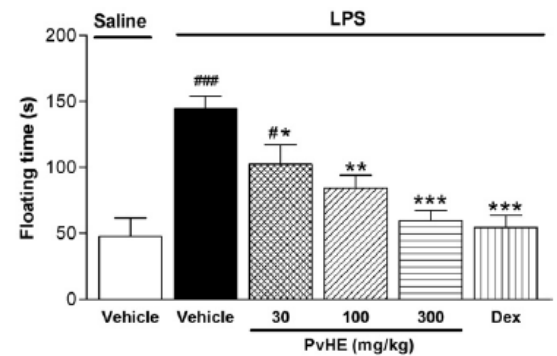


Fig. 2. Effect of the pretreatment with vehicle, *Pyrostegia venusta* hydroethanolic extract (PvHE; 30, 100 and 300 mg/kg, p.o.) or dexamethasone (Dex, 1 mg/kg) on time spent floating in the forced swim test (top, $n = 10$ animals per group), which were measured 2 h after administration of either lipopolysaccharide (LPS) or saline. Each column represents the mean with S.E.M. The symbols denote the significance levels: # $p < 0.05$ and ## $p < 0.01$ when compared with the control groups (vehicle plus saline); * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ when compared with the vehicle plus LPS group.

Our study showed that the hydroethanolic extract of flowers of *Pyrostegia venusta* attenuated the behavioral changes induced by LPS in the FST and open field test. These results were analogous to the effects of pretreatment with dexamethasone, a steroidal drug that inhibits immune and inflammatory responses, including cytokine and prostaglandin production (Eddleston et al., 2007; Wang et al., 2008; Yang et al., 2009). Indeed, dexamethasone reversed LPS-induced sickness behavior.

Previous phytochemical investigation of flowers of *Pyrostegia venusta* resulted in the isolation of hentriacontane, meso-inositol, β -sitosterol and 7-O- β -D-glucuronopyranosyl-acacetin

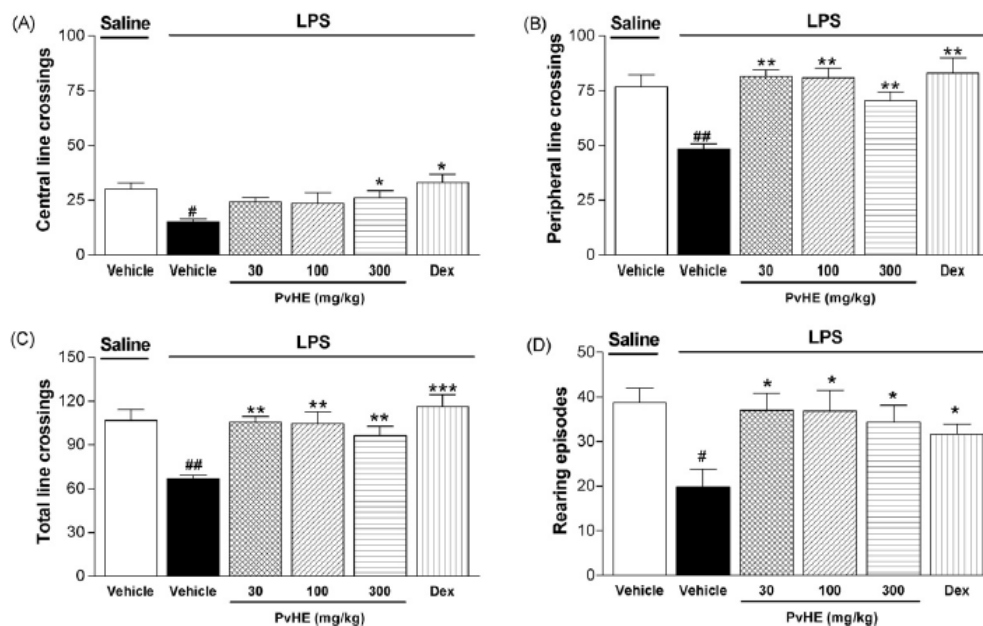


Fig. 3. Effect of the pretreatment with vehicle, *Pyrostegia venusta* hydroethanolic extract (PvHE; 30, 100 and 300 mg/kg, p.o.) or dexamethasone (Dex, 1 mg/kg) on central (A), peripheral (B) and total (C) line crossings, and rearing (D) in the open field test ($n = 10$ per group), which were measured 2 h after administration of either lipopolysaccharide (LPS) or saline. Each column represents the mean with S.E.M. The symbols denote the significance levels: # $p < 0.05$ and ## $p < 0.01$ when compared with the control groups (vehicle plus saline); * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ when compared with the vehicle plus LPS group.

(Dubey and Misra, 1976; Ferreira et al., 2000; Krishna et al., 2002; Cardozo et al., 2009). The anti-inflammatory activities of β -sitosterol, isolated from the *Cyperus rotundus*, have been shown in carrageenan-induced edema in rats. β -Sitosterol was found to possess potent anti-inflammatory activities, similar to that of hydrocortisone, when administered intraperitoneally (Gupta et al., 1980). Furthermore, β -sitosterol has been shown to inhibit the growth of PC-3 human prostate cancer cells and is effective in inducing apoptosis. Its mechanism of action may involve prostaglandin production (Awad et al., 2005). In addition, acacetin (5,7-dihydroxy-4'-methoxyflavone), a flavonoid compound, has anti-inflammatory effects (Shen et al., 2010). Pan et al. (2006) demonstrated that acacetin inhibited the induction of nitric oxide synthase (NOS) and cyclooxygenase-2 (COX-2) in macrophages activated with LPS by inhibiting the transcriptional activation.

Sickness behavior is a medical term that refers to prolonged depressed feelings and behavioral changes brought on by physical illness, whether temporary illness like the flu or a cold, or something chronic like heart disease, diabetes or cancer. The rationale to evaluate LPS-induced depressive-like behaviors (sickness behav-

ior) of the extract was supported by the use of *Pyrostegia venusta* as a general tonic as well as a treatment for the general symptoms of flu and cold. Furthermore, chemical analysis of the extract will be conducted to isolate and characterize the active principles responsible for the observed effects.

Acknowledgments

This work was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais, Brazil (FAPEMIG; Grants # APQ-1272-08 and # APQ-2887-09). We thank Marina de Fátima Venâncio and José dos Reis Pereira for their excellent technical assistance.

References

- Awad, A.B., Burr, A.T., Fink, C.S., 2005. Effect of resveratrol and beta-sitosterol in combination on reactive oxygen species and prostaglandin release by PC-3 cells. *Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids* 72, 219–226.
- Blatt, C.T., dos Santos, M.D., Salatino, A., 1998. Flavonoids of Bignoniaceae from the "cerrado" and their possible taxonomic significance. *Plant Systematic and Evolution* 210, 289–292.
- Cardozo, N.P., Parreira, M.C., Alves, P.L., Bianco, S., 2009. Foliar area estimate of two sugarcane-infesting weeds using leaf blade linear dimensions. *Planta Daninha* 27, 683–687.
- Dantzer, R., 2009. Cytokine, sickness behavior, and depression. *Immunology and Allergy Clinics of North America* 29, 247–264.
- Dos Santos, M.D., Blatt, C.T., 1998. A quantitative analysis of foliar flavonoids and total phenolics of *Pyrostegia venusta* Miers. from both the forest and cerrado. *Revista Brasileira de Botânica* 21, 135–140.
- Dubey, R.C., Misra, K., 1976. Chemical components of *Pyrostegia venusta* flowers. *Journal of the Indian Chemical Society* 53, 378–381.
- Dunn, A.J., Swiergiel, A.H., 2005. Effects of interleukin-1 and endotoxin in the forced swim and tail suspension tests in mice. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* 81, 688–693.
- Eddleston, J., Herschbach, J., Wagelie-Steffen, A.L., Christiansen, S.C., Zuraw, B.L., 2007. The anti-inflammatory effect of glucocorticoids is mediated by glucocorticoid-induced leucine zipper in epithelial cells. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 119, 115–122.
- Ferreira, D.T., Alvares, P.S., Houghton, P.J., Braz-Filho, R., 2000. Chemical constituents from roots of *Pyrostegia venusta* and considerations about its medicinal importance. *Química Nova* 23, 42–46.
- Frenois, F., Moreau, M., O'Connor, J., Lawson, M., Micon, C., Lestage, J., Kelley, K.W., Dantzer, R., Castanon, N., 2007. Lipopolysaccharide induces delayed Fos/DeltaFosB immunostaining within the mouse extended amygdala, hippocampus and hypothalamus, that parallel the expression of depressive-like behavior. *Psychoneuroendocrinology* 32, 516–531.
- Gupta, M.B., Nath, R., Srivastava, N., Shanker, K., Kishor, K., Bhargava, K.P., 1980. Anti-inflammatory and antipyretic activities of beta-sitosterol. *Planta Medica* 39, 157–163.
- Harden, L.M., du Plessis, I., Poole, S., Laburn, H.P., 2008. Interleukin (IL)-6 and IL-1 beta act synergistically within the brain to induce sickness behavior and fever in rats. *Brain, Behavior, and Immunity* 22, 838–849.
- Kelley, K.W., Bluthé, R.M., Dantzer, R., Zhou, J.H., Shen, W.H., Johnson, R.W., Brossard, S.R., 2003. Cytokine-induced sickness behavior. *Brain, Behavior, and Immunity* 17, 112–118.
- Krishna, V., Sharma, S., Pareek, R.B., Singh, P., 2002. Terpenoid constituents from some indigenous plants. *Journal of the Indian Chemical Society* 79, 550–552.
- Mabry, T.J., Markham, K.R., Thomas, M.B., 1970. *The Systematic Identification of Flavonoids*. Springer-Verlag, Berlin.
- Mendonça, R.C., Felfili, J.M., Walter, B.M., Silva, M.C., Rezende, A.R., Filgueiras, T.S., Nogueira, P.E., 1998. Flora vascular do Cerrado. In: Sano, S.M., Almeida, S.P. (Eds.), *Cerrado ambiente e flora*, EMBRAPA, Planaltina Distrito Federal, pp. 286–556.
- Pan, M.H., Lai, C.S., Wang, Y.J., Ho, C.T., 2006. Acacetin suppressed LPS-induced up-expression of iNOS and COX-2 in murine macrophages and TPA-induced tumor promotion in mice. *Biochemical Pharmacology* 72, 1293–1303.
- Porsolt, R.D., Bertin, A., Jalfre, M., 1997. Behavioral despair in mice: a primary screening test for antidepressants. *Archives Internationales de Pharmacodynamie et de Thérapie* 229, 327–336.
- Scalon, S.P., Vieira, M.C., Lima, A.A., Souza, C.M., Mussury, R.M., 2008. Pregerminative treatments and incubation temperatures on the germination of "cipó-de-São-João" [*Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers] – Bignoniaceae. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* 10, 37–42.
- Shen, K.H., Hung, S.H., Yin, L.T., Huang, C.S., Chao, C.H., Liu, C.L., Shih, Y.W., 2010. Acacetin, a flavonoid, inhibits the invasion and migration of human prostate cancer DU145 cells via inactivation of the p38 MAPK signaling pathway. *Molecular and Cell Biochemistry* 333, 279–291.
- Swiergiel, A.H., Dunn, A.J., 2007. Effects of interleukin-1beta and lipopolysaccharide on behavior of mice in the elevated plus-maze and open field tests. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 86, 651–659.
- Wang, X.Q., Zhou, X., Zhou, Y., Rong, L., Gao, L., Xu, W., 2008. Low-dose dexamethasone alleviates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats and upregulates pulmonary glucocorticoid receptors. *Respirology* 13, 772–780.
- Yang, Y.H., Aeberli, D., Dacumos, A., Xue, J.R., Morand, E.F., 2009. Annexin-1 regulates macrophage IL-6 and TNF via glucocorticoid-induced leucine zipper. *The Journal of Immunology* 183, 1435–1445.

Manuscript Number: JEP-D-10-02340

Title: Anti-inflammatory and antinociceptive effects of the hydroethanolic extract of the flowers of *Pyrostegia venusta* (Ker.) Miers

Article Type: Full Length Article

Keywords: Bignoniaceae, antinociceptive activity, anti-inflammatory activity.

Corresponding Author: Mrs. Fabiana Cardoso Vilela,

Corresponding Author's Institution: Federal University of Alfenas–MG

First Author: Clarice C Veloso

Abstract

1
2
3 *Aim of the study:* *Pyrostegia venusta* (Ker.) Miers (Bignoniaceae) is native to the
4
5 Brazilian Cerrado and popularly known as “cipó-de-são-joão.” In Brazilian folk
6
7 medicine, the flowers of *P. venusta* are used as a general tonic and a treatment for
8
9 diarrhea, vitiligo, cough, and common infections and inflammatory diseases of the
10
11 respiratory system, such as bronchitis, flu, and cold. Nevertheless, scientific information
12
13 regarding *Pyrostegia venusta* is scarce; there are no reports related to its possible anti-
14
15 inflammatory and antinociceptive effects.
16
17

18
19
20
21 *Materials and methods:* The *Pyrostegia venusta* hydroethanolic extract (PvHE) was
22
23 used to evaluate the anti-inflammatory and analgesic effects using carrageenan-induced
24
25 paw edema, peritonitis induced by lipopolysaccharide, acetic acid-induced writhing, and
26
27 formalin-induced paw-licking tests in Swiss male mice.
28
29

30
31
32 *Results:* The PvHE at test doses of 30-300 mg/kg p.o. demonstrated that the anti-
33
34 inflammatory effects by the reduced paw edema was induced by carrageenan and
35
36 inhibited the leukocyte recruitment into the peritoneal cavity. The extracts were tested
37
38 in doses of 30-300 mg/kg p.o. and demonstrated antinociceptive activity in acetic acid-
39
40 induced writhing and formalin tests.
41
42

43
44
45 *Conclusion:* Our results demonstrate that the hydroethanolic extract of the flowers of
46
47 *Pyrostegia venusta* markedly demonstrated anti-inflammatory and antinociceptive
48
49 action in mice and the oral administration of these extracts showed no apparent acute
50
51 toxicity.
52
53
54

*Manuscript

[Click here to view linked References](#)

1 **Anti-inflammatory and antinociceptive effects of the hydroethanolic extract of the**
2 **flowers of *Pyrostegia venusta* (Ker.) Miers**

3
4
5 Clarice C. Veloso^a, Layla D. M. Cabral^a, Andressa D. Bitencourt^a, Lidiane S. Franqui^a,
6
7 Flávia V. Santa-Cecília^b, Danielle F. Dias^b, Roseli Soncini^a, Fabiana C. Vilela^a,
8
9 Alexandre Giusti-Paiva^a

10
11
12
13
14
15
16
17 ^a Laboratory of Physiological Sciences, Institute of Biomedical Sciences, Federal
18
19
20 University of Alfenas–MG, 37130-000 Alfenas, Brazil

21
22
23 ^b Faculty of Pharmaceutical Sciences, Federal University of Alfenas-MG, 37130-000
24
25 Alfenas, Brazil

26
27
28
29
30
31
32
33
34 * Corresponding author:

35 Alexandre Giusti-Paiva, PhD
36 Instituto de Ciências Biomédicas
37 Universidade Federal de Alfenas
38 Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700
39 Centro

40
41
42
43
44 37130-000
45 Alfenas, MG
46 Brasil
47 Tel: +55 35 32991303
48 Fax: +55 35 32991063
49 e-mail: agiustipaiva@gmail.com
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Abstract

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Aim of the study: *Pyrostegia venusta* (Ker.) Miers (Bignoniaceae) is native to the Brazilian Cerrado and popularly known as “cipó-de-são-joão.” In Brazilian folk medicine, the flowers of *P. venusta* are used as a general tonic and a treatment for diarrhea, vitiligo, cough, and common infections and inflammatory diseases of the respiratory system, such as bronchitis, flu, and cold. Nevertheless, scientific information regarding *Pyrostegia venusta* is scarce; there are no reports related to its possible anti-inflammatory and antinociceptive effects.

Materials and methods: The *Pyrostegia venusta* hydroethanolic extract (PvHE) was used to evaluate the anti-inflammatory and analgesic effects using carrageenan-induced paw edema, peritonitis induced by lipopolysaccharide, acetic acid-induced writhing, and formalin-induced paw-licking tests in Swiss male mice.

Results: The PvHE at test doses of 30-300 mg/kg p.o. demonstrated that the anti-inflammatory effects by the reduced paw edema was induced by carrageenan and inhibited the leukocyte recruitment into the peritoneal cavity. The extracts were tested in doses of 30-300 mg/kg p.o. and demonstrated antinociceptive activity in acetic acid-induced writhing and formalin tests.

Conclusion: Our results demonstrate that the hydroethanolic extract of the flowers of *Pyrostegia venusta* markedly demonstrated anti-inflammatory and antinociceptive action in mice and the oral administration of these extracts showed no apparent acute toxicity.

Keywords: Bignoniaceae, antinociceptive activity, anti-inflammatory activity.

1. Introduction

1
2
3
4
5
6 Many species belonging to the Bignoniaceae family, such as *Pyrostegia venusta*,
7
8 are known to be of medicinal value (Emmanuel et al., 2010). *Pyrostegia venusta* is
9
10 popularly known in Brazil as “cipó-de-são-joão”, “cipó caititu”, “cipó tingá” and “dedo
11
12 de moça” (Pool, 2008) and is widely distributed in the cerrado, which is has been noted
13
14 as being a typical ecosystem of central and southeastern Brazil (Blatt et al., 1998). In
15
16 folk medicine, the aerial parts of *Pyrostegia venusta* are mainly used as an infusion or
17
18 decoction. They are administered orally as a general tonic for the treatment of diarrhea,
19
20 vitiligo, cough and common infections and inflammatory diseases of the respiratory
21
22 system, such as bronchitis, flu and the common cold (Cardozo et al., 2009; Ferreira et
23
24 al., 2000; Scalon et al., 2008).
25

26
27
28 The literature records the phytochemical study of the flowers of *Pyrostegia*
29
30 *venusta*, from which the compounds β -sitosterol, n-hentriacontane,
31
32 acacetin-7-O- β -glucopyranoside and meso-inositol have been isolated (Dubey and
33
34 Misra, 1976; Veloso et al., 2010). Other studies have indicated the presence of
35
36 carotenoids in the flowers (Harborne, 1967) and rutin in the leaves (Blatt et al., 1998).
37
38
39
40
41
42
43

44
45 Due to the large variety of compounds found in the flowers of this species and a
46
47 need to effectively identify new anti-inflammatory and analgesic therapies, the objective
48
49 of this study was to evaluate the anti-inflammatory and analgesic effects of the
50
51 hydroethanolic extract of *Pyrostegia venusta* flowers in animal models.
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

2. Material and methods

2.1. Plant material

Pyrostegia venusta (Ker.) Miers (Bignoniaceae) were collected in Alfenas, Minas Gerais, Brazil. The plant was identified by Dr. G. Alves-da-Silva from the Department of Pharmacy at the Federal University of Alfenas, and the voucher specimen (699) has been deposited at the Herbarium of the Federal University of Alfenas-MG.

2.2. Preparation of the plant extracts and reference drugs

The flowers of *Pyrostegia venusta* were dried in an oven at 40 °C and powdered. The *Pyrostegia venusta* hydroethanolic extract (PvHE) was obtained by maceration in a 50% hydro-alcoholic solution for 48 h at room temperature, and this procedure was repeated twice. The PvHE was concentrated on a rotary evaporator and then dried with a spray dryer (Büchi Mini Spray Dryer B-290). The yield of the PvHE was 6.0%. The residues were used for determining bioactivity.

The PvHE were administered in 30, 100, and 300 mg/kg doses after being suspended in a vehicle (1% sodium carboxymethylcellulose suspension in distilled water). The animals in the control group received the same experimental handling as those in the test groups, with the exception that the drug treatment was replaced with appropriate volumes of the dosing vehicle. Dexamethasone (1 mg/Kg), indomethacin (10 mg/kg) and morphine sulphate (10 mg/kg) were used as reference drugs in the

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29

vehicle. All test drugs were intraperitoneally administered, except for indomethacin, which was orally administered.

2.3. Determination of the total phenolics and flavonoids in the PvHE

The total phenolic content in the PvHE was determined using the Folin-Ciocalteu technique, and the total flavonoid content was determined according to the methods of Singleton et al., 1999.

2.4. Pharmacological procedures

2.4.1. Animals

30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54

Adult male Swiss mice (22–28 g) were obtained from the Central Animal Facility of the Federal University of Alfenas and housed under controlled light (12:12 h light:dark cycle; lights on at 6:00 am) and temperature conditions ($23 \pm 1^\circ\text{C}$) with access to water and food *ad libitum*. The animals were allowed to habituate to the housing facilities for at least one week before the experiments were started.

2.4.2. Evaluation of anti-inflammatory activity in mice

2.4.2.1. Carrageenan-induced mice paw edema.

55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Pedal inflammation in mice was produced as described previously by Vinegar and collaborators (1969), following an overnight fast with free access to water. Paw edema was measured with a plethysmometer (Model 7140, Ugo Basile, Italy). The basal

1 volume of the right hind paw was determined before the administration of any drug.
2 After determination of the basal volume, the animals (n = 8 per group) were divided
3 into the experimental groups in such a way that the mean volumes of the different
4 groups were similar. The vehicle, PvHE or indomethacin was orally administered 1 h
5 before the i.pl. injection of carrageenan (1,000 µg/paw, 20 µl). The paw volume was
6 measured at 1, 2, 3 and 4 h after injection of the inflammatory stimulus. The results are
7 presented as the paw volume (ml) variation in relation to the basal values.
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21

22 2.4.2.2. Peritonitis induced by lipopolysaccharide

23
24 To assess the possible effect of the PvHE on leukocyte recruitment into the
25 peritoneal cavity, the animals (n = 8 per group) were orally pre-treated with the vehicle
26 and PvHE and intraperitoneally administered with dexamethasone. Thirty minutes later,
27 lipopolysaccharide (LPS) from *Escherichia coli* serotipo 026:B6 (100 µg/kg i.p.)
28 dissolved in pyrogen-free sterile saline was administrated. Four hours after the injection
29 of LPS, the mice were killed by an inhalatory overdose of halothane, and the cells from
30 the peritoneal cavities were harvested by injecting 5.0 ml of PBS containing 0.5% of
31 sodium citrate. The abdomens were gently massaged and the blood-free cell suspension
32 was carefully aspirated with a syringe. Abdominal washings were placed into plastic
33 tubes, and total cell counts were performed immediately in a Neubauer chamber (Cunha
34 et al., 1989; Vilela et al., 2010).
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55

56 2.4.3. Evaluation of antinociceptive activity in mice

57 2.4.3.1. Acetic acid-induced writhing in mice

58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Acetic acid (0.6% v/v, 10 ml/kg) was injected into the peritoneal cavities of mice, which were placed in a large glass cylinder, and the intensity of the nociceptive behavior was quantified by counting the total number of writhes occurring between 0 and 20 min after the stimulus injection, as described earlier by Koster et al., (1959). Oral treatments with the vehicle, indomethacin or the PvHE, were given 1 h prior to the acetic acid injection ($n = 6$ per group). Morphine was intraperitoneally administered (i.p.) 30 min before the test. The writhing response consists of a contraction of the abdominal muscle together with a stretching of the hind limbs. The antinociceptive activity was expressed as writhing scores over a period of 20 min.

2.4.3.2. Formalin-induced nociception

A formalin solution (5% in 0.9% saline; 20 μ l/paw) was injected into the hind paw plantar surface (i. pl.), and the animals were individually placed in transparent observation chambers, as previously described (Santos and Calixto, 1997). Oral treatments (p.o.) with the vehicle, indomethacin or the PvHE were given 1 h prior to formalin injection ($n = 8$ per group). Morphine was administrated (i.p.) 30 min before the test. The time spent in licking the injected paw was recorded and expressed as the total licking time in the early phase (0–5 min) and late phase (20–30 min) after formalin injection.

2.4.4. Open-field test

To discard the possible nonspecific muscle relaxants or the sedative effects of the extract, the motor performance of the mice was evaluated on the open-field

1 apparatus (Archer, 1973). Groups of mice ($n = 10$) were treated with the vehicle or
2 PvHE one hour before the performance of the test. Each animal was placed in the center
3 of the open-field arena and allowed to have free ambulation for 5 min for the
4 observation of the locomotion frequency (number of floor units the animal entered on
5 all its limbs).
6
7
8
9
10

11 2.4.5. Evaluation of acute toxicity of the *Pyrostegia venusta* extract

12 The PvHE (0.5-5 g/Kg) was orally administered to a group of mice, both male
13 and female. The behavior parameters observed after administration were convulsion,
14 hyperactivity, sedation, grooming, and increased or decreased respiration during a
15 period of seven days.
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33

34 2.5. Statistical analysis

35 The data obtained were analyzed using the GraphPad software program v.4.0
36 and expressed as mean \pm S.E.M. Statistically significant differences between the groups
37 were calculated by the application of an analysis of variance (ANOVA), followed by
38 the Newman-Keuls test ($p < 0.05$ were considered significant).
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

3. Results

3.1. Total phenols and flavonoids contents

The analysis showed that the level of polyphenolics in the PvHE was 998 mg/g extract. The content of total flavonoids was 543 mg quercetin equivalent/g extract. Our previous reports showed that a principal constituent was identified as the flavonoid acacetin-7-*O*-glycopyranoside by HPLC/DAD analysis (Veloso et al., 2010).

3.2. Carrageenan-induced mice paw edema

Figure 1 shows that the PvHE significantly inhibited ($F_{4,35} = 6.12$; $P = 0.0009$) the carrageenan-induced mice paw edema at doses of 30-300 mg/kg at 3 h post carrageenan, for which the inhibitory values of edema were 56.5%, 74.78% and 89.13%, for 30, 100 and 300 mg/kg of the PvHE, respectively. Indomethacin (10 mg/kg) gave a percentage inhibition of 73.48%.

3.2. Peritonitis induced by lipopolysaccharide

In agreement with previous studies, LPS-induced peritonitis was followed by a significant increase in the number of leukocytes in the peritoneal cavity of mice when compared to the control group treated only with the vehicle (Vilela et al., 2010). The PvHE significantly inhibited ($F_{5,35} = 8.29$; $p < 0.001$) leukocyte recruitment induced by LPS (100 μ g/kg) into the peritoneal cavity in mice at doses of 30-300 mg/kg. The

1 percentage inhibition of leukocyte recruitment at 4 h post-LPS were 51.7%, 87.3% and
2 95.2% for 30, 100 and 300 mg/kg of the extract, respectively. Dexamethasone (1
3 mg/Kg) gave a significant percentage inhibition ($p < 0.001$) of 98.9%.
4
5
6
7
8
9
10

11 3.4. Acetic acid-induced writhing in mice 12 13 14

15 Fig 3 shows the results of the acetic acid writhing test. The PvHE at doses of 100
16 and 300 mg/kg significantly reduced ($F_{4,42} = 7.67$; $p < 0.001$) the number of writhes by
17 43.20% and 69.10%, respectively. Indomethacin at a dose of 10 mg/kg exhibited a
18 significant percentage reduction ($p < 0.001$) in acetic acid-induced writhing of 65.32%.
19
20
21
22
23

24 25 26 27 28 29 3.5. Formalin test in mice 30 31

32 The PvHE at doses of 30–300 mg/kg p.o. induced a significant antinociceptive
33 activity compared to the control, reducing formalin-induced nociceptive responses
34 during the first ($F_{5,57} = 6.14$; $p < 0.001$; Fig. 4A) and second ($F_{5,57} = 7.90$; $p < 0.001$; Fig.
35 4B) phases. The reference drug indomethacin suppressed only the second phase of the
36 formalin test, whereas morphine inhibited both phases of the pain stimulus.
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49

50 3.6. Open-field test 51 52

53 Mice treated with the PvHE at 30–300 mg/kg did not display a reduction in the
54 numbers of crossings and rearings when compared to the control group in the open-field
55 test (data not shown).
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

3.7. Acute toxicity

The PvHE given to mice at a dose of 0.5–5 g/kg p.o. had no effect on their behavioral responses during the observation period of seven days after administration. No mortality was observed up to seven days of monitoring. The LD₅₀ value of these extracts in mice was, therefore, estimated to more than 5 g/kg p.o. Because the effective dose used in the present study (100 mg/kg p.o.) was 5-fold less than the dose used in the acute toxicity test, it was safe to assume that the normal doses of 30, 100, and 300 mg/kg p.o. given to mice in this study were safe.

4. Discussion

The flowers of *Pyrostegia venusta* are commonly used in traditional Brazilian medicine for the treatment of various inflammatory diseases. However, its pharmacological actions have not been thoroughly investigated to date. The present study demonstrated that the hydroethanolic extract of the flowers of *Pyrostegia venusta* display antinociceptive and anti-inflammatory properties. Because the extract did not produce any mortality in mice even in a dose of 5 g/kg, it may be considered relatively safe.

In this study, the anti-inflammatory activity of the hydroethanolic extract from the flowers of *Pyrostegia venusta* were evaluated using the carrageenan-induced mice paw edema and peritonitis induced by lipopolysaccharide model. In mice, the

1 inflammatory response induced by carrageenan is characterized by a biphasic response.
2
3 Marked edema formation resulting from the rapid production of several inflammatory
4
5 mediators, such as histamine, serotonin and bradykinin, is observed in the first-phase.
6
7 The second-phase is characterized by the release of prostaglandins and nitric oxide with
8
9 a peak at 3 h, produced by inducible isoforms of COX (COX-2) and nitric oxide
10
11 synthase (iNOS), respectively (Seibert et al., 1994). Oral administration of the PvHE
12
13 suppressed the edematous response in a dose-dependent manner 3 h after the
14
15 carrageenan injection. The inhibitory effect of the PvHE on the carrageenan-induced
16
17 inflammation in mice may be due to the inhibition of cyclooxygenase (Morris, 2003)
18
19 because its effect can be compared to that caused by indomethacin. In another model of
20
21 acute inflammation (peritonitis induced by lipopolysaccharide), the PvHE significantly
22
23 reduced the leukocyte migration to the peritoneal cavity induced by
24
25 lipopolysaccharides.
26
27
28
29
30
31

32 This work shows that the PvHE p.o. produces significant antinociception
33
34 according to the assessment of the abdominal writhes elicited by acetic acid and the
35
36 formalin test in mice. The PvHE was shown to possess anti-nociceptive activity to the
37
38 abdominal writhes elicited by acetic acid. Pretreatment with the PvHE in doses of 100
39
40 and 300 mg/kg reduced the number of acetic acid-induced writhes in mice significantly.
41
42 This model, which is a visceral pain model, releases arachidonic acid via
43
44 cyclo-oxygenase (COX); prostaglandins biosynthesis plays a notably important role in
45
46 the nociceptive mechanism (Duarte et al., 1988). The results of the present study
47
48 indicate that the analgesic effect of the PvHE may possibly be triggered by the
49
50 inhibition of the synthesis or action of prostaglandin. The PvHE was found to be
51
52 effective in both phases of formalin response, acute and delayed. The early phase,
53
54 named the non-inflammatory pain, is a result of the direct stimulation of nociceptors
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 and reflects centrally-mediated pain; the late phase, named the inflammatory pain, is
2 caused by local inflammation with a release of inflammatory and hyperalgesic
3 mediators (Hunnskaar and Hole, 1987). In this study, administration of the PvHE induced
4 antinociceptive activities in both the early and late phases of the formalin test.
5
6
7 Considering the inhibitory property of the PvHE on the first phase of formalin, it is
8 presumed that its possible antinociceptive activity is due, at least in part, to a decrease in
9 the depolarization of the sodium channels present in the cell membrane of the peripheral
10 nociceptors. Moreover, the antinociceptive effect of the PvHE in the second phase is
11 due to its possible anti-inflammatory action, inhibiting the release of the inflammatory
12 mediators. The possible nonspecific action of the muscle relaxants or the sedative
13 effects was discarded, as tested on the open-field apparatus. This result corroborates the
14 anti-inflammatory and antinociceptive effect of the PvHE suggested by the nociceptive
15 tests.
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30

31
32 In previous studies, β -sitosterol, n-hentriacontane,
33 acacetin-7-O- β -glucopyranoside and meso-inositol were identified (Dubey and Misra,
34 1976). The anti-inflammatory activities of β -sitosterol isolated from the *Cyperus*
35 *rotundus*, have shown carrageenan-induced edema in rats. β -sitosterol is found to
36 possess potent anti-inflammatory activities, similar to that of hydrocortisone, when
37 administered intraperitoneally (Gupta et al., 1980). Others studies have demonstrated
38 that acacetin inhibits the induction of nitric oxide synthase (NOS) and
39 cyclooxygenase-2 (COX-2) in macrophages that are activated with LPS by inhibiting
40 the transcriptional activation (Shen et al., 2010; Pan et al., 2006). In addition, Veloso et
41 al. (2010) observed that the hydroethanolic extract from flowers of *Pyrostegia venusta*
42 attenuated the depressive-like and exploratory behaviors induced by lipopolysaccharide.
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
841
842
843
844
845
846
847
848
849
850
851
852
853
854
855
856
857
858
859
860
861
862
863
864
865
866
867
868
869
870
871
872
873
874
875
876
877
878
879
880
881
882
883
884
885
886
887
888
889
890
891
892
893
894
895
896
897
898
899
900
901
902
903
904
905
906
907
908
909
910
911
912
913
914
915
916
917
918
919
920
921
922
923
924
925
926
927
928
929
930
931
932
933
934
935
936
937
938
939
940
941
942
943
944
945
946
947
948
949
950
951
952
953
954
955
956
957
958
959
960
961
962
963
964
965
966
967
968
969
970
971
972
973
974
975
976
977
978
979
980
981
982
983
984
985
986
987
988
989
990
991
992
993
994
995
996
997
998
999
1000

1
2 neuropsychological symptoms collectively referred to sickness behavior (Dantzer, 2009;
3 de Paiva et al., 2010).

4
5
6 The precise mechanisms that are involved in the production of the
7 anti-nociceptive and anti-inflammatory responses of the *Pyrostegia venusta* extract are
8 not completely understood, but they may be caused by the presence of flavonoids
9 identified by Veloso and collaborators (2010). Thus, this extract may be useful in the
10 treatment of inflammatory and pain disorders, which supports previous claims of its
11 traditional use.
12
13
14
15
16
17
18

19
20
21 In conclusion, the present study supported the use of the flowers of *Pyrostegia*
22 *venusta* in traditional medicine for the treatment of various inflammatory diseases. It is
23 concluded that the hydroethanolic extract of the flowers of *Pyrostegia venusta* has
24 anti-inflammatory and anti-nociceptive activities.
25
26
27
28
29
30

31 32 33 34 35 36 **6. Acknowledgments**

37
38
39 This work was supported by Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de
40 Minas Gerais, Brazil (FAPEMIG; Grants # APQ-1272-08 and # APQ-2887-09). We
41 thank Marina de Fátima Venâncio and José dos Reis Pereira for their excellent technical
42 assistance.
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

REFERENCES

- 1
2
3
4 Archer, J., 1973. Tests for emotionality in rats and mice: a review. *Animal Behavior* 21,
5 205-235.
6
7
8
9
10 Blatt, C.T.T., Santos, M.D., Salatino, A., 1998. Flavonoids of Bignoniaceae from
11 "cerrado" and their possible taxonomic significance. *Plant Systematics and Evolution*
12 210, 289-292.
13
14
15
16
17 Cardozo, N.P., Parreira, M.C., Alves, P.L., Bianco, S., 2009. Foliar área estimate of two
18 sugarcane-infesting weeds using leaf blade linear dimensions. *Planta Daninha*. 27,
19 683-687.
20
21
22
23
24
25 Cunha, F.Q., Souza, G.E., Souza, C.A., Cerqueira, B.C., Ferreira, S.H., 1989. In-vivo
26 blockage of neutrophil migration by LPS is mimicked by a factor released from
27 LPS-stimulated macrophages. *British Journal of Experimental Pathology* 70, 1-8.
28
29
30
31
32
33 Dantzer, R., 2009. Cytokine, sickness behavior and depression. *Immunology and*
34 *Allergy Clinics of North America* 29, 247-264.
35
36
37
38 de Paiva, V.N., Lima, S.N., Fernandes, M.M., Soncini, R., Andrade, C.A., Giusti-Paiva,
39 A., 2010. Prostaglandins mediate depressive-like behaviour induced by endotoxin in
40 mice. *Behavior Brain Research* 215, 146-151.
41
42
43
44
45
46 Duarte, I.D., Nakamura, M., Ferreira, S.H., 1988. Participation of the sympathetic
47 system in acetic acid-induced writhing in mice. *Brazilian Journal of Medical and*
48 *Biological Research* 21, 341-343.
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1 ethanol leaf extract of *Spathodea campanulata* P. Beauv (Bignoniaceae). Journal of
2 Medicinal Food 13, 827-833.

3
4
5 Ferreira, D.T., Alvares, P.S., Houghton, P.J., Braz-Filho, R., 2000. Chemical
6
7 constituents from roots of *Pyrostegia venusta* and considerations about its medicinal
8
9 importance. Quimica Nova 23, 42-46.

10
11
12 Harbone, J. B., 1967. Comparative biochemistry of the flavonoids. VI. Flavonoid
13
14 patterns in the Bignoniaceae and Gesneriaceae. Phytochemistry 6, 1646-1651.

15
16
17 Hunskaar, S., Hole, K., 1987. The formalin test in mice: dissociation between
18
19 inflammatory and non inflammatory pain. Pain 30, 103-114.

20
21
22 Koster, R., Anderson, M., De Beer, E.J., 1959. Acetic acid analgesic screening.
23
24 Federation Proceedings 18, 418-420.

25
26
27 Morris, C. J., 2003. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. Methods in
28
29 Molecular Biology 225, 115-121.

30
31
32 Pan, M.H., Lai, C.S., Wang, Y.J., Ho, C.T., 2006. Acacetin suppressed LPS-induced up
33
34 expression of iNOS and COX-2 in murine macrophages and TPA-induced tumor
35
36 promotion in mice. Biochemical Pharmacology 72, 1293-1303.

37
38
39 Pool, A., 2008. A review of the genus *Pyrostegia* (Bignoniaceae). Annals of the
40
41 Missouri Botanical Garden 95, 495-510.

42
43
44 Santos, A.R., Calixto, J.B., 1997. Further evidence for the involvement of tachykinin
45
46 receptor subtypes in formalin and capsaicin models of pain in mice. Neuropeptides
47
48 31, 381-389.

49
50
51 Scalon, S.P., Vieira, M.C., Lima, A.A., Souza, C.M., Mussury, R.M., 2008.
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Pregerminative treatments and incubation temperatures on the germination of
“cipó-de-São-João” [*Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers] – Bignoniaceae. *Revista
Brasileira de Plantas Mediciniais* 10, 37-42.

Seibert, K., Zhang, Y., Leahy, K., Hauser, S., Masferrer, J., Perkins, W., Lee, L.,
Isakson, P., 1994. Pharmacological and biochemical demonstration of the role of
cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. *Proceedings of the National Academy
of Sciences of the United States of America* 91, 12013–12017.

Shen, K.H., Hung, S.H., Yin, L.T., Huang, C.S., Chao, C.H., Liu, C.L., Shih, Y.W.,
2010. Acacetin, a flavonoid, inhibits the invasion and migration of human
prostate cancer DU145 cells via inactivation of the p38 MAPK signaling pathway.
Molecular and Cell Biochemistry 333, 279–291.

Singleton, V. L., Orthofer, R., Lamuela-Raventos, R.M., 1999. Analysis of total phenols
and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent.
In: L. Packer, Editor, *Oxidants and Antioxidants, Part A, Methods in Enzymology*
299, 152–178.

Veloso, C.C., Bitencourt, A.D., Cabral, L.D.M., Franqui, L.S., Dias, D.F., dos Santos,
M.H., Soncini, R., Giusti-Paiva, A., 2010. *Pyrostegia venusta* attenuate the sickness
behavior induced by lipopolysaccharide in mice. *Journal of Ethnopharmacology*
132, 355-358.

Vilela, F.C., Bitencourt, A.D., Cabral, L.D., Franqui, L.S., Soncini, R., Giusti-Paiva, A.,
2010. Anti-inflammatory and antipyretic effect of *Sonchus oleraceus* in rats. *Journal
of Ethnopharmacology* 127, 737-741.

Vinegar, R., Schreiber, W., Hugo, R., 1969. Biphasic development of carrageenin

edema in rats. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutic* 166, 96-103.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

LEGENDS

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Figure 1. Effects of the administration of the hydroethanolic extract of *Pyrostegia venusta* flowers (PvHE; 30, 100 and 300 mg/kg, p.o.) or indomethacin (10 mg/kg, p.o.) on mice paw edema induced by intraplantar carrageenan injection (1 mg/paw). Each point represents the mean \pm S.E.M. of eight animals. The asterisks denote the significance levels when compared with the control group: * P < 0.05, ** P < 0.01.

Figure 2. Effects of the administration of the hydroethanolic extract of *Pyrostegia venusta* flowers (PvHE; 30, 100 and 300 mg/kg, p.o.) or dexamethasone (1 mg/kg, i.p.) on the lipopolysaccharide-induced recruitment of leukocytes to the peritoneal cavity of mice. Each column represents the mean \pm S.E.M. of six animals per group. ***p < 0.001 compared with the saline + vehicle group. # p < 0.05; ### p < 0.01 compared with LPS + vehicle group.

Figure 3. Effects of the hydroethanolic extract from *Pyrostegia venusta* flowers (PvHE) administered orally against acetic acid-induced writhing movements in mice. Animals were pretreated orally with the vehicle, PvHE (doses 30, 100, and 300 mg/kg), and indomethacin (10 mg/kg) prior to the acetic acid (0.6%, i.p.). Each column represents the mean with S.E.M. for eight mice in each group. The asterisks denote the significance levels when compared with the control group: *p < 0.05; *** p < 0.001.

Figure 4. Effects of the hydroethanolic extract from *Pyrostegia venusta* flowers (PvHE) given by the oral route on the licking induced by formalin in mice. Animals were pretreated orally with the vehicle, PvHE (doses 30, 100, and 300 mg/kg), indomethacin (INDO; 10 mg/kg) or morphine (MORP; 1 mg/kg) prior to formalin. The total time spent licking the hindpaw was measured in the first and second phases after intraplantar injection of formalin. Each column represents the mean with S.E.M. for eight mice in each group. The asterisks denote the significance levels when compared with the control group: *p < 0.05; ** p < 0.01; ***p < 0.001.

Figure 1. Veloso et al.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30

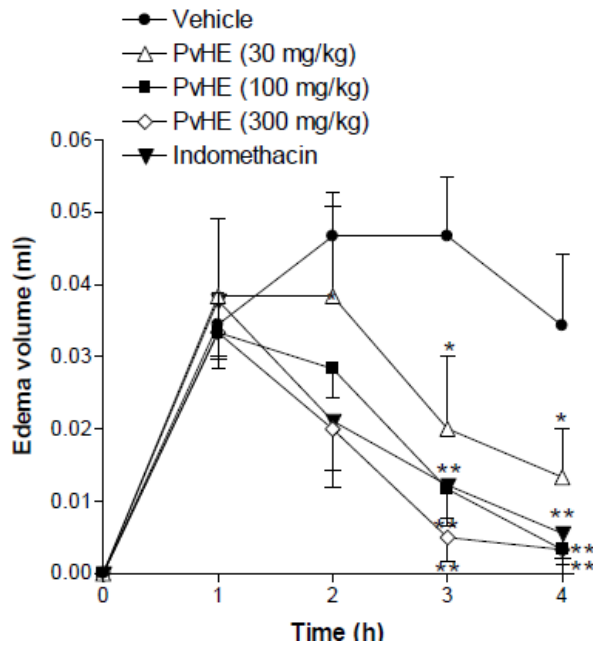
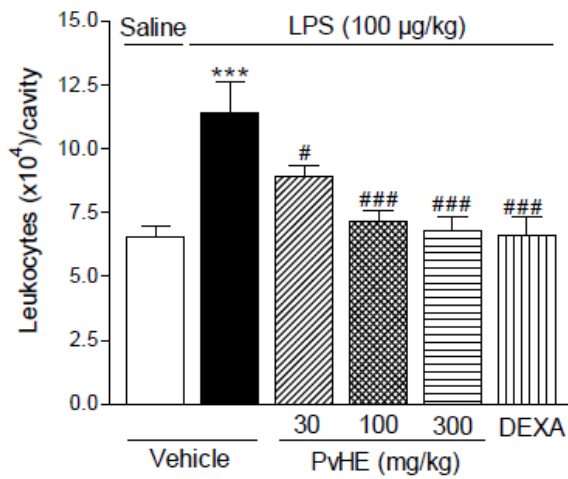


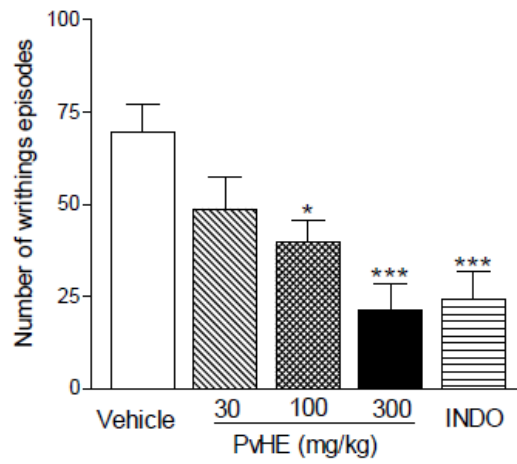
Figure 2. Veloso et al.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27



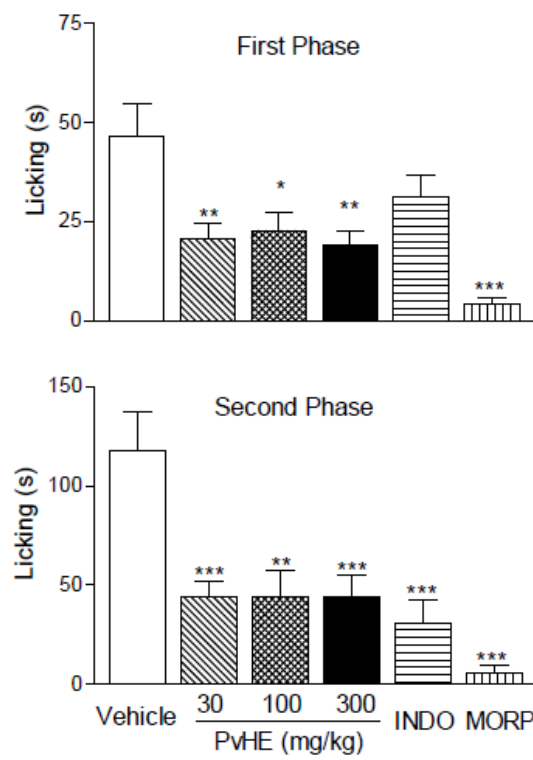
1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26

Figure 3. Veloso et al.



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40

Figure 4. Veloso et al.



5 CONCLUSÕES

- ❖ EHPv atenuou o comportamento doentio em camundongos, sustentando o uso popular das flores de *Pyrostegia venusta* na medicina tradicional para o tratamento dos sintomas decorrentes de um processo infeccioso, tais como: gripe, resfriado, bronquite, etc.
- ❖ A partir dos estudos realizados, pode-se concluir que o extrato hidroetanólico das flores de *Pyrostegia venusta* possui efeito anti-inflamatório e antinociceptivo, através dos testes de peritonite e edema de pata induzido por carragenina; contorções abdominais induzidas por ácido acético e formalina, respectivamente.
- ❖ A análise do cromatograma obtido para EHPv permitiu a caracterização do constituinte majoritário como sendo acacetina-7-O- β -D-glicosídeo, que possui atividade anti-inflamatória.
- ❖ O perfil cromatográfico e a determinação do conteúdo total de substâncias fenólicas e de flavonóides de um extrato pode ser aplicada no controle de qualidade de possíveis fitoterápicos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS, B. et al. **Molecular Biology of the Cell**. Garland Science, 4. ed., 2002. p. 831-906.
- ALEY, K.O.; LEVINE, J.D. Role of protein kinase A in the maintenance of inflammatory pain. **J Neurosci**, v. 19, p. 2181–6, 1999.
- BASBAUM, A.I.; JESSELL, T.M. **In principles of Neuroscience**. New York: McGraw-Hill, 2000. p. 472-491.
- BLATT, C.T.T.; SANTOS, M.D.; SALATINO, A. Flavonoids of the Bignoniaceae from the “cerrado” and their possible taxonomic significance. **Pl. Syst.**, v. 210, p. 289-292, 1998.
- BOZZA, P.T. et al. Lypopolissacharide-induced pleural accumulation depends on marrow neutrophils and platelet-activating-factor. **Eur. J. Pharmacol**, v. 270, p. 143–149, 1994.
- BUCKINGHAM, J.; MACDONALD, F.M.; BRADLEY, H.M. **Dictionary of Natural Products**, v. 2, p. 1700, 1994.
- CALIXTO, J. B.; SIQUEIRA JR., J. M. Desenvolvimento de Medicamentos no Brasil: Desafios. **Gazeta Médica da Bahia**, v.78 (1), p.98-106, 2008.
- CARDOZO, N.P. et al. Foliar área estimate of two sugarcane-infesting weed using leaf blade linear dimensions. **Planta Daninha**, v.27, p.683–687, 2009.
- CARVALHO, W. A.; LEMÔNICA, L. Mecanismos Celulares e Moleculares da Dor Inflamatória. Modulação Periférica e Avanços Terapêuticos. **Rev Bras Anestesiol**, v. 48, p.137-158, 1998.
- COLLIER, H.O. et al. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **British Journal of Pharmacology**, v. 32, p. 295–310, 1968.
- COS, R. et al. **J. Nat. Prod**, v. 61, p. 71, 1998.
- CUNHA, F.Q.; TEIXEIRA, M.M.; FERREIRA, S.H. Pharmacological modulation of secondary mediator systems-cyclic AMP and cyclic GMP-on inflammatory hyperalgesia. **Br J Pharmacol**, v. 127, p. 671–8, 1999.
- DANTZER, R. Cytokine, Sickness Behavior, and Depression. **Immunol Allergy Clin North Am**, v. 29(2), p. 247-264, 2009.
- DANTZER, R. et al. From inflammation to sickness and depression: when the immune system subjugates the brain. **Nature Rev Neurosci**, v. 9, p. 46-56, 2008.

- DE MESQUITA, M.L. et al. Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100 (7), p. 783–787, 2005a.
- DE MESQUITA, M.L. et al. New ether diglycosides from *Matayba guianensis* with antiplasmodial activity. **Bioorganic Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 4499–4506, 2005b.
- DE MESQUITA, M.L. et al. In vitro antiplasmodial activity of Brazilian Cerrado plants used as traditional remedies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, p. 165–170, 2007.
- DE MESQUITA, M.L. et al. Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 123, p. 439–445, 2009.
- DE PAIVA, V.N. et al. Prostaglandins mediate depressive-like behaviour induced by endotoxin in mice. **Behavioural Brain Research**, v. 215, p. 146–151, 2010.
- EDDLESTON et al. The anti-inflammatory effect of glucocorticoids mediated by glucocorticoid-induced leucine zipper in epithelial cells. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 119, p. 115–122, 2007.
- DE SAMPAIO, E. S. **Dissertação de Mestrado**. Paraná: Universidade Federal do Paraná, 1991.
- DOS SANTOS, M.D.; BLATT, C.T. A quantitative analysis of foliar flavanoids and total phenolics of *Pyrostegia venusta* Miels. From both the forest and cerrado. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 21, p. 135–140, 1998.
- DUBEY, R.; MISRA, K. J. **Indian Chem. Soc.**, v. 53, p. 378, 1976.
- DUNN, A. J.; SWIERGIEL, A. H. Effects of interleukin-1 and endotoxin in the forced swim and tail suspension tests in mice. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 81(3), p. 688–693, 2005.
- DUNNA, A. J. et al. Reduced Ingestion of Sweetened Milk Induced by Interleukin-1 and Lipopolysaccharide Is Associated with Induction of Cyclooxygenase-2 in Brain Endothelia. **Modulation**, v. 13(2), p. 96–104, 2006.
- EK, M. et al. Activation of vagal afferents after intravenous injection of interleukin-1beta: role of endogenous prostaglandins. **J Neurosci**, v. 18, p. 9471–9479, 1998.
- ESKANDARI, F.; WEBSTE, J. I.; STERNBERG, E. M. Neural immune pathways and their connection to inflammatory diseases. **Arthritis Res Ther**, v. 5, p. 251–265, 2003.
- ESPINDOLA, L.S. et al. Trypanocidal activity of a new diterpene from *Casearia sylvestris* var. *lingua*. **Planta Medica**, v. 70, p. 1093–1095, 2004.

FERREIRA, D.T. et al. Constituintes Químicos das raízes de *Pyrostegia venusta* e considerações sobre a sua importância medicinal. **Química Nova**, v. 23, 2000.

GALDINO, G.G. et al. Involvement of the nitric oxide/CGMP/KATP pathway in antinociception induced by exercise in rats. **Life Sciences**, v. 86, p. 505–509, 2010.

GOEHLER, L. E. et al. Interleukin-1beta in immune cells of the abdominal vagus nerve: a link between the immune and nervous systems? **J Neurosci**, v. 19, p. 2799–2806, 1999.

GOTTLIEB, O.R. Ethnofarmacology versus chemosystematics in the search for biologically active principles in plants. **J. Ethnopharm.**, v. 6, p. 227-238, 1982.

GOTTLIEB, O. R.; MORS, W. B. Potential utilization of brazilian wood extractives. **J. Agric. Food Chem.**, v. 28, p. 196-215, 1980.

HARBONE, J. B. Flavonoids and evolution of the angiosperms. **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 5, p. 7-22, 1977.

HUANG, Y. et al. Exaggerated sickness behavior and brain proinflammatory cytokine expression in aged mice in response to intracerebroventricular lipopolysaccharide. **Neurobiol Aging**, v. 29 (11), p. 1744-53, 2008.

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

JOLY, A. B. **Botânica (Introdução à Taxonomia Vegetal)**. SP: Companhia Editora Nacional, 4. ed., 2005.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, 2001.

JULKUNEN-TIITO, R. Phenolic constituents in the leaves of Northern willows: methods for the analysis of certain phenolics. **J. Agric. Food Chem.**, v. 33, p. 213-217, 1985.

KELLEY, K. W. et al. Cytokine-induced sickness behavior. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 17, p. 112–118, 2003.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. W. Animal Models of Nociception. **Pharmacological Reviews**, v. 53, p. 600-652, 2001.

LORENZI, H. **Plantas Daninhas do Brasil**. São Paulo, 1982.

MELO e SILVA, F.M., DE PAULA, J.E., ESPINDOLA, L.S. Evaluation of the antifungal potential of Brazilian Cerrado medicinal plants. **Mycoses**, v. 52, p. 511–517, 2009.

MENDONÇA, R.C. et al. **Flora vascular do Cerrado**. Planaltina Distrito Federal: EMBRAPA, 1998. p. 286–556.

PEREZ, A. C. et al. Quantitative assessment of nitric oxide in rat skeletal muscle and plasma after exercise. **European Journal of Applied Physiology**, v. 88, p. 189–191, 2002.

POOL, A. A review of the genus *Pyrostegia* (Bignoniaceae). **Ann. Missouri Bot. Gard**, v. 95, p. 495-510, 2008.

RAJA, S. N. et al. **In Textbook of Pain**. Churchill Livingstone: Edinburgh, 1999. p. 11-57.

RIVEST, S. et al. How the blood talks to the brain parenchyma and the paraventricular nucleus of the hypothalamus during systemic inflammatory and infectious stimuli. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 223, p. 22–38, 2000.

RODRIGUES, A.M.S. et al. Larvicidal activity of *Cybistax antisyphilitica* against *Aedes aegypti* larvae. **Fitoterapia**, v. 76, p. 755–757, 2005.

ROMANOVSKY, A. A. Thermoregulatory manifestations of systemic inflammation: lessons from vagotomy. **Auton Neurosci**, v. 85, p. 39–48, 2000.

SCALON, S.P. et al. Pregerminative treatments and incubation temperature on the germination of “cipó-de-São-João” [*Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.)Miers]–Bignoniaceae. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, v. 10, p. 37–42, 2008.

SANTOS, A.R.S.; VEDANA, E.M.A.; FREITAS, G.A.G. Antinociceptive effect of meloxicam, in neurogenic and inflammatory nociceptive models in mice. **Inflammation Research**, v. 47, p. 302–307, 1988.

SANTOS, M. D.; BLATT, C. T. T. **Teor de flavonóides e fenóis totais em folhas de *Pyrostegia venusta* Miers. de mata e de cerrado**. Santo Amaro: UNISA, 1997.

SEIBERT, K. et al. **Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain**, v. 91, p. 12013–12017, 1994.

SHIBATA, M. et al. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. **Pain**, v. 38, p. 347–352, 1989.

SMITH, P. M. **The chemotaxonomy of plants**. Bristol : Edward Arnold, 1976.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática**. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2005.

SWIERGIEL, A. H.; DUNN A. J. Effects of interleukin -1 β e lipopolysaccharide on behavior of mice in the elevated plus-maze and open field tests. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 86(4), p. 651-659, 2007.

TINOI, J.; RAKARIYATHAM, N.; DEMING, R. L. Determination of Major Carotenoid Constituents in Petal Extracts of Eight Selected Flowering Plants in the North of Thailand. **Chiang Mai J. Sci.** v. 33, p. 327-334, 2006.

VILLARREAL, C.F. et al. The peripheral pro-nociceptive state induced by repetitive inflammatory stimuli involves continuous activation of protein kinase A and protein kinase C epsilon and its NaV1.8 sodium channel functional regulation in the primary sensory neuron. **Biochemical Pharmacology**, v. 77, p. 867-877, 2009.

WANG, X. Q. et al. Low dose dexamethasone alleviates lipopolysaccharide-induced acute lung injury in rats and upregulates pulmonary glucocorticoid receptors. **Respirology**, v. 13, p. 772– 276, 2008.

WATTENBERG, L. **Celular Biochem** . Supplement. v.22, p.162, 1995.

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

YANG, R. B. et al. Toll-like receptor-2 mediates lipopolysaccharide-induced cellular signalling. **Nature**, v. 395, p. 217–219, 1998.

YANG, R. B. et al. Annexin-1 regulates macrophage IL-6 and TNF via glucocorticoid-induced leucine zipper. **The Journal of Immunology**, v. 183, p. 1435–1445, 2009.

YEOMANS, D.C.; COOPER, B.Y.; VIERCK, C.J.JR. Nociceptive responses to high and low rates of noxious cutaneous heating are mediated by different nociceptors in the rat: behavioral evidence. **Pain**, v. 68, p. 133-140, 1996.