

- BETIJANE SOARES DE BARROS -

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE

ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DO FUNGO

***Rhizoctonia
solani***

awking
EDITORA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE

ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DO FUNGO

Rhizoctonia solani

Este livro descreve a atividade antiinflamatória e antinociceptiva da fração metanólica obtida a partir da biomassa do fungo endofítico do gênero *Rhizoctonia*. Dentre as plantas afetadas por este fungo, merece destaque a aroeira-vermelha, que é utilizada popularmente para diferentes finalidades, incluindo inflamação. Juntos, nossos resultados mostram, pela primeira vez, que a fração metanólica obtida a partir da biomassa do fungo endofítico *Rhizoctonia solani* apresenta atividade antiinflamatória e antinociceptiva.

ISBN 978-65-81683-00-9



9

786581

683009

 **hawking**
EDITORA
www.editorahawking.com.br



AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE
ANTINOCICEPTIVA E
ANTI-INFLAMATÓRIA
DO FUNGO
RHIZOCTONIA
SOLANI

DIREÇÃO EDITORIAL

Dra. Andrea Marques Vanderlei Ferreira

CONSELHO EDITORIAL

Dra. Maria de Lourdes Fonseca Vieira
Universidade Federal de Alagoas – UFAL (Brasil)

Dra. Ana Paula Morais Carvalho Macedo
Universidade do Minho (Portugal)

Dra. Lucy Vieira da Silva Lima
Universidade Federal de Alagoas – UFAL (Brasil)

Dr. Fábio Luiz Fregadolli
Universidade Federal de Alagoas – UFAL (Brasil)

Dra. Jamyle Nunes de Souza Ferro
Universidade Federal de Alagoas – UFAL (Brasil)

Dr. Rafael Vital dos Santos
Universidade Federal de Alagoas – UFAL (Brasil),
Universidade Tiradentes - UNIT (Brasil)

Dr. Anderson de Alencar Menezes
Universidade Federal de Alagoas – UFAL (Brasil)

Dr. Patrocínio Solon Freire
Instituto Federal de Pernambuco - IFPE (Brasil)

Dra. Laís da Costa Agra
Universidade Federal do Rio de Janeiro- UFRJ (Brasil)

Dra. Adriana de Lima Mendonça

Universidade Federal de Alagoas – UFAL (Brasil),
Universidade Tiradentes - UNIT (Brasil)

Dra. Ana Marlusia Alves Bomfim

Universidade Federal de Alagoas – UFAL (Brasil),
Universidade Tiradentes - UNIT (Brasil)

BETIJANE SOARES DE BARROS

AVALIAÇÃO DA
ATIVIDADE
ANTINOCICEPTIVA E
ANTI-INFLAMATÓRIA
DO FUNGO
RHIZOCTONIA
SOLANI

Maceió-AL
2020



DIREÇÃO EDITORIAL: Andrea Marques Vanderlei Ferreira

DIAGRAMAÇÃO: Lucile Vieira | Jeamerson de Oliveira

DESIGNER DE CAPA: Jeamerson de Oliveira

IMAGEM DE CAPA: Fotografia de Betijane Soares de Barros

O padrão ortográfico, o sistema de citações e referências bibliográficas são prerrogativas do autor. Da mesma forma, o conteúdo da obra é de inteira e exclusiva responsabilidade de seu autor.



Todos os livros publicados pela Editora Phillos estão sob os direitos da Creative Commons 4.0

https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.pt_BR

2019 Editora HAWKING

Avenida Comendador Gustavo Paiva, 3330, Mangabeiras.

Em frente ao Extra Mangabeiras e próximo ao Shopping Maceió.

www.editorahawking.com.br

editorahawking@gmail.com

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

S116p

Barros, Betijane Soares de

Avaliação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do fungo *Rhizoctonia Solani*. [recurso digital] / Betijane Soares de Barros. – Maceió-Alagoas: Editora Hawking, 2020.

ISBN: 978-65-81683-00-9

Disponível em: www.editorahawking.com.br

1. Antiinflamatorio. 2. Antinociceptivo. 3. Fungo.
4. Avaliação. 5. Rhizoctonia. I. Título.

CDD: 570

Índices para catálogo sistemático:

1. Ciências da Vida - (Biológicas) 570

“Todo mundo é capaz de dominar uma dor,
exceto quem a sente.”
(William Shakespeare)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me proporcionar tantas bênçãos divinas todos os dias.

Aos meus pais, Josias e Dora, pelo amor, carinho, confiança, dedicação, amizade e por ensinar valores que vou ter sempre como base em minha vida, vocês são o meu grande amor.

Ao professor Dr^o. Emiliano de Oliveira Barreto, pela confiança, pela oportunidade de desenvolver este trabalho, obrigada por tudo.

Ao meu esposo Dinho, pelo companheirismo incondicional. Amor da minha vida.

Ao meu filho Lucas, que foi minha principal fonte de inspiração.

Aos meus irmãos Cleide e Katy, pelo incentivo, amor, carinho e companheirismo. Amo-os muito.

Aos meus sobrinhos Josias Neto, Iasmim e Karolyna, que foram minha principal fonte de inspiração.

As minhas primas Izabel e Rosana pela companhia, apoio, carinho, amor e incentivo.

A toda minha família que sempre me incentivaram e torceram por mim, obrigada, amo muito vocês.

A minha amiga Isabela, por ter me ligado todos os dias na hora que mais precisei, por sofrer e sorrir comigo, pelo incentivo, apoio, ajuda em todos os momentos. Sou muita grata.

Ao meu amigo Altair pelas suas incansáveis ligações, pela força, simplicidade, companheirismo. Grande pessoa e grande amigo.

A Mônica, Diego Coutinho e Renato Rodarte, pelo carinho, preocupação e interesse. Obrigada.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório, Ozileudiane, Fábria, Laís, Fabíola e Rafael. Em especial agradeço a Juliane, Isabela, Jamylle e Alex, posso dizer que grande parte do que sei, se não tudo, devo a vocês. Amigos vocês foram presença constante e participaram de todas as conquistas e desapontamentos de alguns dos melhores anos da minha vida, como eu gostaria de estar sempre perto de vocês, obrigada por tudo.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	14
LISTA DE TABELAS.....	15
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	16
APRESENTAÇÃO.....	18
INTRODUÇÃO.....	19
1. PROCESSO INFLAMATÓRIO.....	23
2. DOR.....	28
2.1. Mecanismos da nocicepção.....	31
3. FÁRMACOS UTILIZADOS NO CONTROLE DA DOR E DA INFLAMAÇÃO.....	35
4. PRODUTOS NATURAS.....	39
5. FUNGOS, ENDOFÍTICOS E ESPÉCIE RHIZOCTONIA <i>SOLANI</i>	45
MATERIAL E MÉTODOS.....	51
1. ANIMAL.....	51
2. OBTENÇÃO DO FUNGO ENDOFÍTICO.....	51
3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA.....	55
3.1. Teste de contorção abdominal induzida por ácido acético	55
3.2. Teste da placa quente.....	56
3.3. Teste de formalina.....	58

4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA.....	60
4.1. Teste de edema de pata.....	60
5. ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	62
RESULTADOS.....	63
1. Análise da atividade antinociceptiva da fração metanólica do fungo <i>Rhizoctonia solani</i>	63
1.1. Efeito da FM na nocicepção induzida por ácido acético.....	63
1.2. Duração do Efeito FM na nocicepção induzido por ácido acético...	65
1.3. Efeito da FM na nocicepção induzida pela placa quente.....	66
1.4. Efeito da FM na nocicepção induzida pela formalina.....	69
2. Análise da atividade anti-inflamatória da fração metanólica do fungo <i>Rhizoctonia solani</i> no modelo de edema de pata induzida por carragenina.....	73
2.1. Efeito da FM sobre o edema de pata induzido por histamina.....	75
2.2. Efeito da FM sobre o edema de pata induzido por PGE ₂	77

DISCUSSÃO.....	79
CONCLUSÃO.....	92
REFERÊNCIAS	93

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Efeito da FM na nocicepção induzida por injeção de ácido acético.....	64
Figura 2.	Duração do Efeito FM na nocicepção induzida por injeção de ácido acético.....	65
Figura 3.	Efeito da FM na nocicepção induzida pela formalina.....	69
Figura 4.	Análise da atividade antiinflamatória da fração metanólica do fungo <i>Rhizoctonia solani</i> no modelo de edema de pata induzida por carragenina...	73
Figura 5.	Efeito da FM sobre o edema de pata induzido por histamina.....	75
Figura 6.	Efeito da FM sobre o edema de pata induzido por PGE ₂	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Efeito da FM no modelo da placa quente.....	67
Tabela 2	Efeito da FM envolvendo receptores na ação antinociceptiva no modelo de formalina.....	71

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Ilustração 1	Crescimento do teleomorfo em meio BDA.....	54
Ilustração 2	Biomassa do teleomorfo <i>R. solani</i> crescendo em meio BD.....	54
Ilustração 3	Fracionamento.....	55
Ilustração 4	Resposta nociceptiva (contorção abdominal) induzida por ácido acético em camundongo.....	56
Ilustração 5	Animal exposta a placa quente (Hot Plate).....	57
Ilustração 6	Injeção intraplantar (i.pl.) de formalina (2 %).....	59

Ilustração 7	Resposta nociceptiva (lambida da pata) induzida pela injeção i.pl. de formalina (2 %)......	59
Ilustração 8	Avaliação do edema de pata utilizando o Pletismômetro.....	61

APRESENTAÇÃO

Este livro descreve a atividade antiinflamatória e antinociceptiva da fração metanólica obtida a partir da biomassa do fungo endofítico do gênero *Rhizoctonia*. Dentre as plantas afetadas por este fungo, merece destaque a aroeira-vermelha, que é utilizada popularmente para diferentes finalidades, incluindo inflamação. Juntos, nossos resultados mostram, pela primeira vez, que a fração metanólica obtida a partir da biomassa do fungo endofítico *Rhizoctonia solani* apresenta atividade antiinflamatória e antinociceptiva.

INTRODUÇÃO

A resposta inflamatória consiste em um evento fisiológico complexo que envolve o reconhecimento do estímulo para sua posterior destruição e tentativa de reconstruir o tecido danificado. A partir do reconhecimento do agente agressor, desencadeia-se a ativação e a amplificação de respostas celulares resultando na produção e liberação de diversos mediadores químicos que são responsáveis pela resposta inflamatória (Maseda D, Johnson E, Crofford L., 2016). No entanto, se a destruição do agente agressor e o processo de reparo não ocorrem de maneira eficiente e sincronizada, a reação inflamatória pode levar a uma lesão tecidual persistente e danosa ao organismo (NATHA, 2002).

Dentre os diversos sistemas de “vigilância” da homeostase do organismo, a dor tem papel de destaque por despertar nossa atenção imediatamente. Além de despertar, direciona nossa atenção até que o

ponto sensível tenha sido identificado e o evento que está desencadeando a lesão, ou representando risco, tenha sido afastado (Wall, 1999). À medida que crescemos e nos tornamos mais experientes, as reações clássicas de remover o estímulo lesivo, adotar uma postura que limite novas lesões e otimize a recuperação e buscar segurança, alívio e cura em resposta à dor, tornam-se mais sutis, elaboradas e sofisticadas. Desse modo, a função básica e fundamental da dor é “avisar “que algo está ameaçando nossa sobrevivência e/ou bem estar e, clinicamente, é um sintoma importante para permitir a avaliação do surgimento ou evolução de diversas doenças. Apesar de seu caráter “benéfico”, em alguns casos a dor pode causar mais desconforto que a própria desordem sinalizada por ela (Mrozkova P, Palecek J, Spicarova D., 2016).

O tratamento do processo inflamatório, bem como da dor, mostra-se diversificado, contando com ajuda de antiinflamatórios esteroidais e não-esteroidais, tais como glicocorticóide e indometacina, bem como outras substâncias

com potencial analgésico capazes de aliviar a dor, como os compostos similares a morfina. (Oliveira Jr JO, 2014). No entanto, vários desses tratamentos exibem diferentes efeitos adversos os quais limitam seu uso. Pois sabemos que desde o início das civilizações, o homem faz uso dos recursos naturais em seu cotidiano, onde utiliza produtos extraídos de plantas e animais para sanar as enfermidades. Em decorrência dessas ações, e, através da observação, logo se percebeu que havia substâncias com ação medicinal e/ou tóxica (SIMÕES *et. al.*, 2007). Dessa maneira, produtos de origem natural têm dado, nos últimos anos, grande contribuição para o desenvolvimento de terapias farmacológicas modernas como os digitálicos, antitumorais e antiinflamatórios (RATES, 2001).

Nos últimos anos, produtos de origem natural mostram-se como fontes promissoras para obtenção de substâncias com propriedades terapêuticas. Diferentes estudos vêm sendo desenvolvidos com o objetivo de buscar elementos de origem natural de interesse terapêutico e que não

apresentem os efeitos colaterais dos fármacos atualmente utilizados (FIGUEIREDO, C.A; GURGEL, I.G.D.; GURGEL Jr., G.D., 2014).

Os microorganismos são fontes promissoras na busca de diversos metabólitos bioativos e têm originado importantes produtos para a indústria farmacêutica com aplicações em diversas áreas, merecendo destaque o antibiótico, penicilina. Além disso, na tentativa de atender as novas perspectivas de inovações metodológicas atualmente requisitadas pelo mercado mundial, ensaios de produção de compostos biologicamente ativos em larga escala tornam-se cada vez mais difundidos e necessários. Dessa maneira, vários esforços concentram-se na busca por fontes de fármacos ainda pouco exploradas. Neste contexto, os fungos endófitos mostram-se como ferramentas importantes para ampliar as chances de obtenção de novos agentes farmacologicamente ativos (RADIASTUTI et al., 2017).

Rhizoctonia é uma espécie pertencente ao Reino Fungi, da ordem Agonomycetales,

seus representantes habitam o solo e atuam como patógenos endofíticos de vários organismos vegetais (HUSSAIN et al., 2014) (ALFENAS e SILVEIRA, 2002). Dentre as plantas afetadas por este fungo merece destaque a aroeira-vermelha (*Schinus terebinthifolius* Raddi), que é usada popularmente para diferentes finalidades, incluindo inflamações (LUCENA et al., 2006). O fungo endofítico *Rhizoctonia solani*, em sua fase teleomórfica, produz uma vasta gama de substâncias incluindo, dipeptídeos cíclicos e vários ácidos orgânicos (PEDRAS et al., 2005). Tendo por base este conjunto de informações, este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial antinociceptivo e antiinflamatório da fração metanólica obtida a partir da fase teleomórfica do fungo endofítico *Rhizoctonia solani* (FERREIRA et al. (2015).

1. PROCESSO INFLAMATÓRIO

A inflamação mostra-se como um processo fisiológico através do qual o tecido

vascularizado responde a injúria. A resposta inflamatória é bastante estereotipada, sendo marcada por mudanças no fluxo sanguíneo no foco da lesão (devido à vasoconstricção seguida por vasodilatação arteriolar), aumento de permeabilidade nas vênulas, e recrutamento de leucócitos (HANSSON, 2005).

A palavra inflamação é derivada do “estado de se estar inflamado”, onde inflamar significa “colocar fogo” o que implica na cor vermelha, na possibilidade de aquecimento e na geração de calor e dor (TROWBRIGDE e EMLING, 1996). A resposta inflamatória é um mecanismo benéfico e fisiológico pelo qual o organismo se defende contra infecções e tenta reparar danos teciduais ou perda de função (LAWRENCE *et al.*, 2002). O processo inflamatório pode ser denominado agudo ou crônico, de modo que imediatamente após o estímulo, segue-se a inflamação aguda, sendo definida como um conjunto de alterações bioquímicas e celulares que ocorrem em resposta a estímulos inespecíficos, tais como infecções ou danos

teciduais (HANSSON, 2005). As reações inflamatórias locais são caracterizadas por eventos vasculares responsáveis pelos sinais típicos da presença de inflamação: rubor (hiperemia), tumor (edema), calor (aumento da temperatura local) e dor, como descrito por Cornelius Celsus, no início da era Cristã (GILROY *et al.*, 2004). O quinto sinal da inflamação, que é a perda da função do tecido ou órgão lesado foi descrito posteriormente por Virchow no século XIX (COTRAN *et al.*, 2000).

As causas que levam à inflamação são múltiplas e de natureza variável. São reconhecidos os seguintes tipos de agentes que causam inflamação: agentes biológicos (como bactérias, vírus, protozoários), agentes químicos (como ácidos, álcalis, terebintina, formaldeído, carragenina), agentes físicos (como calor excessivo, frio exagerado, eletricidade, radiação ultravioleta e ionizante) e agentes imunes (exposição a antígenos provocando ativação da resposta imunológica do hospedeiro) (Maseda D, Johnson E, Crofford L., 2016).

Os componentes básicos de um processo inflamatório envolvem eventos vasculares e celulares, mediadores derivados de células e da ativação plasmática, que produzem os sinais clássicos da inflamação descritos anteriormente. As alterações vasculares iniciam-se imediatamente após o estímulo inflamatório e desenvolvem-se durante as primeiras horas após a agressão (WILLIAMS, 1983). Em condições normais a microcirculação apresenta baixíssima permeabilidade a macromoléculas. As proteínas plasmáticas circulam muito lentamente entre sangue e tecidos e retornam ao sangue através dos vasos linfáticos. Esta situação muda dramaticamente durante o processo inflamatório. A microcirculação torna-se permeável a macromoléculas e fluídos vindos do sangue, causando edema tecidual (GILROY *et al.*, 2004).

Os eventos celulares são marcados pela saída das células circulantes da luz do vaso e a migração de leucócitos para o sítio inflamatório. Esse fenômeno segue algumas fases como captura, rolamento dos

leucócitos pelo endotélio, adesão firme e transmigração (SCHMID-SCHONBEIN, 2006). Todas estas etapas do processo de migração leucocitária são dependentes da expressão pelos leucócitos e pelas células endoteliais, de moléculas denominadas moléculas de adesão e de mediadores quimiotáticos (WEBER, 2003).

A mobilização adequada dos leucócitos circulantes para o sítio inflamado é fundamental para a defesa do organismo, já que estas células podem desenvolver suas ações de fagocitose e destruição de agentes patogênicos levando à resolução do processo. Os leucócitos circulantes migram seletivamente e em número significativo para o tecido inflamado no decorrer do processo. Em uma resposta inflamatória aguda, há acúmulo predominante de neutrófilos, enquanto que as células mononucleares são observadas mais tardiamente durante a fase aguda, bem como nos processos crônicos. A migração de eosinófilos também pode ocorrer em processos inflamatórios, estando principalmente associada a processos

alérgicos e infecções parasitárias. Algumas das células envolvidas já estão presentes no tecido afetado, tais como: células endoteliais, células mesoteliais, mastócitos, macrófagos e alguns linfócitos (SAMPSON 2000; BROCHE e TELLADO, 2001). Estas células, residentes ou leucócitos, são capazes de produzir uma vasta gama de mediadores inflamatórios, incluindo histamina, serotonina, prostaglandinas (PGs), leucotrienos (LTs), fator ativador de plaquetas (PAF), citocinas, quimiocinas, fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa) e numerosas proteases, que podem estar relacionados tanto com a inflamação quanto com a dor (BOYTON e OPENSHAW, 2002).

2. DOR

Dor é um processo fisiológico indispensável ao indivíduo, sendo uma sensação desagradável, que varia desde desconforto leve, associada a um processo destrutivo real ou potencial dos tecidos. Esta sensação é uma resposta resultante da

integração de impulsos dos nervos periféricos, ativados por estímulos locais, sendo capaz de indicar alterações que ocorrem no organismo (PRADO e DEL BEL, 1998).

A dor é sempre subjetiva, cada indivíduo aprende a sua aplicação através de experiências relacionadas a lesões sofridas durante o crescimento (MERSKEY, 1991). Entretanto, sua percepção envolve fatores ambientais, culturais, espirituais, psicológicos, sociais, e principalmente, sua interpretação e significação como sofrimento total serão desenvolvidas por associações positivas, negativas e contextuais de cada experiência individual (ANAND e CRAIG, 1996). Atualmente a dor é considerada o quinto sinal vital humano junto com temperatura corpórea, pressão arterial, ritmo cardíaco e frequência respiratória. Fisiologicamente a dor é uma resposta de defesa que visa à preservação do organismo à agressão (TREEDE 1995).

A dor pode ser classificada quanto sua duração em dois tipos: dor aguda e dor crônica. A dor aguda está associada com

uma lesão tecidual recente, ativação de nociceptores e pode desaparecer até mesmo antes da cura do dano tecidual (CARR e GOUDAS, 1999; PARK e VASKO, 2005). Por outro lado, a dor crônica se caracteriza por ser persistente, podendo durar meses ou anos, e alterações adaptativas o que muitas vezes dificulta o tratamento (IADAROLA e CAUDLE, 1997; BESSON, 1999). A percepção dolorosa a um determinado estímulo nocivo tem como propósito biológico alertar o organismo sobre algum perigo no ambiente, incluindo a resposta comportamental de proteger o organismo contra possível lesão (CHENG *et al.*, 2002). A transmissão da dor envolve uma interação complexa de estruturas centrais e periféricas desde a pele, vísceras ou outros tecidos até o córtex cerebral (FURST, 1999).

A origem da dor pode ser classificada em quatro tipos principais: nociceptiva, neurogênica, neuropática e psicogênica. Dor nociceptiva é provocada por estímulos sobre os nociceptores localizados nos tecidos. Dor neurogênica reflete um dano tecidual neuronal na periferia ou no sistema nervoso

central (SNC). Dor neuropática acontece devido a uma disfunção ou dano no tecido nervoso. A dor psicogênica origina-se de uma fonte somática identificável e que pode refletir fatores psicológicos (MILLAN, 1999).

2.1. Mecanismos da nocicepção

Os nociceptores são receptores para diversas substâncias algogênicas localizados na membrana plasmática e que traduzem o sinal externo em potenciais de ação. Estes por sua vez, são propagados ao longo dos axônios até o corpo celular no gânglio da raiz dorsal (GRD), bem como ao corno dorsal da medula espinhal (LEMKE, 2004).

Inicialmente, os impulsos nociceptivos são recebidos pela medula espinhal, mais precisamente pelo seu corno dorsal, que é a área primária de recebimento da maioria das informações somatosensoriais (COGGESHALL e CARLTON, 1997). O corno dorsal da medula espinhal é uma estrutura dividida em lâminas, com base na sua citoarquitetura, sendo que cada lâmina

se caracteriza por receber tipos diferentes de informações. Alguns estímulos somatosensoriais provenientes da pele, músculos ou vísceras também são capazes de chegar à medula espinhal através do corno ventral (ALMEIDA *et al.*, 2004).

A ativação do nociceptor é decorrente de uma despolarização de membrana da célula nervosa, favorecendo a liberação de substâncias químicas, conhecidas como neuropeptídeos. Dentre eles destacam-se a substância P e neuroquinina A que atuam como agentes pró-inflamatórios de forma parácrina ou autócrina, bem como neurotransmissores que possuem papel na transmissão do sinal através das fibras nervosas até o sistema nervoso central (ROCHA *et. al.*, 2007). A resposta nociceptiva ocorre em tecidos que contenham o número e o tipo apropriado de nociceptores e o dano tecidual deve ser intenso o suficiente para estimular e ativar estes nociceptores (LEMKE, 2004).

A sensibilização dos nociceptores acontece em decorrência de estímulos térmicos, mecânicos e químicos, sendo estes

responsáveis pela liberação local de diversos mediadores capazes de estimular a transmissão da informação ao sistema nervoso central (SNC). Esses mediadores podem ser liberados pelos neurônios sensoriais e simpáticos e por células não neuronais como plaquetas, leucócitos, mastócitos, células endoteliais, fibroblastos e células de Schwann. Em um quadro crônico, há também participação de mediadores liberados a partir de células inflamatórias interferindo na transmissão nociceptiva (JULIUS e BASBAUM, 2001).

O tecido que recebe a maior parte dos estímulos nociceptivos é a pele, sendo a parte do organismo que fornece a maioria das informações nociceptivas (BESSON, 1999). De fato, na camada epidermal da pele existem fibras aferentes de pequeno diâmetro responsáveis por conduzir as sensações de pressão intensa, calor nociceptivo ou irritantes químicos ao sistema nervoso central e também outras fibras não mielinizadas, de diâmetro maior, responsáveis por conduzir sensações inócuas como toque ou leves variações da

temperatura. Seus axônios podem ser mielinizados ou não e são envoltos por células de Schwann, que servem para proteção, suporte, fonte de nutrientes, auxílio no reparo, regulação do pH e do balanço iônico nas proximidades dos neurônios sensoriais (MILLER *et al.*, 2002). As células de Schwann também possuem atividade secretória, podendo liberar citocinas, aminoácidos excitatórios e ATP, que modulam a transmissão de estímulos sensoriais (JEFTINIJA e JEFTINIJA, 1998; IRNICH *et al.*, 2001).

Estímulos nociceptivos resultam na liberação local de diversos mediadores químicos, que medeiam, facilitam ou ainda atenuam a transmissão da informação ao sistema nervoso central. Após a lesão tecidual, esses mediadores são liberados por neurônios sensoriais e simpáticos e por células não neuronais, como as células inflamatórias. Tais mediadores fazem com que a informação sensorial seja levada, através das fibras aferentes, ao sistema nervoso central para que este a processe e responda adequadamente em cada situação

(BESSON, 1997). Dessa maneira, percebe-se que o processo doloroso é bastante complexo, portanto, o tratamento com substâncias analgésicas requer fármacos que atuem em diferentes etapas do processo de transmissão e/ou condução percepção dolorosa.

3. FÁRMACOS UTILIZADOS NO CONTROLE DA DOR E DA INFLAMAÇÃO

Atualmente, vários medicamentos para o tratamento da dor e inflamações encontram-se disponíveis para uso clínico. Dentre os mais usados, os glicocorticóides possuem grande amplitude de ações farmacológicas, merecendo destaque seus efeitos antiinflamatórios e imunossupressores capazes de inibir tanto as manifestações iniciais quanto as tardias do processo inflamatório (ADCOCK et al., 2005). Apesar dos glicocorticóides apresentarem excelentes propriedades antiinflamatórias quando utilizados na terapêutica, seu freqüente uso produz drásticos efeitos colaterais. Tal fato encoraja

a busca por substâncias com menos efeitos indesejáveis e com maior seletividade de ação antiinflamatória.

Os antiinflamatórios não-esteroidais (AINEs), possuem como molécula-alvo a enzima cicloxigenase (COX). A inibição da atividade das COXs (COX-1 constitutiva, COX-2 induzida, ou ambas) é um dos principais mecanismos de ação de diversos fármacos, analgésicos e antiinflamatórios, especialmente os AINEs como o ácido acetilsalicílico (aspirina[®]) e a indometacina. Desta forma, seu efeito antiinflamatório deve-se principalmente à inibição da produção de prostaglandinas como a prostaglandina E2 (PGE2), PGD2 e PGI2, bem como dos tromboxanos (TXs) (SAFAYHI, 1997; FITZGERALD, 2003).

Como a COX-2 é uma enzima expressa por células envolvidas na inflamação, foi correlacionada como sendo a maior responsável pela produção de prostanóides como prostaglandinas, prostaciclina e os tromboxanos, nos processos inflamatórios e dolorosos. A partir daí a busca por inibidores seletivos de COX-

2 se tornou intensa. Assim, foram desenvolvidos inibidores seletivos da COX-2 da primeira geração, incluindo o celecoxib (Celebrex[®]; Pharmacia), e o rofecoxib (Vioxx[®]; Merck) que foram aprovados pelo Food and Drug Administration (FDA) para o tratamento da artrite (FITZGERALD, 2003). Foram desenvolvidos também os inibidores seletivos para COX-2 de segunda geração como o valdecoxib[®] (Bextra; Pfizer), etoricoxib[®] (Arcoxia; Merck) e o lumiracoxib[®] (Prexige; Novartis) (FITZGERALD, 2003).

Entretanto, estudos demonstram que o Vioxx pode causar sérios efeitos colaterais cardiovasculares como ataque cardíaco e infarto (BOMBARDIER et al., 2002). Apesar disto, a comercialização do Vioxx continuou e após 18 meses de uso contínuo, vários indivíduos exibiram os distúrbios cardiovasculares descritos acima. FITZGERALD (2003) demonstrou que rofecoxib e o celecoxib são capazes de reduzir além dos níveis de PGE₂, os níveis de prostaciclina (PGI₂). A produção de PGI₂ pode causar inibição da agregação

plaquetária, indução da vasodilatação e prevenção de proliferação em células musculares lisas *in vitro*. Os inibidores não seletivos de COX inibem tanto síntese de PGI₂ como também de tromboxano A₂, enquanto que os inibidores seletivos da COX-2 inibem somente a produção da PGI₂. A produção de tromboxano A₂ fica intacta podendo induzir a agregação plaquetária, vasoconstrição e proliferação vascular. Em longo prazo a redução da PGI₂ e o aumento da tromboxano devem predispor os pacientes ao risco de infarto do miocárdio e outros problemas cardiovasculares. Motivados por estes relatos, a Merck anunciou a retirada voluntária do mercado, em todo o mundo, do medicamento Vioxx, indicado para o tratamento da artrite e dor aguda.

Dentre os múltiplos mecanismos nos quais os fármacos antiinflamatórios esteroidais atuam, merece destaque a inibição da migração celular para a área afetada, através da supressão da expressão de moléculas de adesão, ou da indução da síntese de uma proteína inibidora de

fosfolipase A2, a anexina-1 (também conhecida como lipocortina). Outro mecanismo de ação dos corticosteróides ocorre através da ativação de receptores nucleares para glicocorticóides que regulam a transcrição de alguns genes pró-inflamatórios de resposta primária, incluindo os que expressam a COX-2. O complexo esteróide-receptor também é capaz de promover inibição da transcrição de um grande número de citocinas envolvidas na inflamação crônica, destacando-se principalmente a interleucina-1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral (TNF-alfa). Além disso, os corticosteróides podem ainda promover uma repressão da síntese dos receptores das citocinas, como dos receptores da IL-2 (RODRIGUES *et al.*, 2003; DALLOB *et al.*, 2003).

4. PRODUTOS NATURAIS

O uso de produtos naturais é tão antigo quanto à história humana. Existem relatos de povos egípcios datados cerca de 1500 anos a.C., que descrevem várias

doenças e seus tratamentos utilizando produtos de origem natural. Textos de civilizações antigas como as do oriente médio, sumérios, assírios, bem como gregos e povos nativos americanos deixaram seu legado acerca de seus conhecimentos sobre a utilização de produtos naturais para o tratamento de algumas enfermidades (LOMBARDINO *et al.*, 2004).

Ao passar dos anos essas informações se tornaram grandes tesouros para a indústria farmacêutica, o que impulsionou a busca pela identificação de princípios ativos e, conseqüentemente, na síntese de uma gama de medicamentos que atualmente são utilizados para o tratamento de várias doenças. Antenados a essa realidade, a ciência mundial passou a perceber que os estudos de produtos naturais orientados pelo uso popular apresentam um interessante alvo a ser explorado à descoberta de novos fármacos (YUNES e CALIXTO, 2001). Assim, para validação científica de uma fonte de recurso natural, algumas etapas devem ser seguidas, como: estudos taxonômicos, identificação química, testes

farmacológicos pré-clínicos e clínicos e trabalhos nas comunidades para indicar a forma de uso correta (CAMURÇA-VASCONCELOS *et al.*, 2005).

Em 1828, o professor Friedrich Wohler, demonstrou a possibilidade de produzir compostos sintéticos através de manipulação química, utilizando produtos de origem animal e vegetal como matéria prima (SZEKESSY- HERMANN, 1978). A indústria aperfeiçoou o método de Wohler e alguns anos após sua descoberta já era possível conjugar moléculas inorgânicas com compostos orgânicos. Como exemplo tem-se a síntese do ácido acetil-salicílico (AAS). O ácido salicílico é o precursor do ácido acetil-salicílico que é extraído da casca do salgueiro (*Salix Alba*), sendo em seguida conjugado com um acetato, formando o AAS, um dos medicamentos mais utilizados na história humana (LEVESQUE *et al.*, 2000; LOMBARDINO *et al.*, 2004).

Cem anos após a descoberta de Wohler, o médico Alexander Fleming foi responsável por outro importante divisor de

águas para a indústria farmacêutica, descobrindo um produto bioativo derivado de fungos. Ele observou que placas de culturas de *Staphylococcus*, quando contaminadas com um bolor, provocavam a morte bacteriana. Posteriormente, Fleming descobriu que esses fungos, do gênero *Penicillium* produziam uma substância bactericida que ele denominou de penicilina. Alguns anos mais tarde, Howard Florey e Ernst Chain conseguiram purificar a substância, comprovando os resultados de Fleming. A penicilina ajudou a salvar muitas vidas sendo um dos antibióticos mais utilizados atualmente na clínica (BENTLEY, 2005).

Atualmente, cerca de 25-30% de todos os medicamentos utilizados na terapêutica são de origem natural ou derivado de algum composto natural. Além disso, o Brasil tem uma das maiores biodiversidade do mundo, possuindo cerca de 20-22% de todas as plantas e microorganismos existentes no planeta (CALIXTO, 2005). Vários trabalhos demonstram importantes resultados acerca da utilização de produtos naturais em

diferentes patologias (BUTLER, 2004; GULLO *et al.*, 2006). Embora, as plantas medicinais sejam muitas vezes o único recurso terapêutico de comunidades e grupos étnicos, o conhecimento agregado perante toda essa biodiversidade ainda é pequeno (MACIEL *et al.*, 2002; CALIXTO, 2005).

Mesmo a medicina convencional tendo superado muitas das terapias populares, ressurgiu nos últimos anos um grande interesse, especialmente pela indústria farmacêutica, em examinar o potencial biológico de substâncias extraídas de plantas medicinais (ZHANG *et al.*, 2001). Dessa forma, a indústria tem se voltado ao conhecimento popular a fim de adquirir informações terapêuticas que foram sendo acumuladas durante séculos. Ressurgindo das pequenas comunidades, a cultura medicinal tem despertado também o interesse de pesquisadores, em estudos envolvendo áreas multidisciplinares, como por exemplo, taxonomia, botânica, farmacologia e fitoquímica, que juntas enriquecem os conhecimentos sobre a

inesgotável fonte medicinal natural, sendo um caminho promissor e eficaz para descobertas de novos medicamentos (MACIEL *et al.*, 2002).

No entanto, as plantas medicinais não são as únicas fontes de substâncias bioativas que vêm sendo extensivamente estudados. Nos últimos anos, alguns metabólitos animais e compostos produzidos por fungos vêm ganhando destaque perante a indústria farmacêutica (BENTLEY, 2005). Dentre os compostos bioativos isolados de diferentes espécies de fungos podemos mencionar terpenóides, esteróis, ácidos graxos, proteínas, lectinas, proteoglicanas e polissacarídeos (WASSER, 2002; LIU *et al.*, 2007; MORADALI *et al.*, 2007). Tais compostos apresentam uma vasta gama de ações incluindo a capacidade em reduzir os níveis plasmáticos de colesterol e modulador de sistema imune e de crescimento de tumores (SMITH, ROWAN, SULLIVAN, 2002; WASSER, 2002).

5. FUNGOS, ENDOFÍTICOS E ESPÉCIE RHIZOCTONIA SOLANI

As associações entre os seres vivos é uma condição vital para espécies incapazes de conseguirem, sozinhas, meios de sobrevivências, como obtenção de nutrientes e defesas contra espécies predadoras. Entre os microorganismos, os fungos são os que se encontram mais frequentemente associados às plantas (ZOBBERI, 1972). Os fungos não produzem clorofilas (são heterotróficos) e sua parede celular é constituída principalmente de quitina. Assim, para que ocorra o sucesso na sobrevivência é inevitável a sua associação com outros seres vivos, especialmente as plantas, ou de sua capacidade de assimilar nutrientes do meio ambiente. Estas associações podem ser parasitárias, mutualistas ou comensais (RICHARDSON, 1999).

Os fungos podem apresentar frutificações de duas naturezas, ou seja, a da forma teleomórfica, antigamente denominada "forma perfeita" ou sexuada e frutificações assexuadas ou clonais,

antigamente denominadas "forma imperfeita" e hoje, anamórfica. Na maioria das vezes, para cada espécie existe uma forma anamórfica e uma forma teleomórfica. Assim, conclui-se que os fungos, em geral, podem possuir, ao contrário do que ocorre em outras espécies de organismo, dois nomes científicos para uma mesma entidade biológica, um da forma teleomórfica e outro da forma anamórfica. Nos países tropicais e subtropicais onde existem extremos de temperaturas menores, a grande maioria dos fungos fitopatogênicos se manifesta sob a forma assexuada ou anamórfica e apenas raramente algum desses fungos manifesta a forma sexuada ou teleomórfica (PUTZKE e PUTZKE, 1998).

Os microrganismos, principalmente os fungos, são responsáveis por importantes transformações metabólicas no organismo que parasitam, pelo controle biológico de pragas e doenças, pela fixação biológica do nitrogênio atmosférico, e degradação de compostos tóxicos. Além disso, eles

também apresentam potencial na produção de compostos de atividade biológica.

Endofíticos são todos os microrganismos capazes de colonizar, em alguma fase do seu ciclo de vida, tecidos vegetais, principalmente suas partes aéreas, sem causar dano à planta (PETRINI, 1991) ou de forma mais prática, microrganismos isolados de tecidos vegetais desinfectados superficialmente ou de partes internas das plantas (HALLMANN *et al.*, 1997).

Fungos endofíticos são encontrados na maioria das espécies vegetais, permanecendo em estado de latência ou colonizando ativamente os tecidos de forma local ou sistêmica. Por ocuparem um nicho ecológico semelhante àqueles ocupados por patógenos os endófitos apresentam grande potencial para o controle biológico (HALLMANN *et al.*, 1997). Este controle pode ser resultante de diversos mecanismos: competição por espaço e nutrientes na planta hospedeira, produção de compostos antimicrobianos (PLEBAN *et al.*, 1997; LI *et al.*, 2000) e indução de resistência sistêmica (M'PIGA *et al.*, 1997;

BENHAMOU *et al.*, 1998; DUIJFF *et al.*, 1997).

Processos de interação entre microrganismos e plantas já vem sendo relatados há muitas décadas. Com exceção da associação entre plantas e fungos micorrízicos e de bactérias diazotróficas da rizosfera acreditava-se que esta interação levasse à formação de lesões nos tecidos vegetais, as quais poderiam causar a morte no interior de tecidos vegetais sem que os hospedeiros sofram qualquer dano aparente, abrindo desta forma novas perspectivas para o estudo das interações plantas/microrganismos (AZEVEDO *et al.*, 2000).

Plantas contendo fungos endofíticos, na maioria das vezes, são rejeitadas por herbívoros, isto está associado à produção de compostos tóxicos aos herbívoros produzidos em parte pelos endofíticos. Inicialmente, o conhecimento da comunidade endofítica associada ao hospedeiro de interesse, é importante, pois qualquer desequilíbrio na população de endofíticos poderá proporcionar o

estabelecimento de patógenos (ARAÚJO *et al.*, 1995).

O gênero *Rhizoctonia* foi descrito pela primeira vez pelo micologista francês De Candolle, em 1815, como sendo um fungo não esporulante que ataca, preferencialmente, raízes e que produz filamentos de hifas a partir de escleródios (SNEH *et al.*, 1991). O micélio é caracterizado pela ramificação em ângulo reto com septação imediatamente e após o ramo, constricção na base da ramificação e septo doliporo. A fase sexuada deste fungo é *Thanatephorus cucumeris*, classificado no reino Fungi, filo Basidiomycota, ordem Ceratobasidiales, Ceratobasidiaceae (BUTLER; BOLKAN, 1973, ANDERSON, 1982; ADAMS, 1988). Dentre as plantas afetadas por este fungo merece destaque a aroeira-vermelha, que é usada na medicina popular para diferentes finalidades, incluindo dor e inflamações.

Desde o século passado, os endofíticos têm sido usados como agentes de controle biológico de pragas e doenças como bioherbicidas e como vetores para introduzir

genes em plantas hospedeiras (AZEVEDO *et al.*, 2000). Especial atenção vem sendo dada à possibilidade da utilização destes microrganismos como vetores para a introdução de novas características em plantas de interesse ou mesmo para a produção de compostos biologicamente ativos como antibióticos e metabólitos secundários de interesse farmacológico (MANDALA *et al.*, 1997; STROBEL e HESS, 1999; RODRIGUES *et al.*, 2000). Dessa maneira, fica evidente a importância sobre as substâncias que os endofíticos são capazes de produzir, tendo então, razões para aprofundar os estudos sobre os produtos derivados desses organismos.

MATERIAL E MÉTODOS

1. ANIMAIS

Foram utilizados camundongos Swiss adultos de ambos os sexos (25 a 35 g), provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Alagoas (BioCen-UFAL). Os animais foram mantidos em condições controladas de temperatura ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 horas) com livre acesso a ração e água antes dos experimentos. Os animais permaneceram no laboratório para sua adaptação por um período de pelo menos 1 hora (h) antes da realização dos experimentos. Todos os experimentos foram aprovados e estão de acordo com as normas do Comitê de Ética Institucional da UFAL (Protocolo nº 23065.12614/2006-89).

2. OBTENÇÃO DO FUNGO ENDOFÍTICO

As sementes de aroeira-vermelha, coletadas de planta sadia com cerca de seis anos de idade e três metros de altura, no

Campus A.C. Simões da UFAL, Maceió (AL), foram desinfectadas em etanol (70 %) durante 30 segundos, seguido por banho em solução de hipoclorito de sódio (10 %) durante 20 minutos. Em seguida, o material foi filtrado e as sementes lavadas com água destilada estéril por quatro vezes. Posteriormente, as sementes foram maceradas mecanicamente e semeadas em nove placas de Petri (quatro sementes/placa) contendo papel de filtro umedecido e meio BDA (batata-dextrose-ágar).

As sementes foram mantidas em meio BDA (Ilustração 1) por 40 dias sob iluminação constante à temperatura ambiente ($25 \pm 3^{\circ}\text{C}$). Após este período, utilizando-se características macroscópicas e micromorfológicas o fungo foi identificado como sendo uma fase teleomórfica da espécie *Rhizoctonia solani*.

Após a identificação, a biomassa foi fragmentado e transferido para 50 Erlenmeyers, onde ficou por mais 30 dias em meio BD (batata-dextrose) (Ilustração 2). Após esse período, a biomassa do fungo obtida foi seca em estufa (60°C) sendo em

seguida macerada mecanicamente e mantida em metanol por 24 horas para posterior fracionamento. Em seguida, o material foi aplicado à coluna de sílica, e o eluato obtido submetido ao rotaevaporador para evaporar o solvente. Em temperatura ambiente o material cristalizado obtido foi denominado fração metanólica (FM).

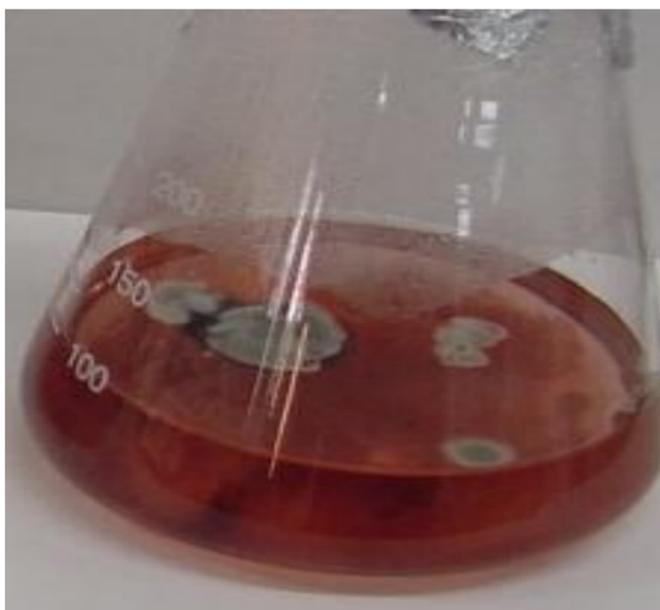


Ilustração 1. Crescimento do teleomorfo em meio BDA.



Ilustração 2. Biomassa do teleomorfo *R. solani* crescendo em meio BD.

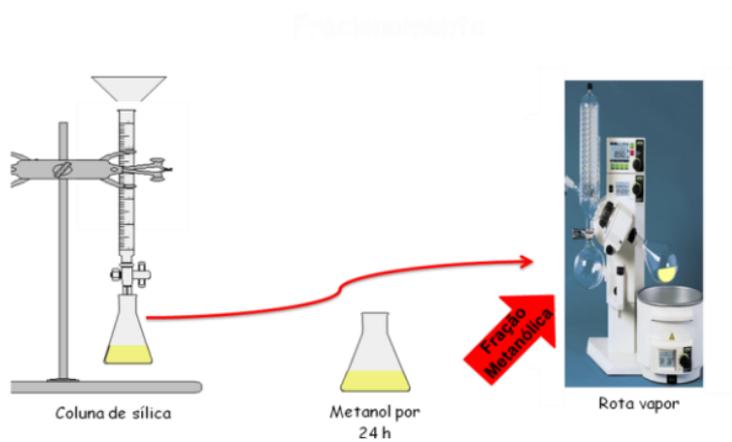


Ilustração 3. Fracionamento

3. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA

3.1. Teste de contorção abdominal induzida por ácido acético

A resposta nociceptiva foi induzida pela injeção intraperitoneal (i.p.) de ácido acético (0,8 %) diluído em água. O total de contorções abdominais foi registrado durante 10 minutos, tendo-se iniciado o registro da contagem 5 minutos após a injeção do ácido acético (Ilustração 3). O tratamento com a FM (0,1, 1, 10 e 100 mg/kg), soluções salina (NaCl, 0,9 %) ou indometacina (20 mg/kg), foi feito por via intraperitoneal (i.p.) por 1h ou até 8 h antes do estímulo algico.



Ilustração 4. Resposta nociceptiva (contorção abdominal) induzida por ácido acético em camundongo.

3.2. Teste da placa quente

Os camundongos foram colocados sobre uma placa de metal aquecida (54 ± 1 °C) e a resposta ao estímulo térmico, ato de saltar ou lambe uma das patas posteriores, foi registrado como tempo de latência (Ilustração 6). Foi adotado um *cut-off* (o tempo máximo de permanência do animal sobre a placa) de 30 segundos para preservar o animal de possíveis lesões causadas pela exposição a tempos superiores. Os animais

foram pré-tratados com a FM (1, 10 e 100 mg/kg, i.p.), salina ou morfina (5 mg/kg, i.p.), à medida do tempo de latência foi registrada no seguinte intervalo de tempo (60 min).



Ilustração 5. Animal exposta a placa quente (Hot Plate).

3.3. Teste de formalina

Neste modelo os animais receberam uma injeção intraplantar (i.pl) contendo 10 µl de solução de formalina a 2 % na pata posterior direita (Ilustração 4). Logo após a injeção da formalina, os animais foram colocados individualmente, sob funil de vidro invertido para facilitar a observação. O tempo que animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada com formalina foi avaliado durante 30 min, sendo este período considerado indicativo de nocicepção (Ilustração 5). Este modelo permite avaliar duas fases de sensibilidade dolorosa: a primeira fase, que ocorre durante os primeiros 5 minutos após a injeção de formalina (dor de origem neurogênica), e a segunda fase, que ocorre entre 15 a 30 minutos após a formalina, representando a dor inflamatória. Uma hora antes do estímulo nociceptivo os animais foram pré-tratados (i.p.) com a FM (10 mg/kg), salina ou indometacina (20 mg/kg) (HUNSKAAR e HOLE, 1987).

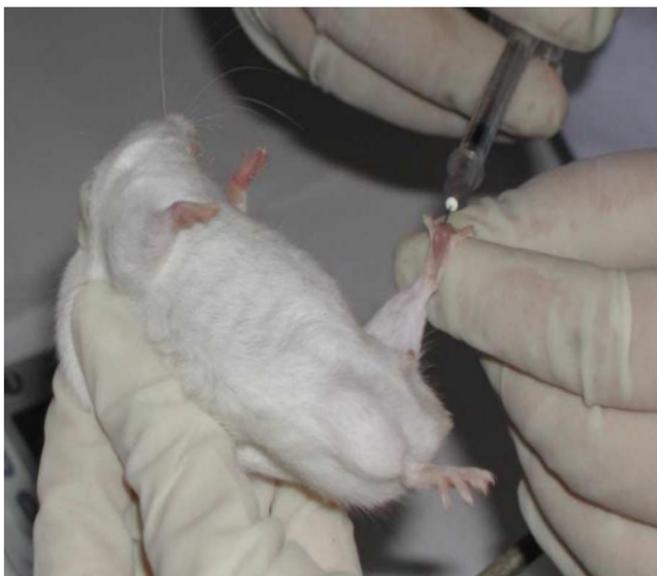


Ilustração 6. Injeção intraplantar (i.pl.) de formalina (2 %).



Ilustração 7. Resposta nociceptiva (lambida da pata) induzida pela injeção i.pl. de formalina (2 %).

4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA

4.1 Testes de edema de pata

A análise do edema de pata foi realizada com auxílio do aparelho de pletismômetro (Ilustração 7). O equipamento é composto por duas cubetas de acrílico ligadas através de sistema de vasos comunicantes e preenchidas com, água destilada, solução salina (0,45 %) e detergente (1 %). A pata do camundongo é imersa até a junção tíbio-tárcica em uma das cubetas, e o volume deslocado para a segunda cubeta – proporcional ao volume da pata imersa – é medido com auxílio de um sensor eletrônico de pressão e registrado. Os animais receberam uma injeção intraplantar com carragenina (300 µg/pata), histamina (100 µg/pata) ou PGE2 (100 ng/pata) na pata esquerda, sendo o volume final de 50 µl/pata. A pata direita recebeu apenas solução salina (NaCl, 0,9%). Os animais receberam 1 hora antes por via i.p. a FM (10 mg/kg) ou indometacina (20 mg/kg). Após

os diferentes estímulos o volume de cada pata foi avaliado em diferentes tempos (0,5, 1, 2 ou 4h) sendo os valores expressos em microlitros (μL) de acordo com a seguinte fórmula:

$$\Delta \text{Volume } (\mu\text{L}) = (\text{volume da pata esquerda}) - (\text{volume da pata direita}).$$



Ilustração 8. Avaliação do edema de pata utilizando o Pletismômetro.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram analisados através do teste de análise de variância do teste *t* e ANOVA, seguido do teste estatístico one-way de Newman-Keuls-Student. Os dados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (EPM) de no mínimo 4 animais, onde os valores de $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

RESULTADOS

1. ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DA FRAÇÃO METANÓLICA DO FUNGO ENDOFÍTICO RHIZOCTONIA SOLANI

1.1. Efeito da FM na nocicepção induzido por ácido acético

A contorção abdominal induzida por ácido acético decorre da irritação química na cavidade peritoneal. Mesmo sendo um modelo de nocicepção de fácil execução, o teste de contorção abdominal permite avaliar a atividade antinociceptiva de várias substâncias que atuam tanto em nível central quanto periférico (SHINDE *et al.*, 1999). Por se tratar de um método simples, econômico e rápido, este modelo foi o primeiro passo no estudo da atividade antinociceptiva da FM.

Conforme apresentado na Figura 1, o pré-tratamento dos animais por 1 hora com FM (0,1,1, 10 e 100 mg/kg, i.p.) foi capaz de produzir uma inibição significativa das contorções abdominais induzidas pelo ácido

acético em todas as doses testadas. Resultado semelhante também obteve o grupo tratado com um fármaco padrão, indometacina (20 mg/kg, i.p.).

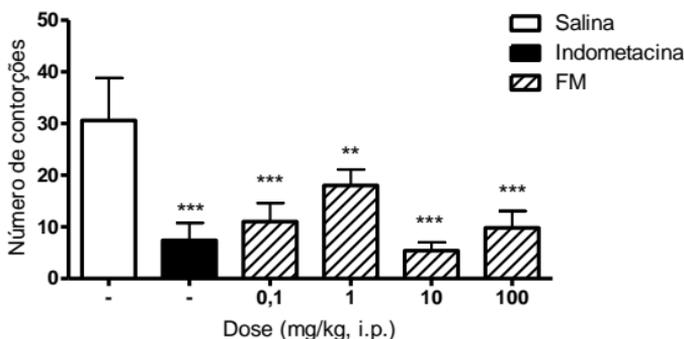


Figura 1. Efeito da FM na nociceção induzida por ácido acético em camundongos. Animais usados como controle foram tratados com solução salina ou com indometacina (20 mg/kg, i.p.). A FM, nas diferentes doses, foi administrada por via (i.p) 1 h antes do ácido acético. Cada valor representa a média \pm EPM (n = 6). As diferenças estatísticas foram determinadas pela análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Student-Newman-Keuls. (*) denota nível de significância comparado ao

grupo tratado com salina. $**P<0,01$ e $***P<0,001$.

1.2. Duração do Efeito FM na nocicepção induzido por ácido acético

Buscando avaliar a duração do efeito antinociceptivo induzido pelo FM, animais tratados com a FM foram, em diferentes tempos (30, 60, 120, 240 e 480 min), submetidos ao estímulo com ácido acético. Como mostrado na Figura 2, o tratamento com FM (10 mg/kg, i.p.) apresentou em 30 min um efeito antinociceptivo bastante significativo que perdurou por no mínimo 8 h.

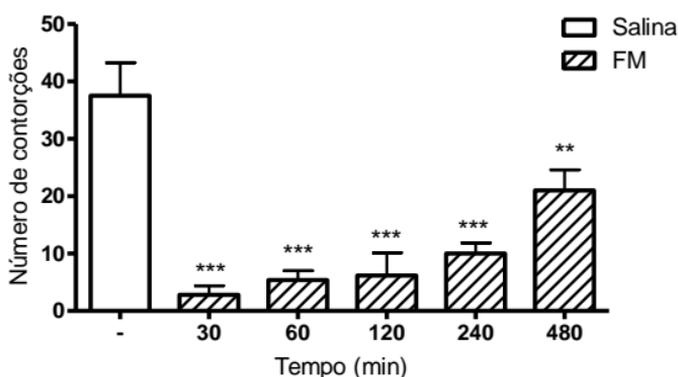


Figura 2. Duração do efeito antinociceptivo da FM. O número de contorções abdominais foi registrado em diferentes intervalos de tempo após tratamento da FM na dose de (10 mg/kg, i.p.). Animais controles receberam tratamento com salina. Cada ponto representa a média \pm EPM de 6 animais. As diferenças estatísticas foram detectadas com ANOVA seguidos com o teste de Newmann-Keuls-Student. ***P<0,001 denota nível de significância comparado ao grupo tratado com salina.

1.3. Efeito da FM na nocicepção induzida pela placa quente

Neste modelo, o estímulo térmico atua diretamente nos nociceptores periféricos com imediata condução do sinal ao SNC, sendo recebida pelo córtex cerebral e entendida como nociva ao organismo, emitindo o sinal de resposta como retirada imediata da parte do organismo em contato com a fonte agressora (KURAISCH et. al., 1983). Assim, podem-se avaliar os efeitos de fármacos com ação central como a

morfina, fármaco de referência nesse modelo, que age inibindo diretamente a transmissão ascendente das informações nociceptivas na medula espinhal e ativando circuitos eferentes que partem do mesencéfalo e chegam ao corno dorsal da medula (GUSTEIN; AKIIL, 2003).

De acordo com a Tabela 1, o pré-tratamento por 60 minutos com a FM, apenas nas doses de 10 e 100 mg/kg, foi capaz de aumentar o tempo de latência na percepção do estímulo nociceptivo induzido de placa quente (54 °C), indicando assim, que os efeitos antinociceptivos da FM parecem decorrer de uma ação central. Em outro grupo experimental, o tratamento com morfina revelou um aumento significativo no tempo de latência.

Tabela 1. Efeito da FM no modelo da placa quente.

Tratamento	Concentração (mg/kg)	Tempo de latência (s)
Salina	-	7,0 ± 1,5
	1	10,9 ± 3,7
	10	13,8 ± 2,9 *
FM	100	16,0 ± 4,0 *
	5	14,2 ± 2,7 *
Morfina		

A resposta foi analisada no tempo de 60 min após administração de salina, FM (1, 10 e 100 mg/kg, i.p.) ou morfina (5 mg/kg, i.p.). Os resultados foram representados pela média ± EPM de 6 animais. As diferenças estatísticas foram detectadas com ANOVA seguidos com o teste de Newmann-Keuls-Student. (*) $p < 0,05$ denota nível de significância comparado ao grupo salina.

1.4. Efeito da FM na nocicepção induzida pela formalina

Como mostra a Figura 3, o tratamento por via intraperitoneal com a FM (10 mg/kg) foi capaz de inibir a resposta nociceptiva induzida por formalina de maneira significativa tanto na fase neurogênica (0 a 5 min) quanto na fase inflamatória (15 a 30 min), quando comparado ao controle tratado com salina. Vale destacar que os animais que receberam indometacina (20 mg/kg, i.p.) apresentaram inibição da resposta nociceptiva apenas na fase inflamatória.

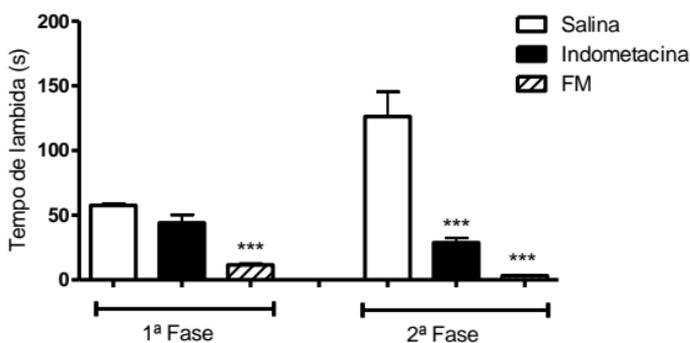


Figura 3. Efeito do tratamento com a FM sobre a nocicepção induzida por formalina.

Os animais foram tratados por via intraperitoneal com a FM (10 mg/kg), salina ou indometacina (20 mg/kg) e a nocicepção medida de 0-5 min (na primeira fase) e de 15-30 min (na segunda fase) após a injeção (i.pl.) de formalina. Os resultados foram representados pela média \pm EPM de 4 animais. As diferenças estatísticas foram detectadas com ANOVA seguidos com o teste de Newmann-Keuls-Student. ***P<0,001 denota nível de significância comparado ao grupo salina da respectiva fase.

Com propósito de avaliar o mecanismo de ação responsável pelas ações antinociceptivas da FM obtido a partir da biomassa do fungo *Rhizoctonia solani*, foi utilizado diferentes estratégias, incluindo antagonista opióide, dopaminérgico, adrenérgico, muscarínico e inibidor da enzima óxido nítrico sintase (L-NAME). Para todas as estratégias, os animais foram tratados previamente por 15 min antes da administração da FM (10 mg/kg, i.p.). Como revelado na Tabela 2, o tratamento com FM induziu um efeito antinociceptivo em ambas

as fases do teste de formalina, fenômeno que foi revertido apenas pelo pré-tratamento com naloxana, sugerindo que o sistema opióide esteja envolvido nas ações antinociceptivas da FM. Vale apenas ser observado também que outros antagonistas como metoclopramida e ioimbina intensificaram o efeito antinociceptivo da FM.

Tabela 2. Efeito do tratamento com a FM sobre a nocicepção induzida por formalina.

Pré-tratamento (i.p.)	Grupo	Tempo de lambida (s)	
		1 ^a Fase	2 ^a Fase
-	Salina	57,5 ± 1,2	180,8 ± 14,9
-	FM	11,5 ± 1,0 ***	60,6 ± 4,2 ***
Metoclopramida (1 mg/kg)	FM	4,3 ± 1,9	14,5 ± 6,5
Ioimbina (1 mg/kg)	FM	3,5 ± 0,9	5,6 ± 0,3
Atropina (1 mg/kg)	FM	17,5 ± 5,5	53,8 ± 8,4
L-NAME (20 mg/kg)	FM	11,8 ± 3,2	86 ± 29,9
Naloxona (1 mg/kg)	FM	35,8 ± 8,5 +	181,8 ± 31,3 +

Os animais foram tratados por via intraperitoneal com a FM (10 mg/kg) e salina, a nocicepção medida de 0-5 min. (na primeira fase) e de 15-30 min. (na segunda fase) após a injeção (i.pl.) de formalina. Os resultados foram representados pela média \pm EPM de 4 animais. As diferenças estatísticas foram detectadas com ANOVA seguidos com o teste de Newmann-Keuls-Student. ***P<0,001 denota nível de significância comparado ao grupo salina da respectiva fase. +P<0,05 denota nível de significância comparado ao grupo FM da respectiva fase.

2. ANÁLISE DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DA FRAÇÃO METANÓLICA DO FUNGO RHIZOCTONIA SOLANI NO MODELO DE EDEMA DE PATA INDUZIDA POR CARRAGENINA

Com a finalidade de analisar o efeito da FM sobre o processo inflamatório, utilizamos o modelo de edema de pata induzido por carragenina (300 μ g/50 μ l/pata). 1h antes os animais foram tratados com a FM (10 mg/kg, i.p.), e após 30, 60 120 ou 240 minutos o edema formado foi avaliado.

Os resultados demonstram que a FM induz uma redução significativa na formação do edema a partir de 60 minutos da injeção do estímulo até 4 horas. Vale destacar que este fenômeno se mostrou mais eficaz do que o grupo tratado com indometacina (Figura 4).

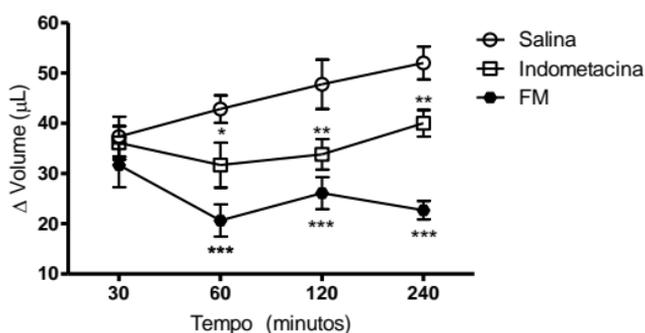


Figura 4. Efeito da FM sobre o edema de pata induzida por carragenina. Os animais foram pré-tratados com salina ou indometacina (20 mg/kg, i.p.) 1 h antes do estímulo. A avaliação foi realizada em diferentes tempos após injeção com carragenina (300µg/50µl, i.pl). Os resultados foram representados pela média ± EPM de 6 animais. As diferenças estatísticas foram detectadas com ANOVA seguidos com o teste de Newmann-Keuls-Student. (*)

denota nível de significância comparado ao grupo tratado com salina. ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$.

2.1. Efeito da FM sobre o edema de pata induzido por histamina

Dando continuidade à análise da influência da FM sobre os parâmetros da resposta inflamatória, utilizamos outros estímulos edematogênicos como histamina e PGE2. Assim, primeiramente os animais foram pré-tratados com FM (10 mg/kg, i.p.) e 1 h após foram estimulados na pata com histamina (100 µg/pata). Após 30 min da injeção com histamina o edema formado foi avaliado. Como demonstrado na Figura 5, o tratamento por 1 h com prometazina (5 mg/kg, i.p.), um antagonista de receptor histamínico, se mostrou efetivo na inibição da formação do edema induzido por histamina. Neste mesmo experimento, o pré-tratamento com FM reduziu de maneira significativa a formação do edema quando comparado ao grupo tratado com salina (Figura 5).

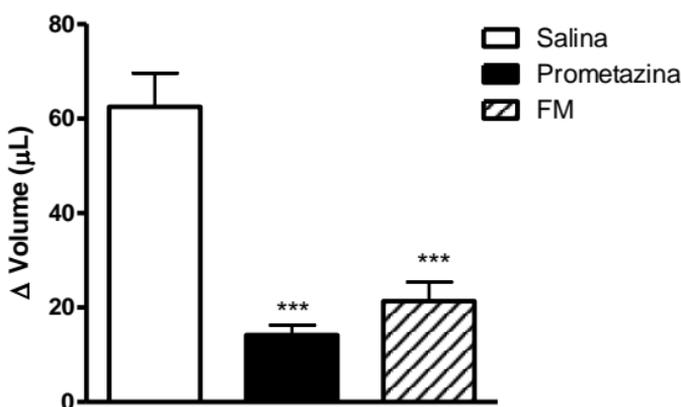


Figura 5. Efeito da FM sobre o edema de pata induzida por histamina. Os animais foram estimulados com histamina (100 μg/pata) e avaliados após 30 mim. Os animais foram pré-tratados com salina, prometazina (5 mg/kg, i.p.) ou FM (10 mg/kg, i.p.) 1 h antes do estímulo. Os resultados foram representados pela média ± EPM de 6 animais. As diferenças estatísticas foram detectadas com ANOVA seguidos com o teste de Newmann-Keuls-Student. ***P<0,001 denota nível de significância comparado ao grupo tratado com salina.

2.2. Efeito da FM sobre o edema de pata induzido por PGE₂

Em outro grupo experimental, os animais foram tratados com a FM (10 mg/kg, i.p.), e após 1 h, os animais foram estimulados com injeção intraplantar com PGE₂ para indução do edema. Neste experimento, verificamos que o estímulo com PGE₂ (100 ng/pata) foi capaz de induzir edema de maneira significativa, sendo que o pré-tratamento com FM foi capaz de inibir de modo significativo o edema formado (Figura 6). Indometacina (20 mg/kg, i.p.), administrado 1 h antes do estímulo, utilizado como controle, se mostrou efetivo na inibição da formação do edema induzido por PGE₂ (Figura 6).

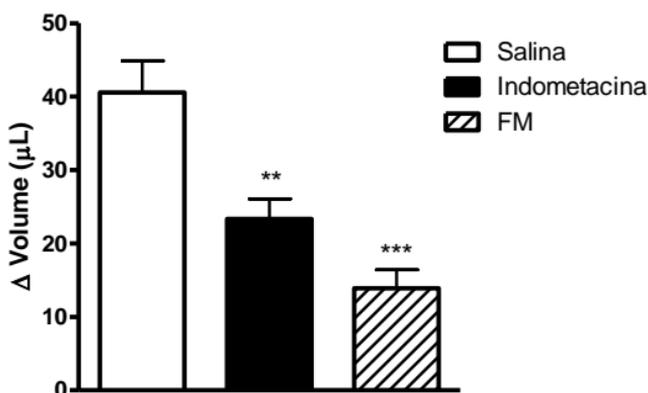


Figura 6. Efeito da FM sobre o edema de pata induzida por PGE2. Os animais foram estimulados com PGE2 (100 ng/pata) e avaliados após 1 h. Os animais foram pré-tratados com salina, indometacina (20 mg/kg, i.p.) ou FM (10 mg/kg, i.p.) 1 h antes do estímulo. Os resultados foram representados pela média \pm EPM de 6 animais. As diferenças estatísticas foram detectadas com ANOVA seguidos com o teste de Newmann-Keuls-Student. (*) denota nível de significância comparado ao grupo tratado com salina. ** $P < 0,01$ e *** $P < 0,001$.

DISCUSSÃO

Os resultados do presente estudo demonstram, pela primeira vez, que a fração metanólica obtida a partir da biomassa do fungo endofítico *Rhizoctonia solani* isolado das sementes da planta aroeira-vermelha apresentou uma atividade significativa antinociceptiva e antiinflamatória. Estes se mostram relevantes uma vez que não há registros científicos similares envolvendo outras espécies deste gênero.

A descoberta de novas substâncias com atividade analgésica e/ou antiinflamatória é ainda um aspecto altamente desejável e de enorme importância para a indústria farmacêutica e conseqüentemente, para utilização clínica. Várias evidências demonstram que um grande número de medicamentos utilizados terapêuticamente é derivado direta ou indiretamente de produtos naturais, especialmente de plantas superiores, sendo uma fonte inesgotável de possibilidades para a descoberta de novos medicamentos

(KOEHN e CARTER, 2005). Entretanto, várias dificuldades são encontradas por aqueles que desejam estudar as ações de produtos de origem natural em sistema biológico, como por exemplo, a escolha de modelos experimentais, a obtenção de extratos padronizados, a dificuldade de obtenção, isolamento e identificação das substâncias ativas. Somando-se a isso, muitas doenças estão associadas a múltiplos fatores, dificultando a escolha de um alvo específico para o estudo (COOKSON, 2004).

Atualmente, o uso clínico de novas substâncias com atividades analgésicas utilizadas principalmente para o tratamento de vários tipos de dor (tanto de origem neurogênica quanto inflamatória), vem aumentando significativamente. Vários modelos de analgesia em animais de laboratórios podem ser utilizados para verificar atividade antinociceptiva de frações e compostos isolados. No entanto, esses modelos possuem características próprias, que devem ser consideradas, tais como simplicidade, reprodutibilidade e

validade dos resultados obtidos e principalmente, a possibilidade de serem correlacionados com estudos clínicos (DICKENSON, 1997).

Inicialmente, este trabalho foi conduzido utilizando o modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, com a intenção de avaliar a atividade antinociceptiva da fração metanólica, bem como o tempo inicial de sua ação e a duração de seu efeito. O modelo do ácido acético vem sendo utilizado há muitos anos e se tornou uma valiosa ferramenta para a triagem de novos agentes com atividade analgésica e/ou antiinflamatória, tendo em vista que este modelo é sensível a fármacos com estas propriedades (TJOLSEN e Hole, 1997; LAFLAMME et al., 1999; LE BARS et al., 2001). A administração intraperitoneal de ácido acético provoca a liberação de muitos mediadores presentes no processo inflamatório, como as citocinas IL-1 β , IL-6, TNF- α , prostaglandinas, bradicinina entre outros, sendo considerado, portanto, um típico modelo de nocicepção inflamatória

visceral (RIBEIRO et al., 2000, IKEDA et al., 2001). A nocicepção causada pelo ácido acético, além de ser influenciada pelas muitas substâncias pró-inflamatórias liberadas, pode ser mediada em parte pela dissociação dos prótons presentes no ácido acético, que estimulam diretamente canais de cátions não seletivos, promovendo assim o início da dor visceral (IKEDA et al., 2001; JULIUS e BASBAUM, 2001; COUTAUX et al., 2005). De fato, a acidificação do tecido pode ocorrer em uma variedade de patologias, pois é bem conhecido que os prótons mostram-se envolvidos na geração da dor inflamatória (REEH e KRESS, 2001; VOILLEY et al., 2001). A fração metanólica do endofítico *R. solani* reduziu de forma significativa a nocicepção provocada pelo ácido acético em camundongos. Além disso, o tratamento com a fração metanólica produziu um efeito antinociceptivo máximo após 30 min de sua administração, efeito este, que decresceu de maneira gradual, permanecendo significativo por no mínimo 8 horas após sua administração.

Motivados pela ação antinociceptiva apresentada pela fração metanólica no modelo de contorção abdominal por ácido acético, buscamos avaliar se este efeito antinociceptivo seria decorrente de uma possível ação central. Para isso, os animais foram submetidos ao teste da placa quente. Este modelo mostra-se útil por permitir avaliar substâncias com ação central, tal como a morfina (ANKIER, 1974). Os fármacos que atuam por mecanismos centrais para impedir a nociceção, podem inibir a transmissão do sinal na via aferente ou eferente. A morfina, fármaco de referência, age inibindo diretamente a transmissão ascendente das informações nociceptivas na medula espinhal e ativando circuitos eferentes que partem do mesencéfalo e chegam ao corno dorsal da medula (GUSTEIN e AKIIL, 2003). A fração metanólica, foi capaz de aumentar significativamente o tempo de latência na percepção do estímulo nociceptivo no modelo de placa quente quando este foi administrado 60 minutos antes da aplicação do estímulo térmico, assim como o grupo

tratado com morfina. Deste modo, constatamos que os efeitos antinociceptivos da fração metanólica mostraram-se semelhantes ao da morfina, sugerindo uma ação central.

Tendo por base os dados anteriores, decidimos ampliar o conhecimento a respeito do efeito antinociceptivo da fração metanólica. Para isso, utilizamos o modelo de indução de nocicepção pela injeção intraplantar de formalina. Após 1 h do tratamento com a fração metanólica, administrado pela via intraperitoneal, observou uma redução tanto na primeira quanto na segunda fase da nocicepção induzida pela formalina. Este modelo permite avaliar dois tipos diferentes de dor, a dor neurogênica e a inflamatória. Na primeira fase deste modelo, caracterizada pela dor neurogênica, observa-se ativação direta dos nociceptores presentes em axônios não-mielinizados, como fibras C, e pouco mielinizadas, como as fibras A δ , acarretando na liberação de neuropeptídeos como SP e CGRP em terminais periféricos e centrais (MCCALL et al., 1996; PUIG e

SORKIN, 1996). Já na segunda fase, caracterizada pela dor inflamatória, a dor é mediada pela combinação de mecanismos de sensibilização, tanto na periferia quanto a nível central (HUNSKAAR e Hole, 1987; TJOLSEN et al., 1992).

Tem sido demonstrado que a injeção intraplantar de formalina em roedores provoca a liberação de várias substâncias algicas e pró-inflamatórias, as quais podem estar diretamente relacionadas às fases características deste modelo. Dentre as substâncias liberadas, podemos destacar o glutamato, prostaglandinas, óxido nítrico, taquicininas, prótons, bradicinina, dentre outros (TJOLSEN et al., 1992; MALMBERG, 1995; SANTOS e CALIXTO, 1997).

Com propósito de avaliar o mecanismo de ação usamos diferentes estratégias que incluem o uso dos antagonistas do sistema opióide, dopaminérgico, adrenérgico, muscarínicos e um inibidor da síntese de óxido nítrico (L-NAME) sobre a antinocicepção induzida pela FM no modelo de formalina.

O primeiro sistema investigado foi o dopaminérgico, utilizando a metoclopramida, um antagonista de receptores D2 e bloqueador de receptores 5-HT₃. A dopamina é um neurotransmissor cujo papel está diretamente relacionado a várias neuropatologias, incluindo dor e neurodegeneração. Estudos sugerem que o sistema dopaminérgico encontra-se ativado em situações que envolvem estresse através da liberação de opióides endógenos (WOOD, 2004). Como nossos resultados revelaram uma possível ação central da FM, e sabendo que na prática clínica, a metoclopramida é frequentemente usada concomitantemente com opiáceos como a morfina, pré-tratamos os animais com este antagonista e notamos que não houve reversão dos efeitos antinociceptivos da FM. Em sintonia com estes achados, Kamerman e colaboradores (2006) demonstraram que ondansetron, um bloqueador de receptores 5-HT₃, não interfere na sensibilidade nociceptiva e não afeta os efeitos antinociceptivos da morfina.

Em seguida, usamos um antagonista do receptor α_2 adrenérgico, a ioimbina. Os receptores α_2 estão envolvidos na inibição da transmissão sensorial por interferirem na condutância do cálcio, em neurônios sensoriais presentes no corpo dorsal da medula espinal, inibindo assim, a liberação de neurotransmissores (FURST, 1999). Nossos resultados revelam que o tratamento com ioimbina não foi capaz de reverter a antinocicepção da FM descartando assim a participação da via α_2 -adrenérgica nos efeitos induzidos por esta fração.

Recentes achados demonstram que a ativação periférica de receptores colinérgicos muscarínicos produz antinocicepção em diferentes modelos experimentais. Além disso, é conhecido o envolvimento da acetilcolina como modulador das respostas nociceptivas. Em adição, sabe-se que a atropina mostra-se capaz de reverter a antinocicepção determinada por antiinflamatórios não-esteroidais (PINARDI *et al.*, 2003). Desta forma, com propósito de avaliar o envolvimento do sistema muscarínico na

antinociceção da FM, tratamos os animais com atropina antes da administração da FM. Nossos resultados revelaram que a atividade antinociceptiva da FM não foi alterada pela atropina, sugerindo que a FM atinge seu efeito independente do sistema colinérgico.

Nos últimos anos diferentes trabalhos apontam para a participação do óxido nítrico (NO) em processos nociceptivos (Vallance e CHAN, 2001). Em nosso modelo, o L-NAME, um inibidor da biossíntese do óxido nítrico, administrado antes da FM não se mostrou capaz em reverter a antinociceção, descartando o envolvimento do NO neste processo antinociceptivo da FM.

Motivados ainda pelo importante efeito antinociceptivo da FM no modelo da placa quente e no modelo de formalina, verificamos o envolvimento do sistema opióide nesta antinociceção. Opióides são analgésicos amplamente usados na prática clínica, sendo a morfina o principal fármaco deste grupo com habilidade de aumentar o limiar de dor. Assim usamos a naloxona, um antagonista não seletivo dos receptores opióides, para investigar o envolvimento

deste sistema no efeito detectado. Nossos resultados mostram que a antinocicepção causada pela FM foi antagonizada pelo pré-tratamento com naloxona sugerindo que o mecanismo opióide esteja envolvido na antinocicepção da FM.

Sabendo-se que a segunda fase do teste de formalina mostra-se capaz de revelar substâncias envolvidas com a dor de origem inflamatória, e que a FM foi eficiente em inibir este parâmetro, decidimos investigar se a FM também seria capaz de modular outro parâmetro do processo inflamatório, como o aumento na permeabilidade vascular.

Para este fim, o modelo de edema de pata vem sendo amplamente utilizado para avaliar a atividade antiinflamatória de novos compostos, onde se utiliza vários estímulos como indutores do edema, incluindo carragenina, histamina, PGE2, entre outros (NANTEL et al., 1999; PASSOS et al., 2007; MARIOTTO et al., 2008).

Carragenina que é um poderoso agente inflamatório por estimular a produção e liberação de inúmeros mediadores no local

da administração que incluem histamina, serotonina e bradicinina, bem como por citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β e TNF- α , além da liberação de prostaglandinas e óxido nítrico, produzidos principalmente pelas isoformas de ciclooxigenase-2 (COX- 2) e óxido nítrico sintase induzida (iNOS), respectivamente (NANTEL *et al.*, 1999; POSADAS *et al.*, 2004). Este modelo é conhecido por induzir a formação de edema (HENRIQUES *et al.*, 1987), que se desenvolve nas 4 horas iniciais e é conhecido por produzir um edema intenso (POSADAS *et al.*, 2004). Sabendo-se disso, utilizando estímulos específicos, como a histamina ou PGE2, buscamos investigar um possível envolvimento direto da FM sobre a formação de edema desencadeada por estes mediadores. A histamina atinge seus efeitos ao se ligar a receptores específicos denominados receptores histaminérgicos (classificados ainda em H1, H2 e H3), enquanto a PGE2, um metabólito do ácido araquidônico produzidos pela ciclooxigenase, mostra-se capaz de causar

vasodilatação e aumentar a permeabilidade capilar gerando edema (SALEH et al., 1997).

Em nossos experimentos, verificamos que o edema induzido pela carragenina foi drasticamente inibido pela FM, fenômeno semelhante de inibição do edema pela FM também foi observado quando o estímulo foi a PGE₂, o que indica uma forte ação antiedematogênica desta fração. Além disso, a FM foi efetiva em prevenir o edema formado pela histamina.

De maneira conjunta, os resultados obtidos neste estudo revelam que a FM mostra-se possuidora de efeitos analgésicos e antiinflamatórios por mecanismos que parecem depender de receptores opióides, visto que no modelo de formalina a naloxona reverteu ambas as fases neurogênica e inflamatória da dor. Assim, em sintonia com estes achados, foi demonstrado anteriormente que o tratamento com morfina preveniu a formação do edema de pata, fenômeno revertido por naloxona (GYIRES et al., 1985; AMANN et al., 2002).

Portanto, nossos resultados revelam que a fração metanólica do fungo *Rhizoctonia solani*, obtido das sementes de aroeira-vermelha, apresentam uma importante ação analgésica e antiinflamatória/antiedematogênica.

CONCLUSÃO

A fração metanólica obtida da biomassa do fungo endofítico *Rhizoctonia solani* apresentou atividade antinociceptiva no modelo de contorção abdominal induzido por ácido acético, sendo um efeito persistente por no mínimo 8 h. A antinocicepção revelada pelo teste da placa quente sugere possíveis efeitos centrais da fração metanólica.

A fração metanólica foi capaz de inibir a nocicepção tanto na fase neurogênica quanto na fase inflamatória do teste de formalina, fenômeno que foi revertido apenas pelo pré-tratamento com naloxona, o que indica o envolvimento dos receptores opiáceos nas ações da fração metanólica. A fração metanólica exibiu

importante atividade antiinflamatória no modelo de edema de pata induzido por carragenina, histamina bem como por PGE2.

Estes resultados demonstram, pela primeira vez, o efeito antinociceptivo e antiinflamatório da fração metanólica obtida do fungo endofítico do gênero *Rhizoctonia solani*.

REFERÊNCIAS

ADAMS, G.C. *Thanatephorus cucumeris* (*Rhizoctonia solani*), a species complex of wide host range. **Advances in Plant Pathology**, v.6, p.535-552, 1988.

ADCOCK I.M, COSIO B, TSAPROUNI L, BARNES P.J, ITO K. Redox regulation of histone deacetylases and glucocorticoid-mediated inhibition of the inflammatory response. **Antioxid Redox Signal**, v.7 p.144-52, 2005.

ALFENAS AC.; SILVEIRA SF. Análise de proteínas e isoenzimas de isolados de *Rhizoctonia* spp patogênicos a *Eucalyptus*.

Fitopatologia brasileira, v.27, p.33-41, 2002.

ALMEIDA T.F., ROIZOINBLATT, S., TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomicla review. **Barim Res**, v.100, p.40-56, 2004.

AMANN, R., LANZ, I., SCHULIGOI, R. Effects of morphine on oedema and tissue concentration of nerve growth factor in experimental inflammation of the rat paw. **Pharmacology**, V.66, p.169-72, 2002.

ANAND, K.J.S.; CRAIG, K.D. New perspectives on the definition of pain. **Pain**, v. 67 p. 3-6, 1996.

ANDERSON, N.A. The genetics and pathology of *Rhizoctonia solani*. **Phytopathology, St. Paul**, v.20, p.329-344, 1982.

ANKIER S.I. New hot plate tests to quantify antinociceptive and narcotic antagonist activities. **Eur J Pharmacol**, v.27, p.1-4, 1974.

ARAÚJO, W. L.; AZEVEDO, J. L.

Isolamento e identificação de microrganismos de 11 porta-enxertos de *Citrus* sp. Anais da 20^a Reunião Anual de Genética de Microrganismos, Piracicaba; ESALQ/USP, v.20, p.111, 1995.

AZEVEDO, J. L.; MACCHERONI, W. Jr.;

PEREIRA, J. O. and ARAÚJO, W. L.

Endophytic microorganisms: a review on insect control and recent advances on tropical plants. **EJB: Electronic Journal of Biotechnology**, v.3, 2000.

BENHAMOU, N.; KLOEPPER, J. W. AND

TUZUN, S. Induction of resistance against *Fusarium* wilt of tomato by combination of chitosan with an endophytic bacterial strain: ultrastructure and cytochemistry of the host response. **Planta**, v.204, p.153-168, 1998.

BESSON, J.M. The complexity of physiopharmacologic aspects of pain.

Drugs, v.53, 1997.

BESSON, J.M. The neurobiology of pain.

Lancet, v.353, p.1610-1615, 1999.

BENTLEY, R. The development of penicillin: genesis of a famous antibiotic. **Perspect Biol Med**, v.48, p.44-52, 2005.

BOMBARDIER, C. An evidence-based evaluation of the gastrointestinal safety of coxibs. **Am J Cardiol**, v.89, p.3-9, 2002.

BOYTON RJ, OPENSHAW PJ. Pulmonary defences to acute respiratory infection. **Br Med Bull**, v.61, p.1-12, 2002.

BROCHE F, TELLADO JM. Defense mechanisms of the peritoneal cavity. **Curr Opin Crit Care**, v.7, p.105-16, 2001.

BUTLER, M. S. The role of natural product chemistry in drug discovery. **J Nat Prod**, v.67, p.2141-53, 2004.

BUTLER, E.E; BOLKAN, H. A medium for heterokaryon formation in *Rhizoctonia solani*. **Phytopathology**, v.63, p.542-543, 1973.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view. **J Ethnopharmacol**, v.100, p.131-134, 2005.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A.L.F.;
MORAIS, S.M.; SANTOS, L.F.L.;
ROCHA, M.F.G.; BEVILAQUA, C.M.L.
Validação de plantas medicinais com
atividade anti-helmíntica. Artigo de revisão.
Rev. Bras. Pl. Med., v.7, p.97-106, 2005.

CARR DB, GOUDAS LC. Acute pain.
Lancet, v.353, p. 2051-2058, 1999.

COGGESHALL, R.E.; CARLTON, S.M.
Receptor localization in the mammalian
dorsal horn and primary afferent neurons.
Brain Res. Rev., v. 24, p. 28-66, 1997.

COOKSON, W. The immunogenetics of
asthma and eczema: a new focus on the
epithelium. **Nature Rev Immunol**, v.4, p.
978-988, 2004.

COUTAUX, A., F. ADAM, J. C. WILLER
E D. LE BARS. Hyperalgesia and allodynia:
peripheral mechanisms. **Joint Bone Spine**,
v.72, p.359-371, 2005.

COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS,
T. Patologia estrutural e funcional. 6^a
edição. Editora Guanabara Koogan, 2000.

CHENG HY, PITCHER GM,
LAVIOLETTE SR, WHISHAW IQ, TONG
KI, KOCKERITZ LK, WADA T, JOZA
NA, CRACKOWER M, GONCALVES J,
SAROSI I, WOODGET JR, OLIVEIRA-
DOS-SANTOS AJ, IKURA M, VAN DER
KOOY D, SALTER MW, PENNINGER
JM. DREAM is a critical transcriptional
repressor for pain modulation. **Cell**, v.108,
p.31-43, 2002.

DALLOB, A., et al. Characterization of
etoricoxib, a Novel, Selective Cox-2
Inibitor. **J Clin Pharmacol**, v. 43 p. 573-
585, 2003.

DICKENSON, A. Mechanisms of central
hypersensitivity: excitatory amino acid
mechanisms and their control. In:
DICKENSON, A.; BESSON, J.-M. **The
pharmacology of pain**, p. 167-209, 1997.

DUIJFF, B.J.; GIANINAZZI-PEARSON,
V. AND LEMANCEAU, P. Involvement of
the outer membrane lipopolysaccharides in
the endophytic colonization of tomato roots
by biocontrol *Pseudomonas fluorescens*

strain WCS417r. **New Phytologist**, v.135, p.325-334, 1997.

FITZGERALD GA. COX-2 and beyond: Approaches to prostaglandin inhibition in human disease. **Nat Rev Drug Discov**, v.2, p. 879-90, 2003.

FÜRST, S. Transmitter involved in antinociception in the spinal cord. **Brain Res Bulletin**, v.48, p. 129-141, 1999.

GILROY DW, LAWRENCE T, PERETTI M, ROSSI AG. Inflammatory resolution: new opportunities for drug discovery. **Nat Rev Drug Discov**, v.3, p. 01-16, 2004.

GULLO, V. P., J. MCALPINE, K. S. LAM, D. BAKER E F. PETERSEN. Drug discovery from natural products. **J Ind Microbiol Biotechnol**, v.33, p.523-531, 2006.

GUSTEIN, H.B.; AKIIL, H. Analgesicos opioides. In: GOODMAN & GILMAN. As Bases farmacológicas da Terapêutica / editores responsáveis, Joel G. Hardman, Lee E. Limbird; editor-consultor, Alfred Doodman Gilman; [tradução da 10. ed. Original, Carla de Mello Vorsatz... et al.;

revisão técnica, Almir Lourenço da Fonseca]. – Rio de Janeiro; MacGraw. v.1, p. 333-340, 2003.

GYIRES K, BUDAVÁRI I, FÜRST S, MOLNÁR I. Morphine inhibits the carrageenan-induced oedema and the chemoluminescence of leucocytes stimulated by zymosan. **J Pharm Pharmacol**. v.37, p.100-4, 1985.

HALLMANN, J.; QUADT-HALLMANN, A.; MAHAFFEE, W. F. AND KLOEPFER, J. W. Bacterial endophytes in agricultural crops. **Canadian Journal of Microbiology**, v.43, p. 895-914, 1997.

HANSSON, P. M. Dampening inflammation. **Nature Immunol**, v.6, p.1179-1181, 2005.

HENRIQUES, M. G., P. M. SILVA, M. A. MARTINS, C. A. FLORES, F. Q. CUNHA, J. ASSREUY- FILHO E R. S. Cordeiro. Mouse paw edema. A new model for inflammation? **Braz J Med Biol Res**, v.20, p.243-249, 1987.

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

IADAROLA JM, CAUDLE RM. Good pain, bad pain. *Science*, v.278, p. 239-40, 1997.

IKEDA, Y., A. UENO, H. NARABA E S. OH-ISHI. Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanoids in the acid-induced writhing responses of mice. **Life Sci**, v.69, p.2911-9, 2001.

IRNICH, D.; BURGSTAHLER, R.; BOSTOCK, H.; GRAFE, P. ATP affects both axons and Schwann cells of unmyelinated C fibres. **Pain**, v. 92, p. 343-350, 2001.

JEFTINIJA, S.D.; JEFTINIJA, K.D. ATP stimulates release of excitatory amino acids from cultured Schwann cells. **Neuroscience**, v. 82, p. 927-934, 1998.

JULIUS, D. E A. I. BASBAUM. Molecular mechanisms of nociception *Nature*, v.413, p.203-10, 2001.

KOEHN FE, CARTER GT. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nat Rev Drug Disco**, v. 4, p. 206-220, 2005.

KURASHI Y.; HARADA Y., SATON, M., TAKAGI, H. Separate involvement of the spinal noradrenergic and serotonergic systems in morphine analgesia: the differences in mechanical and thermal algesic tests. **Brain Research**, v. 273, p. 245-252, 1983.

LAFLAMME, N., S. LACROIX E S. RIVEST. An essential role of interleukin-1beta in mediating NF-kappaB activity and COX-2 transcription in cells of the blood-brain barrier in response to a systemic and localized inflammation but not during endotoxemia. **J Neurosci**, v.19, n.24, Dec 15, p.10923-10930, 1999.

LAWRENCE T, WILLOUGHBY DA, GILROY DW. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. **Nat Rev Immunol**, v.2, p. 787-95, 2002.

LE BARS, D., M. GOZARIU E S. W. CADDEN. Animal models of nociception. **Pharmacol Rev**, v.53, p.597-652, 2001.

LEMKE, K.A. Understanding the pathophysiology of perioperative pain. **Can Vet J. V.** v.45, p. 405-413, 2004.

LEVESQUE, H. E O. LAFONT. [Aspirin throughout the ages: a historical review]. **Rev Med Interne**, v.21, p. 8-17, 2000.

LI, J.K.; STROBEL, G.; HARPER, J.; LOBKOVSKY, E.; CLARDY, J. Cryptocin, a potent tetramic antimycotic from the endophytic fungus *Cryptosporiopsis* cf. *quercina*. **Organ Letter**, v.23, p. 767-770, 2000.

LIU, D. Z.; LIANG, H. J.; CHEN, C. H.; SU, C. H.; LEE, T. H.; HUANG, C. T.; HOU, . C.; LIN, S. Y.; ZHONG, W. B.; LIN, P. J.; HUNG, L. F.; LIANG, Y. C. Comparative anti-inflammatory characterization of wild fruiting body, liquid-state fermentation, and solid-state culture of *Taiwanofungus camphoratus* in microglia and the mechanism of its action. **J Ethnopharmacol**, v. 113, p. 45-53, 2007.

LOMBARDINO, J. G. E J. A. Lowe, 3rd. The role of the medicinal chemist in drug discovery--then and now. **Nat Rev Drug Discov**, v.3, p.853-862, 2004.

LUCENA PL, RIBAS FILHO JM, MAZZA M, CZECHKO NG, DIETZ UA, CORREA NETO MA, HENRIQUES GS, SANTOS OJ, CESCHIN AP, THIELE ES. Evaluation of the aroreira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) in the healing process of surgical incision in the bladder of rats. **Acta Cir Bras**. v.21, p. 46-51, 2006.

MACIEL, M. A. M., PINTO, A.C., VEIGA, V.F., GRYNBERG, N.F., ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quim Nova**, v.25, p. 429-438, 2002.

MANDALA, S.M.; THORNTON, R.A.; ROSENBACH, M.; MILLIGAN, J.; GARCIA-CALVO, M.; BULL, H.G. AND KURTZ, M.B. Khafrefungin, a novel inhibitor of sphingolipid synthesis. **Journal Biology Chemistry**, v.272, p. 709-714, 1997.

MALMBERG, A. B. E T. L. Yaksh.
Cyclooxygenase inhibition and the spinal
release of prostaglandin E2 and amino acids
evoked by paw formalin injection: a
microdialysis study in unanesthetized rats. **J
Neurosci**, v.15, p. 2768-2776, 1995.

MCCALL, W. D., K. D. TANNER E J. D.
LEVINE. Formalin induces biphasic activity
in Cfibers in the rat. **Neurosci Lett**, v.208,
p.45-48, 1996.

MARIOTTO, S., E. ESPOSITO, R. DI
PAOLA, A. CIAMPA, E. MAZZON, A. C.
DE PRATI, E. DARRA, S. VINCENZI, G.
CUCINOTTA, R. CAMINITI, H. SUZUKI
E S. CUZZOCREA. Protective effect of
Arbutus unedo aqueous extract in
carrageenan-induced lung inflammation in
mice. **Pharmacol Res**, v.57, p.110-124,
2008.

MERSKEY, H. The definition of pain. **Eur.
J. Psychiatry**, v. 6, p. 153-159, 1991.
MILLAN, M.J. The induction of pain: an
integrative review. **Prog Neurobiol**. v.57, p.
1-164, 1999.

MILLER, K.E.; RICHARDS, B.A.;
KRIEBEL, R.M. Glutamine-,
glutaminesynthetase-, glutamate
dehydrogenase- and pyruvate
carboxylaseimmunoreactivities in the rat
dorsal root ganglion and peripheral nerve.
Brain Res., v. 945, p. 202-211, 2002.

MORADALI, M. F.; MOSTAFAVI, H.;
GHODS, S.; HEDJAROUDE, G. A.
Immunomodulating and anticancer agents in
the realm of macromycetes fungi
(macrofungi). **Int Immunopharmacol**, v. 7,
p. 701-24, 2007.

M'PIGA, P.; BÉLANGER, R. R.;
PAULITZ, T. C. AND BENHAMOU, N.
Increased resistance to *Fusarium oxysporum*
f. sp. *radicis-lycopersici* in tomato plants
treated with the endophytic bacterium
Pseudomonas fluorescens strain 63-28.
Physiological and Molecular Plant
Pathology, v.50, p. 301-320, 1997.

NANTEL, F., D. DENIS, R. GORDON, A.
NORTHEY, M. CIRINO, K. M. METTERS
e C. C. Chan. Distribution and regulation of
cyclooxygenase-2 in carrageenan-induced

inflammation. **Br J Pharmacol**, v.128, p.853-859, 1999.

NATHA, C. Points of control in inflammation. *Nature*, v. 420, p. 846-852, 2002.

PARK KA, VASKO MR. Lipid mediators of sensitivity in sensory neurons. **Trends Pharmacol Sci**, v.26, p. 571-577, 2005.

PASSOS, G. F., E. S. FERNANDES, F. M. DA CUNHA, J. FERREIRA, L. F. PIANOWSKI, M. M. CAMPOS e J. B. CALIXTO. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. **J Ethnopharmacol**, v.110, p.323-33, 2007.

PEDRAS MS, YU Y, LIU J, TANDRON-MOYA YA. Metabolites produced by the phytopathogenic fungus *Rhizoctonia solani*: isolation, chemical structure determination, syntheses and bioactivity. **Z Naturforsch**, v.60, p. 717-722, 2005.

PLEBAN. S.; CHERNIN, L. AND CHET, I. Chitinolytic activity of an endophytic strain

of *Bacillus cereus*. **Letters in Applied Microbiology**, v.25, p. 284-288, 1997.

PRADO, P.T.C.; DEL BEL, E. A. *C-fos*, na immediate early gene as a neuromaker for nociceptin. **Medicina Ribeirão Preto**, v,31, p.424-433,1998.

PETRINI, O. Fungal endophyte of tree leaves. In: Andrews, J. and Hirano, S. S. eds. Microbial ecology of leaves. New York: **Spring-Verlag**, p.179-197, 1991.

POSADAS, I., M. BUCCI, F. ROVIEZZO, A. ROSSI, L. PARENTE, L. SAUTEBIN e G. CIRINO. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. **Br J Pharmacol**, v.142, p.331-338, 2004.

PUIG, S. e L. S. SORKIN. Formalin-evoked activity in identified primary afferent fibers: systemic lidocaine suppresses phase-2 activity. **Pain**, v.64, p.345-355, 1996.

PUTZKE, J. & PUTZKE, M. T. L. Os Reinos dos fungos. Santa Cruz do Sul – RS: **Edunisc**. v.1. p.365-67, 1998.

RATES, S.M.K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603-13, 2001.

REEH, P. W. e M. KRESS. Molecular physiology of proton transduction in nociceptors. **Curr Opin Pharmacol**, v.1, p.45-51, 2001.

RIBEIRO, R. A., M. L. VALE, S. M. THOMAZZI, A. B. PASCHOALATO, S. POOLE, S. H. FERREIRA E F. Q. CUNHA. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **Eur J Pharmacol**, v.387, p.111-118, 2000.

RICHARDSON, D. H. S. War. In the world of lichens: parasitism an simbiosis as exemplified by lichens and lichenicolous fungi. **Mycological Research**, v.103, p.641-650, 1999.

ROCHA, A. P. C.; KRAYCHETE, D.C.; LEMONICA, L.; CARVALHO, L.R.; BARROS, G.A.M. De; GARCIA, J.B.S.; SAKATA, R.K. Pain: Current Aspects on Peripheral and Central Sensitization. **Rev. Bras. de Anest.** v. 57, 2007.

RODRIGUES, A. D., et al. Absorption, metabolism, and excretion of etoricoxib, a potent and selective cyclooxygenase-2 inhibitor, in healthy male volunteers. The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics. **DMD**, v.31, p. 224-232, 2003.

RODRIGUES, K.F.; HESSE, M. AND WERNER, C. Antimicrobial activities of secondary metabolites produced by fungi from *Spodias mombin*. **Journal of Basic Microbiology**, v.40, p. 261-267, 2000.

SAFAYHI H, SAILER ER. Anti-inflammatory actions of pentacyclic triterpenes. **Planta Med**, v.63, p. 487-493, 1997.

SAMPSON AP. The role of eosinophils and neutrophils in inflammation. **Clin Exp Allergy**, v.30, p. 22-27, 2000.

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

SALEH, T. S., J. B. CALIXTO e Y. S. MEDEIROS. Pro-inflammatory effects induced by bradykinin in a murine model of pleurisy. **Eur J Pharmacol**, v.331, p.43- 52, 1997.

SCHMID-SCHONBEIN, G. W. Analysis of inflammation. *Annu Rev Biomed Eng*, v.8, p. 93-131, 2006.

SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E.P., GOSMANN, G., De MELLO, J.C.P., MENTZ, L.A., PETROVICK, P.R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6 ed. Editora da UFRGS Porto Alegre. p. 75, 2007.

SHINDE, U. A.; PHADKE, A. S. Studies on the anti-inflammatory and analgesic activity of *Cedrus deodara* (Roxb.) Loud. wood oil. **J Ethnopharmacol**, v.65, p. 21-27, 1999.

SMITH, J. E.; ROWAN, N. J.; SULLIVAN, R. Medicinal mushrooms: a rapidly developing area of biotechnology for cancer therapy and other bioactivities. **Biotechnol Lett**, v. 24, p. 1845-1938, 2002.

SNEH, B.; BURPEE, L.; OGOSHI, A.
Identification of Rhizoctonia species.
Minnesota: USA. APS **Press**, 1991.

STROBEL, G.A. AND HESS, W.M.
Glucosylation of the peptide leucinostatin A,
produced by an endophytic fungus of
European yew, may protect the host from
leucinostatin toxicity. **Chemistry Biology**,
v.4, p. 529-536, 1999.

SZEKESSY-HERMANN, V. [Friedrich
Wohler synthesized urea 150 years ago].
Orv Hetil, v.119, p.3073-3075, 1978.

TJOLSEN, A., O. G. BERGE, S.
HUNSKAAR, J. H. ROSLAND e K.
HOLE. The formalin test: an evaluation of
the method. **Pain**, v.51, p.5-17, 1992.

TJØLSEN, A. e K. HOLE. Animal models
of analgesia. In: DICKENSON, A.,
BESSION, J. (Eds.), *The Pharmacology of
Pain*. Springer Verlag. **Berlin**, v.130, p.1-20,
1997.

TREEDE, R.D. Peripheral acute pain
mechanisms. **Ann Med**. v.27, p.213-216,
1995.

TROWBRIGDE HO, EMLING RC.
Mediadores químicos da resposta vascular.
In: Inflamação uma revisão do processo.
Quitessence Publishing Co. Inc., v.172,
p.27-42, 1996.

VALLANCE, P. e N. CHAN. Endothelial
function and nitric oxide: clinical relevance.
Heart, v.85, p.342-350, 2001.

VOILLEY, N., J. DE WEILLE, J. MAMET
e M. LAZDUNSKI. Nonsteroid anti-
inflammatory drugs inhibit both the activity
and the inflammation-induced expression of
cidsensing ion channels in nociceptors. **J**
Neurosci, v.21, p.8026-8033, 2001.

WALL, P.D. Introduction to the fourth
edition. In: WALL, P.D.; MELZACK, R.
Textbook of pain. **Churchill Livingstone**,
p. 1-8, 1999.

WASSER, S. P. Medicinal mushroom as a
source of antitumor and immunomodulation
polysaccharides. **Appl Microbiol**
Biotechnol, v. 60, p. 258-274, 2002.

WEBER C. Novel mechanistic concepts for the control of leukocyte transmigration: specialization of integrins, chemokines, and junctional molecules. **J Mol Med**, v.81, p. 4-19, 2003.

WILLIAMS TJ. Interactions between prostaglandins, leukotrienes and other mediators of inflammation. **Br Med Bull** 39(3):239-42, 1983.

WOOD PB. Stress and dopamine: implication for the pathophysiology of chronic widespread pain. **Med Hypoth.** 62: 420-424, 2004.

YUNES, R.A., CALIXTO, J.B. Plantas medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna. **Editora Argos, Chapecó.** 528 p. c.1, p. 20-4, 2001.

ZHANG, G. e S. GHOSH. Toll-like receptor-mediated NF-kappaB activation: a phylogenetically conserved paradigm in innate immunity. **J Clin Invest**, v.107, n.1, Jan, p.13-9. 2001.

ZOBERI, M. H. **Tropical Microfungi.** *Lodon: The Macmillan Press*, 1ª ed., p. 1, 1972.

FIGUEIREDO, C.A; GURGEL, I.G.D.; GURGEL Jr., G.D.– **A Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos: construção, perspectivas e desafios.** *Physis*, v.24, p.381-400, 2014.

Maseda D, Johnson E, Crofford L. **Production of inflammatory cytokines is regulated by mPGES-1- -Dependent PGE2 in T cells. Inflammatory Bowel Dis.** 2016.

Mrozkova P, Palecek J, Spicarova D. **The role of protease-activated receptor type 2 in nociceptive signaling and pain.** *Physiol Res.* 2016.

Oliveira Jr JO. **A cronificação da dor. O papel dos analgésicos anti-inflamatórios como os inibidores da ciclo-oxigenase do tipo 2 e dos anticonvulsivantes como os gabapentinóides na transição da dor aguda para crônica.** *Revisão clínica. Discutindo a dor.* 2014;71-7.

RADIASTUTI, N. et al. Endophytic Colletotrichum spp. from Cinchona calisaya wedd. and it's potential quinine production as antibacterial and antimalaria. AIP Conference Proceedings 1813, 020022, 2017, doi: 10.1063/1.4975960.

HUSSAIN, H. et al. Seimatoric acid and colletonoic acid: Two new compounds from the endophytic fungi, Seimatosporium sp. and Colletotrichum sp. Chinese Chemical Letters, v.25, n.12, p.1577-1579, 2014.

FERREIRA, M.C. et al. Molecular phylogeny, diversity, symbiosis and discover of bioactive compounds of endophytic fungi associated with the medicinal Amazonian plant Carapa guianensis Aublet (Meliaceae). Biochemical Systematics and Ecology, v.59, p.36-44, 2015.