

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA**

**IDENTIFICAÇÃO DA AÇÃO ANALGÉSICA CENTRAL DO EXTRATO
AQUOSO E HIDRO-ALCOÓLICO E ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DA
AÇÃO DA *Dioclea grandiflora* EM ROEDORES**

ALUNA: JOUSE BEZERRA CAVALCANTI

**ORIENTADOR: PROFESSORA Dr. GERALDO BOSCO LINDOSO COUTO
CO-ORIENTADOR: PROFESSOR Dr. EDVALDO RODRIGUES DE
ALMEIDA**

**RECIFE
2005**

SUMÁRIO

Lista de tabelas.....	09
Apresentação da dissertação.....	10
Ação analgésica central da <i>Dioclea grandiflora</i> em comundongos.....	11
Anexos.....	30

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Efeitos dos EHDg e EADg em camundongos avaliados pelo teste da placa quente.....	31
TABELA 2 – Efeitos dos EHDg e EADg em camundongos avaliados pelo teste da imersão da cauda.....	32
TABELA 3 – Avaliação da ação antinoceptiva da DGL e morfina com o pré-tratamento pela naloxona no teste da imersão da cauda.....	33
TABELA 4 – Efeito dos EHDg e EADg avaliados pelo número de contorções induzidas pelo ácido acético em camundongos.....	34
TABELA 5 – Efeito da DGL e da morfina administradas por 21 dias determinado pelo teste de imersão de cauda, em camundongos.....	34

APRESENTAÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Esta dissertação foi estruturada sob a forma de artigo científico para ser enviada ao periódico *Phytotherapy Research*, especializado na área de Farmacologia. Para elaboração deste trabalho foram utilizados bancos de dados disponíveis “on line”, além de revistas impressas e livros didáticos. Trata-se de um modelo experimental de analgesia, *in vivo*, cujo título é: Ação analgésica central da *Dioclea grandiflora* em camudongos. Neste artigo foi utilizada uma metodologia própria para avaliar drogas analgésicas de ação central, e a droga testada foi a *Dioclea grandiflora*, espécie presente na flora brasileira, nas regiões da caatinga e do cerrado e utilizada sob a forma de extratos hidroalcoólico e aquoso da casca do caule. Estudos já identificaram seu efeito analgésico através do extrato das sementes e da casca de suas raízes, além do efeito de tolerância. Assim, a atividade analgésica central dos extratos aquoso e hidroalcoólico da casca do caule da *Dioclea grandiflora* foi identificada e estatisticamente significativa, quando comparada ao grupo controle.

ARTIGO

**Ação analgésica central da *Dioclea grandiflora* em
comundongos.**

Cavalcanti, J.B.^a; E.R. Almeida^{b*}; Couto, G.B.L.^a.

^a Programa de Pós-graduação em Odontologia do Departamento de Prótese e
Cirurgia Bucofacial da UFPE

^b Coordenador do Laboratório de Avaliação de Drogas Psicoativas e Toxicologia
do Departamento de Antibióticos da UFPE.

* Universidade Federal de Pernambuco, CEP 5067901, Recife, Pernambuco,
Brasil.

Correspondência: edvaldo.ra@gmail.com (ER.Almeida)

Fone/Fax: + 55 81 21268346

Resumo

A *Dioclea grandiflora* é conhecida popularmente como “mucunã”, “mucunã-de-carço” e “olho-de-boi” e encontra-se no Brasil, distribuída nas regiões da caatinga e do cerrado. Este trabalho objetivou identificar um possível efeito analgésico central dos extratos hidroalcoólico e aquoso da casca do caule da *Dioclea grandiflora*, nas doses de 30, 60 e 120 mg/kg, fazendo uso dos testes da placa quente, da imersão da cauda, e das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, além do efeito de tolerância na dose de 30 mg/kg, através do tratamento crônico por 21 dias consecutivos, administrados por via intraperitoneal em camundongos. Nos resultados dos testes da placa quente, da imersão da cauda e das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, observou-se, no tratamento agudo, um efeito antinocepcivo significativo ($p < 0.05$). Efeito este inibido pela naloxona, antagonista morfínomimético específico do receptor opióide. Enquanto que, no teste da imersão da cauda, no tratamento crônico, apenas o extrato hidroalcoólico, na dose de 30 mg/kg apresentou tolerância. Esses resultados sugerem que os extratos hidroalcoólico e aquoso apresentam ação analgésica central e apenas o hidro-alcoólico apresenta tolerância, quando administrado cronicamente, que é típico dos opióides.

Palavras chaves: Efeito analgésico, Extrato hidroalcoólico, Extrato aquoso, *Dioclea grandiflora*, morfina, naloxona.

1. Introdução

A *Dioclea grandiflora* (Leguminosae) (DGL), pertencente à família das Fabaceae. No Brasil, a DGL é conhecida popularmente como “mucunã”, “mucunã-de-carço” e “olho-de-boi”, encontra-se distribuída nas regiões da caatinga e do cerrado e suas sementes e raízes são utilizadas pela população em formas de infusão nos distúrbios renais e prostáticos (Batista, 1993).

Em 1995, Batista et al. isolaram e identificaram a diocleína, flavonóide da *Dioclea grandiflora*, a qual induziu o efeito analgésico em roedores. Já Lemos et al. (1999) detectou um potencial vaso relaxante no endotélio da aorta de ratos a partir da diocleína.

Mattei et al. (1995), examinaram a ação farmacológica central das sementes da DGL e detectaram uma possível atividade ansiolítica. Posteriormente, foi isolado e identificado o dioclenol por Bhattacharyya et. al. (1997), e a dioflorina por Bhattacharyya et. al. (1998). Em seguida, Jenkins et al. (1999), através de uma investigação da casca da raiz da *Dioclea grandiflora*, isolaram e identificaram três novos flavonóides: o agradol, paraibanol e o diosalol. Almeida et al. (2000) demonstraram que os flavonóides dioclenol e dioflorin apresentaram uma atividade farmacológica em modelos experimentais de analgesia.

No estudo de Silva (2003), observou-se uma atividade bacteriostática do extrato aquoso e hidroalcoólico da casca do caule da DGL que inibiu o crescimento de *Staphylococcus aureus*. Já o extrato hidroalcoólico das folhas e raízes inibiu o crescimento de espécies fúngicas, tais como: *Cândida*

albicans, *Trichophyton mentagrophytes* e *Micriporum canis*. Também em seus estudos foram observadas as atividades antitumorais, frente ao sarcoma 180 do extrato etanólico e aquoso da casca do caule. Efeitos tóxicos importantes sobre fígado e rins foram observados em ambos os extratos.

Almeida et. al, (2003) demonstrou uma atividade analgésica central do extrato hidroalcoólico das sementes da DGL em roedores, bem como das substâncias diocleína e dioclenol.

Teixeira et al. (2006) identificou a capacidade da proteína lectina da DGL em inibir a adesão de microorganismos, como o *Streptococos mutans*, *Strep. sobrinus*, *Strep. Mitis*, *Strep. Sanguis* e *Strep. oralis*, na película adquirida formada na superfície do esmalte dentário.

Este estudo avaliou o possível efeito farmacológico dos extratos hidroalcoólico (EHDg) e aquoso (EADg) da casca do caule da DGL em modelos experimentais, com o objetivo de determinar uma atividade analgésica central nas doses de 30, 60 e 120 mg/kg, fazendo uso dos testes da placa quente, da imersão da cauda e das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, além de verificar o efeito de tolerância na dose de 30 mg/kg.

2. Material e Métodos

2.1 Material Botânico

As cascas do caule da *Dioclea grandiflora* foram coletadas na região de Santa Rita, Paraíba, Brasil, durante o mês de julho de 2006. O material botânico desta espécie foi identificado pela Profa. Maria de Fátima Agra da Universidade Federal da Paraíba, e sua exsicata foi depositada no Herbário Lauro Pires Xavier (JPB), sob o código 4440-JPB, MO.

2.2 Preparação dos Extratos Hidroalcoólico (EHDg) e Aquoso (EADg)

Foram utilizados 100g do material seco para cada tipo de extrato, previamente triturados em máquina forrageira. O material vegetal foi extraído com uma mistura álcool-água (70:30) para o hidroalcoólico e com água para o aquoso, perfazendo um volume final de 800 ml para cada tipo de extrato. Posteriormente, o material foi submetido à agitação mecânica por 24 horas e, em seguida, deixado em repouso por 48 horas na geladeira. Logo após, os extratos foram filtrados em filtro de papel e concentrados, usando-se para isto um rota-vapor para retirada total do solvente, pesados e calculado os seus rendimentos, os quais resultaram em 11,6% e 17,2% do total utilizado para o EHDg e EADg, respectivamente. Para os testes farmacológicos, as doses dos extratos foram diluídas em água destilada acrescida de uma gota de dimetilsufóxido (DMSO) a 5%, antes de sua administração.

2.3 Animais

Foram utilizados duzentos e dezesseis camundongos albinos (*Mus musculus Swiss*) de ambos os sexos, pesando em média 20 - 30g, obtidos do Biotério do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco. Os animais estiveram sempre sob o controle da temperatura de 23 ± 1 °C, com um ciclo claro/escuro de 12 horas, iniciando-se a fase clara às 06:00 horas da manhã, com livre acesso à água e comida. Todos os experimentos foram realizados entre 9h e 16 horas. Os animais foram cuidadosamente monitorados e mantidos de acordo com a recomendação ética do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e the National Institute of Health Guide for Care and use of Laboratory Animals, sendo adotadas como critérios de avaliação pela Comissão de Ética em Experimentação Animal (CEEA) da UFPE, a qual forneceu parecer favorável a realização do experimento no processo sob o nº 008199/2006-30.

Após os experimentos os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e encaminhados para o Departamento de Cirurgia Experimental para incineração.

2.4 Drogas e soluções

Foram utilizadas nos experimentos as seguintes drogas: ácido acético glacial (Merck, Brasil), morfina (Merck, E.U.A), hidrocloreto de naloxona (Research Biochemical Inc, E.U.A.).

Os extratos aquoso e hidroalcoólico foram dissolvidos em água destilada acrescida de uma gota de DMSO a 5% (Merck, Brasil), e como solução controle foi usada a salina 0,9% (Merck, Brasil). Todas as soluções foram administradas por via intraperitoneal (i.p.), em volume de 0.1 mL/10g de peso corporal.

2.5 Teste da placa quente.

Foram utilizados oito grupos de seis camundongos de ambos os sexos. Os testes foram realizados de acordo com a técnica descrita por Yeh e Mitchel (1971) e Almeida et al., (2003, 2006). Os grupos testes receberam o extrato aquoso e hidroalcoólico nas doses de 30, 60 e 120mg/kg (i.p.). No grupo controle foi administrado salina 0,1mL/10 g (i.p.), e no grupo padrão morfina 3 mg/kg (i.p.) 30 minutos antes da avaliação do teste. A medida referente ao tempo de reação do animal ao estímulo nódico foi realizada aos 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração dos respectivos tratamentos.

2.6 Teste da imersão da cauda.

Foram utilizados oito grupos de seis camundongos de ambos os sexos. Os grupos experimentais receberam o extrato aquoso e hidroalcoólico nas doses de 30, 60 e 120 mg/kg (i.p.). Enquanto que a solução salina 0.1 mL/10 g (i.p.) e a morfina de 3 mg/kg (i.p.) foram administradas nos grupos controle e padrão, respectivamente. Neste teste, foi medido o tempo de reação ou latência, com a cauda do animal com a água aquecida a $50^{\circ} \pm 3^{\circ}\text{C}$. As leituras foram realizadas imediatamente após a administração (leitura basal) e aos 30,

60, 90 e 120 minutos após as respectivas administrações, de acordo com Grotto & Sulman (1967) e Almeida et al. (2003; 2006).

2.7 Teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético.

Foram utilizados oito grupos de seis camundongos de ambos os sexos, sendo que nos grupos tratados foram administrados os extratos aquoso e hidroalcoólico nas doses de 30, 60 e 120mg/kg (i.p.) e o grupo controle recebeu solução salina 0.1 mL/10 g (i.p.), enquanto o grupo padrão morfina 3 mg/kg (i.p.). Após 60 minutos da administração das substâncias relatadas acima, foi administrada a solução de ácido acético 0,85% (v/v) na dose de 10 mL/10g (i.p.) em todos os animais. Em seguida, foi contado o número de contorções abdominais apresentado por cada animal, durante um período de 15 minutos (Almeida et al., 2000; Almeida et al., 2003, 2006; Shadab; Ahmad; Tariq, 2002).

2.8 Avaliação da ação antinoceptiva da DGL e da morfina com o pré-tratamento pela naloxona no teste da imersão da cauda.

Neste experimento foram utilizados oito grupos de seis animais de ambos os sexos. Todos os animais receberam naloxona 2 mg/kg (i.p.). Após 15 minutos, os grupos experimentais receberam o extrato aquoso e hidroalcoólico nas doses de 30, 60 e 120mg/kg (i.p.), enquanto que no grupo controle foi administrada solução salina 0,1mL/10 g (i.p.) e no grupo padrão morfina 3mg/kg (i.p.). As leituras foram realizadas imediatamente após a administração (leitura basal) e aos 30, 60, 90 e 120 minutos após as respectivas administrações, de acordo com a metodologia proposta por Younos et. al. (1990).

2.9 Efeito analgésico da administração crônica da DGL e morfina pelo teste da imersão de cauda.

Neste experimento, foram utilizados quatro grupos de animais contendo seis animais cada, de ambos os sexos, para o estudo da administração crônica da DGL. Os grupos tratados receberam o extrato aquoso e o hidroalcoólico, na dose de 30mg/kg (i.p.), durante 21 dias consecutivos. O grupo controle recebeu solução salina 0,1mL/10g de peso corporal (i.p.), e o grupo padrão recebeu morfina 3mg/kg (i.p), durante 21 dias consecutivos. O efeito analgésico foi avaliado pelo teste da imersão da cauda de acordo com Jansen et al. (1963) e Almeida et al. (2003, 2006), no primeiro dia de tratamento (leitura basal) e após 7, 14 e 21 dias de administração dos extratos, salina e morfina.

2.10 Análise Estatística dos Resultados.

Os dados obtidos foram submetidos ao teste de análise de variância (ANOVA). Comparações entre animais tratados e controles foram realizadas utilizando o teste de comparação múltipla de Dunnett's ou o teste t de Student', dependendo do caso. Os resultados foram considerados significantes quando $p < 0.05$.

2. Resultados

3.1 Efeito dos EHDg e EADg no teste da placa quente

A Tabela 1 apresenta que os extratos aquosos e hidroalcoólico da DGL nas doses de 30, 60 e 120mg/kg, administrados por via intraperitoneal, produziram uma atividade antinoceptiva significativa quando comparado ao grupo controle, e uma atividade similar à morfina, quando administrada na dose de 3 mg/kg (i.p.).

3.2 Efeito dos EHDg e EADg no teste da imersão da cauda

Os EHDg e EADg da casca do caule da DGL, administrados intraperitonealmente nas doses de 30, 60 e 120 mg/kg, produziram uma atividade antinoceptiva estatisticamente significante quando comparado ao grupo controle e uma atividade similar à morfina (3m/kg, i.p.) (Tabela 2).

3.3 Bloqueio da ação antinoceptiva da DGL e da morfina com o pré-tratamento pela naloxona no teste da imersão da cauda.

A ação antinoceptiva dos EHDg e EADg e da morfina foi bloqueada pela naloxona (2 mg/kg, i.p.), como apresentada na Tabela 3.

3.4 Efeito dos EHDg e EADg no teste das contorções abdominais induzidas pelo ácido acético.

A DGL produziu uma inibição máxima das contorções de forma similar àquela observada no grupo padrão (Tabela 4).

3.5 Efeito antinoceptivo da DGL e da morfina administradas por 21 dias determinado pelo teste da imersão da cauda.

O EHDg na dose de 30 mg/kg (i.p.) demonstrou um efeito antinoceptivo estatisticamente significativo durante os primeiros dias de tratamento, de acordo com a morfina (3 mg/kg, i.p.), no entanto, este não foi significativo até o final dos vinte e um dias, como foi demonstrado pelo tratamento crônico com o EADg (Tabela 5).

4. Discussão

Os resultados sugerem que os EHDg e EADg da casca do caule apresentam efeito analgésico central, como foi evidenciado pelo aumento do tempo de reação a dor dos camundongos em relação ao grupo controle, quando foram submetidos aos estímulos noceptivos nos testes da placa quente e imersão da cauda, além da diminuição das contorções abdominais quando foi administrada a solução de ácido acético a 0,85% (v/v). Não houve diferença significativa entre os extratos aquoso e hidroalcoólico no aumento do tempo de reação a dor dos animais.

A ação analgésica apresentada pelos extratos hidroalcoólico e aquoso da casca do caule da *Dioclea grandiflora* envolve componentes supra-espinhais e espinhais como demonstrada pela utilização dos testes da placa quente (Yaksh; Rubi, 1976) e da imersão da cauda (Mayer; Libeskind, 1974), respectivamente.

Essa ação analgésica central foi confirmada pelo efeito bloqueador da naloxona, um antagonista morfinomimético específico dos receptores opióides (μ e κ), de acordo com Belvisi et al. (1998), Quock et al. (1999) e Munday et al. (2000), no teste da imersão da cauda.

Em relação ao bloqueio da ação analgésica pela naloxona, os dados deste trabalho estão de acordo com Batista (1995) e Almeida et al. (2003), os quais usaram nos seus experimentos o extrato etanólico bruto da casca das raízes da DGL e o extrato hidroalcoólico das sementes da DGL, respectivamente. Estas concordâncias sugerem que a natureza dos

constituintes presentes nas sementes e na casca das raízes da *Dioclea grandiflora* são os mesmos ou similares àqueles responsáveis pela ação antinoceptiva da casca do caule.

O efeito clássico de tolerância foi evidenciado apenas para o EHDg, característico de reação adversa da morfina e outras substâncias opióides, que foi demonstrado pela administração crônica dos EHDg e EADg na dose de 30 mg/kg (i.p.), por 21 dias consecutivos, através do teste da imersão da cauda.

Em relação à tolerância clássica, os resultados obtidos com o EHDg não estão de acordo com Almeida et al. (2003), os quais não demonstraram essa tolerância com o tratamento crônico de 30 dias consecutivos com o extrato hidroalcoólico das sementes da *Dioclea grandiflora*, nas doses de 250 e 500 mg/kg, por via intraperitoneal e oral, através do teste da imersão da cauda. Esta discordância pode ser devido à maior dose e a parte da planta, como matéria prima do extrato, utilizadas por Almeida et al (2003). Desta forma, apenas houve diferença significativa entre os EHDg e EADg em relação à tolerância, observada apenas no grupo tratado com o EHDg, que pode ser explicado pelo solvente utilizado (álcool etílico:água, 70:30 v/v).

Esse efeito antinoceptivo dos EHDg e EADg da casca do caule pode ser explicado pela redução no influxo de Ca^{2+} no axônio terminal do nervo aferente que induz uma diminuição da atividade da adenilato ciclase, resultando na diminuição dos níveis do amp-cíclico e no efluxo de íons de K^+ , promovendo a hiperpolarização do nervo e finalmente a um efeito antinoceptivo (Dickinson; Fleetwood-Walker, 1998; Grubb, 1998; Yaksh, 1999; Prado, 2001).

5. Referências

Almeida ER, Almeida RN, Navarro DS, Bhattacharyya J, Silva BA, Birnbaum JSP. 2003. Central antinociceptive effect of a hydroalcoholic extract of *Dioclea grandiflora* seeds in rodents. *Journal of Ethnopharmacology* **88**: 1-4.

Almeida ER, Soares RPF, Lucena FR, Oliveira JRG, Albuquerque JFC, Couto GBL. 2006. Central antinociceptive effects of hydro-alcoholic extract from the leaves of *Cissus sicyoides* on mice. *Pharmaceutical Biology* **44**: 1-5.

Almeida RN, Navarro DS, Agra MF, Almeida ER, Majetich G, Bhattacharyya J. 2000. Analgesic effect of dioclenol and dioflorin isolated from *Dioclea grandiflora*. *Journal of Pharmaceutical Biology* **38**: 394-395.

Batista, JS. 1993. Estudo químico e farmacológico das cascas das raízes da *Dioclea grandiflora* Mart.ex.Benth. Dissertação de mestrado apresentada a Universidade Federal da Paraíba, 85 p.

Batista JS, Almeida RN, Bhattacharyya J. 1995 Analgesic effect of *Dioclea grandiflora* constituents in rodents. *Journal of ethnopharmacology* **45**: 207-210.

Belvisi MG, Chung DM, Barnes PJ. 1998. Opioid modulation of non-cholinergic neural bronchoconstriction in guinea-pig in vivo. *British Journal of Pharmacology* **95**: 413-418.

Bhattacharyya J, Majetich G., Jenkins TM, Almeida RN. 1998. Dioflorin, a minor flavonoid from *Dioclea grandiflora*. *Journal of Natural Products* **61**:413-414.

Bhattacharyya J, Majetich G, Spearing P, Almeida RN. 1997. Dioclenol, amino flavonol from roots bark of *Dioclea grandiflora*. *Phytochemistry* **46**: 385-387.

Dickinson T, Fleetwood-Walker SM. 1998. Neuropeptides and nociception: recent advances and therapeutic implications. *Trends in Pharmacology Sciences* **19**:346-348.

Grotto, M & Sulman, FG. 1967. Modified receptacle method for animal analgesimetry. *Archives Internationales de Pharmacodynamic et de Thérapie* **65**: 152 - 159.

Grubb, BB. 1998. Peripheral and central mechanisms of pain. *British Journal of Anesthesiology* **81**:8-11.

Janssen PAG, Niemegeers CJ, Dony JGH. The inhibitory effect of fentanyl and other morphine-like analgesics on the warm water induced withdrawal reflex in rats. *Arzneimittelforsch. Drug Research* **6**:502-507.

Jenkins T, Bhattacharyya J, Teng Q, Agra MF, Almeida RN. 1999. Flavonoids from root- bark of *Dioclea grandiflora*. *Phytochemistry* **52**: 723- 730.

Lemos VS, Freitas MR, Muller B, Lino YD, Queiroga CEG, Cortes SF. 1999. Dioclein, a new nitric oxide and endothelium– dependent vasodilator flavonoid. *European journal of pharmacology* **386**: 41-46.

Mattei R, Leite JR, Tufik S.1995. A study of the pharmacological actions of *Dioclea grandiflora* Martiuns ex.bentham. *São Paulo medical journal/RPM*, **113**: 687-692.

Mayer DJ, Liebeskind JC. 1974. Pain reduction by focal electrical stimulation of the brain and anatomical and behavioral analysis. *Brain Research* **68**:73-93.

Munday MY, Ali A, Mason R, Wilson VG. Pharmacological examination of contractile responses of the guinea-pig isolated ileum produced by mu-opioid receptor antagonists in the presence of, and following exposure to, morphine. *British journal of Pharmacology* **131**:893-902.

Prado WA. 2001. Involvement of calcium in pain and antinociception. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* **34**:449-461.

Quock RM, Burrkey TH, Varga E, Hosohata Y, Hosohata K, Cowell SM, Slate CA, Ehlert FJ, Roeke WR, Yamamura HI. 1999. The delta-opioid receptor: molecular pharmacology, signal transduction, and determination of drug. Efficacy. *Pharmacological Reviews* **51**:503-507.

Shadab Z, Ahmad MA, Tariq AS. 2002. Effect of roots aqueous extract of *Delphinium denudatum* on morphine-induced tolerance in mice. *Fitoterapia* **73**:553-556.

Silva LLS. 2003 Aspectos farmacológicos de *Dioclea grandiflora* Mart. Ex. Benth. (Fabaceae): Atividades antimicrobiana, citotóxica e antitumoral. Tese de doutorado, apresentada a Universidade Federal da Paraíba. 124 p.

Teixeira EH, Napimoga MH, Carneiro VA, Oliveira TM, Cunha RMS, Havt A, Martins JL, Pinto VPT, Gonçalves RB, Cavada BS. 2006. In vitro inhibition of *Streptococci* binding to enamel acquired pellicle by plant lectins. *Journal of Applied Microbiology* **101**: 111-116.

Yaksh TL. 1999. Spinal systems and pain processing: development of novel analgesic drugs with mechanistically defined models. *Trends in Pharmacological Science* **20**:329-336.

Yaksh TL, Rubi TA. 1976. Analgesia mediated by a direct spinal action of narcotics. *Sciences* **192**: 1357-1358.

Yeh SY, Mitchell CL. 1971. Analgesic activity and toxicity of oripavine and Δ -dihydrothebaine in the mouse and rat. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* **179**: 642-651.

Younos C, Rolland A, Fleurentin J, Lanhers MC. 1990. Analgesic and behavioral effects of *Morinda citrifolia*. *Planta Med* **56**: 430-434.

TABELAS

Tabela 1. Efeitos dos EHDg e EADg em camundongos avaliados pelo teste da placa quente.

Tratamento mg/kg (i.p.)	Reação no tempo (s), média \pm D.P.				
	Basal	30 min.	60 min.	90 min.	120 min.
Salina	7,6 \pm 0,7	7,4 \pm 1.9	7,6 \pm	8,1 \pm	7,4 \pm
Morfina (3)	8,1 \pm 1,0	22,5 \pm 1.4 **	23,5 \pm **	11,3 \pm *	9,6 \pm
E.H. (30)	8,8 \pm 0,5	9,8 \pm 0.4	10,1 \pm 0,9*	9,8 \pm 0,5	8,8 \pm 0,4
E.H. (60)	5,9 \pm 0,2	8,6 \pm 0.5*	8,8 \pm 0,7*	6,8 \pm 0,4	5,3 \pm 0,9
E.H. (120)	5,6 \pm 0,4	10,1 \pm 1.8*	9,1 \pm 1,0**	6,5 \pm 0,7	6,0 \pm 1.2
E.A. (30)	6,6 \pm 0,3	13,6 \pm 1.6**	9,5 \pm 0,8*	6,5 \pm 0,3	8,3 \pm 1,1
E.A. (60)	6,4 \pm 0,5	10,4 \pm 1.5*	8,0 \pm 0,6*	9,5 \pm 1,2*	6,3 \pm 1,1
E.A. (120)	6,9 \pm 0,7	10,3 \pm 1.2*	11,5 \pm 1.4**	6,8 \pm 0,9	6,1 \pm 0,9

n= 6. *p< 0.05 comparado aos valores do grupo controle.

**p< 0.01 comparado aos valores do grupo controle.

Tabela 2. Efeitos dos EHDg e EADg em camundongos avaliados pelo teste da imersão da cauda.

Tratamento mg/kg (i.p.)	Reação no tempo (s), média ± D.P.				
	Basal	30 min.	60 min.	90 min.	120 min.
Salina	14,6±0,7	15,0±1,3	13,8±1,7	13,5±1,1	12,8±0,9
Morfina (3)	13,7±0,9	21,8±1,2**	21,4±0,8**	18,5±1,2**	14,2±0,8
E.H. (30)	8,3±0,8	14,5±0,**	14,3±1,0**	9,3±1,4	9,3±1,6
E.H. (60)	5,6±0,6	10,3±0,8**	7,1±0,9*	7,5±1,0*	7,5±0,4*
E.H. (120)	8,1±0,8	13,6±0,9**	12,3±0,5**	10,2±0,7*	8,6±0,7
E.A. (30)	7,5±0,5	11,0±0,9*	8,0±0,7	7,0±0,6	6,0±0,4
E.A. (60)	8,3±1,1	11,7±0,5**	10,7±0,4*	10,8±0,7*	9,3±0,8
E.A. (120)	9,0±1,1	14,2±1,0*	16,2±0,8**	15,0±0,9**	12,2±0,9*

n= 6. *p< 0.05 comparado aos valores do grupo controle.

**p< 0.01 comparado aos valores do grupo controle.

Tabela 3. Avaliação da ação antinoceptiva da DGL e morfina com o pré-tratamento pela naloxona no teste da imersão da cauda.

Tratamento mg/kg (i.p.)	Reação no tempo (s), média \pm D.P.				
	Basal	30 min.	60 min.	90 min.	120 min.
Naloxone (2) + Salina	7,2 \pm 0,2	7,8 \pm 0,8	6,7 \pm 0,9	7,4 \pm 0,6	7,2 \pm 1,2
Naloxone (2) + Morfina (3,0)	8,1 \pm 0,5	8.7 \pm 0,9	8.0 \pm 0.5	9.0 \pm 1.1	7,9 \pm 0,9
Naloxone (2) + E.H. (30)	9.7 \pm 0,7	10.5 \pm 0,8	9.5 \pm 1,0	9.1 \pm 0,5	9.0 \pm 1,1
Naloxone (2) + E.H. (60)	18,5 \pm 0,8	20 \pm 1,2	19,9 \pm 0,9	19,5 \pm 0,8	19,2 \pm 0,7
Naloxone (2) + E.H. (120)	22,6 \pm 1,2	22.1 \pm 1,3	21.2 \pm 1,2	21.0 \pm 0,7	18.6 \pm 0,9
Naloxone (2) + E.A. (30)	8.4 \pm 0.8	10,0 \pm 0,9	10.5 \pm 0,9	8,9 \pm 1,0	9.6 \pm 1,0
Naloxone (2) + E.A. (60)	8,0 \pm 0,7	7,9 \pm 0,8	7,5 \pm 0,6	7,2 \pm 0,6	7.0 \pm 0,7
Naloxone (2) + E.A. (120)	6.1 \pm 1,0	7.3 \pm 0,8	7,2 \pm 0,9	7.2 \pm 1,1	7.0 \pm 0.5

n= 6. *p< 0.05 comparado aos valores do grupo controle.

Tabela 4. Efeito dos EHDg e EADg avaliados pelo número de contorções induzidas pelo ácido acético em camundongos.

Tratamento mg/kg (i.p.)	Contorções (média ± D.P)
Salina	24,2±1,9
Morfina (3,0)	1,7±0,2**
E.H. (30)	8,3±1,0**
E.H. (60)	0,8±0,4**
E.H. (120)	2,6±0,5**
E.A. (30)	7,6±0,8**
E.A. (60)	4,8±0,8**
E.A. (120)	4,8±0,9**

n= 6. **p< 0.01 comparado aos valores do grupo controle.

Tabela 5. Efeito da DGL e da morfina administradas por 21 dias determinado pelo teste de imersão de cauda, em camundongos.

Tratamento (mg/kg, i.p.)	Reação no tempo (s), média \pm D. P.				
	Basal	1 dia	7 dias	14 dias	21 dias
Salina	5,8 \pm 0,7	5,8 \pm 0,9	5,1 \pm 0,8	5,1 \pm 0,6	5,9 \pm 0,8
Morfina	6,7 \pm 0,8	17,5 \pm 1,3**	17,5 \pm 0,9**	14,0 \pm 1,0**	7,5 \pm 0,7
E.H. (30)	8,7 \pm 0,7	14,4 \pm 1,0**	8,3 \pm 0,5	8,9 \pm 0,8	7,5 \pm 0,4
E.A. (30)	8,3 \pm 0,8	12,4 \pm 1,2**	9,2 \pm 0,7	10,2 \pm 1,5*	10,9 \pm 1,0*

n= 6. *p< 0.05 comparado aos valores do grupo controle.

**p< 0.01 comparado aos valores do grupo controle.

ANEXOS

Instructions to Authors

Phytotherapy Research is a monthly, international journal for the publication of original research papers, short communications, reviews and letters on medicinal plant research. Key areas of interest are pharmacology, toxicology, and the clinical applications of herbs and natural products in medicine, from case histories to full clinical trials, including studies of herb-drug interactions and other aspects of the safety of herbal medicines. Papers concerned with the effects of common food ingredients and standardized plant extracts, including commercial products, are particularly welcome, as are mechanistic studies on isolated natural products. Short communications dealing with the pharmacology and screening of crude or uncharacterized extracts will be considered for publication only if they are clearly of interest to our international readership and are not deemed more suitable for a regional audience.

Phytotherapy Research does not publish agricultural, phytochemical, structure elucidation, quality control or botanical identification papers unless directly pertinent to the pharmacological effects or overall safety of plant based medicines currently in use.

Manuscript Submission. *Phytotherapy Research* operates an online submission and peer review system that allows authors to submit articles online and track their progress via a web interface. Please read the remainder of these instructions to authors and then click <http://mc.manuscriptcentral.com/ptr> to navigate to the *Phytotherapy Research* online submission site.

All papers must be submitted via the online system.

Authors are welcome to submit the names and contact details of up to three suggested reviewers, using the online system. Submission of a manuscript will be held to imply that it contains original unpublished work and is not being submitted for publication elsewhere at the same time.

File types. Preferred formats for the text and tables of your manuscript are .doc, .rtf. Figures must be provided in .tiff or .eps format.

Upon acceptance, authors **must** supply by postal mail to the Content Editor: a Copyright Transfer Agreement with original signature(s), and permission grants, quoting the manuscript code. If the manuscript contains extracts, including illustrations, from other copyright works (including material from on-line or intranet sources) it is the author's responsibility to obtain written permission from the owners of the publishing rights to reproduce such extracts using the Wiley Permission Request Form. **Content Editor:** Robert Huston, John Wiley & Sons Ltd, the Atrium, Southern Gate, Chichester, West Sussex, PO19 8SQ, UK

Manuscript Style. The language of the journal is English. Please ensure that your manuscript has been checked by an English language expert if there is

concern for grammatical or other errors. All submissions including book reviews must have a title, be double-line spaced with type no smaller than 12 point, and have a margin of 3 cm all round. Tables must be on separate pages after the reference list, and not be incorporated into the main text. Figures should be uploaded as separate Image files.

- The **title page** must list the full title, short title of up to 60 characters and names and affiliations of all authors. Give the full address, including email, telephone and fax, of the author who is to check the proofs.
- Include the name(s) of any **sponsor(s)** of the research contained in the paper, along with **grant number(s)**.
- Supply an **abstract** of up to 200 words for all articles. An abstract is a concise summary of the whole paper, not just the conclusions, and is understandable without reference to the rest of the paper. It should contain no citation to other published work.
- Include up to six **keywords** that describe your paper for indexing purposes.
- Authors may suggest up to 3 potential reviewers
- A concise **introduction** is required of the background to the subject, its significance and its relationship to earlier works, with references.
- **Materials and methods** should be presented with clarity and detail. State the original and important findings in the **results**. Illustrate these with figures or tables where necessary but keep these to a minimum.
- **Results** and **discussion** may be combined as one section. Discuss the principal conclusions drawn from the results and their important implications.
- **Convention on biodiversity.** Authors must indicate that they have obtained authority to access plant samples (other than freely available commercial crops or herbal products) used for research and that this has been authorised by the appropriate agent of the government of the source country as required under the framework of the United Nations Convention on Biodiversity.
- **Botanical aspects.** Plant materials used must be adequately described using the Latin binomial for the plant, author of the name, plant family, source (e.g. country and region of collection, name of the collector and collection number) means of unambiguous identification (e.g. name and affiliation of expert botanist or the results of comparison with a published monograph and/or authenticated reference specimen). The reference number and place of deposition of a voucher specimen of the plant material must be given. For papers relating to crude plant extracts, the method of extraction and the yield of dried extract as a percentage weight of the starting fresh or dried plant material must also be stated. These should be submitted as short communications (see below).
- **Experimental procedures.** Bioassay data for plant extracts or isolated compounds must be accompanied by data for positive and negative controls. All animal experiments should be conducted in accordance with the UK Animals (Scientific Procedures) Act 1986 and associated guidelines, the EEC Directive of 1986 (86/609/EEC) or the NIH guide for the care and use of laboratory animals (NIH Publication No. 80-23; revised 1978). The Editors will reject papers if there is any doubt about the suitability of the animal procedures used.

- Use Chemical Abstracts nomenclature for chemical names and structures. Use proper or proprietary names with caution. Common acronyms for biomedical names are acceptable but define all others when first mentioned. Define abbreviations when first mentioned and do not use in the title or abstract. Define non-standard units.
- Keep acknowledgements brief and place them at the end of the paper.

Original Papers. These should not exceed five printed pages including a maximum of four figures and/or four tables and 30 references, (where one page comprises 800 words or the equivalent in illustrative and tabular material).

Short Communications. These must be complete, self-contained papers, and not preliminary reports. These should not exceed two printed pages including a maximum of two figures and/or two tables and 10 references. To exceed the limit may delay acceptance or publication of the paper.

Reviews and Keynote Lecture Transcripts. These will usually be written at the invitation of the Editors. Unsolicited reviews and manuscripts based on Conference Keynote Lectures will be welcome but authors wishing to submit these are requested to consult the Editor beforehand, ideally prior to commencement of writing. Reviews should include a Table of Contents and will normally be limited to 10,000 words including references and should be submitted via the online system.

Correspondence. Items submitted for the **correspondence columns**, which need have no fixed format are intended for constructive comments on published work or for putting forward new ideas and are published at the discretion of the Editors.

Reference style. References should be quoted in the text as name and year, and listed at the end of the paper alphabetically. All references must be complete and accurate. *Phytotherapy Research* uses *Index Medicus Style* abbreviations for journals cited. For correct abbreviations visit <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/jrbrowser.cgi> . If necessary, cite unpublished or personal work in the text but do not include it in the reference list. References should be listed in the following style:

Journals: Wright CW, Phillipson JD. 1990. Natural products and the development of selective antiprotozoal drugs. *Phytother Res* **4**: 127-139.

Books: Wagner H, Bladt S. 1996. *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas* (2nd edn). Springer-Verlag: Berlin Heidelberg.

Chapters in Books: Kips RH. 1985. Environmental aspects. In *Pesticide Application: Principles and Practice*, Haskel PT (ed). Oxford University Press: Oxford; 1-34.

Illustrations. Upload each figure as a separate file in either .tiff or .eps format, with the lead author's name, the figure number and the top of the figure indicated. Compound figures e.g. 1a, b, c should be uploaded as one figure. Tints are not acceptable. Lettering must be of a reasonable size that would still be clearly legible upon reduction, and consistent within each figure and set of figures. Please supply artwork at the intended size for printing, sized to the text width of 84 mm/single column, 176 mm/double column. Where a key to symbols is required, please include this in the artwork itself, not in the figure legend. All illustrations must be supplied at the correct resolution:

- Black and white and colour photos - 300 dpi
- Graphs, drawings, etc - 800 dpi preferred; 600 dpi minimum
- Combinations of photos and drawings (black and white and colour) - 500 dpi

The cost of printing **colour** illustrations in the journal will be charged to the author. If colour illustrations are supplied electronically in either TIFF or EPS format, they **may** be used in the PDF of the article at no cost to the author, even if this illustration was printed in black and white in the journal. The PDF will appear on the *Wiley InterScience* site.

Copyright. To enable the publisher to disseminate the author's work to the fullest extent, the author must sign a [Copyright Transfer Agreement](#), transferring copyright in the article from the author to the publisher, and submit the original signed agreement with the article presented for publication. A copy of the agreement to be used (which may be photocopied) can be found in the first issue of each volume of *Phytotherapy Research*. Copies may also be obtained from the journal editor or publisher, or may be printed from the journal website.

Further Information. Proofs will be sent to the author for checking. This stage is to be used only to correct errors that may have been introduced during the production process. Prompt return of the corrected proofs, preferably within two days of receipt, will minimize the risk of the paper being held over to a later issue. 25 complimentary offprints will be provided to the author who checked the proofs, unless otherwise indicated. Further offprints and copies of the journal may be ordered. There is no page charge to authors.