

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS-UNIFAL

BRUNO FARIA DE PAULA

Estudo farmacognóstico e avaliação das atividades Anti-inflamatória e analgésica das folhas do nabo forrageiro (*Raphanus sativus* L. var. *oleífera* Metzg.)

Alfenas-MG
2014

BRUNO FARIA DE PAULA

Estudo farmacognóstico e avaliação das atividades Anti-inflamatória e analgésica das folhas do nabo forrageiro (*Raphanus sativus* L. var. *oleifera* Metzg.)

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre pela Universidade Federal de Alfenas.

Orientador: Prof. Dr. Geraldo Alves da Silva
Co-orientador: Prof. Dr. Marcelo Aparecido da Silva

Alfenas-MG
2014

Paula, Bruno Faria de.

Estudo farmacognóstico e avaliação das atividades Anti-inflamatória e analgésica das folhas do nabo forrageiro (*Raphanus sativus* L. var. *Oleifera* Matzg.). / Bruno Faria de Paula. - 2014.
69 f. -

Orientador: Geraldo Alves da Silva.
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -
Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2014.
Bibliografia.

1. Brassicaceae. 2. *Raphanus sativus*. 3. Analgesia.
4. Inflamação. I. Silva, Geraldo Alves da. II. Título.

CDD: 615.321

BRUNO FARIA DE PAULA

Estudo farmacognóstico e avaliação das atividades Anti-inflamatória e analgésica das folhas do nabo forrageiro (*Raphanus sativus* L. var. *oleifera* Metzg.)

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.

Aprovado em: 25/08/2014

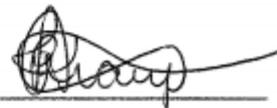
Prof. Dr. Geraldo Alves da Silva.
Instituição: Universidade Federal de Alfenas.

Ass:



Profa. Dr. Fernanda Borges de Araújo Paula
Instituição: Universidade Federal de Alfenas.

Ass:



Profa. Dr. Ana Maria Duarte Dias costa
Instituição: Universidade José do Rosário Vellano.

Ass:



Alfenas-MG
2014

AGRADECIMENTOS

À Deus, por conceder-me a oportunidade da realização deste trabalho;

Aos meus pais, pelo incentivo à continuidade dos meus estudos, principalmente minha mãe Maria de Lourdes pelo exemplo de fé e dedicação;

Ao Prof. Dr. Geraldo Alves da Silva pela orientação, pelo aprendizado, pela paciência e por toda confiança;

Ao Prof. Dr. Marcelo Aparecido Silva por todo aprendizado e pela paciência no estágio docente;

Ao professor colaborador, Prof. Dr. Alexandre Giusti Paiva pela oportunidade de trabalhar no Laboratório de Fisiologia da Universidade Federal de Alfenas;

À professora Dr. Vanessa Boralli pela realização das análises no espectrômetro de massas, no laboratório de análises toxicológicas da UNIFAL;

Aos amigos do Laboratório de Plantas Medicinais da UNIFAL: Silvia Helena Martelli Dias, Ana Flávia da Silva e Marilda de Souza Borges;

Aos amigos do Laboratório de Fisiologia da UNIFAL;

Aos amigos discentes do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UNIFAL-MG pelo incentivo nos estudos e pesquisa;

À secretaria do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da UNIFAL-MG;

À CAPES pelo incentivo financeiro;

À Universidade Federal de Alfenas pela oportunidade.

RESUMO

As plantas medicinais são comumente utilizadas pela população a fim de substituir ou auxiliar os processos de cura. Dentro deste contexto, o nabo forrageiro, *Raphanus sativus* L. var. *oleiferus* Metzg., pertencente à família Brassicaceae, também chamada por crucifera, é uma planta que apresenta conhecidas classes de compostos bioativos, assim como o próprio *Raphanus sativus* L. Neste trabalho, foram realizados estudos com a finalidade de se obterem parâmetros físico-químicos da droga vegetal como granulometria, cinzas totais e insolúveis em ácido, perda por dessecação e substâncias extrativas e estudos para o conhecimento do seu potencial bioativo e fitoquímico, sendo os testes de analgesia e inflamação e a triagem fitoquímica complementada à espectrometria de massas do extrato seco. Os parâmetros físico-químicos revelaram pela granulometria que a droga possui partículas moderadamente grossas, e com valores de cinzas totais e insolúveis em ácido de 16,69 e 0,025% respectivamente. A perda por dessecação foi de 6,96% e as substâncias extrativas representam 25% do total de massa da droga. A triagem fitoquímica revelou a presença de importantes classes farmacognósticas como flavonoides, esteroides-triterpenos e taninos, que puderam ser extensivamente associados à atividade biológica. Adicionalmente, foram propostas estruturas para os flavonóides encontrados no extrato seco de *R. sativus*, como sendo o canferol, e a quercetina além do glicosinolato glicorrafenina. Os ensaios biológicos mostraram: ausência de toxicidade aguda nas concentrações testadas; uma atividade anti-inflamatória para o teste de peritonite comparável à do padrão Indometacina nas concentrações de 30, 100 e 300 mg/kg do extrato seco. Já no teste de edema de pata, as concentrações mais ativas e com atividade comparável à do padrão foram de 30 e 300 mg/kg. O teste de analgesia feito pela metodologia da formalina mostrou melhor atividade do extrato para a concentração de 300 mg/kg enquanto que a atividade nas outras duas concentrações (30 e 100 mg/kg) não evidenciou efeito significativo. O teste da placa quente, porém, não mostrou resultado antinociceptivo favorável do extrato seco.

Palavras-chave: Brassicaceae. Cruciferae. *Raphanus sativus* L. var. *oleiferus* Metzg.. Analgesia. Inflamação.

ABSTRACT

Medicinal plants are commonly used by the population to replace or assist the healing process. Within this surrounding context, the wild radish, *Raphanus sativus* L. var. *oleiferus* Metzg. Wich belongs to the Brassicaceae family, also known as crucifera, is a plant with known classes of bioactive compounds, as well as the *Raphanus sativus* L itself. In this work, studies were conducted to obtain physico-chemical parameters of the drug as grain size, total and acid insoluble ashes, loss on drying and extractive substances, and studies to the knowledge of its bioactive and phytochemical potential, with tests such as analgesia and inflammation and phytochemical screening complemented with mass spectrometry of dry extract. The physico-chemical parameters classified the drug as moderately coarse size particles, and values of total and acid insoluble ashes of 16.69 and 0.025% respectively. The loss on drying was 6.96% and extractive substances representing 25% of the total mass of drug. Phytochemical screening revealed the presence of important pharmacognostic classes such as flavonoids, steroids, triterpenes and tannins, which could be extensively associated with biological activity. In addition, chemical structures were proposed for the flavonoids and other compounds found in dry extract of *R. sativus*, as the kaempferol and quercetin as the flavonoids and glicorrafenine as a glucosinate. The biological tests showed: absence of acute toxicity at the tested concentrations; an anti-inflammatory activity comparable to indomethacin in the standard concentrations of 30, 100 and 300 mg/kg of dry extract peritonitis test. You paw edema test, the most active and comparable to the standard activity concentrations were 30 and 300 mg/kg. The analgesia test made by the methodology of formalin better activity of the extract at the concentration of 300 mg/kg whereas the activity of the other two concentrations (30 and 100 mg/kg) showed no significant effect. The hot plate test, however, showed no antinociceptive favorable result of dry extract.

Key words: Brassicaceae. Cruciferae. *Raphanus sativus* L. var. *oleiferus* Metzg..
Analgesia. Inflammation.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AlCl ₃	Cloreto de alumínio
ANAVA	Análise da variância
CMC	Carboximetilcelulose
COX	Ciclo-oxigenase
E.B.R.S.	Extrato bruto de <i>Raphanus sativus</i> L. var. <i>oleifera</i> Metzg.
E.M.	Espectrômetro de massas
Ext.	Extrato
eV	Elétrons volts
FeCl ₃	Cloreto Férrico
IASP	Associação Internacional para Estudos da Dor
I.p	Intra-peritoneal
LPS	Lipopolissacarídeo
Min.	Minutos
m/z	Relação Massa carga
N°	Número
Seg.	Segundos
V.o	Via oral
Var.	Variedade
WHO	Organização Mundial da Saúde

LISTA DE FIGURAS

Figura 01- Estrutura do glicoraphanídeo, metabólito de <i>Raphanus sativus</i> L.....	14
Figura 02- Estrutura dos metabólitos canferol e quercetina.....	15
Figura 03- Foto de <i>Raphanus sativus</i> L.....	16
Figura 04- Foto das flores de <i>Raphanus sativus</i> L. Var. <i>Oleifeus</i> Metzg.....	18
Figura 05- Obtenção do extrato seco das folhas do nabo forrageiro.....	28
Figura 06- Análise granulométrica.....	38
Figura 07- Espectro de massas full scan do E.B.R.S em modo negativo.....	43
Figura 08- Espectro do composto com m/z 577 em modo negativo.....	44
Figura 09- Fragmentação do composto com m/z 577 em modo negativo.....	45
Figura 10- Espectro do composto com m/z 593 em modo negativo.....	45
Figura 11- Fragmentação do composto com m/z 593 em modo negativo.....	46
Figura 12- Espectro do composto com m/z 434 em modo negativo.....	47
Figura 13- Fragmentação do composto com m/z 434 em modo negativo.....	48
Figura 14- Efeito do E.B.R.S. no Teste de peritonite.....	49
Figura 15- Efeito do E.B.R.S. no Teste de edema de pata.....	51
Figura 16- Efeito do E.B.R.S. no Teste de formalina.....	53
Figura 17- Efeito do E.B.R.S. no Teste de placa quente.....	56

LISTA DE TABELAS

TABELA 01- Classificação científica do nabo forrageiro.....	19
TABELA 02- N° e diâmetro de abertura dos tamises utilizados na granulometria.	26
TABELA 03- Grupos fitoquímicos e reagentes de identificação.....	31
TABELA 04- Valores encontrados nos ensaios farmacopeicos.....	40
TABELA 05- Identificação fitoquímica da droga vegetal e extrato seco.....	41
TABELA 06- Tempo médio \pm erro padrão médio.....	56

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1	FAMÍLIA BRASSICACEAE.....	14
2.2	GÊNERO RAPHANUS.....	15
2.3	<i>RAPHANUS SATIVUS</i> L. VAR. <i>OLEIFERUS</i> METZG.....	17
2.4	USO DE PLANTAS MEDICINAIS NO TRATAMENTO DE DOENÇAS...	19
2.5	INFLAMAÇÃO.....	20
2.6	ANALGESIA.....	22
3	OBJETIVOS.....	24
3.1	OBJETIVOS GERAIS.....	24
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
4.1	COLETA DO MATERIAL VEGETAL.....	25
4.2	IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL.....	25
4.3	OBTENÇÃO DA DROGA VEGETAL.....	25
4.4	GRANULOMETRIA.....	26
4.5	OBTENÇÃO DO EXTRATO SECO.....	27
4.6	CÁLCULO DO RENDIMENTO DO PROCESSO.....	29
4.7	ENSAIOS FARMACOPEICOS.....	29

4.7.1	Perda por dessecação.....	29
4.7.2	Cinzas totais e Cinzas insolúveis em ácido.....	29
4.7.3	Determinação substâncias extraídas por álcool 70°.....	30
4.8	ANÁLISE QUÍMICA.....	31
4.8.1	Triagem fitoquímica.....	31
4.8.2	Espectrometria de massas.....	32
4.9	ESTUDO FARMACOLÓGICO.....	32
4.9.1	Toxicidade aguda.....	32
4.9.2	Atividade antiinflamatória.....	33
4.9.2.1	Teste de peritonite.....	33
4.9.2.2	Teste de edema de pata induzido por carragenina.....	34
4.9.3	Atividade antinociceptiva.....	35
4.9.3.1	Teste de formalina	35
4.9.3.2	Teste de placa quente.....	35
4.10	ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	37
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	38
5.1	GRANULOMETRIA.....	38
5.2	RENDIMENTO DO EXTRATO SECO DAS FOLHAS.....	39
5.3	ENSAIOS FARMACOPEICOS.....	39
5.4	TRIAGEM FITOQUÍMICA.....	41
5.5	ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS	43

5.6	TOXICIDADE AGUDA.....	48
5.7	ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA.....	49
5.7.1	Teste de peritonite.....	49
5.7.2	Teste de edema de pata induzido por carragenina.....	50
5.8	ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA.....	53
5.8.1	Teste de formalina.....	53
5.8.2	Teste de placa quente.....	55
6	CONCLUSÕES	58
	REFERÊNCIAS.....	59

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais são comumente utilizadas pela população a fim de substituir ou auxiliar os processos de cura. O uso destas espécies vegetais pode levar tanto a cura como as intoxicações, necessitando de estudos que proporcionem o melhor entendimento de suas propriedades químicas, biológicas, morfológicas e estudos da dose para a padronização, a descrição e a validação (WHO, 1998).

O nabo forrageiro, *Raphanus sativus* L. var. *oleiferus* Metzg., pertencente à família Brassicaceae conhecida também por cruciferae, é uma planta anual, herbácea, ereta, muito ramificada e que pode atingir de 100 a 180 cm de altura (DERPSCH; CALEGARI, 1992).

Raphanus sativus L. possui algumas variedades das quais as variedades *Níger* e *radícula* são cultivadas para a alimentação por serem raízes tuberosas, já a variedade *oleiferus* é cultivada principalmente devido ao teor de óleo em suas sementes, sendo utilizada na produção de óleos para biodiesel e como cobertura vegetal. Devido aos escassos estudos sobre a variedade oleífera a maioria dos estudos é relacionada ao rabanete comum (*Raphanus sativus* L.).

Os rabanetes têm sido usados como um tradicional fitoterápico chinês há mais de 1400 anos, desde que foi registrada na primeira farmacopeia chinesa (DUAN et al., 2006). As folhas e as raízes de *Raphanus sativus* L., são utilizadas em diferentes partes do mundo. Os usos das Diferentes partes do rabanete, incluindo as raízes, as sementes e as folhas, possuem várias propriedades medicinais (NADKARNI, 1976).

Gutierrez et al. (2004) reportaram os constituintes de *Raphanus sativus* L., sendo alcaloides, flavonoides e outros compostos fenólicos. Devido ao uso popular de *Raphanus sativus* L. e suas implicações como fitoterápico, o presente trabalho realizou o estudo farmacognóstico e avaliou a atividade anti-inflamatória e analgésica do extrato seco das folhas da espécie vegetal *Raphanus sativus* L. var. *oleífera* Metzg. ainda não relatada na literatura em ensaios *in vivo*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

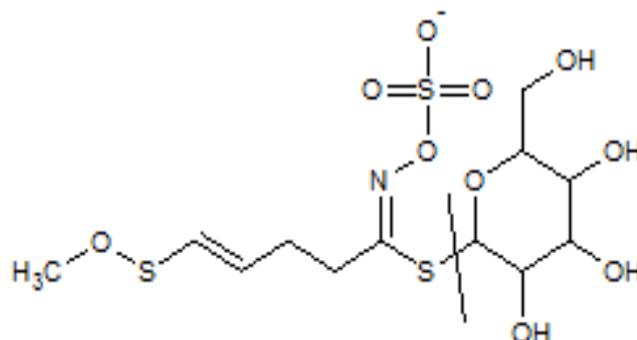
2.1 FAMÍLIA BRASSICACEAE OU CRUCÍFERAE

A família Brassicaceae (Cruciferae) é composta de 350 gêneros e cerca de 3500 espécies (Sasaki; Takahashi, 2002). A família Brassicaceae compreende uma vasta gama de hortaliças com potencial nutracêutico e nutricional (D'ANTUONO et al., 2007). Outras espécies de Brassicaceae importantes são: rúcula (*Eruca sativa* L.), rabanete (*Raphanus sativus* L.), colza (*Brassica napus* L. Var. *oleifera*) e mostarda indiana (*Brassica juncea* L.).

A família também é conhecida por suas mais de 120 espécies daninhas, várias das quais são importantes ervas agrícolas como: a mostarda selvagem (*Sinapis arvensis* L.), nabo (*Rapistrum rugosum* L.), nabo bravo (*Raphanus raphanistrum* L.) (KOORNNEEF et al., 2004). Segundo Jahangir et al. (2009) a família Brassicaceae possui uma rica fonte de nutrientes, tais como: vitaminas (carotenóides, tocoferol, ácido ascórbico, ácido fólico), minerais (Cu, Zn, P, Mg, entre outros), carboidratos (sacarose e glicose), e os ácidos como o hidroxibenzoico, clorogênico, cafeico, p-cumárico, ferúlico. Outros compostos que estão presentes são as antocianinas, quercetina, canferol e glicosinatos como o glicoraphanídeo.

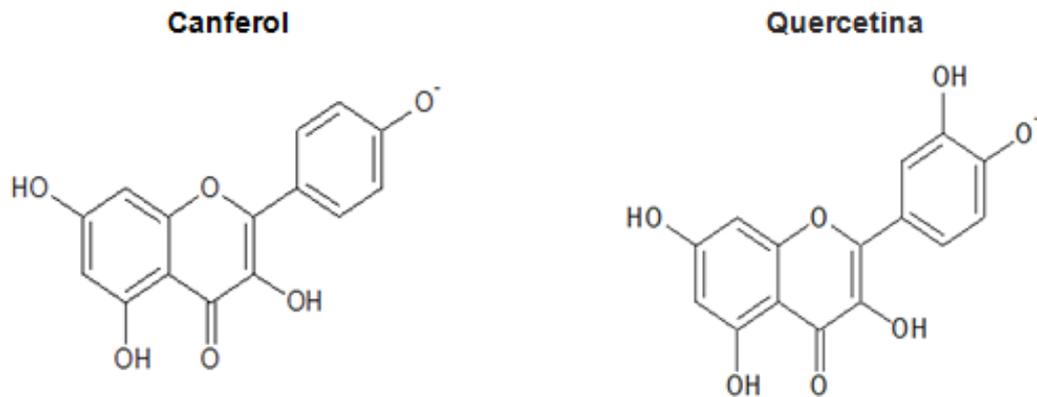
Estruturas encontradas na família Brassicaceae

Figura 1- Estrutura do glicoraphanídeo, metabólito de *Raphanus sativus* L.



Fonte: Njumbe Ediage et al. (2011)

Figura 2- Estrutura dos metabólitos canferol e quercetina



Fonte: Do autor

2.2 GÊNERO *RAPHANUS*

O gênero *Raphanus*, um gênero do velho mundo da tribo Brassiceae, é composto de duas espécies: rabanete (*Raphanus sativus*) e rabanete selvagem (*R. raphanistrum*). Há alguma controvérsia quanto o provável centro de origem, sendo o mais provável é a de ter se originado na região entre o Mediterrâneo e o Mar Cáspio (CRISP, 1995). Os Estudos genéticos conduzidos com *Raphanus* indicam que este gênero provavelmente seja um híbrido entre linhagens de mostardas, notadamente dos grupos *Brassica nigra* e *B. rapa*, originado em algum evento ocorrido a cerca de 5 milhões de anos (YANG et al., 2002).

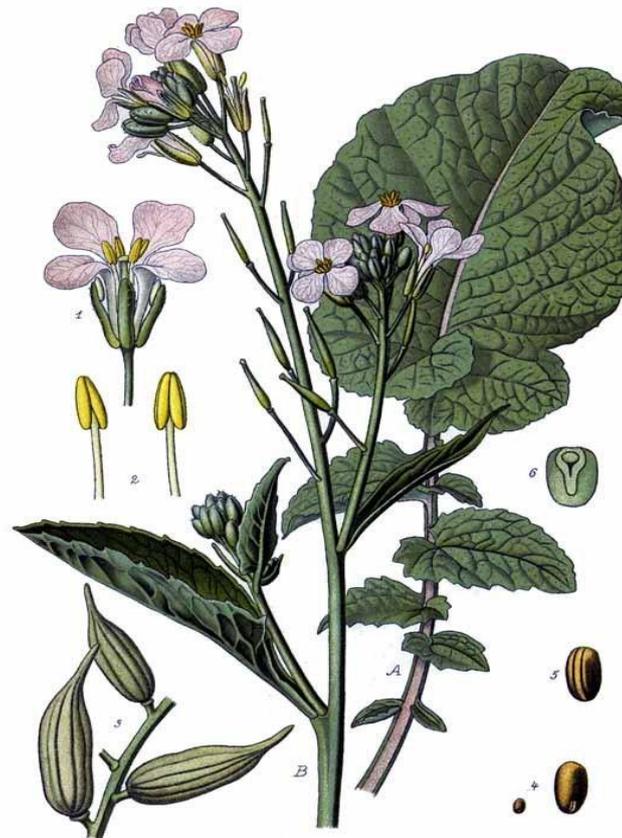
Estima-se também que *Raphanus sativus* seja uma espécie derivada de *Raphanus raphanistrum* (YAMAGUSHI; TERACHI, 2003; YAMANE et al., 2005). Diversos autores têm sugerido que devido às semelhanças genéticas e à viabilidade na hibridação natural entre *R. sativus* L. e *R. raphanistrum* este grupo deva ser consolidado em uma única espécie (SNOW; CAMPBELL, 2005).

O gênero *Raphanus* aparece descrito por vários autores por seus valores medicinais. Chandra et al. (2006) evidenciaram relativa hipoatividade da glândula tireoide de ratos quando foi administrado rabanete fresco e cozido às suas dieta. As raízes foram aplicadas para estimular o apetite, a digestão, e o fluxo de bÍlis (CHEVALLIER, 1996) e o sumo das folhas frescas foram utilizados como um agente diurético e laxante (CHOPRA et al., 1986). As sementes são utilizadas na medicina

tradicional coreana como carminativas, diuréticas, expectorantes, laxantes, agentes estomacais e, especialmente, como anticancerígenas e anti-inflamatórias (DUKE; AYENSU, 1985; YEUNG, 1985; CHOPRA et al., 1986).

A menor incidência de úlceras gástricas em populações do sul da Ásia pode ser devido aos hábitos alimentares das pessoas desta região, um dos alimentos que é especulado por essa ação de proteção contra úlceras são as folhas de *Raphanus sativus* L. (JAYARAJ et al., 1998). Para apoiar essa hipótese Alqasoumi e colaboradores (2008) relataram que o suco da raiz de *Raphanus sativus* L. tem sido o responsável pela ação anti-ulcerogênica. A atividade anti-oxidante do extrato foi relatada por (BARILLARI et al., 2006), e a atividade hepatoprotetora do extrato de *Raphanus sativus* L. por (ZAMAN; AHMAD, 2004).

Figura 3- Foto de *Raphanus sativus* L.



Fonte: http://commons.wikimedia.org/wiki/Raphanus_sativus

O nabo forrageiro apresenta alguns sinônimos:

- *Raphanus sativus* L.;
- *Raphanus sativus* L. var. *oleiferus* Stokes;
- *Raphanus sativus* L. var. *oleiferus* Metzg.;
- *Raphanus sativus* L. var. *oleiformis* Pers.;
- *Raphanus sativus* L. convar. *oleifer* (Stokes) Alef.;
- *Raphanus sativus* convar. *Oleiferus*.

Variedades importantes de *R. sativus* incluem:

- Variedade oleifera (*Raphanus sativus* L. var. *oleiformis*), também chamado de *R. sativus* Grupo Radish (WIERSEMA; LEÓN, 1999), oleaginosas e rabanetes forrageiras, que são cultivadas no Sudeste Asiático e na Europa para forragem e cultivadas para a alimentação animal e como adubo verde;
- Variedade caudatus (*Raphanus sativus* var. *caudatus* (L.) LH Bailey), também conhecido como *R. sativus* Rat-Tailed (WIERSEMA; LEÓN, 1999);
- Variedade sativus ou radícula (*Raphanus sativus* var. *sativus*), também conhecido como Grupo *R. Radish sativus* Pequeno (WIERSEMA; LEÓN, 1999), onde todas as formas são com raízes comestíveis, folhas e brotos de rabanete germinadas;
- Variedade niger ou longipinnatus (*Raphanus sativus* L. var. *niger* J. Kern), conhecido como grupo *R. sativus* Radish chinês ou rabanete grande com os nomes comuns de rabanete chinês, rabanete japonês, rábano.

2.3 RAPHANUS SATIVUS L. VAR. OLEIFERUS METZG.

A planta em estudo é o nabo forrageiro (*Raphanus sativus* L. var. *oleiferus* Metzg.), pertencente à família Cruciferae ou Brassicaceae, é uma planta anual, alógama, herbácea, ereta, muito ramificada e que pode atingir de 100 a 180 cm de altura (DERPSCH; CALEGARI, 1992). Pela escassez de informações sobre o uso do

nabo forrageiro como planta medicinal, a maioria dos estudos é relacionado ao Rabanete (*Raphanus sativus* L.).

Figura 4- Foto das flores de *Raphanus sativus* L. Var. *Oleifeus* Metzg.



Fonte: <https://www.flickr.com/photos/bambolia/4539788701/in/photostream/>

O nabo forrageiro é empregado para adubação verde e rotação de culturas nas regiões sul, sudeste e centro-oeste do Brasil (CRUSCIOL et al., 2005), apresenta teores de óleo na faixa de 40% a 54% (DOMINGOS, 2005).

O nabo forrageiro é uma planta cujos grãos apresentam vários fatores antinutricionais, como o ácido fítico, os glicosinolatos, os compostos fenólicos, o ácido erúcido e os taninos (BELL, 1993), que afetam o seu valor nutritivo, podendo alterar a fisiologia, o consumo e o desempenho produtivo dos animais (CHUBB, 1982).

A partir das sementes do nabo forrageiro, alguns glicosinolatos responsáveis no tratamento do câncer têm sido isolados (DAXENBICHLER et al., 1991; NASTRUZZI et al., 1996; BARILLARI et al., 2005; DUAN et al., 2006).

Tabela 1- Classificação científica do nabo forrageiro

Reino:	Plantae
Divisão:	Magnoliophyta
Classe:	Magnoliopsida
Ordem:	Brassicales
Família:	Brassicaceae
Gênero:	<i>Raphanus</i>
Espécie:	<i>Raphanus sativus</i> L.
Variedade:	<i>Raphanus sativus</i> L. var. <i>oleiferus</i> Metzg.

Fonte: Do autor

2.4 USOS DE PLANTAS MEDICINAIS NO TRATAMENTO DE DOENÇAS

Em um primeiro momento, os medicamentos à base de plantas, em geral, eram utilizados oralmente na forma de pó, infusão (chá) ou decocto e, via tópica, na forma de preparações à base de água ou óleo para unguentos e cataplasmas (WAGNER; WISENAUER, 2006).

O enorme crescimento do interesse mundial pelos produtos naturais pode ser explicado, entre outros fatores, pelas atuais pesquisas científicas que comprovam a eficácia e a segurança desses produtos. Essa tendência mundial pelo consumo de produtos naturais, principalmente, os de origem orgânica, é justificado pelos riscos de intoxicações alimentícias como também pelas intoxicações medicamentosas. Com isso a procura por produtos fitoterápicos tem aumentado, fazendo que estudos sejam aprofundados sobre as naturezas químicas das drogas vegetais para a devida comprovação de sua eficácia. Assim, produtos naturais passaram a ser sinônimo de produtos saudáveis, seguros e benéficos (MENGUE et al., 2001).

Em 2001 estimava-se que o mercado mundial de derivados de plantas medicinais girasse em torno de 22 bilhões de dólares anuais (YUNES et al., 2001). Porém, ainda faltam estudos científicos que comprovem a utilização segura e eficaz de várias plantas (RIBEIRO et al., 2005). Segundo Garlet e Irgang (2001), o uso dessas plantas, na manipulação dos fitoterápicos, traria vantagens para o país, como redução da importação de medicamentos, promovendo a autossuficiência e

proporcionando à população medicamentos mais baratos e a maior valorização das tradições populares.

Segundo a Anvisa (2004), fitoterápico é: “todo medicamento obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas vegetais. Não se considera medicamento fitoterápico aquele que, na sua composição, inclua substâncias ativas isoladas, de qualquer origem, nem as associações destas com extratos vegetais”.

Devido a grande demanda por produtos fitoterápicos, diversos setores mercadológicos vêm produzindo produtos à base de espécies vegetais, em diversas formas farmacêuticas. Contudo, Nunes et al. (2003) indicam que não há garantia da segurança e eficácia para a grande maioria desses produtos. Nesse sentido, é imprescindível que o fitoterápico, para ser comercializado, esteja registrado no ministério da saúde (LAPA et al., 2000).

2.5 INFLAMAÇÃO

A inflamação é uma reação do organismo a uma lesão dos tecidos ou infecção. As principais características de uma inflamação são: dor, calor e rubor. Isso ocorre devido ao aumento do fluxo de sangue e líquidos corporais migrados para o local. Células provenientes do sistema imunológico são migradas para o local da inflamação, ocorrendo o acúmulo de leucócitos, macrófagos e linfócitos. Essa tem como objetivo principal remover o agente etiológico/lesivo e reparar o tecido lesado (COTRAN et al., 1999).

O sistema imune inato compreende a estimulação de células residentes tais como as células vasculares (células do músculo liso e endotélio), mastócitos e macrófagos, levando à geração e/ou liberação subsequente de mediadores inflamatórios, como exemplo temos as aminas, histaminas; eicosanóides, como a prostaglandina ou leucotrienos; citocinas; quimiocinas e óxido nítrico. Esta definição se contrapõe à da imunidade adquirida, ou aquela onde o sistema imune identifica agentes agressores específicos segundo seu potencial antigênico.

Nesse último caso, o organismo precisa entrar em contato com o agressor, identificá-lo como estranho e potencialmente nocivo e só então produzir uma resposta. A inflamação está associada a uma vasta gama de mediadores, conforme

citados acima, que iniciam este processo, recrutam e ativam outras células para o sítio inflamatório e subsequentemente resolvem a inflamação (GALLIN et al., 1999).

Observações microscópicas permitiram entender a participação da circulação e das células sanguíneas nesse processo, logo modelos experimentais, permitiram caracterizar melhor o processo inflamatório e as substâncias químicas que dele participam (SOUZA et al., 2003).

Os modelos experimentais utilizados em estudos com drogas anti-inflamatórias são: estudo da quimiotaxia de leucócitos “in vitro”; teste do edema inflamatório na pata do animal induzido por substâncias químicas; angiogênese; modelos de inflamação por mecanismos auto-imune; modelos que utilizam agentes infecciosos, teste da permeabilidade capilar induzida pelos marcadores da inflamação; pleurisia ou peritonite; edema inflamatório de orelha induzido por agentes irritantes; dentre outros (LAPA et al., 2002).

A inflamação crônica apresenta características proliferativas, tendo o acúmulo de leucócitos mononucleares como os macrófagos e seus derivados eptelióides e policariontes, linfócitos, plasmócitos, fibroblastos, fibras colágenas, neovasos e, na dependência do agente causal, eosinófilos. Este quadro pode sofrer pequenas variações em função do tipo de tecido afetado, do agente causal e do nível de especificidade da resposta (GARCIA LEME, 1989).

Os macrófagos são as células iniciadoras primárias da resposta inflamatória. A ciência tem fornecido dados que relacionam um grande número de mediadores inflamatórios à ação em alvos específicos, levando à liberação local de outros mediadores de leucócitos e células endoteliais, com conseqüente indução de moléculas de adesão e migração celular para o foco inflamatório (CALIXTO; OTUKI; SANTOS, 2003).

Dos mediadores químicos envolvidos na resposta inflamatória destaca-se o ácido araquidônico (AA) e citocinas. As citocinas são peptídeos regulatórios que são constitutivamente expressas, como fator de necrose tumoral (TNF) em mastócitos (MAURER et al., 2003).

As duas principais citocinas envolvidas na iniciação desta resposta são o fator de necrose tumoral- α (TNF- α) e a interleucina-1 (IL-1). Habtemariam (2000) apresenta alguns compostos, dentre eles vários flavonóides e polifenóis, que atuam em processos bioquímicos regulados por esta citocina.

Existem incontáveis números de plantas, com efeito, anti-inflamatório como: Arnica, Barbatimão, Carobinha, Douradinha, Imburana, Jequitibá-vermelho, Manacá, Pacova, Pé-de-perdiz, Sucupira, Velame Branco. Um exemplo de planta com propriedade anti-inflamatória além das propriedades digestivas, é o coentro, utilizado como antipirético, anti-helmíntico e analgésico no tratamento do reumatismo e dores articulares (ISHIKAWA et al., 2003). Nos últimos cinco anos, novos fitoterápicos têm sido lançados no mercado pela indústria farmacêutica, por exemplo: o "acheflan" (nome comercial) é um fitoterápico, extraído da planta *Cordia verbenacea*, lançado no mercado pela empresa "Ache", e já é o 2º anti-inflamatório mais vendido no mundo inteiro (BRANDÃO et al., 2008; CARVALHO et al., 2008).

2.6 ANALGESIA

Analgesia é a ausência de dor sem perda de outras propriedades sensitivas. A dor pode ser considerada como um mecanismo de defesa para a integridade do organismo e gera um comportamento conhecido como reação de fuga ao perigo. Existem indivíduos com ausência de sensibilidade à dor, que pode ser genética ou adquirida. Uma destas formas é de origem genética chamada analgesia congênita. Já a hiperalgesia é o aumento da sensibilidade aos estímulos nociceptivos.

As sensações dolorosas induzem respostas urgentes de seu alívio, provocando comportamentos como massagear (ou lambear) a área lesada, além de raiva, grito e choro (GANONG, 1988; AGNATI et al., 1991).

A Associação Internacional para Estudos da Dor (IASP) conceituou dor como “uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a um dano real ou potencial dos tecidos, ou descrita em termos de tais lesões” (LOESER; MELZACK, 1999).

A dor aguda é um sintoma biológico de estímulo nocivo, com dano tecidual devido à doença ou trauma. Pode ser altamente localizada ou pode se irradiar. É descrita em caráter de pontadas e persiste enquanto houver patologia tecidual (BERNARD et al., 1996; LOESER; MELZACK, 1999). A dor torna-se crônica quando o controle da patologia não é satisfatório, persistindo além do tempo necessário para a cura da lesão (ASHBURN; STAATS, 1999). Contudo, a dor crônica gera estresse,

reduz a imunidade, diminui a produção de endorfinas e causa alterações do sono, causando depressão (CARVALHO, 1999).

Os neurotransmissores estão envolvidos na transmissão nociceptiva. As taquicininas (substância P, neurocinina A e B) e os aminoácidos excitatórios liberados na medula são importantes mediadores da informação nociceptiva (PICARD et al., 1993; ZHENG; CHEN, 2001). O óxido nítrico é um exemplo importante de mediador do processo nociceptivo na medula espinhal (ALDERTON et al., 2001).

Na terapia da dor existem duas classes principais de drogas analgésicas. Os opioides como a morfina e a codeína que são indicados no tratamento de dores agudas, moderadas ou intensas, são usados quando a resposta nociceptiva não responde a analgésicos menos potentes. Embora os opioides sejam muito efetivos, principalmente no tratamento da dor aguda, sua utilização é limitada pelo fato dessas drogas apresentarem muitos efeitos indesejados, como constipação, náuseas, vômitos, broncoconstrição, hipotensão, bradicardia e depressão respiratória (McQUEEN, 1983; HOSKIN; HANKS, 1991).

Outra classe de drogas bastante utilizada no tratamento da dor são os antiinflamatórios não esteroidais (AINES), que possui vantagens sobre os analgésicos opioides por não provocarem tolerância e dependência com o uso crônico (NUKI, 1983; RAINSFORD; VELO, 1992).

Uma vez que os animais não são capazes de verbalizar os componentes subjetivos da dor, neles não se avalia dor, mas nocicepção. Sendo assim, termos como dor e analgesia são mais adotados para humanos e nocicepção e antinocicepção para animais (JONES, 1996).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

O objetivo foi avaliar o potencial *in vivo* do extrato bruto da folha do nabo forrageiro (*Raphanus sativus* var. *oleifera* Metzg.) na atividade anti-inflamatória e analgésica.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtenção de parâmetros da droga vegetal;
- Caracterização fitoquímica da droga vegetal e do extrato seco;
- Avaliação do efeito anti-inflamatório;
- Avaliação do efeito analgésico;
- Caracterizar quimicamente o extrato seco por espectrometria de massas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL

As folhas de *Raphanus sativus* L. var. *oleifera* Metzg. foram coletadas no dia 02 de agosto de 2012 no terreno localizado na avenida Afonso Pena, Jardim Boa Esperança, município de Alfenas, região Sul do Estado de Minas Gerais. Dados geográficos: 21°25'22.87" S; 45°57'29.42" O; Altitude 842 metros.

4.2 IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

A identificação taxonômica da espécie *Raphanus sativus* var. *oleifera* Metzg. foi realizada pelo professor Dr. Geraldo Alves da Silva, tendo sido depositada a exsicata 2279 no Herbário da Universidade Federal de Alfenas.

4.3 OBTENÇÃO DA DROGA VEGETAL

As folhas passaram pelo processo de secagem em estufa de ar circulante (Solab® SL 102) a 45°C durante sete dias para a completa secagem até peso constante, em seguida foram trituradas em moinho de facas mecânico (CIENILAB CE-430) até obtenção do pó.

4.4 GRANULOMETRIA

Para a padronização do tamanho das partículas da droga vegetal foi utilizado o procedimento seguindo os critérios descritos na Farmacopeia Brasileira 5ª edição p. 92 (2010). O pó triturado foi peneirado no tamis (60) que possui orifício de 250 micrometros, obtendo-se 40 gramas para fazer os ensaios para determinar a melhor vibração para o experimento.

Utilizaram-se 30 gramas, que passaram pelo mesmo tamis (60), nas intensidades 1, 3, 5, 7 e 9 de vibração com tempo de 2 minutos. Assim observou-se qual foi o melhor rendimento (quantidade de material peneirado).

A granulometria é determinada com auxílio de tamises operados por dispositivo mecânico. Esse dispositivo reproduz movimentos horizontais e verticais da operação manual, através da ação mecânica uniforme. As malhas utilizadas e seus respectivos diâmetros estão relacionados na Tabela 2.

Tabela 2- Número e diâmetro de abertura dos tamises utilizados na granulometria

Tamis	Orifício do tamis (µm)
20	850
25	710
35	500
45	355
60	250

Fonte: Do autor

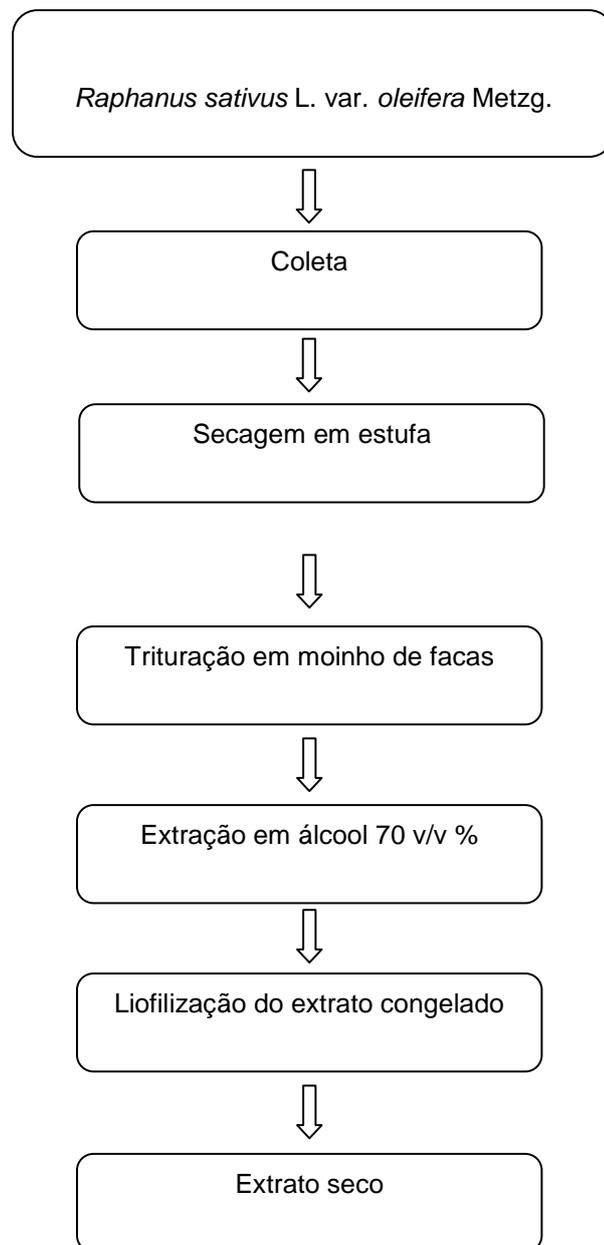
Depois de verificada a melhor vibração do aparelho (intensidade 7), pesaram-se 150 gramas da droga vegetal e montou-se o conjunto de tamises, seguindo da maior malha em cima da menor malha até o fundo coletor. Desta maneira, os 150 gramas do pó bruto foram colocados sobre o maior tamis e a vibração ajustada para a qual apresentou o melhor rendimento.

O tempo de vibração foi de 15 minutos. Após o término do tempo, utilizando um pincel adequado, removeu-se toda a amostra retida na superfície superior de cada tamis e do fundo coletor e pesou-se o pó. O tamanho das partículas foi mensurado, seguindo o preconizado pela WHO (1998).

4.5 OBTENÇÃO DO EXTRATO SECO

O extrato hidroetanólico das folhas da planta foi obtido utilizando método de extração de percolação exaustivo (PRISTA et al., 1995). O processo teve início com o umedecimento antecipado de 200 gramas do pó da droga vegetal com álcool 70% (v/v) durante 2 horas fora do percolador. Em seguida o percolador foi preenchido com a droga vegetal umedecida e adicionou-se álcool 70%, deixando-o em maceração por 7 dias. A vazão do percolado ficou em 1,0 ml/min/Kg de droga vegetal. Obtido o extrato hidroetanólico, ele foi levado ao aparelho de rotavapor sob pressão reduzida e temperatura controlada (aproximadamente 45°C) para concentração do extrato líquido. Após a concentração, o extrato foi congelado em ultrafreezer UFR 30 (Liotop) a -70°C e liofilizado pelo liofilizador L101 (Liotop). Obtido o extrato seco, ele foi armazenado em frasco âmbar e mantido em dessecador.

Figura 5- Obtenção do extrato seco das folhas do nabo forrageiro



4.6 CÁLCULO DO RENDIMENTO DO PROCESSO DE OBTENÇÃO DO EXTRATO SECO

$$\text{Rendimento} = (\text{Massa de extrato seco} / \text{Massa da droga vegetal}) \times 100$$

4.7 ENSAIOS FARMACOPEICOS

4.7.1 Perda por dessecação

Transferiram-se exatamente 3,0 gramas da amostra para o pesa-filtro tarado, previamente dessecado nas mesmas condições a serem adotadas para a amostra, durante 30 minutos. Dessecou-se a amostra a 100-105°C durante 5 horas, até peso constante. Calculou-se a porcentagem de perda em relação ao peso inicial da amostra (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

4.7.2 Cinzas totais e Cinzas insolúveis em ácido

Pesaram-se exatamente 3,0 gramas da amostra pulverizada, transferiu-se para o cadinho de silício previamente tarado. Distribuindo a amostra uniformemente no cadinho e aumentando gradativamente a temperatura até, no máximo, 600 ± 25°C, até que todo o carvão seja eliminado pela incineração. Um gradiente de temperatura (30 minutos a 200°C, 60 minutos a 400°C e 90 minutos a 600°C) foi utilizado. Resfriou-se em dessecador e pesou-se. Calculou-se a porcentagem de cinzas em relação ao peso da droga seca total (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

O resíduo obtido na determinação de cinzas totais foi fervido durante 5 minutos com 25 mL de ácido clorídrico a 7% (p/v) em cadinho coberto com vidro de relógio. Lavou-se o vidro de relógio com 5 mL de água quente, juntando a água de

lavagem ao cadinho. O resíduo, insolúvel em ácido, foi recolhido sobre papel de filtro, isento de cinzas, lavando-o com água quente até que o filtrado se mostrou neutro. O papel de filtro foi transferido para o cadinho original, secou sobre a chapa quente e incinerou-se a 500°C até peso constante. Calculou-se a porcentagem de cinzas insolúveis em ácido em relação à droga seca do início do experimento (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

4.7.3 Determinação das Substâncias extrativas por etanol

Método de extração a frio: Em um erlenmeyer de 250 mL, transferiram-se exatamente 3,0 gramas de droga vegetal finamente pulverizada. A droga foi macerada em 100 mL de álcool (70%), durante 6 h, agitou-se frequentemente e deixou-se em repouso por 18 h., sem deixar perder qualquer quantidade de solvente a solução foi filtrada e transferida (25 mL) para uma cápsula de porcelana tarada e evaporou até secura em banho-maria. Secou-se a 105°C por 6 h e esfriou-se por 30 min. em dessecador, pesando imediatamente. A porcentagem de materiais extraídos em mg/g de droga vegetal seca foi calculada (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

4.8 ANÁLISE QUÍMICA

4.8.1 Triagem fitoquímica

A droga vegetal e o extrato seco da espécie *Raphanus sativus* L. var. *oleifera* Metzg. foram utilizados nos testes analíticos qualitativos para detectar os metabólitos secundários possíveis de serem encontrados. Os metabólitos abaixo descritos (Tabela 3) foram pesquisados de acordo com a metodologia descrita por Costa, (1982 e 2001):

Tabela 3- Grupos fitoquímicos e reagentes de identificação

Grupo fitoquímico	Reagentes de identificação
Alcaloides	Bertrand Bouchardat Dragendorff Mayer
Antraquinonas	Borntraeger direto e indireto
Esteroides	Liebermann-Buchard
Flavonoides	Shinoda Cloreto de Alumínio Cloreto de Férrico
Glicosídeos cardiotônicos	Liebermann-Buchard Baljet Keller-Killiane
Saponinas	Formação de espuma
Taninos	Cloreto de Férrico Precipitação de proteínas Precipitação de alcaloides Acetato de Cobre Vanilina sulfúrica

Fonte: Do autor

4.8.2 Espectrometria de massas

A análise do extrato bruto seco foi realizada utilizando a técnica de espectrometria de massas por injeção direta. Utilizou-se o E.M. Shimadzu LCMS8030 e a energia de fragmentação selecionada foi de – 20 eV. A ionização da amostra foi feita por impacto de elétrons e a análise das massas por um analisador triplo quadrupolo. Os compostos que obtiveram maior intensidade foram selecionados para fragmentação e posterior identificação. As análises foram feitas no Laboratório de Análises Toxicológicas da UNIFAL-MG com a colaboração da Professora Dr. Vanessa Bergamin Boralli Marques

4.9 ESTUDO FARMACOLÓGICO

No estudo farmacológico, foram realizados testes para a avaliação das atividades antinociceptiva e anti-inflamatória de *Raphanus sativus* L. var. *oleifera* Metzg.. O trabalho foi apreciado e aprovado pelo Comitê de Ética em animais da Universidade Federal de Alfenas, sob o protocolo número 490/2013, por estar em conformidade com os princípios éticos exigidos.

Foram utilizados camundongos “Swiss” machos (25±5g) provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL. Os animais foram tratados com ração comercial e água *ad libitum*, garantida sua adaptação por 7 dias em sala climatizada a 23±2°C, em caixas de polipropileno adequadas à sua manutenção e mantidos sob regime de luz com ciclo claro-escuro de 12 h. Ao término, os animais foram sacrificados com halotano.

4.9.1 Toxicidade aguda

A toxicidade aguda em camundongos foi realizada administrando-se o extrato seco de *Raphanus sativus* L. var. *oleifera* Metzg. por via oral na dose de 5 g/kg em

10 animais. Após a administração foram observados os seguintes parâmetros: hiperatividade, sedação, mudanças nas características das fezes (consistência) e consumo de ração e da água. O experimento foi observado durante o período de sete dias com aclimatização adequada. A alimentação e a água foram fornecidas a vontade.

4.9.2 Atividade anti-inflamatória

4.9.2.1 Teste de peritonite

A peritonite induzida por lipopolissacarídeo (LPS) avaliou o possível efeito do extrato na migração dos leucócitos para dentro da cavidade peritoneal. Os animais (n=8) foram pré-tratados em jejum por via oral com o veículo carboximetilcelulose (CMC), o extrato seco nas doses de 30, 100 e 300 mg/Kg e a indometacina (10 mg/kg). Uma hora após os tratamentos, aplicou-se o agente inflamatório (lipopolissacarídeo proveniente de *E. coli* sorotipo 026:B6-Sigma, 100 µg/kg, i.p).

Quatro horas após a indução da inflamação, os animais foram sacrificados por inalação de halotano (anestésico das vias aéreas). Uma incisão foi feita entre a terceira e a quinta costela do lado direito do mediastino. Em seguida, o peritônio de cada animal foi lavado com 3 mL de PBS (Tampão fosfato) 0,1 M. O peritônio foi suavemente massageado e a suspensão de células, isenta de sangue, foi aspirada ao máximo com a ajuda de uma pipeta de Pasteur. Cada amostra coletada foi precisamente medida e feita a correção para o volume injetado no peritônio. Uma alíquota de 10 µL do exsudato foi utilizada para determinar a contagem total de leucócitos em câmara de Neubauer (CUNHA et al., 1989; VILELA et al., 2010).

- Grupo 1: Carboximetilcelulose, 1%, v.o. + Salina (i.p.);
- Grupo 2: Carboximetilcelulose, 1%, v.o. + LPS;
- Grupo 3: Extrato seco, 30 mg/Kg, v.o. + LPS;
- Grupo 4: Extrato seco, 100 mg/Kg, v.o. + LPS;

- Grupo 5: Extrato seco, 300 mg/Kg, v.o. + LPS;
- Grupo 6: Indometacina, 10 mg/Kg, .v.o. + LPS.

4.9.2.2 Teste de edema de pata induzido por carragenina

O edema de pata foi induzido pela injeção de carragenina (2% p/v) em salina estéril e administrada na região subplantar da pata direita de camundongos (n = 8). Os camundongos foram pré-tratados em jejum por via oral com indometacina 10 mg/Kg (v.o), com veículo carboximetilcelulose (CMC) 10mL/Kg (v.o), com extrato seco de *Raphanus sativus var. oleifera* Metzg. nas doses de 30, 100 e 300 mg/Kg (v.o). Transcorrido 60 minutos da administração, foi induzido o edema pela injeção de carragenina (40 µL), aplicada na região plantar da pata direita posterior dos camundongos. Como controle, foi usada salina estéril. Após uma, duas, três e quatro horas da administração da carragenina e do controle, cada pata do animal foi imersa até a região tíbio-társica com o uso do pletismógrafo. A medida do edema foi feita pela diferença entre o volume deslocado da pata direita e o volume basal. A técnica foi baseada no método descrito por Carvalho (1998).

- Grupo 1: Carboximetilcelulose, 1% , v.o. + Salina;
- Grupo 2: Carboximetilcelulose, 1% , v.o.+ carragenina 2% p/v;
- Grupo 3: Extrato seco, 30 mg/Kg, v.o. + carragenina 2% p/v;
- Grupo 4: Extrato seco, 100 mg/Kg, v.o. + carragenina 2% p/v;
- Grupo 5: Extrato seco, 300 mg/Kg, v.o. + carragenina 2% p/v;
- Grupo 6: Indometacina, 10 mg/Kg, v.o. + carragenina 2% p/v.

4.9.3 Atividade antinociceptiva

4.9.3.1 Teste da formalina

O método utilizado para este ensaio foi baseado naquele descrito por Santos e Calixto, 1997. Ele foi realizado utilizando 6 grupos de 8 camundongos os quais foram pré-tratados em jejum por via oral da seguinte forma:

- Grupo 1: Carboximetilcelulose, 1% , v.o.+ Formalina 5%;
- Grupo 2: Extrato seco 30 mg/Kg, v.o. Formalina 5%;
- Grupo 3: Extrato seco, 100 mg/Kg, v.o. Formalina 5%;
- Grupo 4: Extrato seco, 300 mg/Kg, v.o. + Formalina 5%;
- Grupo 5: Indometacina, 10 mg/Kg, v.o. + Formalina 5%;
- Grupo 6: Morfina, 10 mg/Kg, i.p. + Formalina 5%.

Após 1 hora do tratamento dos grupos 1 ao 5, e 30 minutos do tratamento do grupo 6 foi aplicado subcutaneamente 20µL de solução de formalina 5% na região plantar da pata traseira direita dos animais. Durante os tempos de 0 a 5 minutos e de 20 a 30 minutos foi cronometrado o tempo que os animais gastaram lambendo a pata que recebeu a solução de formalina.

4.9.3.2 Teste da placa quente

O teste da placa quente utilizou-se de uma superfície aquecida eletricamente, mantida a uma temperatura aproximada de 50°C±1°C. Foram utilizados grupos de 8 camundongos pré-tratados em jejum por via oral com CMC e extrato seco de *Raphanus sativus* L. var. *oleifera* Metzg. nas doses de 30, 100 e 300 mg/Kg (v.o) mais os fármacos padrão (morfina 1 mg/kg e naloxano 0,4 mg/kg) para grupo controle.

Cada animal foi colocado individualmente sobre a superfície aquecida cercada por uma parede de acrílico para restringir a locomoção dos animais. Foi observado o tempo de latência de resposta ao estímulo termonoceptivo, de acordo com o método descrito por (YAMAMOTO et al., 2002).

Neste teste, a medição do tempo foi interrompida quando o animal apresentou comportamento instintivo de saltar sobre a placa ou lambe as patas com, no máximo, 30 segundos, para evitar a injúria tecidual. Foi registrada a observação para o tempo de 0, 30, 60 e 120 minutos após os tratamentos.

Os grupos foram tratados da seguinte forma:

- Grupo 1: Carboximetilcelulose, 1% , v.o.;
- Grupo 2: Extrato seco 30 mg/Kg, v.o.;
- Grupo 3: Extrato seco, 100 mg/Kg, v.o.;
- Grupo 4: Extrato seco, 300 mg/Kg, v.o.;
- Grupo 5: Morfina, 1mg/Kg, i.p.;
- Grupo 6: Naloxona (0,4 mg/kg) + morfina (1 mg/kg, i.p.);
- Grupo 7: Naloxona (0,4 mg/kg, i.p.) + Extrato 300 mg/kg.

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

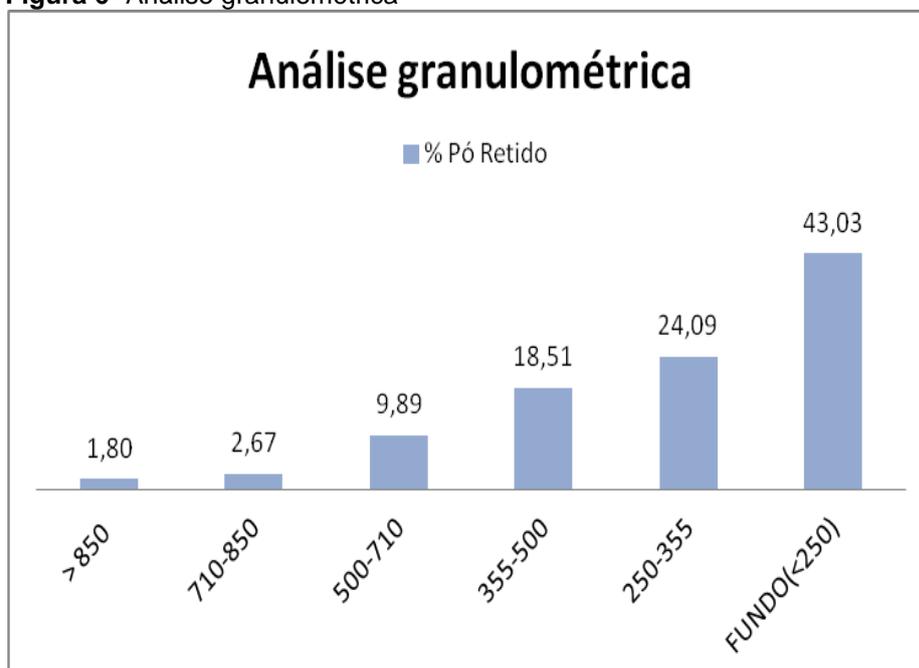
Os resultados foram analisados usando o programa GraphPad Prism v.5.0. Os dados obtidos foram expressos obedecendo a média \pm erro padrão. A análise estatística foi realizada pelo método ANAVA seguida pelo pós-teste Newman-Kells ($p < 0.05$).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 GRANULOMETRIA

As substâncias extraídas dependem do tamanho da partícula, tenuidade do pó e a polaridade do solvente utilizado na extração. O processo extrativo pode influenciar na atividade biológica, devido à interferência deste processo na concentração final dos bioativos (ELOFF, 1998; ELOFF, 2004; OSTROSKY et al., 2008). Segundo o método de controle de qualidade para materiais a base de plantas, da Organização Mundial da Saúde, as partículas para serem consideradas moderadamente finas teriam de passar em sua totalidade, ou em quase sua totalidade, pelo tamis 45 (355 μm) para serem classificadas como moderadamente finas. No caso da droga vegetal *Raphanus sativus* L. var. *oleifera* 32,87% da droga ficaram retidas entre os tamises 20 (850 μm) a 45 (355 μm) (Figura 6). Ou seja, existe uma considerável quantidade de partículas maiores que 355 μm .

Figura 6- Análise granulométrica



Fonte: Do autor

A classificação da droga em estudo se enquadra como moderadamente grossa por ter passado uma porcentagem considerável pelo tamis com abertura nominal de 250 μm (43,03%) e ficado retida 32,87% da droga no tamis com malha maior a 355 μm . O tamanho das partículas da droga pulverizada tem influência direta sobre a eficiência no processo extrativo (LIST; SCHMIDT, 2000). Este processo é de suma importância para todas as etapas do estudo realizado, devido à relação direta entre a extração dos metabólitos secundários e a eficácia dos estudos farmacológicos.

5.2 RENDIMENTO DO EXTRATO SECO DAS FOLHAS

O rendimento do extrato bruto seco das folhas foi de:

$$\text{Rendimento} = \frac{\text{Quantidade extrato seco obtido}}{\text{Quantidade de droga veg.}} \times 100$$

$$\text{Rendimento} = \frac{54 \text{ gramas}}{200 \text{ gramas}} \times 100$$

$$\text{Rendimento} = 27\%$$

5.3 ENSAIOS FARMACOPEICOS

A água residual encontrada em drogas vegetais está diretamente relacionada com o seu processo de perdas durante o armazenamento e uso. A água, em quantidades elevadas, gera a proliferação de micro-organismos em amostras. Pode ocorrer também a degradação de metabólitos secundários presentes na amostra devido a reações de hidrólise. De acordo com a Tabela 4, a perda por dessecação foi de 6,96 % (0,209 gramas), o que corresponde à água presente na droga, em 3,0 gramas.

Tabela 4- Valores encontrados nos ensaios farmacopeicos

Ensaio	Valores encontrados	Valor de referência
Perda por dessecação	6,96 %	<14%
Cinzas totais	16,69 %.	-
Cinzas insolúveis em ácido	0,025 %.	-
Substâncias extrativas por etanol	25%	-

Fonte: Do autor

O limite máximo recomendado de umidade para drogas vegetais é de 14% (SIMÕES et al., 2010). Verificou-se que o valor encontrado na análise da droga corresponde ao preconizado na literatura.

Cinzas totais são os resíduos inorgânicos que permanecem após a queima da matéria orgânica. Considerando-se que foi utilizado um total de 3,0 gramas, a média percentual de cinzas totais em relação à droga vegetal foi de 16,69 % (Tabela 4).

A partir dos resíduos das cinzas totais foram feitos os testes para cinzas insolúveis em ácido. O percentual médio de cinzas insolúveis em ácido na droga vegetal foi de 0,025 % (Tabela 4). Neste teste são esperados, na maioria das drogas vegetais, valores baixos, correspondente às cinzas não fisiológicas, provenientes de material estranho, especialmente areia e terra. Sabe-se, no entanto que algumas espécies, apresentam valores altos de cinzas sem que isto represente contaminação, sendo uma característica do gênero ou da espécie (LUENGAS-CAICEDO, 2005).

O teor de substâncias extrativas tem a finalidade de conhecer o quanto pode ser extraído por um determinado solvente a partir de uma droga vegetal (SILVÉRIO et al., 2006). A solução extrativa teve rendimento de 25% do conteúdo da droga vegetal de *Raphanus sativus* L. var. *oleifera*. Isto significa, que ao utilizar como líquido extrator o álcool 70%, em 3 gramas da droga vegetal da folha são esperados 0,75 gramas de sólidos solúveis. O resultado foi bem próximo dos 27% encontrados no rendimento da percolação, observando-se assim correlação e a eficiência dos métodos extrativos utilizados.

5.4 TRIAGEM FITOQUÍMICA

A triagem fitoquímica da droga vegetal e extrato seco de *Raphanus sativus* L. var. *oleifera* Metzg. foi realizada observando a presença de precipitação e/ou coloração característica para cada experimento das amostras analisadas. A Tabela 5 apresenta os principais compostos bioativos presentes no nabo forrageiro.

Tabela 5 - Identificação fitoquímica da droga vegetal e extrato seco de *Raphanus sativus* L. var. *oleifera* Metzg.

Classe fitoquímica	Reações	Droga	Extrato seco
Alcaloides	Bertrand	-	-
	Bouchardat	-	-
	Dragendorff	-	-
	Mayer	-	-
Antraquinonas	Brontraeger direto	-	-
	Borntraeger indireto	-	-
Esteroides e triterpenoides	Liebermann-Buchard	+	+
	Salkowski	+	+
Flavonoides	Shinoda	+	+
	Cloreto de alumínio	+	+
	Cloreto férrico	+	+
Glicosídeos Cardiotônicos	Liebermann-Buchard	+	+
	Baljet	-	-
	Keller-Killiani	+	+
Saponinas	Formação de espuma	-	-
Taninos	Cloreto férrico	+	+
	Precipitação proteínas	+	+
	Precipitação alcaloides	+	+
	Acetato de cobre	+	+
	Vanilina sulfúrica	+	+

Fonte: Do autor

A triagem fitoquímica revelou a presença de taninos, de flavonóides, de esteroides e de triterpenos no extrato seco da folha e para a droga vegetal (Tabela 5). A verificação de taninos foi realizada através das reações com cloreto férrico

FeCl₃, formando coloração azul (indicador de taninos hidrolisáveis) e pela precipitação de proteínas, alcaloides e acetato de cobre.

A reação positiva para a vanilina sulfúrica confirmou a presença de taninos condensados no extrato seco e na droga vegetal. Os taninos exercem funções importantes como as ações antidiarreicas e anti-inflamatórias, tendo efeitos vasoconstritores e de precipitação das proteínas nos locais de úlceras que forma película de proteção impermeável, que torna a lesão menos permeável a substâncias tóxicas e mais resistentes ao ataque de enzimas proteolíticas (NWAFOR et al., 2000). Hagerman et al. (1999) mencionou os mecanismos paralelos ao efeito anti-inflamatório dos taninos, incluindo o scavenger de radicais livres.

Os flavonoides foram identificados através da reação de *Shinoda*, os quais se reduzem, perdendo hidrogênio, apresentando a coloração vermelha. A reação com o AlCl₃ apresentou fluorescência amarelo-esverdeada e a reação com o FeCl₃ apresentou coloração castanha; os flavonoides são associados por exercerem sua ação como anti-inflamatórios e analgésicos (GARCIA-LEME et al., 1973). Estudos realizados demonstraram a determinação e quantificação de quercetina, de rutina e de campferol em *Raphanus sativus* L. (VENKATAPURA et al., 2011).

As folhas de *Raphanus sativus* L. contêm outros flavonóides funcionais e campferol, conhecidos por terem efeito protetor da mucosa gástrica (REYES et al., 1996; IZZO et al., 1994). Estudos têm provado repetidamente as ações anti-inflamatórias dos flavonoides. Desta forma, tem-se investigado tanto a ação dos flavonoides (quercetina, rutina e mortina) quanto das flavonas nas inflamações aguda e crônica (ROTELLI et al., 2003).

Para a identificação de esteroides e triterpenos foram utilizadas as reações de *Liebermann-Burchard* e de *Salkowski*, verificando a coloração castanha avermelhada, devido à presença do núcleo esteroidal. De acordo Peana et al. (2004) os terpenoides podem estar envolvidos ao antagonismo de receptores NMDA capaz de provocar analgesia supra-espinhal mediada pela estimulação de receptores opióides centrais e de receptores dopaminérgicos D1/D2.

Gutierrez et al. (2004) reportaram os constituintes de *Raphanus sativus* L., sendo: alcaloides, flavonoides e outros compostos fenólicos. Aruna et al. (2012) em um estudo realizado com *Raphanus sativus* L. identificou flavonoides, taninos, polifenóis, óleos voláteis, glicosídeos e glicosinatos. Njumbe Ediage et al. (2011)

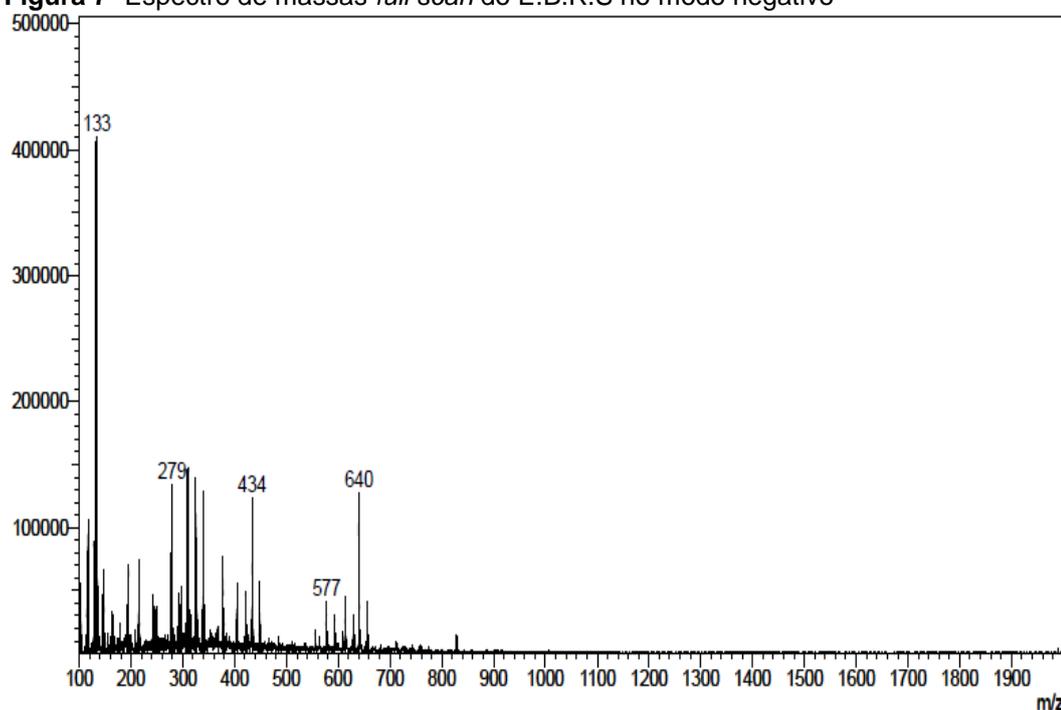
citou a presença da m/z do glicosilanolato conhecido como glicoraphanídeo. Os metabólitos secundários presentes no extrato seco das folhas sugerem as atividades estudadas nesta dissertação.

5.5 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL POR ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A espectrometria de massas é uma técnica instrumental, que possui alta eficiência, com diversas aplicações em vários segmentos de pesquisas. A técnica é utilizada para identificar e quantificar compostos com m/z conhecidos e sugerir estruturas moleculares. A análise utilizou o extrato bruto seco das folhas do nabo forrageiro. A espectrometria de massas neste estudo utilizou o software ACD/Chemsketch para propor as estruturas dos principais compostos do extrato.

A Figura 7 mostra o espectro *full scan* do extrato bruto em modo negativo.

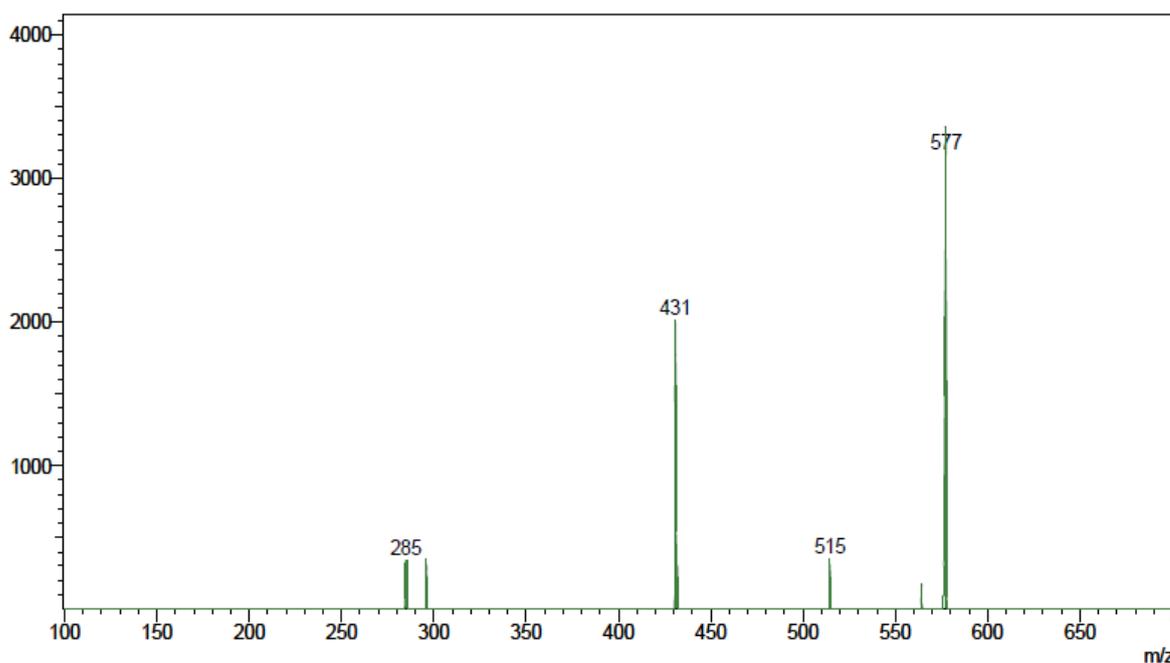
Figura 7- Espectro de massas *full scan* do E.B.R.S no modo negativo



Fonte: Do autor

A partir do espectro *full scan* (Figura 7) pode-se observar que os principais compostos são os de m/z 640, 593, 577, 434. Desta forma, foi possível realizar a fragmentação destes compostos a fim de se elucidar suas estruturas. O composto com m/z 577 apresentou a seguinte fragmentação (Figura 8):

Figura 8- Espectro do composto com m/z 577 em modo negativo



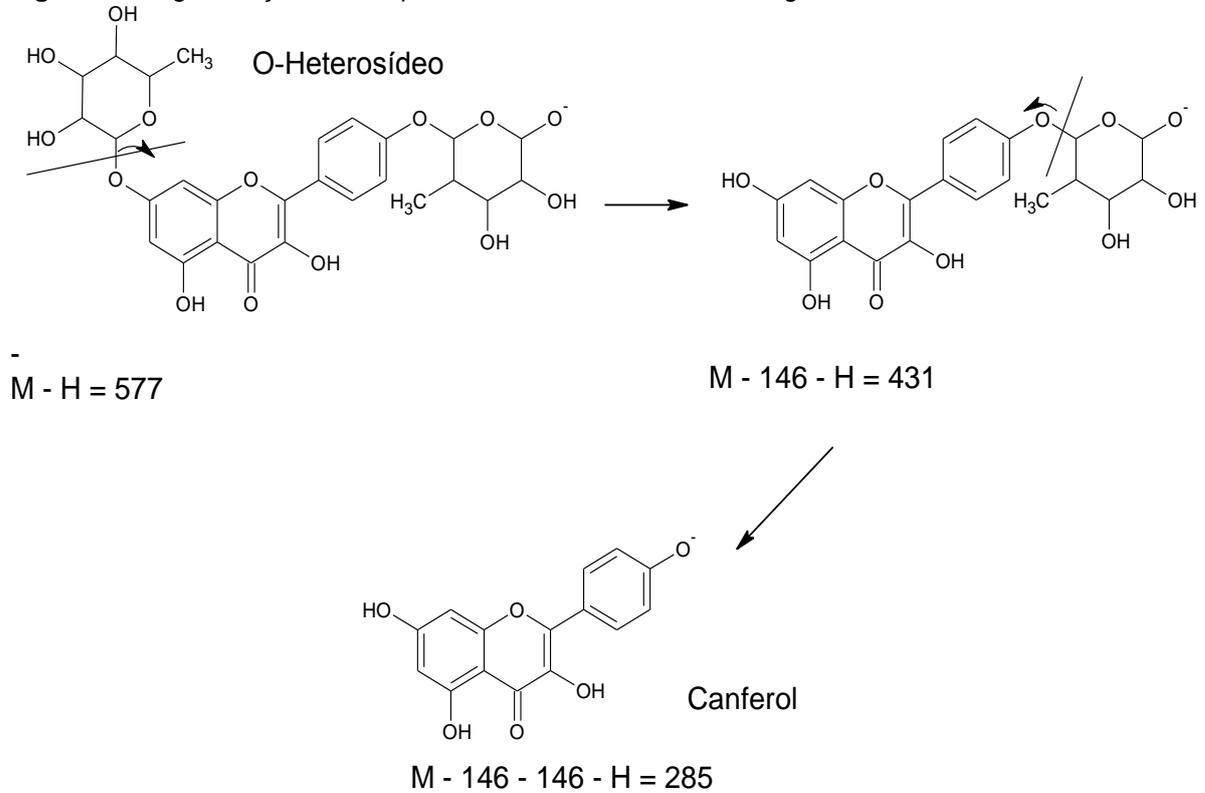
Fonte: Do autor

O canferol é um flavonoide com m/z de 578 encontrado em *R. sativus* (DEVARAJ; VISWANATHA, 2011). Quando ligado a duas moléculas de açúcar, ambas com 146 de massa molecular.

A perda de um H leva a formação de um ânion com massa molar de 577 Da $[M - H]^-$ e, a partir deste, ocorre a perda das duas moléculas de O-desoxiexoses sucessivamente, resultando em um ânion m/z 431 $[M - 146]^-$ e outro m/z 285 $[M - 146 - 146]^-$ segundo o mecanismo de fragmentação proposto por Wolfender et al. (1992) na Figura 9.

O fragmento com m/z 285 corresponde à aglicona do canferol (RAYMOND; MIAO, 2003).

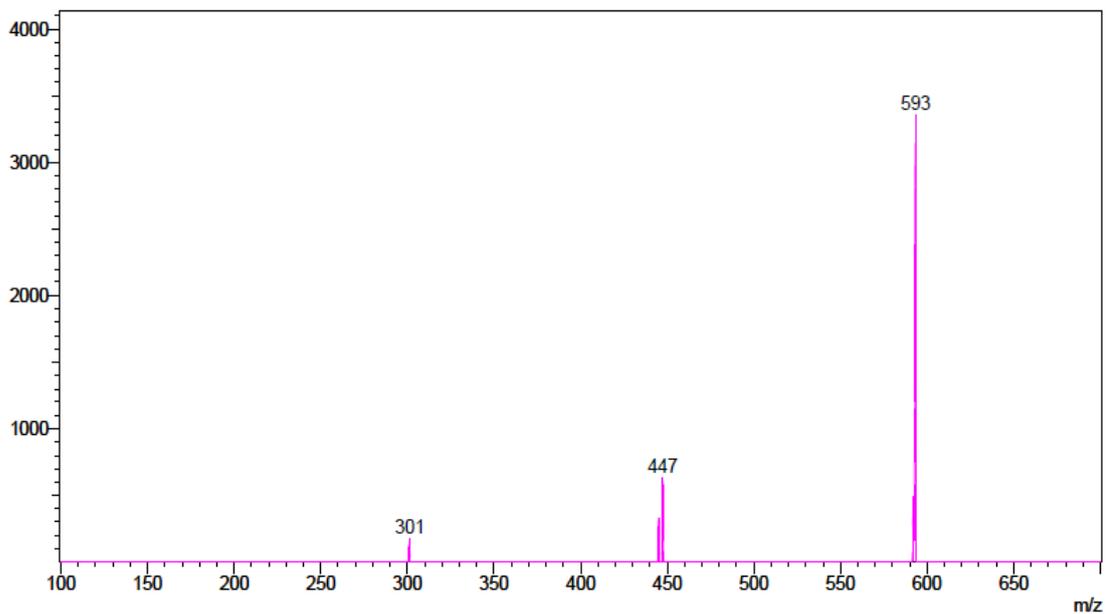
Figura 9- Fragmentação do composto com m/z 577 em modo negativo.



Fonte: Do autor

O composto com m/z 593 obteve o seguinte espectro MS2 (Figura 10):

Figura 10- Espectro do composto com m/z 593 no modo negativo.

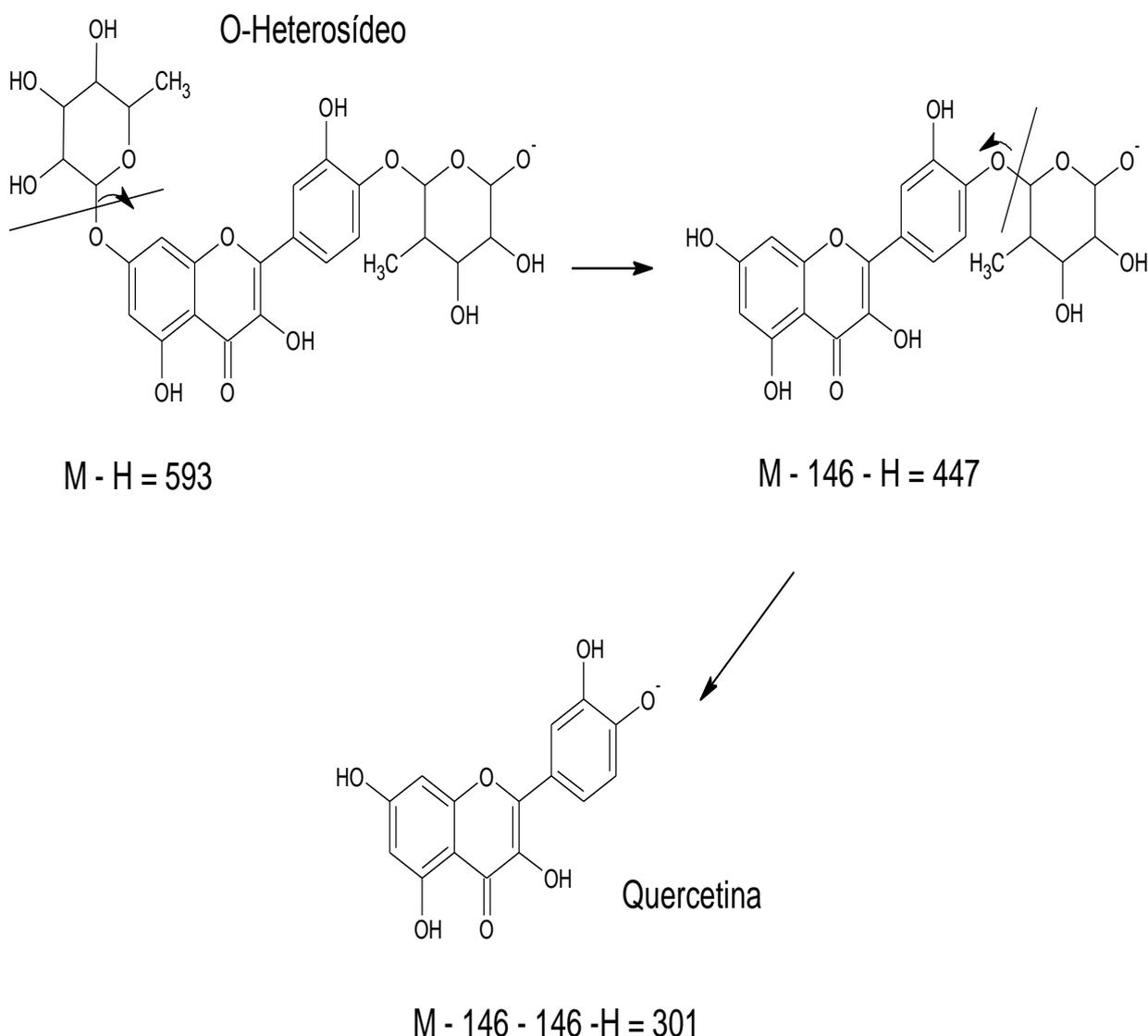


Fonte: Do autor

Observou-se que os fragmentos obtidos a partir do íon molecular foram os de m/z 447 e 301. A quercetina, um flavonoide comum na espécie *R. Sativus* foi proposta como sendo este composto (VANGALAPATI et al., 2014).

O mecanismo de fragmentação da quercetina é semelhante ao do canferol, proposto por Wolfender et al. (1992), com perdas sucessivas de duas O-desoxiexoses de massa molecular 146 (Figura 11).

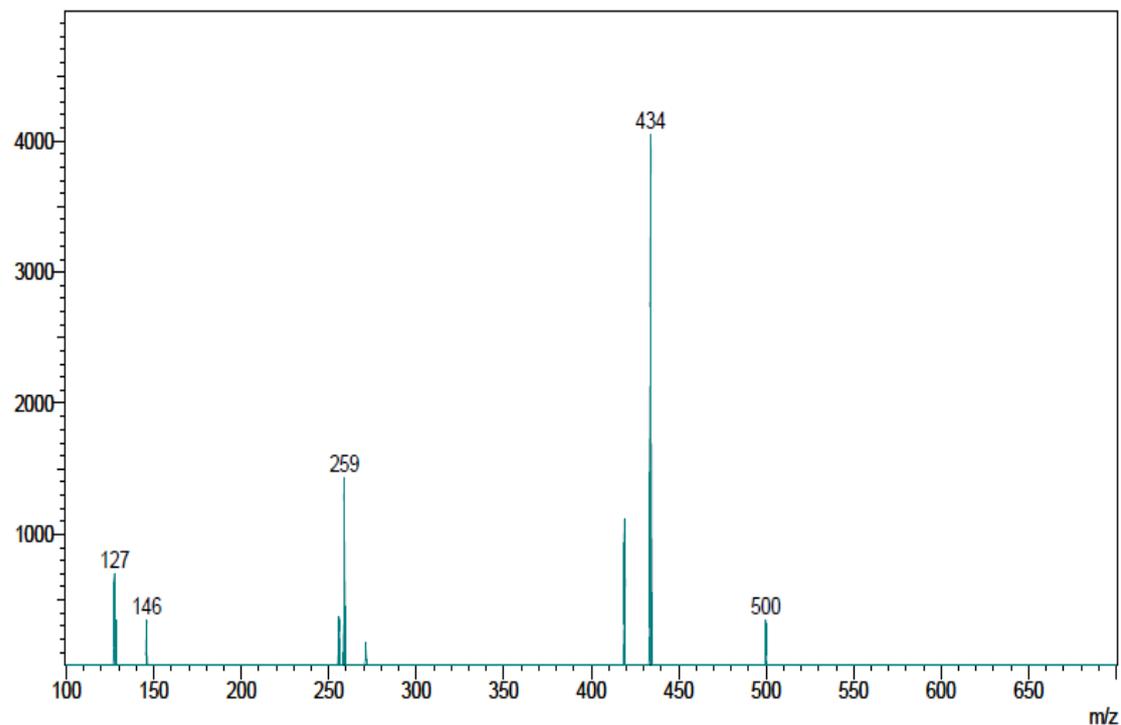
Figura 11- Fragmentação do composto com m/z 593 no modo negativo



Fonte: Do autor

O composto com m/z 434, outro metabólito secundário identificado no *full scan* do extrato bruto de *R. sativus*, produziu o seguinte espectro após sua fragmentação (Figura 12):

Figura 12- Espectro do composto com m/z 434 no modo negativo

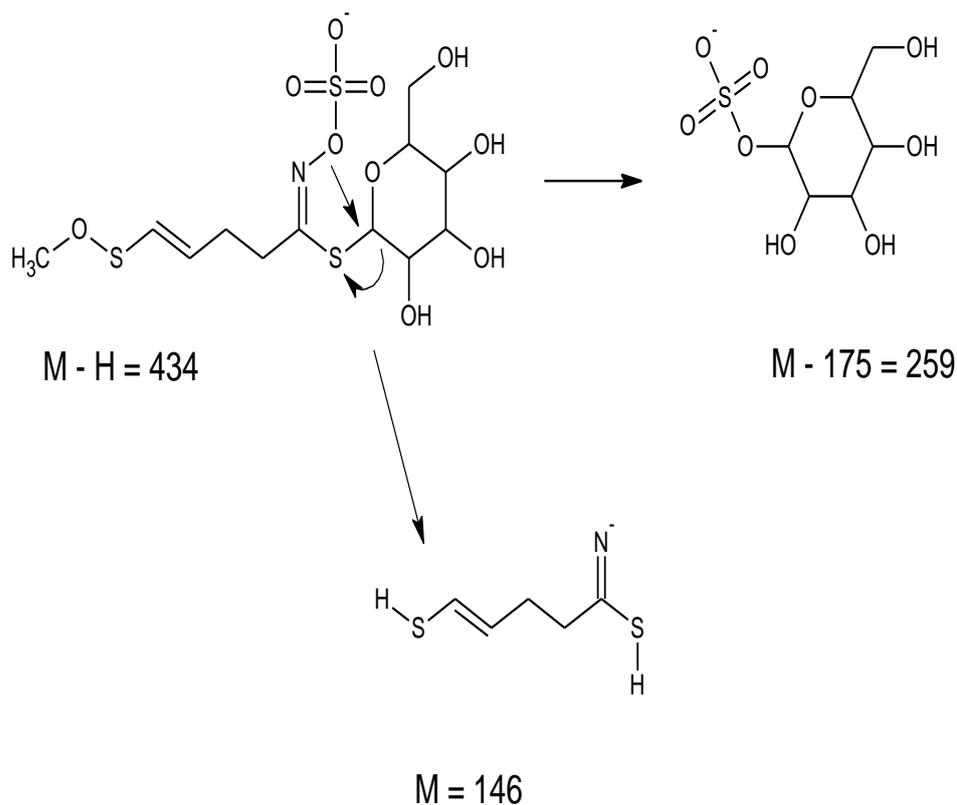


Fonte: Do autor

Os principais fragmentos produzidos a partir da m/z 434 foram os de m/z 259 e 146, a partir dos quais se pode propor a estrutura e o mecanismo de fragmentação segundo Lee et al. (2008) do glicosinolato conhecido como glicorafanina, isolado da espécie *R. Sativus* L. (ARUNA; YERRAGUNT; RAJU, 2012).

Pode-se observar a quebra da ligação S-hexose e a formação de uma ligação O-hexose com o grupo sulfona que estava ligado ao nitrogênio, resultando no íon m/z 259. O íon m/z 146 é formado pela perda da hexose e do grupo SO_4 (Figura 13).

Figura 13- Fragmentação do composto com m/z 434 no modo negativo



Fonte: Do autor

5.6 TOXICIDADE AGUDA

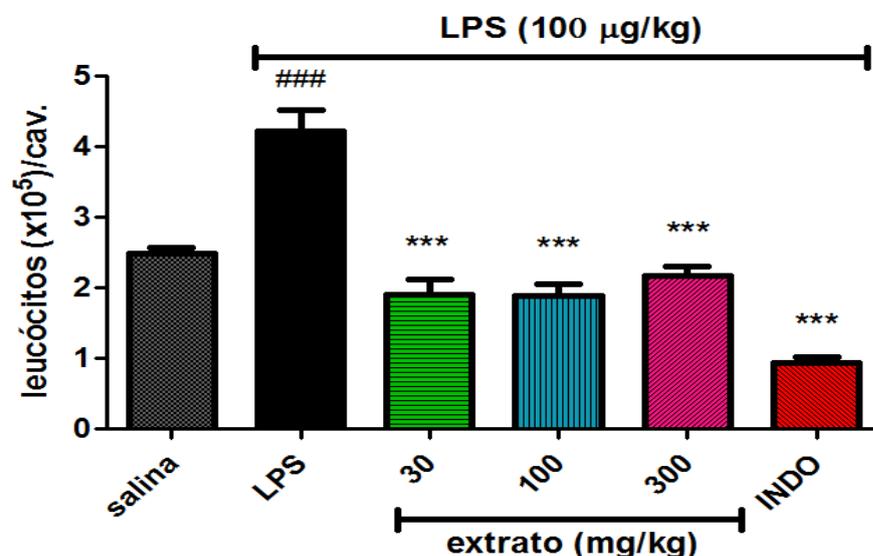
O estudo de toxicidade aguda na concentração de 5 g/kg não mostrou nenhuma diferença no hábito dos camundongos durante os sete dias de observação. O consumo de ração e de água não sofreu alteração. A produção de fezes e sua consistência também não foram alteradas. Não ocorreram mortes de camundongos após o tratamento. Estudo realizado por Devaraj et. al. (2011) sobre a toxicidade oral aguda em *Raphanus sativus* L. não observou mortalidade, quando administrada a dose de 2,0 gramas/kg via oral do extrato das folhas.

5.7 ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

5.7.1 Teste de peritonite

A peritonite induzida por lipopolissacarídeo (LPS) foi seguida pelo aumento significativo ($p < 0,001$) no número de leucócitos na cavidade peritoneal dos camundongos, quando comparado com o grupo controle (Figura 14). No experimento, o extrato reduziu o número de leucócitos do exsudato da cavidade peritoneal agredida pelo LPS. Após 4 horas da aplicação do LPS ($100 \mu\text{g}/\text{kg}; \text{i.p.}$), o número de leucócitos na cavidade peritoneal foi de $1,9 \pm 0,08$, $1,88 \pm 0,18$ e $2,17 \pm 0,13$ (valores expressos pela média \pm erro padrão médio) na ordem de 10^5 leucócitos/cav. para o extrato nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg, respectivamente. A indometacina ($10\text{mg}/\text{kg}$), anti-inflamatório não esteroide, apresentou leitura da ordem de $0,93 \pm 0,08$, mostrando-se significativo em comparação a leitura de $4,22 \pm 0,29$ do grupo tratado somente com LPS.

Figura 14- Efeitos da administração do E.B.R.S. nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg, v.o. e indometacina ($10 \text{ mg}/\text{kg}$, v.o.) no recrutamento de leucócitos induzido por LPS para a cavidade peritoneal de camundongos ($n=8$). Cada coluna representa a média \pm erro padrão. ### $p < 0,001$ em comparação ao LPS com o controle (salina). *** $p < 0,001$ em comparação do LPS com grupos tratados com extrato e indometacina. Análise de variância (ANOVA) seguido do teste Student Newman-Keuls ($p < 0,05$).



Fonte: Do autor

A peritonite induzida por LPS (lipopolissacarídeo) assemelha-se a uma infecção bacteriana e representa um modelo de estudos para inflamação peritoneal aguda (CUNHA et al., 1989; VILELA et al., 2010). Em estudos anteriores, a peritonite induzida por LPS (lipopolissacarídeo proveniente de *E. coli* sorotipo 026: B6-Sigma) provocou um aumento significativo no recrutamento de leucócitos em cavidades peritoneais de ratos, quando comparado com o grupo controle tratado apenas com veículo (CUNHA et al., 1989). O recrutamento de células durante a inflamação depende da liberação de mediadores locais que são responsáveis por alterar o tecido e recrutar células hospedeiras de defesa (THOMAZZI et al., 2010). Neste modelo experimental, os resultados demonstraram que o pré-tratamento com extrato seco de *Raphanus sativus* var. *oleifera* Metzg. reduziu significativamente ($p < 0,001$) o número de células recrutadas nas três concentrações testadas, indicando uma possível presença de agentes anti-inflamatórios ativos no extrato que atuam inibindo os mediadores químicos responsáveis pelo processo inflamatório. Os metabólitos encontrados no extrato sugerem o efeito encontrado no teste de peritonite. Os principais constituintes do extrato com efeito anti-inflamatório poderiam ser os flavonoides e os taninos. Segundo Feldman et al. (2002) a inibição de mediadores inflamatórios, tais como TNF também estão relacionados aos taninos.

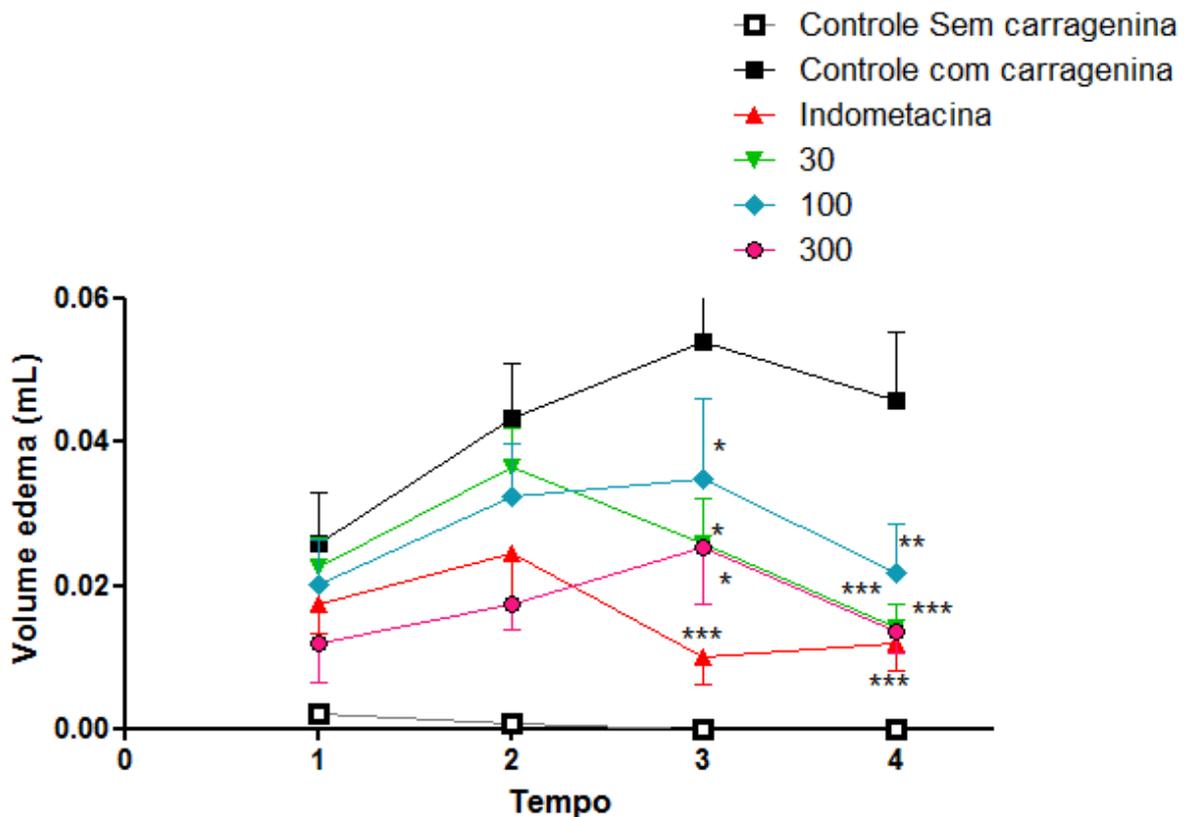
Diversos mecanismos explicam a atividade anti-inflamatória dos flavonóides, sendo os principais a ação sequestrante de radicais livres, a regulação de atividades celulares relacionadas à inflamação, a modulação na atividade das enzimas do metabolismo do ácido araquidônico (fosfolipase A2, ciclo-oxigenase e lipo-oxigenase) e na expressão de genes pro-inflamatórios (CASTELUCCI et al., 2007; FERRANDIZ; ALEARAZ, 1991 e 1987).

5.7.2 Teste de edema de pata induzido por carragenina

O aumento do volume do edema foi verificado no decorrer das quatro horas, com relação aos tratamentos salina x carragenina, conforme a Figura 15. No teste observou-se que após 4 horas da injeção de carragenina houve a diminuição do edema nos animais pré-tratados com extrato ($0,014 \pm 0,003$ mL, $p < 0,001$; $0,021 \pm 0,01$ mL, $p < 0,01$; e $0,013 \pm 0,003$ mL, $p < 0,001$) nas doses de 30, 100 e

300mg/kg respectivamente, quando comparado ao controle (0,05± 0,01) (valores expressos pela média ± erro padrão médio). A inflamação deve-se ao deslocamento de mediadores inflamatórios para o local da agressão. Sugere-se que a atividade antiedematogênica do extrato testado é dependente da dose.

Figura 15- Efeito do E.B.R.S. no edema de pata induzido por carragenina (n=8). Cada valor representa a média ± erro padrão médio. Análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Student Newman-Keuls ($p < 0,05$). * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.



Fonte: Do autor

O teste mais utilizado para a seleção de agentes anti-inflamatórios é o edema induzido pela carragenina em pata de animais, que é frequentemente utilizado para avaliar o efeito anti-edematogênico de produtos naturais (THOMAZZI et al., 2010). A resposta inflamatória induzida pela carragenina é caracterizada por uma resposta que resulta em edema, produzindo vários mediadores inflamatórios e é caracterizada pela liberação de histamina, de serotonina e de bradicinina, e a resposta tardia é caracterizada pela produção de prostaglandina (OGONOWSKI et al., 1997).

A resposta inflamatória dos grupos tratados com as doses do extrato é comparada com o grupo tratado com o agente inflamatório (carragenina) e o grupo tratado com o fármaco indometacina, um anti-inflamatório não esteroide, muito empregado em dores inflamatórias que atua como inibidor não seletivo da enzima ciclo-oxigenase (COX). O tratamento com extrato seco de *Raphanus sativus* var. *oleifera* Metzg. foi efetivo na resposta de redução do edema causada pela carragenina nas doses de 30 e 300 mg/kg, sendo similar ao exibido na quarta hora pelo grupo tratado com indometacina (Figura 15).

Segundo Castelucci et al. (2003), esse efeito pode estar relacionado aos efeitos dos metabolitos secundários das plantas no processo inflamatório. Sugere-se que o efeito foi devido à redução da liberação de mediadores, como histamina, serotonina e/ou bradicinina, no local da inflamação ou por bloquear receptores de diferentes mediadores (OGONOWSKI et al., 1997). Isso pode ser possível devido ao efeito isolado dos metabolitos ou ao efeito sinérgico entre os vários constituintes do extrato. Alguns autores têm provado repetidamente as ações anti-inflamatórias dos flavonoides. Desta forma, tem-se investigado tanto a ação dos flavonóis (quercetina, rutina e mortina) quanto das flavonas nas inflamações aguda e crônica (ROTELLI; GUARDI; JUAREZ; DE LARROCHA, 2003).

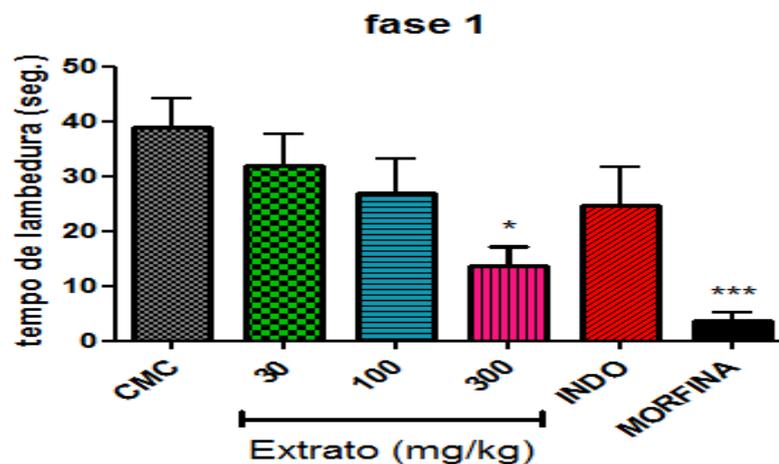
A quercetina (metabólito presente no extrato) tem sido relatada como sendo o agente com melhor atividade na redução do edema de pata, e a rutina, nos processos inflamatórios crônicos como a artrite (PARADKAR et al., 2004).

5.8 ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA

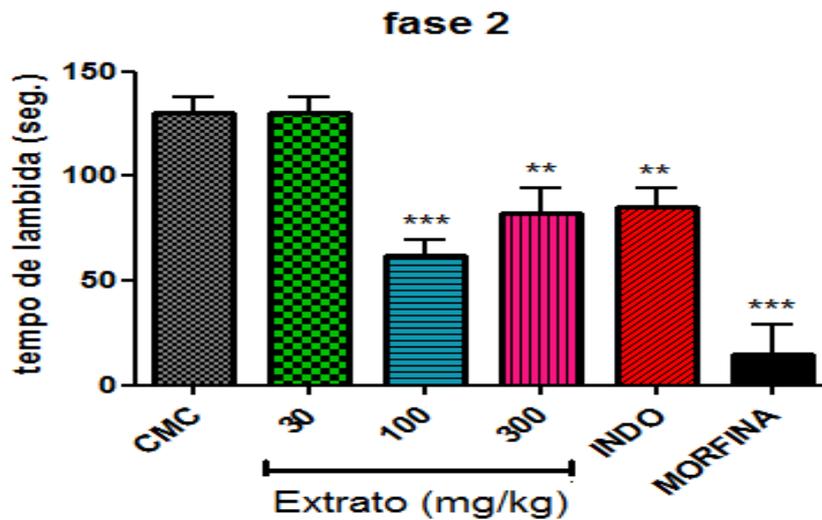
5.8.1 Teste da formalina

A atividade do extrato na 1ª fase (Figura 16) abaixou o tempo de lambida de $38.9 \pm 5,3$ seg. (CMC) a $13,6 \pm 3,7$ seg. na dose de 300mg/Kg ($p < 0,05$), comparado com o grupo controle. Na 2ª fase (Figura 16), o extrato reduziu de $130,4 \pm 7,4$ seg. (CMC) a $62,3 \pm 7,5$ e $82 \pm 12,0$ seg. nas doses de 100 e 300mg/Kg respectivamente, quando comparados com o grupo controle (valores expressos pela média \pm erro padrão médio). A ação da morfina se faz tanto na 1ª e 2ª fase devido a sua ação no sistema nervoso central. No entanto, a 2ª fase é caracterizada pelo surgimento do processo inflamatório local, onde são produzidos mediadores da inflamação que são inibidos por fármacos anti-inflamatórios como a indometacina. Provavelmente, a diminuição do tempo de lambida induzida pela formalina deve-se à inibição da biossíntese de mediadores da inflamação como a ciclo-oxigenase e conseqüentemente das prostaglandinas, sendo mais eficientes nas dores somáticas com componente inflamatório, possuindo três principais efeitos, sendo eles: o anti-inflamatório, o analgésico e o antipirético (DANNHARDT; KIEFER, 2001).

Figura 16- Efeito causado pela formalina em camundongos ($n=8$) depois da administração do E.B.R.S. nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg, indometacina (10 mg/kg) e morfina (10 mg/Kg, i.p.) na 1ª fase e na 2ª fase. Cada coluna representa a média \pm erro padrão médio. Análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Student Newman-Keuls ($p < 0,05$)., * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.



Fonte: Do autor



Fonte: Do autor

O teste da formalina consiste em avaliar a nocicepção em duas fases. A primeira fase (fase neurogênica), ou aguda, que é causada pelo efeito direto da formalina nas fibras sensoriais C. Essa fase é modulada pela ação de analgésicos de ação central como os fármacos derivados de substâncias opioides. A segunda fase corresponde a dor gerada por mediadores inflamatórios, ou seja, gerada por uma resposta tardia ao estímulo da dor. Essa fase é inibida, principalmente, por anti-inflamatórios não-esteroidais, como a indometacina, que é um inibidor não seletivo da ciclo-oxigenase. Segundo Verma et al. (2005) essa reação tardia deve-se a ação na liberação da serotonina, da histamina, da bradicinina e da prostaglandina, que podem provocar sensibilização dos neurônios nociceptivos centrais.

Nos resultados demonstrados, o tempo gasto para o animal lambida a pata ferida foi reduzido significativamente pela administração de extrato seco na concentração de 300 mg/kg, na primeira fase. Seu efeito analgésico se deve a uma série de mecanismos, incluindo o mecanismo central envolvendo inibição da síntese de prostaglandinas (MCCORMACK, 1994; PINI et al., 1995; BJORKMAN, 1995; SANDRINI et al., 2002; HAMZA; DIONNE, 2009).

Na segunda fase, sugere-se a provável atividade anti-inflamatória do extrato seco devido a redução significativa do tempo de lambida nas doses de 100 e 300 mg/kg do extrato. Assim, uma possível redução na liberação de mediadores inflamatórios ou o bloqueio dos receptores para estes mediadores, resultando no efeito antinociceptivo periférico, seria condizente com os efeitos anti-inflamatórios

apresentados nos testes anteriores. Neste teste, fármacos de ação central, como a morfina, inibem ambas as fases igualmente, enquanto fármacos de ação periférica, como os anti-inflamatórios não-esteroidais e corticosteroides inibem somente a segunda fase (DICKENSON; SULLIVAN, 1987; DUBUISSON; DENNIS, 1977; YAKSH et al., 2001).

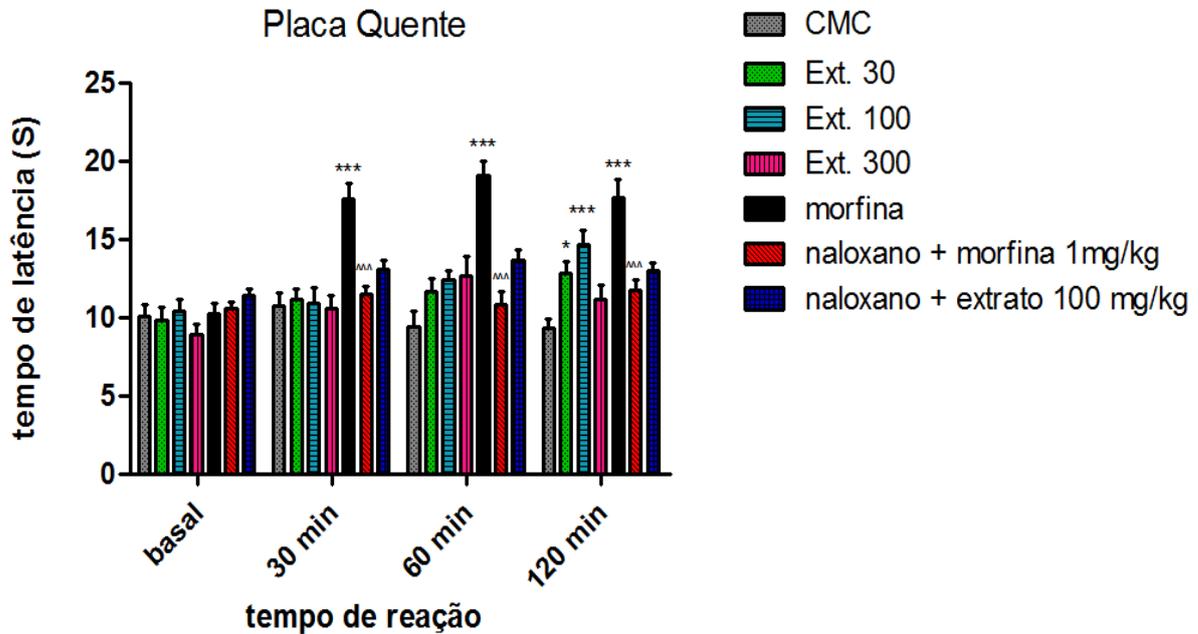
5.8.2 Teste da placa quente

O teste da placa quente avalia a nocicepção central, e se o efeito antinociceptivo do extrato implica no envolvimento de componentes supraespinhais, bem como espinhais (YAKSH; RUDY, 1976; YAKSH; RUDY, 1977; YEUNG et al., 1977). O teste de placa quente foi utilizado para medir os efeitos analgésicos centrais, como também, com o intuito de elucidar o mecanismo de ação pelo qual o extrato mostrou-se eficaz, sendo assim, os animais foram pré-tratados com naloxano (0,4 mg/kg, i.p.) e naloxano (0,4 mg/kg, i.p.) + extrato (100 mg/kg).

O naloxano tem como característica fazer o antagonismo das vias opioides, impedindo a ocupação dos sítios ativos pela morfina, bloqueando, desta maneira, o efeito analgésico da morfina.

Os resultados (Figura 17) sugerem que o extrato não possui efeito antinociceptivo modulado pela via central devido ao fato do efeito analgésico não ter sido revertido pelo antagonista opioide naloxona (0.4 mg/kg; i.p.) + o extrato (100 mg/kg). Entretanto a procura por analgésicos opioides que atuam em seus receptores fora do sistema nervoso central tem sido realizada nos estudos com fármacos antinociceptivos, visando à diminuição dos efeitos colaterais, como tolerância e dependência (BENYHE, 1994; VANEGAS; TORTORICI, 2002).

Figura 17- Efeito do E.B.R.S. no teste de placa quente em camundongos (n=8) tratados com o veículo CMC, extrato nas doses (30, 100, e 300 mg/kg, v.o.); Morfina 1 mg/kg i.p.; naloxano + morfina (0,4 e 1 mg/kg, i.p.), naloxano 0,4 mg/kg, i.p + extrato (100 mg/kg). Cada coluna representa a média \pm erro padrão médio. Análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Student Newman-Keuls ($p < 0,05$): * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. ^^ $p < 0,001$ em comparação com a morfina.



Fonte: O autor

Tabela 6- Valores do tempo de latência (tempo médio \pm erro padrão médio) dados em segundos em relação aos animais tratados com o veículo CMC, extrato nas doses (30, 100, e 300 mg/kg, v.o.); Morfina 1 mg/kg i.p.; naloxano + morfina (0,4 e 1 mg/kg, i.p.), naloxano 0,4 mg/kg, i.p + extrato (100 mg/kg). Análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Student Newman-Keuls ($p < 0,05$): * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$. ^^ $p < 0,001$ em comparação com a morfina.

	BASAL (0 MIN.)	30 MIN.	60 MIN.	120 MIN.
CMC	10.08 \pm 0.7	10.8 \pm 0.8	9.4 \pm 0.98	9.35 \pm 0.59
30	9.87 \pm 0.83	11.13 \pm 0.7	11.7 \pm 0.9	12.87 \pm 0.75*
100	10.43 \pm 0.72	11.0 \pm 0.97	12.4 \pm 0.54	14.67 \pm 0.93***
300	8.91 \pm 0.68	10.6 \pm 0.83	12.7 \pm 1.2	11.1 \pm 0.94
MORFINA	10.23 \pm 0.7	17.6 \pm 1.0***	19.0 \pm 0.96***	17.7 \pm 1.2***
NAL. + MORF.	10.6 \pm 0.44	11.5 \pm 0.56^^	13.5 \pm 0.74^^	11.73 \pm 0.7^^
NAL. + EXT.100	11.41 \pm 0.40	13.1 \pm 0.58	12.0 \pm 1.35	12.97 \pm 0.52

Fonte: Do autor

De acordo com os dados (Tabela 6), observou-se que o tratamento com extrato seco das folhas para as doses de 30 e 100 mg/Kg, mostraram-se efetivas na analgesia para o tempo de 120 minutos em comparação ao grupo controle tratado com o veículo CMC (carboximetilcelulose), aumentando o tempo de permanência dos animais na placa quente. A morfina (fármaco padrão) comprovou significativamente seu efeito analgésico central para todos os tempos estudados assim como o naloxano impediu a ação da morfina de maneira significativa para os tempos de 30, 60 e 120 minutos.

6 CONCLUSÃO

Os ensaios fitoquímicos indicaram a presença de taninos, de flavonoides, de esteroides e de triterpenos. O extrato seco mostrou ausência de toxicidade aguda e foi observado significativo efeito anti-inflamatório de acordo com os testes de edema de pata e peritonite. O teste de formalina mostrou efeito significativo para as duas fases, sendo que a segunda fase mostrou uma correlação com os testes anti-inflamatórios realizados.

O teste de placa quente, se analisado com a 1ª fase do teste de formalina sugere o baixo efeito analgésico do extrato. Foi possível verificar a não relação dos metabólitos com a via opioide, pois o extrato na concentração de 100mg/Kg mostrou efeito anti-nociceptivo para tempo de 120 minutos, mas o naloxano não conseguiu reverter o efeito analgésico do extrato para essa concentração, mostrando que não ocorreu a competição entre naloxano e extrato pelos receptores opioides.

A identificação de metabólitos como a quercetina e o canferol sugere que eles possam estar ligados aos efeitos analgésicos e anti-inflamatórios encontrados, como também não pode ser descartada a ação sinérgica entre os vários constituintes do extrato. Os resultados obtidos neste estudo sugerem que os efeitos biológicos encontrados estão interligados com os metabólitos secundários. Estudos posteriores com isolados dos compostos identificados do extrato são necessários para a averiguação de possíveis mecanismos de ação e a comprovação terapêutica destes.

REFERÊNCIAS

- AGNATI, L. F., et al. Pain, analgesia and stress: an integrated view. **Clinical Journal Pain**, n. 7, p. 23-37, 1991.
- ALDERTON, W. K., et al. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. **Biochemical Journal**, n.357, p. 593-615, 2001.
- ALQASOUMI, S., et al. Gastro protective effect of radish (*Raphanus sativus* L.) on experimental gastric ulcer models in rats. **Farmacia**, v. 56, p. 204–214, 2008.
- ANVISA 2004. Resolução RDC nº 48, de 16 de março de 2004. Nunes GP, Silva MF, Resende UM, Siqueira JM. 2003. Plantas Mediciniais comercializadas por raizeiros no Centro de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. **Rev. Bras. Farmacognosia** v.13, p. 83-92.
- ARUNA G., YERRAGUNI V. G., RAJU A. B.. Phytochemistry and Pharmacology of raphanus sativus. **International Journal of Drug Formulation and Research**, v. 3, n.1, p. 43-52, 2012.
- ASHBURN, M. A.; STAATS, P. S. Management of chronic pain. **Journal Lancet**, n. 353, p. 1865-1869, 1999.
- BARILLARI, J.; CERVELLATI, R.; COSTA, S., Antioxidant and Choloretic Properties of *Raphanus sativus* L. Sprout (Kaiware Daikon) **Extract. J. Agric. Food Chem.** n. 54, p. 9773–9778, 2006.
- BARILLARI, J., et al. Isolation of 4-methylthio-3-butenyl glucosinolate from *Raphanus sativus* sprouts (Kaiware Daikon) and its redox properties. **J. Agric. Food Chem.** n. 53, p. 9890–9896, 2005.
- BELL, J. M. Factors affecting the nutritional value of canola meal: a review. **Canadian Journal of Animal Science, Ottawa**, v. 73, n. 4, p. 689-697, 1993.
- BENYHE, S., Morphine: new aspects in the study of an ancient compound. **Life Sciences**. n. 55, p. 969–979, 1994.

BERNARD, J. F. et al. Involvement of the spinobarabrachio-amygdaloid and hypothalamic pathways in the autonomic and effective emotional aspects of pain. **Progress in Brain Research**, n. 107, p. 243-255, 1996.

BHEEMESH VANGALAPATI et al. Total phenolic content and free radical scavenging activity of *Pterocarpus marsupium* heartwood & *Tribulus terrestris* dry fruits: An in vitro comparative study. **Journal of Pharmacy**, v. 8, n. 5, p. 610-613.

BJORKMAN, R. Central antinociceptive effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs and paracetamol. Experimental studies in the rat. **Acta Anaesthesiologica Scandinavica Supplementum**, n. 103, p.1-44, 1995.

BRANDÃO M. G. L., et al. Other medicinal plants and botanical products from the first edition of the Brazilian Official Pharmacopoeia. **Rev. Bras. Farmacognosia**, v. 18, p. 127-134, 2008.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents) **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, n.33, p. 179-189, 2000.

CALIXTO, J. B., et al. Naturally occurring antinociceptive substances from plants. **Phytotherapy Research**, v.14, p. 401–418, 2000.

CALIXTO, J. B.; OTUKI, M. F.; SANTOS, A. R. S. Antiinflammatory compounds of plant origin. Part I. Action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor Kb (NFKb). **Planta Medica**, v.69, p. 1-12, 2003.

CASTELUCCI. *et al.* Anti-inflammatory activity of *Dasyphyllum brasiliensis* (Asteraceae) on acute peritonitis induced by α -glucan from *Histoplasma capsulatum*/ **Journal of Ethnopharmacology**, n. 112, p. 192–19, 2007.

CARVALHO, J. C. T. **Validação química-farmacológica da espécie vegetal *Pterodon emarginatus* Vog. (Atividade antiinflamatória)**. Tese (Doutorado) - FCF/USP, São Paulo, p. 220, 1998.

CARVALHO, M. M. J. Dor, um estudo multidisciplinar. São Paulo: **Summus Editorial**, 1999.

CARVALHO ACB, BALBINO EE, MACIEL A, Perfeito JPS. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Rev. Bras. Farmacognosia**, v.18, p. 314-319, 2008.

CHANDRA, A. K., et al. Effect of radish (*Raphanus sativus* Linn.) **on thyroid status under conditions of varying iodine intake in rats**. *Indian J Exp Biol*, v. 44, p. 653-661, 2006.

CHEVALLIER, A., **The Encyclopedia of Medicinal Plants**. Dorling Kindersley, London, 1996.

CHOPRA, R.N.; NAYAR, S.L.; CHOPRA, I.C.. **Glossary of Indian Medicinal Plants Including the Supplement**. Council of Scientific and Industrial Research, New Delhi, 1986.

CHUBB, L. G. Antinutritive factors in animal feedstuffs. In: HARESING, W. (Ed.). **Studies in the agricultural and food sciences butterworths. Recent advances in animal nutrition**. Philadelphia: W. Haresign Butterworths, p. 21-37, 1982.

COSTA, A. F. Isolation and identification of the vegetables. In: **Pharmacognosy**. Lisbon: Calouste Gulbenkian, 1982, v. 3, cap. 20, p. 926- 62.

COSTA, A.F. **Farmacognosia: farmacognosia experimental**. 3 ed. Lisboa: Calouste Gulbenkian, v. 3, p. 308-309, 2001.

COTRAN R. S., et al. **Pathologic basis of disease**. Philadelphia: Saunders, 6th ed., 1999.

CRISP P. Radish, *Raphanus sativus* (*Cruciferae*). In: Smartt J, Simmonds NW, editors. **Evolution of crop plants**. 2nd Edition, Longman Scientific & Technical, UK. p. 86–89. 1995.

CRUSCIOL, C. A. C., et al. Persistência de palhada e liberação de nutrientes do nabo forrageiro no plantio direto. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v.40, p.161-168, 2005.

CRUSCIOL, C. A. C., et al. Taxa de decomposição e de liberação de macronutrientes da palhada de aveia preta em plantio direto. **Bragantia**, Campinas, v.67, n.2, p.481-489, 2008

CUNHA, F. Q., et al. In-vivo blockage of neutrophil migration by LPS is mimicked by a factor released from LPS-stimulated macrophages. **British Journal of Experimental Pathology**, n. 70, p.1-8, 1989.

CUNHA, T. M., et al. An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. **Brazilian Journal Medical. Biological Research**, v. 37, n.3, p. 401-407, 2004.

DANNHARDT, G.; KIEFER, W. ciclooxigenase inhibitors.- current status and future prospects. **European journal of medicine.**, v. 36, p. 109-126, 2001.

D'ANTUONO LF; ELEMENTI S; NERI R., Sensory attributes, health promoting aspects and new uses of edible Brassicaceae. **Acta Horticulturae**, v. 741, p. 65-72, 2007.

DAXENBICHLER, M. E., et al. Glucosinolate composition of seeds from 297 species of wild plants. **Phytochemistry** n. 30, p. 2623–2638, 1991.

DEVARAJ V. C., et al. "Protective effect of leaves of *Raphanus sativus* Linn on experimentally induced gastric ulcers in rats," **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 19, n. 3, p.171–176, 2011.

DERPSCH, R.; CALEGARI, A. **Plantas para adubação verde de inverno**. Londrina: Iapar, p. 80, 1992.

DICKENSON, A. H.; SULLIVAN, A. F. Peripheral origins and central modulation of subcutaneous formalin-induced activity of rat dorsal horn neurones. **Neuroscience Letters**, v. 83, p. 207–211, 1987.

DOMINGOS, A. K. **Otimização da etanólise de óleo de *Raphanus sativus* L. e avaliação de sua estabilidade à oxidação**. 2005. 113 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

DUAN, L. X., et al. Thioglucosides from the seeds of *Raphanus sativus* L. **Helv. Chim. Acta**, n. 89, p. 2953–2957, 2006.

DUBUISSON, D.; DENNIS, S. G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain**, n. 4, p. 161–174, 1977.

DUKE, J.A., AYENSU, E.S., Medicinal Plants of China. **Reference Publ., Inc., Michigan**, 1985.

ELOFF, J.N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Med**, v. 64, p. 711-713, 1998.

ELOFF, J. N. Quantifying the bioactivity of plant extracts during screening and bioassay-guided fractionation. **Phytomedicine**, v. 11, p. 370-1, 2004.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988. (Parte I, IV-7)

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 5.ed. São Paulo: Siqueira, 2010.

FELDMAN, K. S., et al. In vitro and in vivo inhibition of LPS-induced tumor necrosis factor- α production by dimeric gallotannin analogues. **Bioorganic and Medicinal Chemistry** n. 10, p. 47–55, 2002.

GALLIN, J. I., et al. Overview in inflammation: basic principles and clinical correlates. Hagerstown: Lippincott, **Willians and Wilkins**, 3. ed., 1360p, 1999.

GANONG, W. The stress response: a dynamic overview. **Hospital Practice**, n. 23, p.155- 190, 1988.

GARCIA-LEME, J., et al. Pharmacological analysis of the acute inflammation process induced in rat's paw by local injection of carrageenan and heating. **British Journal of Pharmacology**, n. 64, p. 91–98, 1973.

GARLET TMB, IRGANG BE. Plantas medicinais utilizadas na medicina popular por mulheres trabalhadoras rurais de Cruz Alta, Rio Grande do Sul, Brasil. **Rev Bras Pl Med**, v. 4, p. 9-18, 2001.

GILANI, A.H., GHAYUR, M.N., Pharmacological basis for the gut stimulatory activity of *Raphanus sativus* leaves. **J. Ethnopharmacol**, v. 95, p. 169–172.

GUTIERREZ, R.M., PEREZ, R.L., *Raphanus sativus* (radish): their chemistry and biology. **Sci. World J**, v.4, p. 811–837, 2004.

HABTEMARIAM, S., Flavonóides como inibidores ou potenciadores da citotoxicidade de necrose tumoral-alfa em células tumorais L-929. . **J. Nat Prod**, v. 60, p. 775-778, 1997.

HAGERMAN, A.E., RIEDL, K.M., RICE, R.E., Tannins as biological antioxidants. **Basic Life Sciences**, v. 66, p. 495–505, 1999.

HAMZA, M.; DIONNE, R.A. Mechanisms of non-opioid analgesics beyond cyclooxygenase enzyme inhibition. **Current Molecular Pharmacology**, v.2, n.1, p.1-14, 2009.

HOSKIN, P. J.; HANKS, G. W. Opioid agonist – antagonist drugs in acute and chronic pain states. **Drugs**, n. 41, p. 326-344, 1991.

ISHIKAWA, T.; KONDO, K.; KITAJIMA, J. Water-soluble constituents of coriander. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v.51, n.91, p.32-9, 2003.

IZZO, A. A., et al. Antiulcer effect of flavonoids Role of endogenous PAF. **Phytother. Res**, v. 6, p. 179–181, 1994.

JAHANGIR M. et al. Health-Affecting Compounds in Brassicaceae. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 8, n. 2, p. 31-43, 2009. Disponível em: <[http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/\(ISSN\)1541-4337](http://onlinelibrary.wiley.com/journal/10.1111/(ISSN)1541-4337)>. Acesso em: 21 Set 2012.

JAYARAJ, A.P., TOVEY, F.I., CLARK, C.G., Possible dietary protective factors in relation to the distribution of duodenal ulcer in India and Bangladesh. **Gut** , v. 21, p. 1068–1076, 1998.

JONES, S. L. Dypirone into the nucleus raphe magnus inhibits the rat nociceptive tail flick reflex. **European Journal of Pharmacology**, n. 318, p. 37-40, 1996.

KOORNNEEF M, ALONSO-BLANCO C, VREUGDENHIL D., Naturally occur- Weigel 18 Plant Physiol. Vol. 158, 2012 ring genetic variation in Arabidopsis thaliana. **Annu Rev Plant Biol** , v. 55, p. 141–172, 2004.

LAPA, A. J. et al. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES, C.M.O. et al. (Ed). Farmacognosia: da planta ao medicamento. Florianópolis: Editora da Universidade Federal de Santa Catarina, p.181-196, 2000.

LEE et al. Rapid screening method for intact glucosinolates in Chinese medicinal herbs by using liquid chromatography coupled with electrospray ionization ion trap mass spectrometry in negative ion mode. **Rapid Commun. Mass Spectrom**; v. 22, p. 2825 – 2834, 2008.

LIST PH, SCHMIDT PC. Phytopharmaceutical technology Florida: CRC Press; 2000. 374 p. LOESER, J; MELZACK, R. Pain, an overview. **Lancet**, n. 353, p.1607-1609, 1999.

LUENGAS-CAICEDO, P. E. Contribuição para a padronização de Extratos de folhas de cecropia glaziovii Snethl.: estudos de variação sazonal e Intra-específica de flavonóides e Proantocianidinas, de metodologias de Extração e de atividade vasorelaxante. **Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)**. Belo Horizonte, 2005.

MAURER M., et al. A polymorphism in the human cytotoxic T- lymphocyte antigen 4 (CTLA-4) gene (exon 1 +49) alters T- cell activation. **Immunogenetics**, v. 54, p. 1-8, 2002.

McCORMACK, K. The spinal actions of nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the dissociation between their anti-inflammatory and analgesic effects. **Drugs**, n. 47, Suppl 5, p. 28-45; discussion 46-27, 1994.

McQUEEN, D. S. Opioid peptide interactions with respiratory and circulatory systems. **British Medical Bulletin**, n. 39, p. 77-82, 1983.

MENGUE SS, MENTZ LA, SCHENKEL EP. Uso de plantas medicinais na gravidez. **Rev Bras Farmacogn**, v. 11, p. 21-35, 2001.

M. J. ALEARAZ AND M. L. FERRFINDIZ, Modification of arachidonic metabolism by flavonoids. **J. Ethnopharmacol.** 1987.

ALEARAZ, M. J.; FERRFINDIZ, M. L. Anti-inflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. **Agents and Actions.** v. 32, p. 6, 1991.

NADKARNI, K.M., **Indian Materia Medica.** Popular Prakashan, Bombay. 1976.

NASTRUZZI, C., et al. In vitro cytotoxic activity of some glucosinolate-derived products generated by myrosinase hydrolysis. **J. Agric. Food Chem.** V. 44, p. 1014–1021, 1996.

NJUMBE EDIAGE, Emmanuel et al. Screening, identification and quantification of glucosinolates in black radish (*Raphanus sativus* L. *niger*.) based dietary supplements using liquid chromatography coupled with a photodiode array and liquid chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1218, n. 28, p. 4395-4405, 2011.

NUKI, G. Nonsteroidal analgesic and inflammatory agents. **British Medical Journal**, n.287, p. 39-42, 1983.

NUNES G. P., et. al. Plantas Medicinais comercializadas por raizeiros no Centro de Campo Grande, Mato Grosso do Sul. **Rev. Bras. Farmacognosia**, v. 13, p. 83-92, 2003.

NWAFOR, P. A., OKWUASABA, F.K., BINDA, L.G., Antidiarrhoeal and anti-ulcerogenic effects of methanolic extract of *Asparagus Pubescens* root in rats. **J. Ethnopharmacol**, v. 72, p. 421–427, 2000.

OGONOWSKI, A. A., et al. Anti-inflammatory and analgesic activity of an inhibitor of neuropeptide amidation. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** v. 280, p. 846–853, 1997.

OSTROSKY, E. A.; Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 2, p. 301-307, Abr./Jun. 2008.

PARADKAR P. N., et al. Dietary isoflavones suppress endotoxin-induced Inflammatory reaction in liver and intestine. **Cancer Lett**, n. 215, p. 21–8, 2004.

PEANA, A.T. et al. Effects of (-)-linalool in the acute hyperalgesia induced by carrageenan, L-glutamate and prostaglandin E₂. **European Journal of Pharmacology**, v.497, n.3, p.279-84, 2004.

PEANA A. T., et al. Profile of spinal and supra-spinal antinociception of (-)-linalool. **European Journal of Pharmacology** n. 485, p. 165-174, 2004a.

PICARD, P., et al.. Use of non-peptide tachykinin receptor antagonists to substantiate the involvement of NK1 and NK2 receptors in a spinal nociceptive reflex in the rat **European Journal of Pharmacology**, v. 232, p. 255-261, 1993.

PINI, L. A. et al. Involvement of brain serotonergic system in the antinociceptive action of acetylsalicylic acid in the rat. **Inflammation Research**, v. 44, n.1, p. 30-35, 1995.

PRISTA, L.N., ALVES, A.C., MORGADO, R.M.R. **Tecnologia Farmacêutica**. 5.ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, v.1, 1995.

RAINDSFORD, K. D.; VELO, G. P. Side effects of anti – inflammatory/analgesic drugs. **Lancaster: Kluwer academic Publishers**, 1992.

RAYMOND et al. A Study of Flavonoid Glycosides by Tandem Mass Spectrometry at High Mass Accuracy. **16th International Mass Spectrometry Conference**, dinburgh, Aug./Sep., n. 5, 2003.

REYES M., et al. Anti-ulcerogenicidade da fração de flavonóides de *Erica andevalensis* Cabezudo Rivera . **Z. Naturforsch.** v. 51, p. 563-569, 1996.

RIBEIRO AQ, LEITE JPV, DANTAS-BARROS A.M. Perfil de utilização de fitoterápicos em farmácias comunitárias de Belo Horizonte sob a influência da legislação nacional. **Rev Bras Farmacognosia**, v. 15, p. 65-70, 2005.

ROTELLI AE, et al. Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation. **Pharmacol Res.**, v. 48, p. 601–6, 2003.

SANDRINI, M., et al. Effect of rofecoxib on nociception and the serotonin system in the rat brain. **Inflammation Research**, v. 51, n.3, p.154-159, 2002.

SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. Further evidence for the involvement of tachykinin receptor subtypes in formalin and capsaicin models of pain in mice. **Neuropeptides**, v. 31, n.4, p. 381-389, 1997.

SILVÉRIO, F. O., et al. Metodologia de extração e determinação do teor de extrativos em madeiras de eucalipto. **R. Árvore**, Viçosa-MG, v. 30, n. 6, p.1009-1016, 2006.

SIMÕES, C. M. O., et al. **Farmacognosia, da planta ao medicamento**. Porto Alegre:editora UFRGS, 1104p, 2007.

SNOW, A. A.; CAMPBELL, L.G. Can feral radishes become weeds In: **J. Gressel** (Ed.) **Crop Fertility and Volunteerism**.

SOUZA, M. M., et al. Métodos de avaliação biológica de produtos naturais e sintéticos. In: BRESOLIN, T. M. B.; CECHINEL FILHO, V. **Ciências químico-farmacêuticas**: Contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos. Itajaí: UNIVALI, 2003.

SOUZA, A. H. **Avaliação do Potencial Antinociceptivo e Mecanismo de ação do 2-[5 triclórometil-5-hidroxi-3-fenil-4,5-dihidro-1Hpirazol- 1-IL] 4-(4 bromofenil)-5 metiltiazol (B50) em camundongos**. Dissertação de Mestrado apresentado ao PPGBT/CCNE/UFSM, 2005.

THOMAZZI, S. M., et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Bowdichia virgilioides* (sucupira). **Journal of Ethnopharmacology**, v.27, p. 451–456, 2010.

VANEGAS, H., TORTORICI, V., Opioidergic effects of nonopioid analgesics on the central nervous system cell. **Mol. Neurobiol.**, v. 22, p. 655-661, 2002.

VILELA, F. C., et al. Anti-inflammatory and antipyretic effects of *Sonchus oleraceus* in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, p.737–741, 2010.

VENKATAPURA C. et al. Simultaneous determination of quercetin, rutin and kaempferol in the leaf extracts of moringa oleifera lam. And raphanus sativus Linn. by liquid chromatography tandem mass spectrometry, 2011.

VERMA, P.R., et al. Antinociceptive activity of alcoholic extract of *Hemidesmus indicus* R.Br. in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.102, p. 298–301, 2005.

WAGNER, H.; WISENAUER M. **Fitoterapia: Fitofármacos, farmacologia e aplicações clínicas**. 2 ed. São Paulo: Pharmabooks, 2006.

WIERSEMA, J.H.; LEÓN, B. World Economic Plants – A Standard Reference. **CRC Press**, USA. 1999.

WOLFENDER, J. L., et al. Mass spectrometry of underivatized naturally occurring glycosides. *Phytochemical Analysis*, n. 3, p. 193-214, 1992.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Quality control methods for medicinal plant materials**. Geneva, 1998.

YAKSH, T.L., et al. An automated flinch detecting system for use in the formalin nociceptive bioassay. **Journal Applied Physiology**, v.90, p.2386–2.

YAMAGISHI H, TERACHI T. Multiple origins of cultivated radishes as evidenced by a comparison of the structural variations in mitochondrial DNA of *Raphanus*. **Genome** v. 46: 89–94, 2003.

YAMAMOTO, T., NOZAKI-TAGUCHI, N., CHIBA, T., Analgesic effect of intrathecally administered orexin-A in the rat formalin test and in the rat hot plate test. **British Journal of Pharmacology** v. 137, p. 170–176, 2002.

YAMANE, K.; LÜ, N; OHNISHI, O. Chloroplast DNA variations of cultivated radish and its wild relatives. **Plant Science**, Amsterdam, v.168, n. 3, p. 627-634, 2005.

YANG, Y., et al. A study of the phylogeny of *Brassica rapa*, *B.nigra*, *Raphanus sativus*, and their related genera using noncoding regions of chloroplast DNA. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, Amsterdam, v. 23, n. 2, p. 268-275, 2002.

YEUNG, H.C. Handbook of Chinese Herbs and Formulas. **Institute of Chinese Medicine**, Los Angeles, 1985.

YUNES R. A.; PEDROSA R. C.; CECHINEL FILHO V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Quim Nova** v. 24, p. 147-152, 2001.

ZAMAN, R.U.; AHMAD, M. Evaluation of Hepatoprotective effects of *Raphanus sativus* L.. **J. Biol. Sci.**, v. 4, p. 463–469, 2004.

Zaman, R.U. Study of cardioprotective activity of *Raphinus sativus* L. in the rabbits. Pak. **J. Biol. Sci.** v. 7, p. 843–847, 2004.

ZHENG, J. H.; CHEN, J. Differential roles os spinal neurokinin $\frac{1}{2}$ receptors in development of persistent spontaneous nociception and hyperalgesia induced by subcutaneous bee venom injection in the conscious rat. **Neuropeptides**, n.35, p. 32-44, 2001.