

Propriedades Analgésica e Antiinflamatória do Extrato Metanólico de Folhas de *Annona coriacea* Mart. (Annonaceae)

Orlando V. SOUSA *¹, Glauciemar DEL-VECHIO-VIEIRA ¹ & Maria A. C. KAPLAN ²

¹ Departamento Farmacêutico, Faculdade de Farmácia e Bioquímica, Universidade Federal de Juiz de Fora, Campus Universitário, Martelos, CEP 36036-330, Juiz de Fora, MG, Brasil

² Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Ilha do Fundão, CEP 21941-590, Rio de Janeiro, RJ, Brasil

RESUMO. O presente trabalho investigou as propriedades analgésica e antiinflamatória do extrato metanólico das folhas de *Annona coriacea*. Foram realizados os testes de contorções abdominais, formalina, placa quente, edema de pata e pleurisia. O extrato reduziu, significativamente ($p < 0,001$), as contorções abdominais (50 mg/kg = $45,87 \pm 2,12$, 100 mg/kg = $29,87 \pm 2,30$ e 200 mg/kg = $29,62 \pm 1,24$) quando comparado ao grupo controle. Ambas as fases do tempo da lambida da pata também foram reduzidas ($p < 0,001$): 1ª fase (50 mg/kg = $52,87 \pm 1,83$, 100 mg/kg = $36,87 \pm 2,24$ e 200 mg/kg = $35,75 \pm 2,17$) e 2ª fase (50 mg/kg = $45,00 \pm 2,20$, 100 mg/kg = $34,25 \pm 2,49$ e 200 mg/kg = $32,62 \pm 2,22$). O tempo de latência sobre a placa quente aumentou na dose 200 mg/kg ($10,62 \pm 0,98$), sendo mais significativo ($p < 0,01$) após 90 minutos de tratamento. A dose de 200 mg/kg teve efeito significativo ($p < 0,01$) sobre o edema de pata ($0,70 \pm 0,06$), o volume do exsudato ($1,42 \pm 0,14$) e a migração leucocitária ($15,58 \pm 0,74$). Estes resultados sugerem que o extrato metanólico de *A. coriacea* possui propriedades analgésica e antiinflamatória, o que pode justificar sua utilização na medicina popular.

SUMMARY. "Analgesic and Anti-inflammatory Properties of *Annona coriacea* Mart. (Annonaceae) Leaves Methanol Extract". In the present study, the analgesic and the anti-inflammatory properties of *A. coriacea* methanol extract were investigated. The experiments were performed by acetic acid writhing, paw licking induced by formalin, hot plate, paw edema and pleurisy. The extract inhibited ($p < 0.001$) the abdominal contortions (50 mg/kg = 45.87 ± 2.12 , 100 mg/kg = 29.87 ± 2.30 and 200 mg/kg = 29.62 ± 1.24) when compared with control group. Both phases of paw lick were reduced ($p < 0.001$): 1st phase (50 mg/kg = 52.87 ± 1.83 , 100 mg/kg = 36.87 ± 2.24 and 200 mg/kg = 35.75 ± 2.17) and 2nd phase (50 mg/kg = 45.00 ± 2.20 , 100 mg/kg = 34.25 ± 2.49 and 200 mg/kg = 32.62 ± 2.22). At the dose 200 mg/kg (10.62 ± 0.98), the effect on the reaction time at hot plate had been significant ($p < 0.01$) after 90 minutes of treatment. The dose 200 mg/kg showed significant effects on the paw edema (0.70 ± 0.06), the volume of the exudate (1.42 ± 0.14) and the leukocytes migration (15.58 ± 0.74). These results suggest that the methanol extract from *A. coriacea* has analgesic and anti-inflammatory properties and this data could explain the popular application.

INTRODUÇÃO

A família Annonaceae inclui 112 gêneros com aproximadamente 2.150 espécies tropicais e subtropicais, espalhadas por todo o planeta. Dos gêneros existentes, há 29 registrados no Brasil, compreendendo cerca de 260 espécies, destacando-se o *Annona*¹. *Annona coriacea* Mart. (Annonaceae), popularmente conhecida como araticum, é encontrada nas regiões Sudeste, Norte e Nordeste do Brasil, especialmente no

Ceará²⁻⁴. As folhas são usadas na medicina popular como carminativa, estomáquica, anti-reumática e anti-helmíntica por via oral e, externamente, em compressas e bochechos, no tratamento de estomatite, nevralgias e cefaléias, bem como, na forma de cataplasma em furúnculos e úlceras para induzir a supuração^{4,5}.

Estudos fitoquímicos das raízes de *A. coriacea* identificaram diterpenóides com esqueleto clerodano⁶ e acetogeninas, tais como coriedie-

PALAVRAS-CHAVE: *Annona coriacea*, Annonaceae, atividade analgésica, atividade antiinflamatória.

KEY WORDS: *Annona coriacea*, Annonaceae, analgesic activity, anti-inflammatory activity.

* Autor a quem correspondência deve ser enviada. E-mail: orlando.sousa@ufjf.edu.br

nina, biseopoxicoriadienina, coriacina, 4-deoxicoriacina, gigantetronenina e gigantecina, que demonstraram atividade citotóxica contra células tumorais ⁷⁻⁹. Uma lectina, denominada ACLEC, caracterizada nas sementes de *A. coriacea* ¹⁰, aumentou a migração de neutrófilos na cavidade abdominal em camundongos ¹¹. Extrato alcoólico das sementes também demonstrou efeito genotóxico, aumentando a frequência de micronúcleos em eritrócitos da medula óssea de camundongos ¹².

Devido suas aplicações terapêuticas na medicina popular, o presente trabalho teve como objetivo investigar as propriedades analgésica e antiinflamatória do extrato metanólico das folhas de *A. coriacea* através dos modelos de nocicepção e inflamação induzidos em animais de laboratório.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta do material vegetal

Annona coriacea foi coletada em Camocim, Ceará, Brasil, em fevereiro de 2005. Uma exsiccata, identificada por Dra. Rita de Cássia Almeida Lafetá, foi depositada no Herbário do Museu Nacional da Universidade Federal do Rio de Janeiro sob nº de registro 195596, Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brasil.

Preparo dos extratos

As folhas foram submetidas à secagem a 50 °C, sob ventilação forçada, com perda de aproximadamente 92% de sua umidade. O material botânico (600 g) foi triturado em moinho mecânico e pulverizado em tamise de malha 80. O extrato metanólico foi obtido por maceração estática durante três semanas com oito trocas de solvente. Após remoção do metanol, o extrato bruto foi solubilizado em dimetilsulfóxido (DM-SO) 1% (v/v) em salina para avaliação das atividades farmacológicas.

Animais

Foram utilizados camundongos Swiss (25-30 g) machos e ratos Wistar (200-240 g) machos provenientes do Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora. Os animais foram mantidos em gaiolas plásticas com ração e água *ad libitum* em temperatura ambiente. Os animais foram privados de ração doze horas antes da realização dos procedimentos. Os protocolos (registro nº 033/2005-CEEA) utilizados foram aprovados pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal desta instituição.

Avaliação da toxidez aguda

Grupos de 10 camundongos receberam doses de 0,5, 1, 1,5, 2 e 3 g/kg do extrato metanólico de *A. coriacea* por via oral, enquanto no grupo controle foi administrado salina. Os grupos foram observados por 48 h, registrando-se a mortalidade dos animais ¹³. A DL₅₀ foi determinada através do método dos probitos usando a porcentagem da mortalidade e o logaritmo das doses seguido de regressão linear ¹⁴.

Avaliação da atividade analgésica

Teste de contorções abdominais

O extrato metanólico (50, 100 e 200 mg/kg) foi administrado, por via oral (v.o.), em camundongos (n = 8) ¹⁵. Após 1 h de tratamento, 10 mL/kg de ácido acético 0,6% foram administrados intraperitonealmente e o nº de contorções abdominais contado entre 10 e 30 min após esse procedimento. O grupo controle recebeu 10 mL/kg de salina (v.o.). Indometacina (10 mg/kg, v.o.) foi o controle positivo do teste e serviu para validar o método.

Teste da formalina

Injeção de 20 µL de formalina 2,5% (em salina estéril) foi aplicada no espaço subplantar da pata direita dos camundongos (n = 8) e a duração do tempo da lambida foi determinada de 0 a 5 min (1ª fase) e 15 a 30 min (2ª fase) após aplicação da formalina ¹⁶. O extrato de *A. coriacea* foi administrado nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg (v.o.) 1 hora antes da injeção da formalina. Os animais controle (n = 8) receberam 10 mL/kg de salina (v.o.). Morfina (1 mg/kg, subcutânea) foi usada como controle positivo do teste (n = 8) e serviu para validar o método.

Teste da placa quente

Grupos de camundongos foram tratados com o extrato metanólico (50, 100 ou 200 mg/kg, v.o.; 0,1 mL/10 g) e o grupo controle recebeu salina (10 mL/kg) (n = 8). Os animais foram colocados em placa quente aquecida a 55±1 °C ¹⁷. As medidas foram realizadas nos tempos zero, 30, 60 e 90 min após administração do extrato, com tempo máximo de permanência (*cut-off*) de 40 s. Em um grupo de animais (n = 8), o efeito do pré-tratamento com naloxona (1 mg/kg, s.c.) sobre a analgesia produzido pelo extrato (200 mg/kg, v.o.) foi determinado. Morfina (1 mg/kg, s.c.), na ausência e na presença de naloxona (n = 8), foi usada como controle positivo do teste e serviu para validar o método.

Avaliação da atividade antiinflamatória *Edema de pata induzido por carragenina*

O edema de pata foi induzido pela injeção de 0,1 mL de carragenina (2% p/v) em salina estéril e administrada na região subplantar da pata direita de rato Wistar machos (n = 6). Os extratos de *A. coriacea* foram administrados (v.o.) nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg 1 h antes da injeção de carragenina¹⁸. O grupo controle recebeu 10 mL/kg de salina (v.o.). Na pata esquerda, usada como controle, foi injetada 0,1 mL de salina estéril. Após 4 h de injeção de carragenina, a medida do edema foi feita pela diferença entre o volume deslocado pela pata direita e pela pata esquerda. Indometacina (10 mg/kg, v.o.) foi usada como controle positivo do teste (n = 8) e serviu para validar o método.

Pleurisia induzida por carragenina

A pleurisia foi induzida em ratos Wistar pela injeção intrapleurar de 0,5 mL, entre a terceira e a quinta costela do lado direito do mediastino, de uma suspensão de carragenina 2% em solução salina estéril¹⁹. Grupos de seis ratos foram tratados com extratos de *A. coriacea* (50, 100 e 200 mg/kg, v.o.), indometacina (10 mg/kg, v.o.) ou 10 mL/kg de DMSO 1% v/v em salina (v.o.) 1 h antes da aplicação do agente inflamatório. Após 4 h da indução da inflamação, os animais foram anestesiados com cloridrato de cetamina (75 mg/kg) e cloridrato de xilazina (10 mg/kg) e sacrificados. Uma incisão foi feita entre a terceira e quinta costela em cada lado do mediastino. O exsudato pleural foi coletado, transferido a um tubo cônico de centrifuga e o volume foi determinado. Uma alíquota de 50 µL do exsudato foi usada para determinar a contagem total de leucócitos em câmara de Neubauer.

Análise estatística

Os resultados foram demonstrados através da média(erro padrão. Análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Student Newman-

Keuls foi utilizada para medir o grau de significância (p < 0,05).

RESULTADOS

Nas doses administradas, o extrato metanólico das folhas de *A. coriacea* não foi tóxico aos animais, não sendo possível determinar a DL₅₀ com exatidão no experimento avaliado. A dose de 3 g/kg não produziu mortalidade nos camundongos, no entanto, o resultado observado serviu como parâmetro para definição das doses nas experiências de atividades analgésica e antiinflamatória.

As doses de 50, 100 e 200 mg/kg do extrato de *A. coriacea* reduziram, significativamente (p < 0,001), as contorções abdominais em 24,95, 51,13 e 51,53% em relação ao controle, respectivamente (Tabela 1). A injeção intrapleurar de formalina promoveu uma resposta característica bifásica (Tabela 2). A duração do tempo de lambida na primeira fase (0-5 min) foi de 85,37±3,26 s e na segunda fase (15-30 min) foi de 87,25±2,92 s para o grupo controle. Após 60 min de tratamento, as doses de 50, 100 e 200 mg/kg do extrato metanólico de *A. coriacea* inibiram, significativamente (p < 0,001), a primeira fase (38,06, 56,81 e 58,12%) e a segunda fase (48,42, 60,74 e 62,58%) em relação ao controle, respectivamente.

O extrato metanólico de *A. coriacea* aumentou o tempo de latência de camundongos expostos à placa quente (Tabela 3). No tempo zero, não houve efeito significativo quando comparado ao grupo controle. Após 30, 60 e 90 min de tratamento, a dose de 200 mg/kg aumentou, significativamente (p < 0,05 ou p < 0,01), o tempo de latência em 26,92, 35,95 e 66,72% em relação ao grupo controle, respectivamente. A morfina mostrou-se um potente analgésico, aumentando o tempo de latência nos tempos avaliados. A naloxona, um antagonista opióide, reduziu o efeito da morfina, mas não alterou o efeito antinociceptivo do extrato testado.

Grupos	Doses (mg/kg)	Número de Contorções	Inibição (%)
Controle	Salina	61,12±1,95	-
	50	45,87±2,12***	24,95
Extrato Metanólico	100	29,87±2,30***	51,13
	200	29,62±1,24***	51,53
Indometacina	10	9,75±0,88***	84,05

Tabela 1. Efeito do extrato metanólico de *A. coriacea* sobre as contorções abdominais induzidas por ácido acético (n = 8). ***P < 0,001. Significativos após análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Student Newman-Keuls quando comparados ao controle.

Grupos	Doses (mg/kg)	Tempo de Reação (s)			
		1ª Fase (s)	Inibição (%)	2ª Fase (s)	Inibição (%)
Controle	Salina	85,37±3,26	-	87,25±2,92	-
	50	52,87±1,83***	38,06	45,00±2,20***	48,42
Extrato Metanólico	100	36,87±2,24***	56,81	34,25±2,49***	60,74
	200	35,75±2,17***	58,12	32,62±2,22***	62,58
Morfina	1	15,62±1,47***	81,70	10,00±1,41***	88,54

Tabela 2. Efeito do extrato metanólico de *A. coriacea* sobre o tempo de reação da lambida da pata induzido por formalina (n = 8). ***P < 0,001. Significativos após análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Student Newman-Keuls quando comparados ao controle.

Grupos	Doses (mg/kg)	Tempo de Latência (s)			
		Zero	30 min	60 min	90 min
Controle	Salina	6,62±0,56	6,50±0,57	6,62±0,62	6,37±0,59
	50	6,75±0,53	6,87±0,52	6,75±0,67	6,62±0,60
Extrato Metanólico	100	6,62±0,59	7,12±0,85	7,50±0,84	7,87±0,72
	200	6,75±0,59	8,25±0,53*	9,00±0,78*	10,62±0,98**
Morfina	1	6,50±0,57	17,37±0,62***	19,37±0,84***	22,37±1,10***
Naloxona+Morfina	1+1	6,50±0,63	10,25±0,75**	9,87±0,64**	9,25±0,96*
Naloxona+Extrato	1+200	6,75±0,59	9,50±0,78**	10,25±0,98**	11,12±1,08**

Tabela 3. Efeito do extrato metanólico de *A. coriacea* sobre o tempo de latência de camundongos expostos à placa quente (n = 8). *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001. Significativos após análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Student Newman-Keuls quando comparados ao controle.

Grupos	Doses (mg/kg)	Volume Deslocado (mL)	Inibição (%)
Controle	Salina	1,08±0,09	-
	50	1,07±0,08	-
Extrato Metanólico	100	0,82±0,06*	16,67
	200	0,70±0,06**	35,18
Indometacina	10	0,52±0,06***	51,85

Tabela 4. Efeito do extrato metanólico de *A. coriacea* sobre o edema de pata induzido por carragenina (n = 6). * P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001. Significativos após análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Student Newman-Keuls quando comparados ao controle.

O efeito antiinflamatório do extrato metanólico de *A. coriacea* avaliado pelo o método do edema de pata induzido por carragenina é mostrado na Tabela 4. A inibição do edema foi observada nas doses de 100 mg/kg (16,67%; p < 0,05) e 200 mg/kg (35,18%; p < 0,01) em relação ao controle. A indometacina reduziu o edema de pata em 51,85%.

Os efeitos sobre a pleurisia demonstraram que as doses de 100 mg/kg (p < 0,05) e 200 mg/kg (p < 0,01) dos extratos reduziram, signifi-

cativamente, o volume do exsudato e o nº de leucócitos totais (Figura 1 e Figura 2). O volume do exsudato foi reduzido em 18,67 e 33,02% nas doses de 100 e 200 mg/kg em relação ao controle, respectivamente. A inibição da migração leucocitária ocorreu nas doses de 100 mg/kg (16,87±0,57; p < 0,05) e 200 mg/kg (15,58±0,74; p < 0,05). Não houve diferença significativa entre polimorfonucleares e mononucleares em relação ao controle. A indometacina reduziu o volume do exsudato e a migração leucocitária.

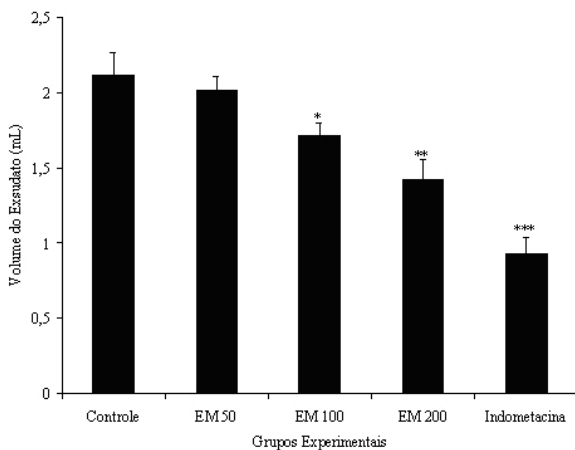


Figura 1. Efeito do extrato metanólico de *A. coriacea* sobre o volume do exsudato da pleurisia induzida por carragenina (n = 6). Indometacina (10 mg/kg) foi o controle positivo teste. EM = Extrato metanólico (50, 100 e 200 mg/kg). *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001. Significativos após análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Student Newman-Keuls quando comparados ao controle.

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Embora estudos tenham demonstrado que *A. coriacea* possui efeito citotóxico⁷⁻⁹ e genotóxico¹², o ensaio de toxicidade aguda mostrou que o extrato metanólico das folhas de *A. coriacea* não foi tóxico nas doses testadas. Como os modelos de avaliação da toxidez e os extratos são diferentes, não foi possível confrontar o resultado com os estudos citados na literatura. No entanto, como não havia nenhum relato sobre a definição de doses farmacológicas para as folhas, este parâmetro foi fundamental para testar as doses neste estudo.

Baseado nos resultados observados neste estudo, o extrato metanólico de *A. coriacea* possui propriedades analgésicas sobre o sistema nervoso periférico e central, sendo pela primeira vez descrito na literatura. Os resultados demonstram que o extrato reduziu as contorções abdominais, sugerindo a inibição da síntese de prostaglandinas pela via da ciclooxigenase²⁰. Além disso, o efeito central e periférico foi demonstrado através de uma resposta bifásica do tempo da lambida da pata induzida por formalina¹⁶. A ação central foi confirmada no teste da placa quente (200 mg/kg), mostrando que o efeito máximo é alcançado após 90 min da resposta. Foi também observado que a ação analgésica do extrato não dependente do sistema opióide, pois o tratamento com naloxona, antagonista opióide, não reverteu o efeito produzido. O teste do tempo da lambida da pata também indi-

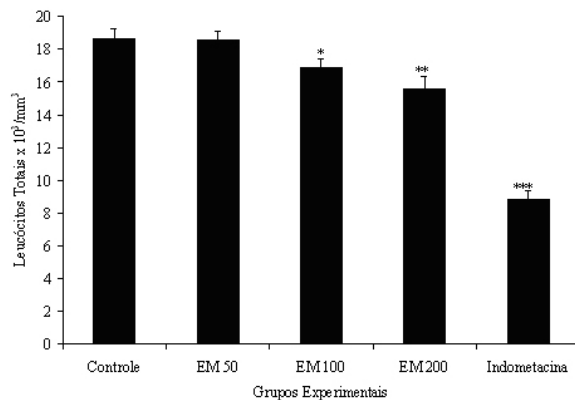


Figura 2. Efeito do extrato metanólico de *A. coriacea* sobre o nº de leucócitos totais no exsudato da pleurisia induzida por carragenina (n = 6). Indometacina (10 mg/kg) foi o controle positivo teste. EM = Extrato metanólico (50, 100 e 200 mg/kg). *P < 0,05; **P < 0,01; ***P < 0,001. Significativos após análise de variância (ANOVA) seguido do teste de Student Newman-Keuls quando comparados ao controle.

cou uma possível atividade antiinflamatória, pois a segunda fase foi reduzida a partir de 50 mg/kg.

A atividade antiinflamatória do extrato metanólico de *A. coriacea* sugerida no teste da formalina foi confirmada pelo modelo do edema da pata induzido por carragenina através da redução do volume deslocado (Tabela 4). Como agente inflamatório, a carragenina induz inflamação pela liberação de prostaglandinas, ocasionando a formação de um edema. Antiinflamatórios não-esteróides, como a indometacina, inibem a ciclooxigenase, reduzindo a biossíntese de prostaglandina e o edema de pata²¹. Provavelmente, o extrato testado possui ação semelhante a este antiinflamatório.

A injeção intrapleural de carragenina ocasiona a formação do exsudato na cavidade pleural^{22,23} e a migração leucocitária^{23,24}. É um método bastante interessante, pois avalia o infiltrado inflamatório e confirma os resultados obtidos no edema de pata. Os antiinflamatórios não-esteróides, tal como a indometacina, inibem o acúmulo do exsudato e mobilização de leucócitos entre 3 e 6 horas após aplicação da carragenina^{19,23}. Ao reduzir o volume do exsudato e a migração leucocitária, o extrato metanólico de *A. coriacea* corroborou com os resultados do edema de pata (Tabela 3, Figuras 1 e 2).

O extrato metanólico das folhas de *A. coriacea* possui propriedades analgésica e antiinflamatória como demonstrado pelos métodos em-

pregados, sugerindo suas potencialidades para fins terapêuticos. Os resultados confirmam seu emprego na medicina popular, entretanto, novos estudos necessitam ser realizados para garantir seu uso seguro.

Agradecimentos. Nossos agradecimentos ao CNPq e a UFJF pelo apoio financeiro.

REFERÊNCIAS

1. Di Stasi, L.C. & C.A. Hiruma-Lima (1989) "Plantas medicinais na Amazônia e na mata Atlântica", (UNESP, ed.), São Paulo, págs. 87-112.
2. Barreira, S., J.R.S. Scolforo, S.A. Botelho & J.M. Mello (2002) *Scientia Forestalis* **61**: 64-78.
3. Meira Neto, J.A.A. & A.W. Saporetti (2002) *R. Árvore* **26**: 645-8.
4. Sousa, O.V. (2003) "Atividades farmacológicas de produtos obtidos de *Duguetia lanceolata* e *Annona coriacea* - Annonaceae". Rio de Janeiro: UFRJ. 143p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Vegetal).
5. Lorenzi, H. & F.J.A. Matos (2002) "Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas", (Instituto Plantarum, ed.), Nova Odessa, págs. 62-63.
6. Ferrari, M. & F. Pellizzoni (1971) *Phytochemistry* **12**: 3267-9.
7. Yu, J.G., X.E. Hu, D.K. Ho, M.F. Bean, R.E. Stephens, J.M. Cassady, L.S. Brinen & J. Clardy (1994) *J. Org. Chem.* **59**: 1598-9.
8. Silva, E.L.M., F. Roblot, O. Laprévote, P. Varenne & A. Cavé (1995) *Nat. Prod. Lett.* **7**: 235-42.
9. Silva, E.L.M., F. Roblot, J. Mahutaeau & A. Cavé (1996) *J. Nat. Prod.* **59**: 528-30.
10. Coelho, M.B., M.G.M. Freire, M.H. Toyama, S. Marangoni, J.C. Novello & M.L.R. Macedo (2003) *Prot. Peptide Lett.* **10**: 165-73.
11. Coelho, M.B., I.A. DeSouza, M.G.M. Freire, S. Marangoni, E. Antunes & M.L.R. Macedo (2006) *Toxicon* **48**: 529-35.
12. Fagundes, F.A., L.B. Oliveira, L.C. Cunha & M.C. Valadares (2005) *Rev. Elet. Farm.* **2**: 24-9.
13. Dietrich, L. (1983) *Arch. Toxicol.* **54**: 275-87.
14. Litchfield, J.T. & F. Wilcoxon (1949) *J. Pharmacol. Exp. Therap.* **96**: 99-113.
15. Koster, R., M. Anderson & E.J. Beer (1959) *Federation Proceedings* **18**: 412.
16. Hunskaar, S. & K. Hole (1987) *Pain* **30**: 103-14.
17. Franzotti, E.M., C.V.F. Santos, H.M.S.L. Rodrigues, R.H.V. Mourão, M.R. Andrade & A.R. Antoniolle (2000) *J. Ethnopharmacol.* **72**: 273-8.
18. Winter, C.A., E.A. Risley & G.W. Nuss (1962) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **111**: 544-7.
19. Vinegar, R., J.F. Traux & J.L. Selph (1973) *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **143**: 711-714.
20. Duarte, I.D.G., D.L. Ferreira-Alves & M. Nakamura-Craig (1992) *Life Sci.* **50**: 891-7.
21. Farsam, H., M. Amanlou, A.R. Dehpour & F. Jahani (2000) *J. Ethnopharmacol.* **71**: 443-7.
22. Ammendola, G., G.M. Di Rosa & L. Sorrentino (1975) *Agents Actions* **5**: 250-5.
23. Almeida, A.P., B.M. Bayer, Z. Horakova & M.A. Beaven (1980) *J. Pharmacol. Exp. Therap.* **214**: 74-9.
24. Compasso, F., C.J. Dunn, S. Yamamoto, D.A. Willoughby & J.P. Giroud (1975) *J. Pathol.* **116**: 117-24.