

**FRANCISCO RAFAEL ALVES SANTANA**

**DEFESA DE DISSERTAÇÃO: 27/11/2015**

**PERFIL FITOQUÍMICO E ATIVIDADES ANTIOXIDANTE,  
GASTROPROTETORA, ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA DO  
EXTRATO HIDROETANÓLICO DAS FOLHAS DE *Tocoyena formosa* (Cham. &  
Schlecht.) K. Schum.**

**ORIENTADOR: IRWIN ROSE ALENCAR DE MENEZES**

# *INTRODUÇÃO*

---

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Apresentação

As plantas medicinais tradicionalmente utilizadas podem exibir diversas atividades farmacológicas, justificando, portanto, o desenvolvimento de estudos para investigar o potencial terapêutico de novos compostos para controlar e tratar diversas doenças.

Diante disso, buscamos investigar algumas possíveis atividades farmacológicas presentes na *Tocoyena formosa* (Cham. & Schlecht.) K. Schum., uma planta conhecida como jenipapo bravo ou jenipapo do campo no qual possui ampla distribuição no Nordeste Brasileiro, sendo de grande ocorrência na região do Cariri, Ceará, Brasil, e tem sua importância tradicional ressaltada por ser muito utilizada como anti-inflamatório e analgésico no tratamento de torções, luxações, dores lombares e dores reumáticas, porém, não se encontram estudos que tenham, por sua vez, legitimado essas ações terapêuticas, além disso, há relatos tradicionais de sua utilização também para o alívio de sintomas gástricos, no qual buscamos validar também essa possível ação gastroprotetora.

A partir disso, esse estudo inédito teve como objetivo avaliar o perfil químico e através de modelos experimentais farmacológicos em camundongos avaliar os efeitos potenciais gastroprotetor, antioxidante, anti-inflamatório e analgésico do extrato hidroetanólico das folhas de *Tocoyena formosa* (Cham. & Schlecht.) K. Schum.

Portanto, diante dos objetivos propedêuticos propostos acima e para melhor ilustração do encadeamento de ideias obtidos a partir dos dados encontrados, estruturamos os resultados e discussão desta dissertação em três partes, no qual a efetivação dos testes experimentais permitiu organizar os dados, formulando-os na forma de artigos originais seguindo as normas de formatação nomeadas pelo corpo editorial de revistas científicas selecionadas de acordo com a área de concentração da pesquisa.

O artigo 1, avalia a atividade antioxidante e gastroprotetora do extrato hidroalcoólico das folhas de *Tocoyena formosa* (Cham. & Schlecht.) K. Schum. Para avaliação da atividade antioxidante foram realizados testes *in vitro*, como: o teste FRAP, onde foram utilizadas concentrações de 25, 50, 100, 200 e 400 µg/ml do EHFTF e da vitamina C e adicionado o reagente FRAP, a curva de calibração foi feita com uma solução de sulfato ferroso nas concentrações: 200, 500, 1000, 1500 e 2000 µM; e o teste de DPPH, onde foram utilizadas também concentrações de 25, 50, 100, 200 e 400 µg/ml tanto para o EHFTF como para a vitamina C e adicionado à solução de DPPH. Para avaliação da atividade gastroprotetora

foram realizados testes *in vivo* de indução de lesão gástrica por Etanol, Etanol Acidificado, Indometacina e Barreira Física. O EHFTF foi administrado nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg para os Testes de indução por Etanol, Etanol Acidificado, Indometacina e na dose de 200 mg/kg (dose eficaz em todos os testes) oral e intraperitoneal, para o Teste de Barreira Física.

O artigo 2, descreve os ensaios de avaliação da toxicidade aguda e determinação da DL50, através da administração oral de dose única do extrato hidroalcoólico das folhas de *Tocoyena formosa* (Cham. & Schlecht.) K. Schum. (EHFTF) com avaliação de parâmetros comportamentais, corporais e macroscópicos dos camundongos, comparando-os com o grupo controle negativo do teste (solução salina a 0,9%), seguindo o protocolo experimental proposto pela OECD (Organização para a cooperação do desenvolvimento económico). Através de ensaios *in vitro*, por prospecção fitoquímica, determinou-se qualitativamente os compostos químicos. A análise da atividade anti-inflamatória ocorreu por ensaios *in vivo*, através dos modelos clássicos de inflamação como o Teste de Edema de Pata induzido por carragenina e dextrana e o Teste de Permeabilidade Vascular em camundongos. O EHFTF foi administrado nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg para o Teste de Edema de Pata e na dose de 200 mg/kg (menor dose eficaz), para o Teste de Permeabilidade Vascular.

O artigo 3, ilustra a análise realizada através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) do extrato hidroalcoólico das folhas de *Tocoyena formosa* (Cham. & Schlecht.) K. Schum. (EHFTF), em relação à composição de compostos fenólicos e flavonoídicos. A análise da atividade antinociceptiva ocorreu por ensaios *in vivo*, através dos modelos clássicos de nocicepção como o Teste de Formalina, Contorções Abdominais, Tail Flick, Hot Plate e Von Frey, no qual o EHFTF foi administrado nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg para todos os Testes. Para avaliar os Mecanismos de Ação envolvidos na antinocicepção promovida pelo o EHFTF, foram realizados inúmeros testes baseados na administração de drogas agonistas e antagonistas envolvidos na nocicepção, e administração na dose de 200 mg/kg (menor dose eficaz) do extrato, e foram investigadas a participação das vias de transmissão nociceptiva: opióide, colinérgica, adrenérgica  $\alpha_1$  e  $\alpha_2$ , serotoninérgica, óxido nítrico, adenosina, dopaminérgica, glutaminérgica e vanilóide.

## 1.2 Justificativa

O estudo de plantas medicinais que tem ação sobre processos dolorosos, inflamatórios e sobre alterações gástricas assume grande importância na sociedade atual, pois as plantas medicinais, além de serem fontes naturais de matéria-prima para novas e importantes moléculas farmacológicas com potencial ativo, elas se tornam uma alternativa/complemento para o tratamento de tais doenças tendo em vista que os medicamentos sintéticos para o tratamento dessas morbidades são de alto custo.

Além disso, estimativas globais sugerem que cerca de 3/4 da população mundial não tem acesso às terapias sintéticas para as diversas patologias, tal setor populacional depende de plantas medicinais, para o tratamento das patologias (SILVA; ANGELIS; TOMA, 2010).

Na natureza existem muitas plantas com ação farmacológica. No Brasil, nesse sentido, se caracteriza por uma grande variedade de plantas, embora a maioria delas seja utilizadas sem base científica (FILIPINI; et. al., 2012).

Entre as muitas plantas medicinais utilizadas pelo público principalmente na região do Cariri, Crato - CE, Brasil, encontra-se a *Tocoyena formosa* (Cham. E Schlecht.) K. Schum. Esta, por ser uma planta muito utilizada popularmente na terapêutica de feridas, contusões, torções, dores (segundo informações colhidas na região) e como anti-inflamatório no tratamento das dores reumáticas, tem sua importância tradicional muito ressaltada, porém, os indivíduos que fazem uso desta espécie não possui informações concretas das reais ações dessa planta.

Sobre esta espécie não há estudos que caracterizam suas propriedades farmacobiológicas, mas devido aos resultados promissores encontrados pelo o uso popular da *Tocoyena formosa* (Cham. & Schlecht.) K. Schum há possibilidades da utilização desta planta e de seus metabolitos secundários para estudos e possivelmente na prática clínica, como agentes com efeitos analgésicos, anti-inflamatórios.

Tendo em vista que a ulcera gástrica é caracterizado como um processo inflamatório e que o nosso laboratório já realiza estudos na tentativa de validar produtos naturais com atividade gastroprotetora, buscamos realizar também o estudo com a *Tocoyena formosa* (Cham. & Schlecht.) K. Schum na atividade inflamatória gástrica.

A relevância desse estudo está justamente na possível eficácia da *Tocoyena formosa* (Cham. & Schlecht.) K. Schum sobre a terapêutica fitoterápica de processos álgicos, lesões inflamatórias e gástricas a partir de estudos farmacológicos pré-clínico em modelos experimentais induzidos já que não se encontra estudos científicos que tenham validado essa

ação ainda; bem como validar os efeitos anti-inflamatório e analgésico desta planta, que poderão servir de base para estudos prospectivos com o objetivo de utilizar esta planta em pacientes com processos inflamatórios, dolorosos e ulcerosos gástricos; e servir de base para o comércio farmacêutico na produção de fármacos para tratamento destas morbidades na aplicação da prática clínica na substituição ou co-tratamento com os medicamentos sintéticos existentes.

Considerando como justificativa também para esse estudo, o fator econômico local, os fármacos analgésicos, anti-inflamatórios e antiulcerosos são de alto custo em relação à economia populacional regional/local e, além disso, de difícil acesso, este estudo pode contribuir para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas facilitando o acesso e o tratamento para estes pacientes. Com isso, a comunidade e as famílias locais/regionais serão beneficiadas, tendo em vista a vasta quantidade dessa planta na região.

Portanto, esse estudo possui uma contribuição direcionada para a busca e a obtenção de novos fármacos ou tratamentos fitoterápicos que possuam potência analgésica, anti-inflamatória e gastroprotetora, baixa incidência de efeitos colaterais, que apresentem favorável custo comercial e que seja de fácil acesso a população, podendo assim representar avanços, como uma nova alternativa, no tratamento da dor e de doenças inflamatórias para essas pessoas.

### **1.3 Referencial Teórico**

#### **1.3.1 Processo inflamatório**

O processo inflamatório consiste em uma ação ordenada entre o sistema imunológico e o local no qual ocorreu a lesão, é uma resposta que é essencial na tentativa de proteger o organismo de estímulos nocivos, porém, em algumas vezes essa resposta pode se tornar exacerbada sem qualquer benefício (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2005).

No processo de lesão tecidual periférica, proteínas do plasma e vários tipos de células são ativadas nos tecidos danificados ou infectados, promovendo a liberação de diversos mediadores químicos, incluindo: fatores de crescimento, quimiocinas, aminas biogênicas, neuropeptídeos, citocinas, bradicininas, eicosanóides e radicais livres (MEDZHITOV, 2008; ROTH; et al., 2009; SERHAN; CHIANG, 2004). Estes mediadores geram e promovem a inflamação provocando alterações humorais, celulares e vasculares levando ao surgimento de sintomas de calor, rubor, dor e edema (SERHAN; CHIANG, 2004)

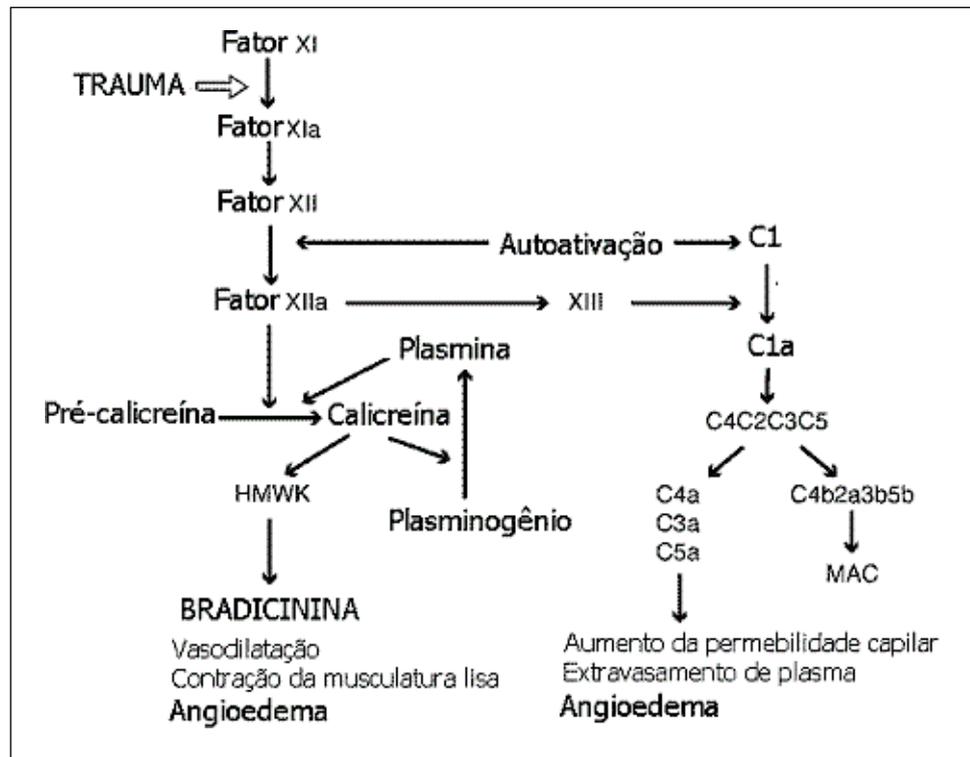
Dentre os efeitos vasculares provocados por esses mediadores incluem vasodilatação, estase vascular e aumento da permeabilidade capilar, no qual reduzem a velocidade do fluxo sanguíneo, resultando na exsudação de plasma rico em proteínas e células, garantindo a migração de leucócitos para o meio extravascular até o tecido lesionado. (ROTH; et al., 2009; COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2005; CRUVINEL; et al., 2010; CARVALHO, 2004)

A migração dessas células circulantes são direcionadas pelas substâncias quimiotáticas como IL-1, TNF- $\alpha$  e quimiocinas liberadas no local da inflamação, e também pelo endotélio que quando ativado expressa moléculas na superfície endotelial que causa a ligação, aderência e migração de leucócitos. Essas moléculas são as selectinas, as integrinas e as quimiocinas que estimulam a migração para sítio tissular lesionado. Estas interações fazem com que essas células sofram diapedese para o meio extravascular se expondo às substâncias quimiotáticas. A concentração quimiotática crescente direciona a migração de mais células ao foco inflamatório. (ABBAS et al., 2011; CRUVINEL et al., 2010)

São essas células que fomentam as ações de defesa contra os agentes infecciosos ou substâncias estranhas (ABBAS et al., 2011). As ações de defesa dessas células incluem a aniquilamento ou inativação do agente/irritante local e remoção dos resquícios celulares no local para que o reparo tecidual possa ocorrer (ROTH et al., 2009), essa função é mediado principalmente por macrófagos e neutrófilos, que têm ação microbicida e fagocítica de modo a proporcionar não só a destruição de agentes infecciosos, mas também de promover a remoção de resquícios celulares que possam estar amplificando a inflamação e impedindo a reparação tecidual. (TIDBALL, 2005) A capacidade dessas células de circular e realizar trocas entre o sangue, à linfa e os tecidos é de fundamental importância para a geração das respostas imunológicas no sítio lesionado (ABBAS; et al, 2011).

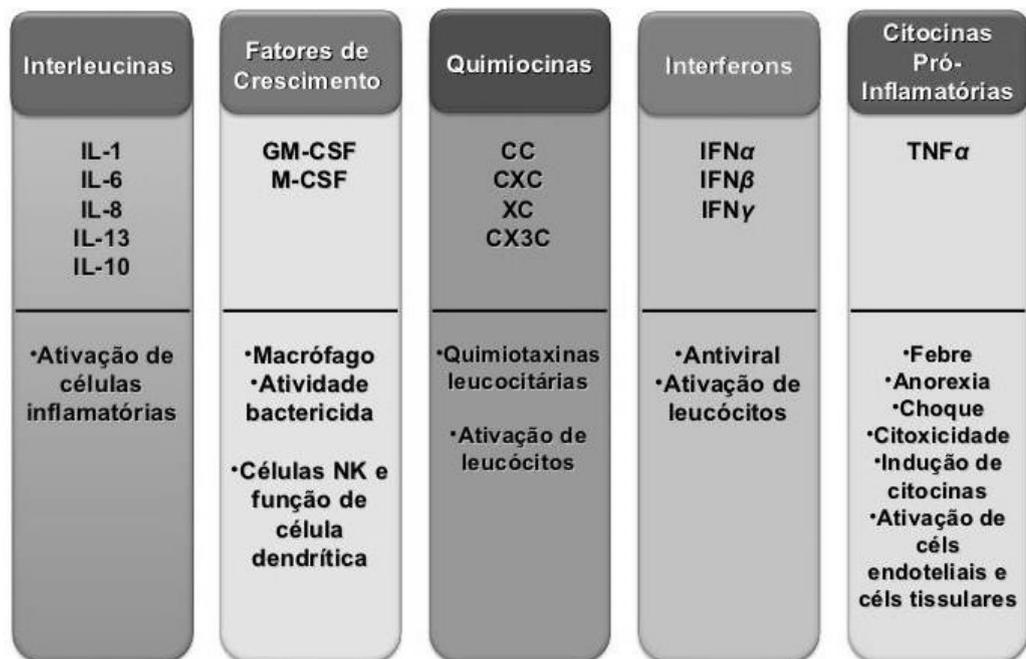
Além dos efeitos vasculares e celulares, os mediadores citados acima também coordenam variadas respostas de defesa, essas respostas são uma série de fenômenos que se associam e se complementam, formando reações em cascata, e envolvem uma interação complexa com as células inflamatórias (tais como macrófagos, neutrófilos e linfócitos) (TEDGUI; MALLAT, 2001) que transmigram dos vasos sanguíneos.

Dentre essas respostas, temos a ativação dos componentes do sistema complemento, do sistema de cininas (**FIGURA 1**), do sistema de coagulação (CRUVINEL; et al., 2010); e também mudanças na concentração plasmática de proteínas hepáticas, hormônios, metabólitos intermediários, neutrofilia e outras alterações (ROTH; et al., 2009) que complementam o processo de defesa e promovem o processo inflamatório.



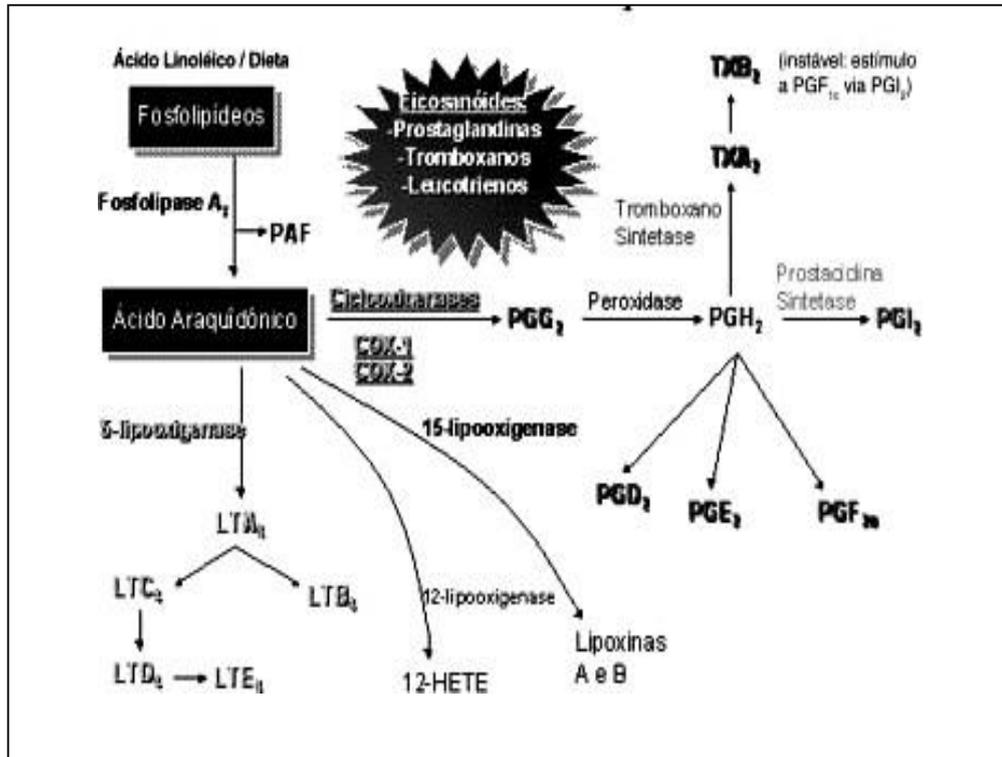
**FIGURA 1:** Ativação do sistema de cininas e do sistema complemento.. FONTE: PRUET, C. W.; et al. Management of the airway in patients with angioedema. Laryngoscopie. vol. 93. Pp: 749-754. 1983. C1, C1a, C4C2C3C5, C4a, C3a, C5a (Componentes do sistema complemento - via clássica); MAC (Complexo de Ataque à Membrana); XI, XIa, XII (fator de Hagemen), XIIa, XIII (Fatores de coagulação); HMWK (high-molecular weight kinogen - cininogênio de alto peso molecular).

Também são ativadas citocinas (**Figura 2**), no qual estas possuem ação importante na instauração dos sinais locais ou sistêmicos da inflamação, estas são produzidas e liberadas por vários tipos de células em resposta a uma múltipla de estímulos desencadeados por agentes microbiológicos ou substâncias estranhas ou em resposta a outras citocinas, sendo também responsáveis pela liberação dos mediadores da inflamação, como os eicosanóides. (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2005).



**Figura 2:** Principais citocinas e suas principais atividades no desenvolvimento do processo inflamatório. **FONTE:** TOSTES, R. *Inflamação: eventos essenciais*. Universidade Federal do Paraná. Disciplina de patologia veterinária. 2011. IL-1 (Interleucina 1), IL-6 (Interleucina 6), IL-8 (Interleucina 8), IL-13 (Interleucina 13), IL-10 (Interleucina 10); GM-CSF (Fator Estimulante de Colônia- Granulócitos-Macrófagos), M-CSF: (Fator Estimulante de Colônia – Macrófago), CC, CXC, XC, CX3C (quimiocinas, onde X= aminoácido e C= cisteína); IFN $\alpha$  (Interferon alfa), IFN $\beta$  (Interferon beta), IFN $\gamma$  (Interferon gama); TNF $\alpha$  (Fator de Necrose Tumoral).

Simultaneamente e decorrente das citocinas, os eicosanoides são liberados, esses mediadores lipídicos são derivados do ácido araquidônico (AA); (CRUVINEL et al., 2010) e liberado dos fosfolipídios de membranas celulares pela ação da enzima fosfolipase A2 (PLA2). O AA é utilizado como substrato por quatro enzimas: a ciclooxigenase (COX), 5-lipoxigenase (5-LO), 12-lipoxigenase (12-LO) e 15-lipoxigenase (15-LO). Por meio de varias reações em cascata dessas enzimas, são formados os mediadores pró-inflamatórios como: prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos no qual a formação desses compostos são importantes mediadores da resposta inflamatória. (RANG, et al., 2012; CASTRO, 2011) **(FIGURA 3)**



**Figura 3: Metabolismos dos fosfolipídios na produção de eicosanóides. FONTE: Adaptado de MONTEIRO, et. al. Os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs). Temas de reumatologia clinica. vol. 9. n. 2. Maio de 2008. Fator de ativação plaquetária (PAF), Ciclooxygenase 1 (COX-1), Ciclooxygenase 2 (COX-2), Prostaglandina G2 (PGG<sub>2</sub>), Prostaglandina H2 (PGH<sub>2</sub>), Prostaglandina F2 $\alpha$  (PGF<sub>2 $\alpha$</sub> ), Prostaglandina E2 (PGE<sub>2</sub>), Prostaciclina I2 (PGI<sub>2</sub>), Tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>), Tromboxano B<sub>2</sub> (TXB<sub>2</sub>), Leucotrieno A<sub>4</sub> (LTA<sub>4</sub>), Leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), Leucotrieno C<sub>4</sub> (LTC<sub>4</sub>), Leucotrieno D<sub>4</sub> (LTD<sub>4</sub>), Leucotrieno E<sub>4</sub> (LTE<sub>4</sub>), 12- ácido hidroxieicosatetranóico (12-HETE).**

Alguns mediadores como as aminas biogênicas (histamina, serotonina) também são produzidas e armazenadas em grânulos nos mastócitos e basófilos ou como precursores circulantes inativos. Essas aminas são fatores edematogênicos que são liberados a partir da desgranulação dessas células quando ativas, e quando liberadas intensificam a inflamação. (MEDZHITOV, 2008)

O processo inflamatório é dividido em duas fases: a aguda e a crônica, ambas passam pelos os mesmos processos, mas o que determina sua diferenciação é o tempo de duração das mesmas. A fase aguda é o estágio inicial da inflamação até a fase de proliferação para reestabelecer as estruturas tissulares lesionada, porém com ação precoce, ou seja esse tipo de inflamação persiste por curto período de tempo, podendo ter ação benéfica por aniquilar rapidamente o estímulo inflamatório, ao contrario da fase crônica que possui longo período de tempo, muitas vezes pode não ser benévola e o estímulo não é eliminado, o que leva a persistência do processo inflamatório. (GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010)

### 1.3.2 Úlcera gástrica

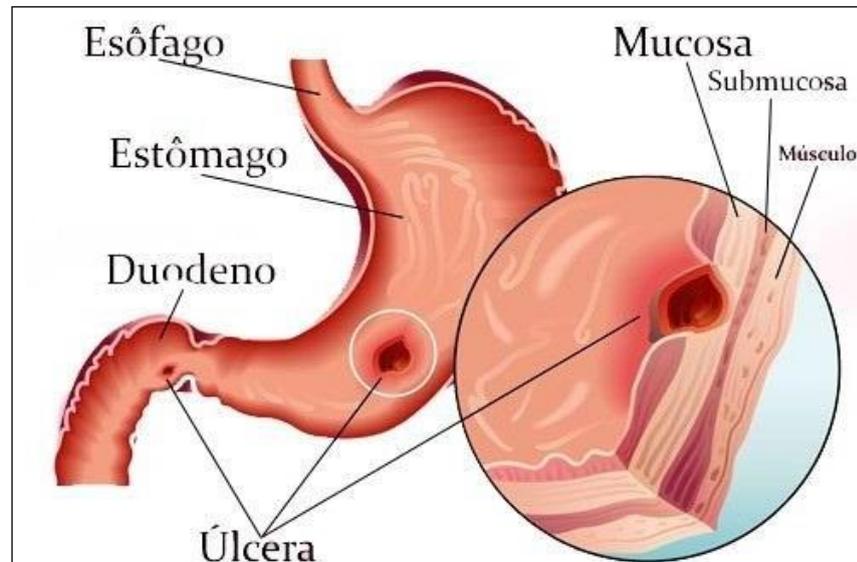
A mucosa gástrica é uma estrutura funcional com habilidade para resistir a diversos fatores agressores intrínsecos (ácido, pepsina, *Helicobacter pylori*) e extrínsecos. Essa habilidade deve-se aos fatores defensivos nela existente como, a camada de muco que recobre a superfície epitelial, o bicarbonato secretado pelo epitélio colunar, a rápida renovação e restituição celular após lesão superficial, a integridade da microcirculação, o bicarbonato intersticial, a hidrofobicidade do epitélio de revestimento, fatores de crescimento da mucosa (CASTRO, 1988) as prostaglandinas e o óxido nítrico (LIU; CRAWFORD, 2005)

As úlceras gástricas resultam justamente do desequilíbrio entre esses fatores agressores e de defesa (VALLE CLARA; et. al., 2012; BRAZ; OLIVEIRA; VIANA, 2013), no qual demonstra que o processo ulcerativo gástrico não é exclusivamente devido a um aumento da secreção de ácido e sim um processo inflamatório complexo (GUERRA; et. al., 2012)

O processo inflamatório causado na mucosa gástrica deriva da infiltração de neutrófilos que são um dos principais mediadores do processo inflamatório e podem liberar espécies reativas de oxigênio, as quais levam a lesão tecidual. Essa lesão inicia-se com um dano microvascular, levando a formação de edema na mucosa, aumento da permeabilidade vascular e conseqüentemente redução na produção de muco e bicarbonato na camada superficial. (ABDULLA, 2009; ABDELWAHAB et. al, 2011).

Essa lesão também pode provocar aberturas que se estendem através da mucosa em direção à camada submucosa ou mais profundamente (**FIGURA 4**). São essas aberturas que diferenciam úlceras de erosões (pois nestas ocorrem deslocamento epitelial na mucosa, mas não há lesão na camada mucosa nem muscular) (OLIVEIRA, 2010).

As úlceras são lesões crônicas, geralmente única, têm menos de 4 cm de diâmetro, e predominam na transição entre antro e corpo, na pequena curvatura do antro próximo a incisura angular (**FIGURA 4**), mas podem ocorrer em qualquer outro local que esteja exposto à ação agressiva dos sucos pépticos ácidos ou em região adjacente à mucosa secretora de ácido (LIU; CRAWFORD, 2005)



**FIGURA 4: Profundidade e localização das úlceras gástricas. Fonte: <http://melhorcomsaude.com/tratamento-natural-ulceras-gastricas/>**

A reparação das úlceras implica na migração de células epiteliais aos locais desnudados da mucosa, aumento da secreção de muco e mobilização local dos sistemas imune, nervoso, vascular e entérico, até a migração de células de vários níveis teciduais, no qual é essencial para que ocorra o processo de restituição. Essa reparação não requer a proliferação de células migratórias para o local constituindo-se como a primeira linha de defesa contra as lesões superficiais e é regulada por fatores de crescimento, incluindo o fator de crescimento epidérmico (EGF), o fator de crescimento de hepatócitos e os fatores de crescimento insulina-like. Estes ativam múltiplas vias de sinalização, incluindo a via mTOR uma via intracelular que age mediando e regulando numerosos eventos celulares como movimento, metabolismo e proliferação. (GIRAUD, 2012).

No entanto, em lesões mais extensas ou ulcerações profundas em que células mucosas estão envolvidas, exige-se reconstrução glandular. Essa reconstrução implica na proliferação e diferenciação dos diferentes componentes celulares da mucosa gástrica a partir de células-tronco do istmo fúndico e das glândulas base antral (GIRAUD, 2012).

A etiologia da úlcera gástrica não está totalmente elucidada, mas acredita-se que esta possua causa multifatorial. Dentre essas causas, temos: o álcool e nicotina, que podem reduzir a secreção de muco e bicarbonato e o aumento da secreção ácida, os fatores genéticos, a *Helicobacter pylori*, a utilização crônica de drogas anti-inflamatórias, (VOMERO; COLPO, 2014) a hipersecreção gástrica associada à síndrome de Zollinger-Ellison, a hiperplasia de células G, o aumento na massa de células parietais o desequilíbrio fisiológico entre hormônios

gastrina e somatostatina, o estresse emocional, cloreto de potássio, medicamentos imunossupressores e outras drogas, e a queda dos níveis de prostaglandinas relacionados com a idade (SAUL; et. al. 2007), a predisposição genética, gastrite, a relação com o sexo, grupo sanguíneo O, distúrbios emocionais como prolongada ansiedade e estresse emocional, choque cirúrgico hemorrágico, queimaduras e trauma são conhecidos por causar irritação lesão gástrica (PETROIANU; SILVA; ALBERTI, 2002; RAO; et. al. 2004).

A consequência de tais fatores, além da lesão gástrica, é a hipersecreção de ácido pelo estômago, achado quase universal e associado com a promoção e desenvolvimento de metaplasia gástrica e úlceras (OLIVEIRA, 2010).

### **1.3.3 Nociceção e dor**

#### **1.3.3.1 Conceitos e Definições de Estímulos**

A dor é um meio de sinalização decorrente de episódios de estímulos nocivos, no qual tenta restabelecer a homeostase, ativando reações na busca para suprimir a etiologia da dor, e como resultado, restaurar/limitar as lesões e/ou agravos (LENT, 2010) É uma experiência com aspectos sensorial, cognitivo e emocional, unificada a algum dano tecidual autêntico ou potencial (INTERNATIONAL, 1994), em decorrência disso os animais em testes experimentais não apresentam dor, pelo o fato de não expressarem caráter cognitivo-emocional e verbal, demonstrando apenas respostas comportamentais e neurofisiológicas da dor o que se caracteriza como nociceção nos animais (LAPA et al., 2008).

A nociceção é um processo neural de codificação que incide na recepção de estímulos pelos nociceptores para fornecer informações ao SNC e processamento da existência do estímulo nocivo (INTERNATIONAL, 1994).

A hiperalgesia é uma resposta aumentada a um estímulo que normalmente é doloroso (MERSKEY; BOGDUK, 1994) no qual, os nociceptores são sensibilizados e os estímulos previamente leves ou ineficazes se tornam dolorosos. A alodinia é dor associada a um estímulo que normalmente não provocaria dor (VERRI JR et al., 2006). Nos testes experimentais de nociceção em animais, deve-se utilizar o termo hipernociceção no aumento da sensibilidade dos neurônios nociceptivos primário, evitando o uso de hiperalgesia e alodinia, pois são termos usados para sintomas humanos (FERREIRA, 2003).

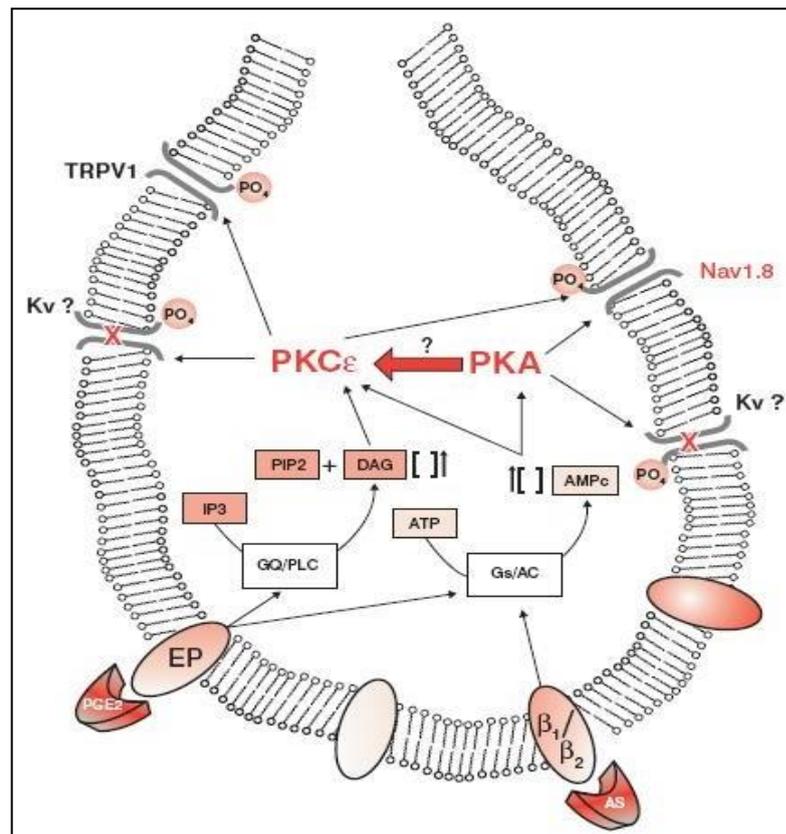
### 1.3.3.2 Mecanismos periféricos, vias ascendentes e mecanismos centrais da dor.

A transmissão da dor começa com uma lesão onde substâncias algigênicas como bradicinina, enzimas, prótons H<sup>+</sup>, serotonina, acetilcolina, histamina, endotelina, substância P, prostaglandinas e aminas simpatomiméticas (ROCHA; et al., 2007; VERRI-JR et al., 2006) são produzidas e liberadas no local estimulando e sensibilizando nociceptores de fibras de neurônios aferentes primários que são classificadas de acordo com critérios anatômicos e funcionais em: pequeno diâmetro que são as não-mielinizadas, no qual conduzem lentamente o impulso nervoso e são denominadas de fibras C; e em médio diâmetro que são as pouco mielinizadas no qual conduzem o impulso rapidamente e são denominadas de fibras A $\delta$ . As fibras A $\delta$  e C mediam a primeira e segunda dor, respectivamente, ou seja, a dor forte, aguda e rápida e a lenta e mais difusa, ambas são chamadas de polimodais, pois respondem aos estímulos nocivos térmicos, químicos e físicos (JULIUS; BASBAUM, 2001; LENT, 2010). Estes nociceptores são terminações nervosas livres de neurônios sensoriais especializados que são acionadas por esses mediadores a partir de estímulos de alta intensidade ou baixa quando estes já se encontram sensibilizados após lesões teciduais ou injúrias inflamatórias. (OLIVEIRA; SILVA, 2009)

Essas substâncias, principalmente prostaglandinas e aminas simpatomiméticas ao entrarem em contato com seus respectivos receptores metabotrópicos promovem a ativação de segundos mensageiros intracelular como adenosina monofosfato cíclico (AMPC) e proteínas quinases A e C (PKA e PKC). Essas proteínas promove a abertura de canais de sódio voltagem dependente em especial do tipo tetrodotoxina resistente (TTxR ou NAV 1.8) (FERREIRA et al. 2009), bloqueiam ou fecham os canais de potássio, com isso ocorre uma modificação potencial de repouso da membrana neuronal levando a ativação e aumento na excitabilidade do axônio (VERRI-JR et al., 2006), e podem ativar receptores TRPV1 ou estes podem ser ativados diretamente pelo o calor, substâncias ácidas com pH 5 a 6 e outras substâncias (capsaicina e anandamida) (ALVES-NETO; COSTA; TEIXEIRA, 2009; EVERAERTS; et al., 2011) (**FIGURA 5**); Outro fator que proporciona a transmissão nociceptiva são os canais iônicos sensíveis ao ácido (ASICs), que são insensíveis à voltagem e ativados por prótons extracelulares e modulados pela PKC (PETROFF et al., 2008)

A junção desses fatores leva a geração de um potencial de ação que se propaga pelas fibras nociceptivas que inervam o corpo e cabeça cujos corpos celulares estão agrupados nos gânglios da raiz dorsal (DRG) ou trigeminal respectivamente, até a outra extremidade no corno dorsal ou posterior da medula espinhal principalmente nas laminae I, II, (fibra C) e V, VI

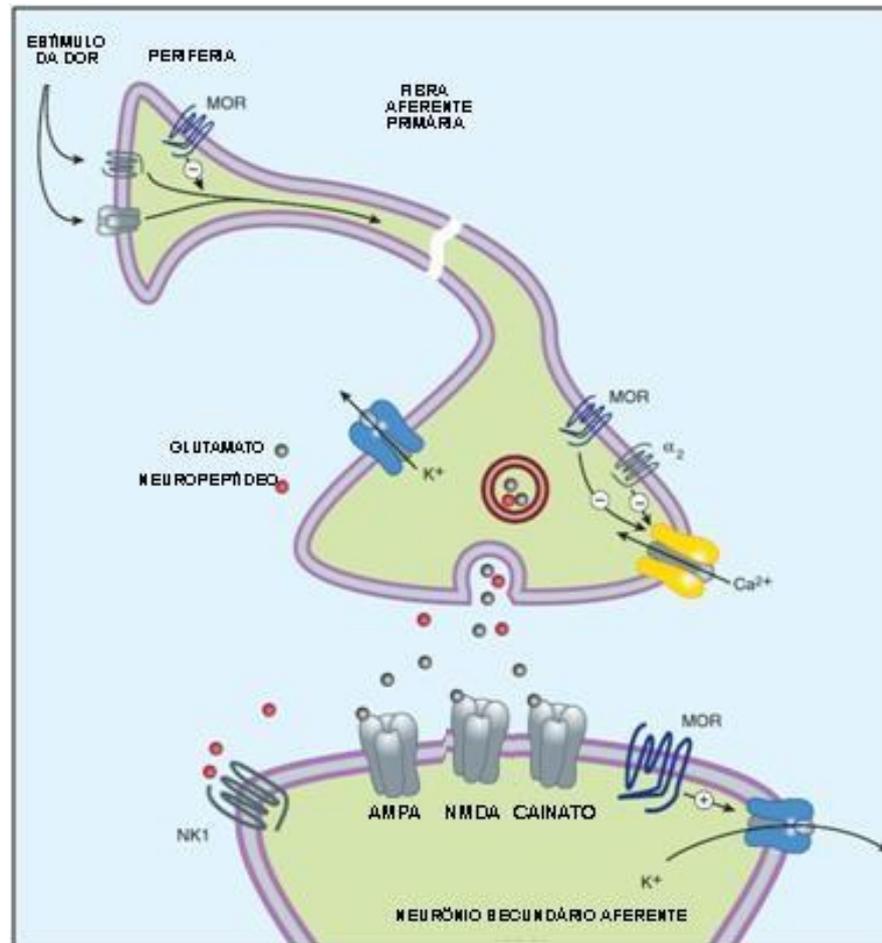
(fibra A $\delta$ ) onde ocorre à entrada de cálcio no terminal pré-sináptico e a liberação de neurotransmissores (FERREIRA et al., 2009; OLIVEIRA; SILVA, 2009; TODD, 2010) tais como: glutamato, acetilcolina, noradrenalina, serotonina e substancia P (SHUMACHER; BASNAUM; WAY, 2012)



**Figura 5: Mecanismos de nocicepção aferente ativadas por prostaglandina E2 (PGE2) e aminas simpatomiméticas (AS). FONTE: FERREIRA; et al. Dor Inflamatória. In: ALVES NETO. et al. dor: Princípios e Prática. São Paulo: ARTMED, 2009. EP (Receptor de prostaglandina E2),  $\beta_1$  e  $\beta_2$  (Receptores Adrenérgicos  $\beta_1$  e  $\beta_2$ ), Gs (proteína G estimulatória), Gq (proteína G quinase), AC (Adenilato Ciclase), PLC (Fosfolipase C), ATP (Adenosina Trifosfato), AMPc (Adenosina Monofosfato Cíclico), IP3 (Trifosfato de Inositol) DAG (Diacilglicerol) PKA e PKC (proteínas quinases A e C), Kv (Canais de Potássio Voltagem Dependente), Nav 1.8 (Canais de Sódio Voltagem Dependente), TRPV1 (Receptor com Potencial Transiente Vanilóide Tipo 1).**

O glutamato, é um aminoácido excitatório, com efeito nociceptivo, ao ser liberado na fenda sináptica ativa os receptores inotrópicos AMPA (Ácido  $\alpha$ -amino-3-hidrorxi-5-meitl-4-isoxazol propiônico) e NMDA (Ácido N-Metil-D-Aspártico) e Cainato que são canais catiônicos não-seletivos que permite a passagem de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{++}$ , a entrada desses íons pode ativar cascatas intracelulares de sinalização e promovem potenciais de ação que transmite o sinal nociceptivo para o segundo neurônio aferente (SHUMACHER; BASNAUM; WAY,

2012; PURVES; et al., 2005) (**FIGURA 6**). O glutamato também pode ativar receptores metabotrópicos (mGlu), esses receptores por sua vez, são divididos em grupo I (mGlu 1 e mGlu 5), no qual estão presentes na membrana pós-sináptica e são acoplados a proteína Gq que leva a ativação da fosfolipase C (PLC), resultando em hidrólise da fosfoinositida ( $PIP_2$ ), libertação de cálcio a partir de armazenamentos intracelulares, e ativação da proteína quinase C (PKC) no qual promove a transmissão nociceptiva (NEUGEBAUER, 2002), a PKC também ativa genes moduladores (c-fos e c-jun) na formação de dinorfina e encefalina (opioides endógenos) para o controle da dor (ROCHA; et al., 2007) (**FIGURA 4**); Em contraste o grupo II (mGlu 2 e mGlu 3) e grupo III (mGlu 4, 6, 7 e 8) estão presentes na membrana pré-sináptica e são acoplados negativamente através de proteínas Gi/Go, no qual inibi a adenilil-ciclase (AC), reduz o AMP cíclico (AMPC) e a formação da proteína cinase dependente cAMP (PKA), inibindo o processo de transmissão nociceptiva (NEUGEBAUER, 2002).



**Figura 6: Mecanismos de nocicepção aferente primário regulado por glutamato, substância P, sistema opióide e  $\alpha$ -adrenérgico na transmissão nociceptiva para o neurônio secundário aferente. FONTE Adaptado de SCHUMACHER, M. A.; BASBAUM, A. I.; WAY, W. L. Opioid Analgesics & Antagonists. In: KATZUNG B. G.; MASTERS S. B.; TREVOR A. J. Basic e clinical pharmacology. 12 ed. Mc Graw Hill Lange, 2012. AMPA (Ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxil-5-meil-4-isoxazol propiônico), NMDA (Ácido N-Metil-D-Aspártico), NK1 (Receptor Neurocinina-1), MOR (Receptor Mu Opióide)**

A Substancia P também age como neurotransmissor excitatório da dor por ativar receptores NK1 (Neurocinina-1), estes por sua vez, ativa tanto os receptores NMDA, como estimula a Fofolipase A2 (PLA2) catalisando a conversão de Fofotidilcolina (PC) em Ácido Aracôdnico (AA) esse ácido sofre ação das enzimas Cicloxigenase (COX) que gera Prostaglandinas (PG) e Tramboxano (TX), e Lipoxigenase (LOX) que gera Leucotrienos (LT); levando a formação de Oxido Nítrico (NO) a partir de um mecanismo dependente de cálcio-calmodulina (CAM), aumento de  $Ca^{++}$  e Oxido Nítrico Sintase (NOS) (ROCHA; et al., 2007; CARVALHO; LEMÔNICA, 1998) (**FIGURA 7**)

O óxido nítrico ativa a Guanilato ciclase (GC) a formação de guanosina 3', 5'-monofosfato cíclico (GMPc) a partir da guanosina trifosfato (GTP), o GMPc ativa a proteína cinase C (PKC) e estimula a transcrição de genes envolvidos na formação de opióides

endógenos como dinorfinas e encefalinas, no qual ambas tem ação antinociceptiva. O NO e as PG difunde-se para o meio extracelular até o terminal aferente primário (**FIGURA 7**) onde promove aumento da liberação de glutamato, aspartato, substância P e peptídeo geneticamente relacionado com a calcitonina (CGRP), contribuindo para a amplificação do processo álgico. Assim, o NO pode modular a hiperexcitabilidade de neurônios do corno dorsal e desempenhar um papel pró-nociceptivo atuando na regulação por feedback positivo (ROCHA; et al., 2007; LUO; CIZKOVA, 2000; CARVALHO; LEMÔNICA, 1998)

O NO também pode modular a excitabilidade de neurônios inibitórios espinhais, reduzindo a atividade dos mesmos, atuando na sensibilização das células do trato espinotalâmico (STT) no corno dorsal. Esta sensibilização sobre essas células resulta na redução da inibição nociceptiva espinal descendente induzida por estimulação na substância cinzenta periaquedutal (PAG) e nas respostas agonistas do efeito inibitório da glicina e do ácido gama-aminobutírico (GABA). Os efeitos inibitórios reduzidos da glicina e do GABA sobre as respostas das células STT também pode ser diminuída pelo GMPC, no qual indica que a modulação de receptores de aminoácidos inibitórios no corno dorsal da medula é mediada pela via NO-GMPC através de um mecanismo de desinibição (LUO; CIZKOVA, 2000).



alívio imediato através de seus agonistas endógenos o 2-araquidonoil-glicerol (2-AG) e anandamida (AEA) ou pela inibição das enzimas que degradam os mesmos como, por exemplo, a amida ácido graxo hidrolase (FAAH). Os receptores CB1 são expressos em neurônios de todo sistema nervoso central (SNC), principalmente no DRG, no corno dorsal da medula espinhal e na PAG, todos os quais são locais importantes para a modulação da dor. Os receptores CB2 não são encontrados no SNC em condições normais, mas regulam positivamente os neurônios nociceptivos após a lesão. Ambos são receptores acoplados a proteína G (GPCRs) que sinalizam através de Gi, diminuindo a condutância dos canais de Na<sup>+</sup>, ativando canais de K<sup>+</sup>, hiperpolarizando a células e diminuindo a liberação de neurotransmissores excitatórios de neurônios nociceptivos (PAN; et al, 2008; NEGUS; et al., 2006; PATAPOUTIAN; TATE; WOOLF, 2009)

O sistema vanilóide, falado anteriormente, está envolvido na transmissão nociceptiva aferente não somente a nível periférico, mas também a nível medular por meio do Receptor Transiente Potencial (TRP), contribuindo assim para a sensibilização ds fibras. Esses receptores também são predominantemente expressos em neurônios nociceptivos do DRG (PATAPOUTIAN; TATE; WOOLF, 2009)

O sinal aferente é então tratado por essa complexa rede de neurônios e interneurônios e neurotransmissores, como mostrado acima, dentro do corno dorsal da medula espinhal ou seu equivalente no tronco cerebral (TODD, 2010). Nesses locais, pode ocorrer modulação (amplificação ou supressão) do sinal nociceptivo. (DRUMMOND, 2000; MILLAN, 2002)

Após a transmissão do neurônio aferente primário dentro do corno dorsal da medula espinhal, as fibras nociceptivas dos neurônios de segunda ordem cruzam a linha média no nível do corno dorsal da medula espinhal e projetam-se de forma ascendente pela porção ventro-lateral da medula e desta para os tratos espinotalâmicos, espinoreticular, espinomesencefálico, sistema espinopontoamigdaliano as fibras pós-sináptica da coluna dorsal se dirige para coluna posterior (ROCHA; et al., 2007; SCHAIBLE; RICHTER, 2004).

Algumas dessas fibras terminam no núcleo talâmico ventroposteromedial (VPM), no qual neurônios de terceira ordem envia suas projeções ascendendo para o córtex cerebral somestésico ou somatosensorial primário, e deste para outra regiões corticais como o córtex insular e cingular anterior, sistema límbico e parietal posterior para o processamento cognitivo da dor. Outros neurônios projetam axônios para o hipotálamo, formação reticular, substância cinzenta periaquedutal, núcleo medial e intratalâmico, e estruturas encefálicas anteriores que são responsáveis pelas respostas neuroendócrinas e afetivo-emocionais da dor (ROCHA; et al., 2007; OLIVEIRA; SILVA, 2009)

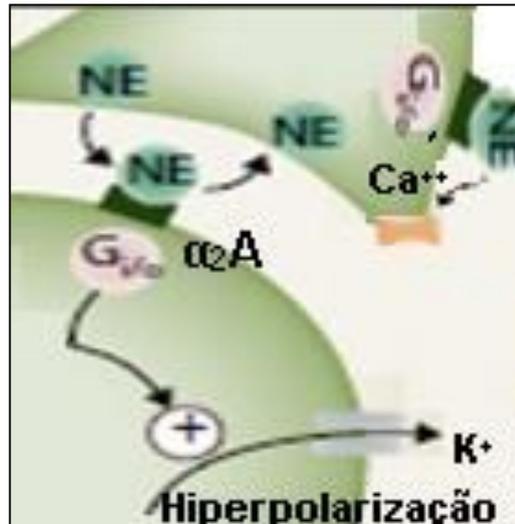
### 1.3.3.3 Vias descendentes inibitórias e modulação da dor

O processo nociceptivo transmitido pela via aferente inclui parte do tratamento da informação pelo cérebro, bem como algumas respostas reflexas para proteger o organismo. Este tratamento para alívio da dor se dá por meio da informação sensorial e conexões inibidoras descendente controlada a partir de várias áreas do cérebro que se projeta para a medula espinhal para diminuir a atividade dos neurônios aferentes nociceptivos (CARVALHO; LEMÔNICA, 1998; ROCHA; et al., 2007).

As vias descentes inibitórias tem origem no córtex somestésico e no hipotálamo. Elas são projetadas a uma região mesencéfálica denominada de substância cinzenta periaquedutal, e destas a diferentes núcleos bulbares, especialmente para os núcleos da rafe, e destes ao corno dorsal da medula. (LENT, 2010; GUYTON; HALL, 2011; RANG et al., 2012)

A via noradrenérgica, por exemplo, envolve a projeção de neurônios noradrenérgicos do locus ceruleus que agem em receptores presentes nos neurônios pré e pós-sinápticos no corno dorsal da medula espinhal, essa via é uma das principais vias descendentes inibitórias da dor. Os receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos são divididos em três subtipos, o  $\alpha_2A$ ,  $\alpha_2B$  e  $\alpha_2C$ , todos os três são acoplados GPCRs ( $G_i$ ), os  $\alpha_2A$  são expressos principalmente em terminais pré-sinápticos e inibem os canais de  $Ca^{++}$ , ao mesmo tempo, são expressos principalmente em neurônios segunda ordem no corno dorsal aumentando a condutância dos canais de  $K^+$ , promovendo o processo de redução ou inibição da dor por hiperpolarização (**FIGURA 8**). Acredita-se que  $\alpha_2$ -adrenérgicos também provoquem analgesia por ativação de neurônios colinérgicos promovendo liberação de acetilcolina (NEGUS; et al., 2006; CARVALHO; LEMÔNICA, 1998)

Os receptores  $\alpha_1$ -adrenérgicos também demonstram ação importante na regulação da nocicepção. São receptores acoplados a proteína  $G_q$ , no qual estimulam a abertura de canais de  $Ca^{2+}$ , elevando o  $Ca^{2+}$  intracelular e ativando fosfolipase C (PLC), formando Diacilglicerol (DAG) e ativando a proteína quinase C (PKC), exercendo ação excitatória sobre a atividade neuronal antinociceptiva quando localizados em interneurônios inibitórios (HOWE; YAKSH; WANG, 1983). O sistema noradrenérgico ativa interneurônios inibitórios agindo na transmissão sináptica GABAérgica e glicinérgica inibitória na substância gelatinosa cinzenta (BABA; SHIMOJI; YOSHIMURA, 2000).



**Figura 8:** Mecanismos inibitório descendente regulado por Noradrenalina, na diminuição da atividade dos neurônios aferentes nociceptivos. FONTE: Adaptado de NEGUS, S.S., et al., Preclinical assessment of candidate analgesic drugs: recent advances and future challenges. *J Pharmacol Exp Ther*, 2006. 319(2): p. 507-14. NE (Noradrenalina),  $\alpha_2A$  (Receptor  $\alpha_2$ -adrenérgico),  $G_i$  (Proteína G inibitória).

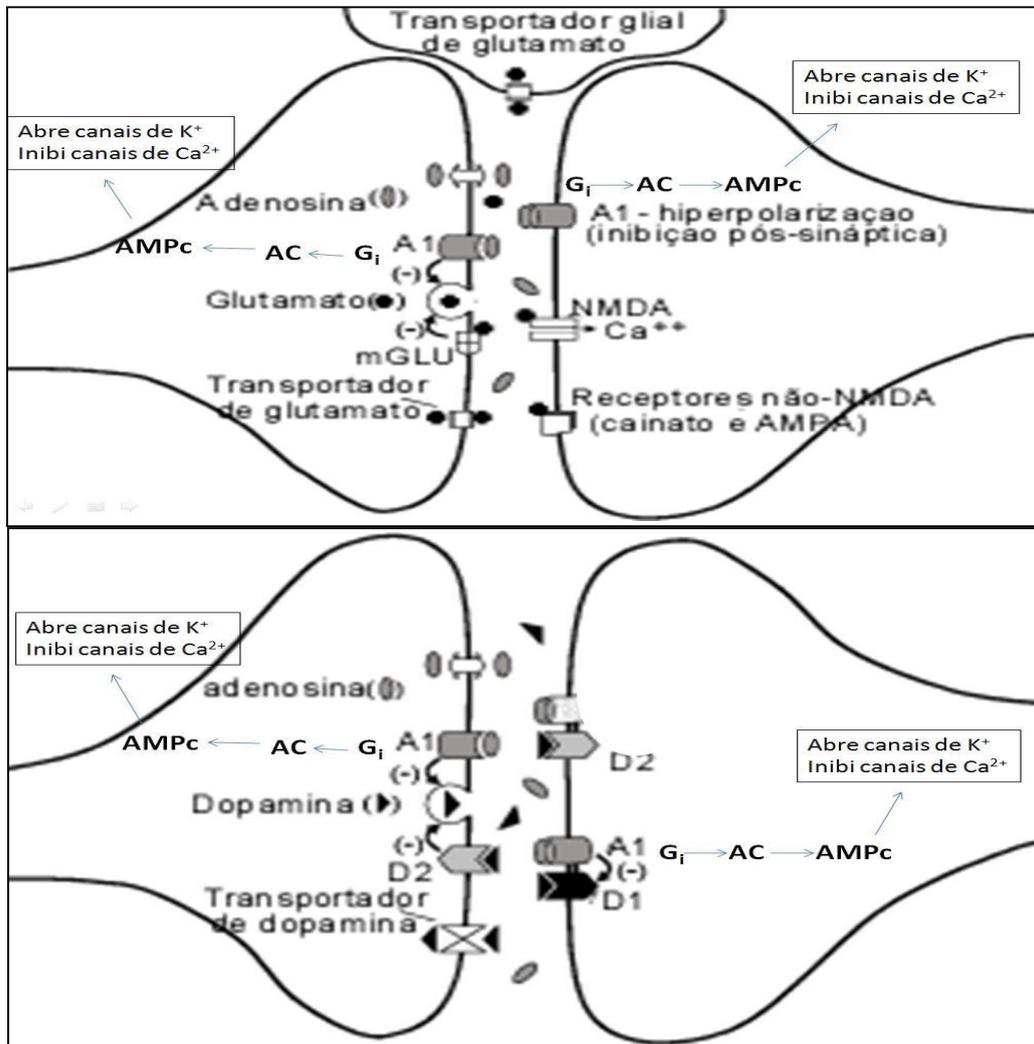
A serotonina (5-HT) exerce efeito inibitório descendente na transmissão nociceptiva atuando sobre os neurônios excitatórios aferentes e interneurônios inibitórios por meio dos receptores 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub> e 5-HT<sub>3</sub>. Os receptores 5-HT<sub>1</sub> apresenta atividade mais expressiva e exerce efeito inibitório nos neurônios excitatórios, por meio do acoplamento a proteína  $G_i$ , esta inibi a ativação da Adenilato Ciclase no neurônio pré-sináptico e promove a abertura de canais de  $K^+$ , o potássio por sua vez, sai hiperpolarizando os neurônios pós-sináptico reduzindo a transmissão nociceptiva aferente. (BOESS; MARTIN, 1994; MILLAN, 1995)

Os receptores 5-HT<sub>2</sub> age por atividade excitatória em interneurônios inibitórios (GABA/glicinérgicos), devido ao acoplamento a proteína  $G_q$  que ativa fosfolipase C (PLC) e a partir do DAG formado, promove a ativação da PKC permitindo o influxo de cálcio e aumento da exocitose desses aminoácidos inibitórios, além disso, inibi as correntes de  $K^+$ . O receptor 5-HT<sub>3</sub> é um canal catiônico ativado por ligante, sua ativação aumenta a atividade da PLC atuando nos interneurônios inibitórios (BOESS; MARTIN, 1994; MILLAN, 1995). A 5-HT aumenta a ação das vias adrenérgicas, encefalinérgicas ou GABA/glicinérgicas promovendo um sinergismo das vias descendentes inibitórias na promoção da analgesia (FÜRST, 1999; SASAKI; et al., 2001)

Os receptores opióides são expressos numa variedade de regiões do sistema nervoso, incluindo o corno dorsal da medula espinal, e várias áreas do cérebro envolvidas na inibição descendente de sinalização de dor. (PAN; et al, 2008) Existem peptídeos opióides caracterizados por encefalinas, endorfinas e dinorfinas, encontrados na PAG e núcleos da rafe.

(LENT, 2010; GUYTON; HALL, 2011). Quatro receptores opióides distintos foram identificados: mu, delta, kapa, e ORL-1 no processamento analgésico, todos são GPCRs ( $G_i$ ). O corno dorsal da medula espinal é sitio principal da ação de opióides, em que a inibição dos canais de  $Ca^{++}$  provoca uma diminuição da taxa de disparo e liberação de neurotransmissores excitatórios de nociceptores DRG e os neurônios de segunda ordem são hiperpolarizado devido à ativação dos canais de  $K^+$  (PAN; et al., 2008; RANG et al., 2012) parte das ações analgésicas dos opióides pode ser mediada através da liberação de adenosina. (CARVALHO; LEMÔNICA, 1998)

A adenosina promove analgesia por dois mecanismos: periférico e central. Os receptores para adenosina se concentram em maior quantidade no corno dorsal da medula espinal (RATHMELL; LAIR; NAUMAN, 2005), os receptores envolvidos na analgesia são:  $A_1$ , que são acoplados a proteína  $G_i$ , inibem AC, reduzem o AMPc intracelular, abre canais de  $K^+$  hiperpolarizando a célula e inibindo a entrada de  $Ca^{2+}$ , no qual reduzem a liberação de neurotransmissores como glutamato, dopamina na membrana pré-sináptica (uma vez que a adenosina tem papel modulador sobre os sistemas dopaminérgico e glutamatérgico), hiperpolarização neuronal e interação antagônica com os receptores dopaminérgicos  $D_1$  na membrana pós-sináptica (**FIGURA 9**);  $A_3$ , que também são acoplados a  $G_i$  e inibi AC, porém a ação desse receptor na modulação da nocicepção não está evidenciado. (CARVALHO; LEMÔNICA, 1998; LARA; SOUZA, 2001; KLINGER; FREISSMUTH; NANOFF, 2002)



**Figura 9: Mecanismo inibitório descendente regulado por Adenosina na modulação sobre os sistemas dopaminérgico e glutamatérgico, na diminuição da atividade dos neurônios aferentes nociceptivos. FONTE: Adaptado de LARA, D. R.; SOUZA D. O. Modelo de hipofunção adenosinérgica para a esquizofrenia: interação entre os sistemas purinérgico, glutamatérgico e dopaminérgico. Revista de psiquiatria clínica. 2001. Gi (Proteína G inibitória), AC (Adenilato Ciclastase), AMPc (Adenosina Monofosfato Ciclica), A1 (Receptor Adenosinérgico 1), D1 (Receptor Dopaminérgico 1), D2 (Receptor Dopaminérgico 2), mGlu (Receptor Metabotrópico de Glutamato), NMDA (Ácido N-Metil-D-Aspártico), AMPA (Ácido  $\alpha$ -amino-3-hidroxil-5-metil-4-isoxazol propiônico).**

A acetilcolina age por mecanismo analgésico descendente inibitório no corno dorsal principalmente através dos receptores muscarínicos  $M_1$ ,  $M_3$  e  $M_5$  no qual tem acoplamento com a proteína  $G_q$ , e seu acionamento eleva a concentração e ação da PLC possivelmente nas vias descendentes inibitórias ou sobre os interneurônios inibitórios, enquanto que os outros receptores  $M_2$  e  $M_4$  estão acoplados a proteína  $G_i$ , inibindo a ação da AC, os canais  $Ca^{2+}$  e estimulando os canais de  $K^+$  possivelmente sobre os neurônios nociceptivos aferentes (MILLAN, 2002). Acredita-se que a analgesia também seja provocada pelos receptores

nicotínicos e que esse efeito envolve a participação de mecanismos dependente de canais de cálcio, de vias adrenérgicas, serotoninérgicas (CARVALHO; LEMÔNICA, 1998).

A dopamina também participa do controle da nocicepção, sendo que as vias dopaminérgicas agem na inibição a nível central nos sistema nigroestriatal (aproximadamente, 80% da dopamina no cérebro) e espinhal especialmente na região do corno dorsal da medula modulando as vias descendentes, agindo principalmente através nos receptores  $D_2$ , mas também dos receptores  $D_3$  e  $D_4$ , no qual a ativação destes receptores promove pela via proteína  $G_i$  à inibição da AC, causando uma supressão da ativação dos canais de  $Ca^{2+}$  e elevando os níveis de  $K^+$  intracelular por meio da abertura dos canais de  $K^+$ , com isso, ocorre uma diminuição na atividade neuronal (MISSALE et al., 1998; KELLENDONK; et al., 2006; NICOLL, 2012)

O ácido gama-aminobutírico (GABA) é um dos principais neurotransmissores inibitórios que exerce importante papel na nocicepção, através de sua atuação sobre seus receptores  $GABA_A$  e  $GABA_B$  (DIAS; PRADO, 2009), mas produz um mecanismo antinociceptivo principalmente por receptores de  $GABA_A$  (FRANKLIN ; ABBOTT, 1993) a ativação desses receptores promove a abertura dos canais de cloro ( $Cl^-$ ), no qual leva a entrada de cargas negativas intracelular nos neurônios, levando a uma hiperpolarização que diminui a excitabilidade do neurônio pós-sináptico, inibindo a transmissão da dor (MENSE; GERWIN, 2010). Os receptores  $GABA_B$  são altamente concentrados no corno dorsal superficial, predominantemente em terminais aferentes de neurônios sensoriais localizadas no gânglio da raiz dorsal (DRG) e medeia, após a ativação nociceptiva, seus efeitos antinociceptivos através de suas subunidades  $GABA_{B1a}$  e  $GABA_{B1b}$ , que são receptores metabotrópicos, no qual a ativação destes no terminal pré-sináptico inibe o influxo de  $Ca^{2+}$  e no terminal pós-sináptico aumenta a saída de  $K^+$ , respectivamente (GASSMANN; BETTLER, 2012; GANGADHARAN; et al., 2009; FRITSCHY, et al., 1999). Os interneurônios GABAérgicos espinhais e/ou seus receptores podem ser ativados por sistemas descendentes noradrenérgicos e serotoninérgicos de origem supra-espinhais. (DIAS; PRADO, 2009) O sistema GABAérgico na medula regula os neurônios aferentes do corno dorsal, (KONTINEN et al., 2001) e aumenta a duração dos bloqueios sensoriais (RATHMELL; LAIR; NAUMAN, 2005)

A glicina é um dos neurotransmissores principais do componente descendente inibitório que age e são liberados em interneurônios espinhais, em interneurônios do tronco encefálico e outras estruturas supraespinhais como tálamo e substância PAG, por meio do aumento na condutância seletiva do cloro pelo seu receptor de canal, causando hiperpolarização da membrana neuronal. (NICOLL, 2012; MARTINS, 2005) A glicina parece

ter papel importante no processamento da dor dentro da substância PAG, esses circuitos antinociceptivos ativados pela glicina na PAG podem ser mediado por vias opióides se a estimulação nociceptiva tiver origem no tecido somático profundo, e o efeito dos opióides na PAG deve-se pela supressão dos efeitos inibitórios da glicina sobre os neurônios que formam parte das vias de controle descendente. A glicina inibe também despolarização induzida pelo glutamato atuando em receptores glutamatérgicos NMDA (MARTINS, 2005)

### 1.3.4 Família Rubiaceae

A vasta família Rubiaceae ocupa o quarto lugar de todo o reino vegetal em número de espécies (CHIQUIERI; DI MAIO; PEIXOTO, 2004), é a quarta maior família botânica dentre as angiospermas (DELPRETE, 2004), é classificada em quatro subfamílias (Cinchonoideae, Ixoroideae, Antirheoideae e Rubioideae) (ROBBRECHT, 1988), é a maior da ordem Gentianales, possuindo por volta de 650 gêneros e 13.000 espécies (ROVA et al., 2002), na flora brasileira é representada por 99 gêneros e 1043 espécies, correspondendo a uma das principais famílias de nossa flora. A Rubiaceae é própria das regiões mais quentes, principalmente dos trópicos, por isso mais de 75% de todas as espécies crescem nessas regiões diminuindo em direção ao sul. A América do Sul supera em número de espécies todas as regiões da Terra, nesta região existem 1.200 espécies ou 30% do total (CHIQUIERI; DI MAIO; PEIXOTO, 2004)

A família Rubiaceae, pertence ao grupo dos vegetais, no qual ainda é um grupo pouco estudado ainda (DELPRETE, 2004) em meio à vasta vegetação do Brasil. Essa família possui uma grande distribuição quanto a sua representação geográfica, pois se distribui principalmente, em regiões tropicais no qual um meio de suas espécies é de ocorrência neotropical sendo a maioria destas localizada na América do Sul. Nas regiões tropicais, como no Brasil, ocorre maior representatividade de arbustos e árvores de pequeno tamanho, nas regiões subtropicais, sua distribuição é diminuída com predominância nas zonas temperadas de herbáceas (BACIGALUPO, 1974). A floração e frutificação dessas espécies ocorrem em maior concentração no período de abril a julho, sendo o mês de julho de maior pico. (REIS; et al., 2003)

Essa família possui também grande variação de formas (ervas, subarbustos, arbustos, pequenas e grandes árvores e lianas), apresenta-se em variados tipos de vegetação, possui heterogeneidade em termos taxonômicos e grande importância econômica (DELPRETE 2004) no qual são utilizadas como alimentícias (*Coffea arabica L.* e *Genipa americana L.*),

ornamentais (*Ixora spp.*, *Mussaenda spp.*, *Gardenia spp.* etc.), na indústria farmacêutica (*Cinchona pubescens Vahl*, produtora de quinina empregada no tratamento da malária) e popularmente como plantas medicinais (espécies dos gêneros *Borreria*, *Cinchona*, *Richardia*) e/ou tóxicas (*Palicourea* e *Psychotria*, popularmente conhecidas como “mata-ratos”) (COELHO; AGRA; BARBOSA, 2006).

São essas características que tornam a família Rubiaceae um excelente modelo para estudos, além de se destacar, também, a existência de muitas espécies de alto potencial medicinal tradicional (DELPRETE 2004).

### 1.3.5 Gênero *Tocoyena*

O gênero *Tocoyena*, pertencente à família Rubiaceae, possui cerca de 30 espécies distribuídas no Brasil, tendo predominância nas regiões de Cerrado, Caatinga, Restinga e Zonas Litorâneas. Várias espécies possuem utilidade econômica, como exemplo a exploração ornamental e uso da madeira para obras de marcenaria. (GOTTSBERGER; EHRENDORFER, 1992)

A identificação das espécies desse gênero e as inter-relações entre as mesmas baseiam-se em características morfológicas. Com base na forma dos lobos da corola e ápice do botão, o agrupamento das espécies se dá em duas seções: *Tocoyena e Acutiflorae* (Schum.). Na seção *Tocoyena* estão incluídas: *T. bullata*, *T. costanensis*, *T. formosa*, *T. longiflora*, *T. mollis.*, *T. obliquinervia*, *T. pendulina*, *T. pittieri*, *T. sllowiana*, *T. tabascensis*, *T. vescidula* *T. williamsii*. A seção *Acutiflorae* está composta de: *T. cubensis*, *T. foetida*, *T. guianensis*, *T. hispidula.*, *T. neglecta*, *T. orinocensis* e *T. speciosa*. A *T. formosa* é a que apresenta maior distribuição geográfica com enorme variação fenotípica e possui 2 subespécies: a *T. formosa* subsp. *formosa* e a *T. formosa* subsp. *tomentosa*. Outras espécies, tais como *T. bullata*, *T. guianensis* e *T. sellowiana*, também demosntraram uma grande variação nos caracteres. (PRADO, 1987)

Dentre os poucos estudos existentes sobre o gênero (a partir de uma revisão sistemática sobre atividade biológica do gênero realizada pelo o autor), observa-se que algumas de suas espécies como a *Tocoyena formosa* são utilizadas tradicionalmente no tratamento de processos dolorosos reumáticos (COELHO; AGRA; BARBOSA; et al., 2007) e como cicatrizante (SOUZA, 2012). Em estudos comprovados cientificamente as espécies *Tocoyena formosa* e *Tocoyena Brasiliensis* apresentam atividade antifúngica (BOLZANI; et al., 1997; HAMERSKI; et al., 2005) a partir dos compostos fitoquímicos como iridoides e

saponinas triterpênicas, respectivamente; e atividade antiparasitária (Acaricida) da *Tocoyena formosa* (SANTOS; et al., 2013).

### ***1.3.6 Tocoyena formosa (Cham. & Schlecht.) K. Schum***

A *Tocoyena formosa* (Cham. & Schldl.) K. Schum. (família Rubiaceae) é uma pequena árvore ornamental popularmente conhecida como "Jenipapo do campo", cresce espontaneamente em regiões secas e em Cerrado e possui vegetação fisionomicamente florística diversificada, sendo muito impressionante por ter flores amarelas e verde (HARMESKY; et. al, 2008; BOLZANI, et. al., 1997). Ela é utilizada na medicina popular do Nordeste do Brasil como anti-inflamatório no tratamento das dores reumáticas (COELHO; AGRA; BARBOSA, 2006).

A *Tocoyena formosa* (Cham. et Sch.) K. Schum é uma espécie sul-americana, encontrada no Paraguai, Bolívia e Brasil, principalmente em formações xeromórficas como cerrado, restinga e caatinga. No Brasil, a espécie tem um gama enorme de distribuição ocorrendo nas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul (COELHO; AGRA; BARBOSA, 2006).

# ***OBJETIVOS***

---

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar o perfil químico e as atividades antioxidante, gastroprotetora, anti-inflamatória e antinociceptiva do Extrato Hidroetanólico das Folhas de *Tocoyena formosa* (Cham. & Schlecht.) K. Schum (EHFTF) em camundongos.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Realizar a prospecção fitoquímica para identificar a presença de compostos químicos no EHFTF;
- Analisar e determinar a presença dos principais constituintes por CLAE;
- Avaliar o potencial antioxidante in vitro do EHFTF a partir dos testes de DPPH e FRAP;
- Realizar *screening* hipocrático e testar a toxicidade aguda por via oral com determinação da DL50 do EHFTF;
- Identificar o potencial farmacológico do EHFTF em camundongos submetidos a testes de inflamação (Teste de Edema de Pata, Permeabilidade Vascular);
- Verificar a atividade antiedematogênica tópica do EHFTF (Teste de Edema de orelha);
- Analisar o efeito gastroprotetor do EHFTF nas lesões gástricas induzidas por etanol, indometacina, etanol acidificado (Etanol+Ácido clorídrico) quanto à área ou número de lesões apresentadas;
- Verificar a influencia do EHFTF sobre a formação de barreira física;
- Avaliar a atividade antinociceptiva do EHFTF em modelos experimentais clássicos de nocicepção: Teste de Formalina, Contorções Abdominais, Tail Flick e Von Frey Hot Plate;
- Avaliar atividade locomotora e coordenação motora através do Teste de Rota Rod;
- Analisar os possíveis mecanismos de ação antinociceptivo do EHFTF.

***MATERIAIS E  
MÉTODOS***

---

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Coleta e identificação do material botânico

As folhas de *Tocoyena formosa* (Cham. & Schlecht.) K. Schum foram coletadas na chapada do Araripe, localizada no nordeste do Brasil, sul do Ceará, na região do Cariri, no município de Crato-CE, no sítio Barreiro Grande (07° 21'44,0''S e 39° 28'41,0''W com altitude de 901m acima do nível do mar), e com proximidade de 65,9 km do município de Serrita-PE (Fonte: Google Earth) e possui uma área total de 76.654,3 km<sup>2</sup> (BRASIL, 2011). O material foi coletado com características no arbusto de fruto, no mês de abril de 2014. Esta espécie ocorre na região e foi explorada sem nenhum impacto a sua biodiversidade e sob autorização do IBAMA N° 44.148-1. Uma amostra representativa da espécie (Exsicata) contendo fruto foi encaminhada para identificação junto ao Herbário Dárdano de Andrade Lima da Universidade Regional do Cariri – URCA sob N° 2.770. **(FIGURA 10)**



**Figura 10:** Exsicata de *Tocoyena formosa* (Cham. & Schlecht.) K. Schum. Coletadas no mês de abril de 2014 (período de frutificação), na chapada do Araripe, localizada no nordeste do Brasil, sul do Ceará, na região do Cariri, no município de Crato-CE, no Sítio Barreiro Grande (07° 21'44,0''S e 39° 28'41,0''W com altitude de 901m acima do nível do mar), sob n° 2770.

### 3.2 Preparação do material e obtenção do extrato

O material botânico (folhas) foi exposto aos raios solares para secagem por um período de 48 h; logo após foi pesado e triturado, sendo em seguida submetido à maceração em solventes etanol e água destilada (na proporção 1:1), por um período de 72 h. O extrato hidroetanólico formulado foi filtrado para retenção do material sólido e posteriormente submetido à extração da clorofila por adição de carvão ativado no extrato (10 g/100 ml) no período de 30 min, após isso, foi novamente filtrado para retenção do carvão ativado. Depois, concentrado por destilação do solvente em evaporador rotativo a uma temperatura em torno de 60°C a 40 rpm para promover a evaporação do etanol. Em seguida o extrato foi posto em banho-maria (60°C) de 24 às 72 h para proporcionar evaporação por completo de etanol, após 24 h, foi congelado e quando em estado sólido, foi colocado em processo de liofilização por 72 h sob temperatura de -61°C.

### 3.3 Prospecção fitoquímica qualitativa

A prospecção fitoquímica do extrato foi realizada para determinação de compostos secundários presentes no EHFTF segundo a metodologia de Matos (2002), sendo avaliada a existência das principais classes, como: taninos, flavonóides, fenóis e alcalóides. Essa metodologia aborda a observação visual de colorações e formação de precipitados após a exposição a reagentes químicos específicos.

O EHFTF liofilizado (0,3 g) foi inicialmente diluído em 30 ml de etanol a 70% e distribuídos em seis porções, onde em seguida foram realizados os três primeiros testes, os outros três tiveram métodos diferentes:

**Teste para Fenóis e Taninos:** em uma porção, foi adicionado 3 gotas de cloreto férrico e agitado, observou-se a cor e a formação de precipitados em relação ao teste branco com água e cloreto férrico.

**Teste para Antocianinas, Antocianidinas e flavanóides:** foram usadas 3 porções, na primeira foi adicionada hidróxido de amônia, alcalinizando até o pH=8,5, na segunda foi adicionada ácido clorídrico, acidificando até o pH=3 e na terceira foi adicionada hidróxido de sódio 1%, alcalinizando o meio até o pH=11.

**Teste para Leucoantocianidinas, catequinas e flavonas:** foram usadas 2 porções, na primeira foi adicionada hidróxido de sódio 1%, alcalinizando o meio até o pH=11, na

segunda foi adicionada ácido clorídrico, acidificando até o pH=3, e ambas foram aquecidas por 2-3 min.

**Teste para Alcalóides:** foi diluído 0,3 g do EHFTF em 30 ml de ácido acético a 5% e submetida ao aquecimento até a fervura do preparado. Foi realizado a alcalinização com hidróxido de amônia (15 ml), seguida da adição de clorofórmio (15 ml), homogeneização e repouso em funil de separação. Foi coletada a fase clorofórmica em béquer e realizada evaporação do solvente (clorofórmio) por aquecimento e adicionado ácido clorídrico a 1% e homogeneizado, depois, esta solução foi aplicada sobre uma lâmina e administrado uma gota de reagente dragendorff observando-se a formação de precipitado que é indicativo da presença de alcalóides.

**Teste para Esteróides e Triterpenóides:** foi diluído 0,3 g do EHFTF em 6 ml de clorofórmio, depois foi filtrado em um funil com uma bola algodão coberto de sulfato de sódio anidro, o filtrado foi separado em um tubo de ensaio e adicionado 1ml de anidrido acético e 3 gotas de ácido sulfúrico, agitou-se, observando a rápida mudança de cores.

**Teste para Saponinas:** foi diluído 0,3 g do EHFTF em 10 ml de clorofórmio e 10 ml de água destilada, depois foi filtrado em um funil com uma bola algodão, agitou-se por 3 min observando a formação de espuma.

#### **3.4 Cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE do extrato hidroetanólico das folhas de *Tocoyena formosa* (Cham. & Schlecht.) K. Schum**

Foram utilizados produtos químicos de grau analítico, como o acetonitrilo, ácido acético, ácido gálico, ácido clorogénico, ácido cafeico e ácido elágico adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha). A catequina, a quercetina, a luteolina e rutina foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). A CLAE foi realizada com um proeminente amostrador automático Shimadzu (SIL-20A) sistema de HPLC (Shimadzu, Quioto, Japão), equipado com bombas alternativas Shimadzu LC-20AT, ligados a um desgaseificador (DGU 20A5) com um integrador (CBM 20<sup>a</sup>), um detector diodo de arranjo (SPD-M20A) e solução LC, 1,22 software SP1.

As análises cromatograficas foram realizadas sob as condições de gradiente utilizando coluna C18 (4,6 mm x 250 mm) de fase inversa, com partículas de diâmetro embalado 5µm; A fase móvel foi água contendo 2% de ácido acético (A) e metanol (B), e o gradiente de composição foi a seguinte: 8% de B até 5 min e alteradas para se obter 20%, 30%, 50%, 60%,

70% , 20% e 10% de B a 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 min, respectivamente, seguindo o método descrito por Silva et al. (2014) com ligeiras modificações.

O extracto hidroalcoólico das folhas de *Tocoyena formosa* (Cham. & Schlecht.) K. Schum e a fase móvel foram filtrados através de filtro de membrana de 0,45 µm (Millipore) e, em seguida, desgaseificou-se por banho de ultrassons antes da utilização, o extracto hidroalcoólico das Folhas de *Tocoyena formosa* (Cham. & Schlecht.) K. Schum foram analisados a uma concentração de 20 mg/mL. A taxa de fluxo foi de 0,6 mL/min, o volume de injeção foi de 50 µL e os comprimentos de ondas foram 270nm para o ácido gálico e ácido elágico, 280 nm para a catequina, a 327 nm para o ácido clorogénico e ácido cafeico e 365 nm para a quercetina, a luteolina e rutina. Todas as amostras e fase móvel foram filtrados através de filtro de membrana de 0,45 µm (Millipore) e, em seguida, desgaseificou-se por banho de ultrassons antes da utilização. As soluções estoques de referências padrões foram preparados na fase móvel de HPLC numa gama de concentrações de 0,020-0,350 mg/ml para catequina, a quercetina, a luteolina e rutina; e 0,025-0,300 mg/ml para elágico, gálico, cafeico e ácidos clorogénicos. Os picos Cromatograficos foram confirmados por comparação do seu tempo de retenção com os de padrões de referência e por espectros de DAD (200 a 500nm). Todas as operações de cromatografia foram realizados a temperatura ambiente e em triplicata.

O limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) foi calculado com base no desvio padrão das respostas e a inclinação por meio de três curvas de análise independentes. O LOD e o LOQ foram calculados como 3,3 e 10  $\sigma/S$ , respectivamente, onde  $\sigma$  é o desvio padrão da resposta e S é o declive da curva de calibração (SILVA; et al., 2014).

### **3.5 Atividade antioxidante do extrato hidroetanólico das folhas de *Tocoyena formosa* (Cham. & Schlecht.) K. Schum**

#### **3.5.1 Atividade antioxidante por determinação de 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH)**

A atividade antioxidante do extracto hidroalcoólico das Folhas de *Tocoyena formosa* (Cham. & Schlecht.) K. Schum (EHFTF) foi medida e determinada através da capacidade do mesmo de sequestrar ou consumir o radical estável livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) por fotolorimetria *in vitro*.

O EHFTF e o ácido ascórbico foram preparados nas concentrações de 400, 200, 100, 50, 25 µg/ml. Posteriormente, o conteúdo foi colocado em placas de 96 poços, onde foi adicionada 50 µl de cada concentração do EHFTF + 50 µl de solvente (água) e 100 µl de

solução de DPPH (30 mg/ml); como controle positivo foi utilizado 50 µl de ácido ascórbico nas diferentes concentrações + 50 µl de solvente (água) e 100 µl de solução de DPPH (em ambiente escuro) em triplicata. Para os controles foram utilizados: 100 µl de etanol em 100 µl de solução de DPPH, 100 µl de solventes (água) em 100 µl de solução de DPPH, para cada grupo tratado e para os controles foram realizados testes em branco onde foram realizados com solventes (etanol e água, respectivamente) mais as amostras. Para cada poço da placa o volume final foram de 200 µl.

As leituras foram realizadas usando filtro de comprimento de onda de 517 nm em leitor de placa de ELISA. Após o tempo de estabilização e reação de 30 min (em ambiente escuro). A absorbância foi lida sendo a atividade antioxidante convertida em porcentagem de inibição. A quantidade de DPPH removida do meio é acompanhada pela diminuição na absorbância da solução do radical, e é proporcional à atividade da amostra, sendo possível assumir que o consumo de DPPH é equivalente a capacidade antioxidante pelas substâncias presentes na amostra. A curva padrão foi determinada por meio de leituras sucessivas no mesmo comprimento de onda (517 nm).

### **3.5.2 Atividade antioxidante pelo o método de redução do ferro - Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP)**

O método FRAP baseia-se na redução de elétrons e a reação ocorre pela formação do complexo TPTZ (2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina) mais  $Fe^{3+}$  de cor amarela, com o antioxidante presente, no qual faz com que o ferro seja reduzido tornando a coloração da amostra azul.

O reagente FRAP foi preparado imediatamente antes da análise através da mistura de 25 ml de tampão acetato (300 mM, pH 3,6), 2,5 ml de solução TPTZ (10 mM de TPTZ em HCl 40 mM) e 2,5 ml de  $FeCl_3$  (20 Mm) em solução aquosa e em seguida aquecida a 37°C por 30 min. Para análise uma alíquota de 100µL do EHFTF ou Vitamina C, (nas concentrações de 400, 200, 100, 50 e 25 µg/ml) respectivamente, foram adicionadas ao tubo de ensaio, depois foi acrescentada 270µL de água destilada e por ultimo 3 ml de reagente FRAP foi adicionado (tudo realizado em triplicata para cada concentração) e aguardado o tempo de 30min em temperatura ambiente.

A curva de calibração foi feita utilizando uma solução de sulfato ferroso padrão de 2.000µM, onde foram diluídas para obter os pontos da curva: 200, 500, 1000, 1500 e 2000µM. Onde 90 µL de cada ponto da curva foi pipetado em triplicata para os tubos e foram adicionados 270 µL de água destilada e 2,7 ml do reagente FRAP. Os tubos de ensaio foram

incubados a 37°C em banho de água durante 30 min. A curva de calibração foi determinada pela equação da reta ( $y = ax + b$ ).

As leituras das absorvâncias foram realizadas em espectrofotômetro com absorvância de 593 nm de comprimento de onda. A concentração equivalente foi definida como a concentração de antioxidante com uma capacidade na redução férrica no TPTZ equivalente ao de 1 mmol/L de  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ . Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão de micro mols de ferro<sup>2+</sup> por grama da amostra ( $\mu\text{mol Fe}^{2+}\text{SO}_4^{-2}/\text{g}$ ).

### 3.6 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss, machos, de idade adulta e com peso de 20 a 30g provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Juazeiro do Norte - FMJ. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas de polietileno com tampa de aço inox, forradas com maravalha autoclavada. A temperatura ambiente e a quantidade de ruído foram mantidas em condições ideais. O fotoperíodo foi de um ciclo claro/escuro de 12/12 horas diárias. A água filtrada e ração foram fornecidas *ad libitum* para os animais. Os animais foram mantidos em jejum de sólidos por um período de 8-18 h antes dos experimentos (de acordo com os testes).

Os animais foram manipulados de acordo com procedimentos para o uso científico de animais estabelecido pela lei Nº 11.794, de 8 de outubro de 2008 e em concordância com os Princípios Éticos para o uso de Animais de Laboratório preconizados pelo CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal), e submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Utilização de Animais da Universidade Regional do Cariri – CEUA/URCA com processo sob Nº 00198/2014.1

### 3.7 Investigação da toxicidade aguda oral e *screening* hipocrático do extrato hidroetanólico das folhas de *Tocoyena formosa* (Cham. & Schlecht.) K. Schum

Os camundongos foram separados aleatoriamente, pesados e divididos em seis grupos ( $n=3$ ) com acesso livre a água, a ração foi permitida 3 h após a administração. Os extratos foram dissolvidos em solução salina a 0,9% nas concentrações de 5000, 2000, 500, 175, 55 e 17.5mg/kg v.o. (dose única), cada animal recebeu uma concentração com volume de 0,1mL/10g. Inicialmente foi administrado 5000mg/kg v.o. havendo ocorrência de óbito, realizou-se as doses decrescentes posteriores. (OECD, 2008)

Os resultados foram registrados de forma sistemática e individual, no qual os parâmetros observados após a administração das substâncias foram relacionados às ações estimulantes do SNC: coçar o focinho, convulsão clônica e tônica, exoftalmia, aumento da frequência respiratória, lambes patas, morder cauda, aumento da motilidade, movimentos estereotipados, piloereção, tremores finos e grosseiros. Relacionados às ações depressoras do SNC: alienação ao meio, analgesia (por compressão da cauda do animal), anestesia (puxando o pêlo e suspendendo o animal), ataxia, diminuição da apreensão da pata, catatonía, dispnéia, exoftalmia, diminuição da frequência respiratória, diminuição da motilidade, diminuição do reflexo corneano, tônus dorsal, ptose palpebral e sedação. E relacionado a outros parâmetros, como: agressividade, contorção, coloração da urina, diâmetro da pupila, diarreia, ereção da cauda, fasciculações, grunhidos, aumento ou diminuição da micção, midríase, orelha (cianótica, hiperêmica ou pálida), passividade, reação de fuga, sialorréia, tremor da cauda, lacrimejamento, sudorese, coma e morte. (MALONE; ROBICHAUD, 1962)

O peso corporal dos animais foi verificado no dia da administração, no sétimo e no décimo quarto dia pós-administração. Durante o período experimental os animais foram examinados diariamente quanto aos aspectos clínicos, incluindo a postura, convulsões/tremores, consistência e aspecto das fezes, fechamento da pálpebra, piloereção, aspecto da pele e pêlos, estresse, salivação, olhos, e comportamento.

Ao final dos 14 dias de avaliação, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e seus órgãos (baço, coração, fígado, pulmões e rins) foram excisados e pesados. Os animais que evoluíram a óbito durante o experimento receberam o mesmo procedimento. (OECD, 2008)

### **3.8 Testes para avaliação da resposta anti-inflamatória do extrato hidroetanólico das folhas de *Tocoyena formosa* (Cham. & Schlecht.) K. Schum**

#### **3.8.1 Teste de edema de pata induzido por carragenina**

Os animais foram divididos em 5 grupos experimentais (n=6) tratados oralmente com veículo (Salina 0,9% 10 mL/kg), EHFTF (400, 200 e 100 mg/kg) e com indometacina (10 mg/kg v.o. como controle positivo) respectivamente. O volume basal das patas traseiras foi determinado antes da administração de qualquer droga. A determinação do volume basal se deu após 3 medições de cada pata para cada animal, de modo que os volumes médios dos diferentes grupos fossem semelhantes. As substâncias foram administradas por via oral, uma

hora antes da injeção intraplantar (20 µl/pata) de carragenina 1% (1mg/100µl) na pata posterior direita e veiculo (salina; 20 µl/pata) na pata posterior esquerda.

O volume da pata foi registrado em 1, 2, 3 e 4 h após a injeção do estímulo indutor da inflamação, com auxílio de um hidropletismômetro elétrico (aparelho que mede o volume de líquido deslocado e o traduz de forma digital) onde para cada hora foram realizado também 3 medições de cada pata para cada animal. Os resultados são apresentados como média da variação ( $\Delta$ ) da diferença do volume (mL) da pata direita e esquerda em relação aos valores basais; e da diferença do peso (mg) da pata direita e esquerda em relação aos valores basais. (Adaptado a partir WINTER; RISLEY; NUSS, 1962)

### **3.8.2 Teste de edema de pata induzido por dextrana**

Os animais foram divididos em 5 grupos experimentais (n=6) tratados oralmente com veículo (Salina 0,9% 10 mL/kg), EHFTF (400, 200 e 100 mg/kg) e com indometacina (10 mg/kg v.o. como controle positivo) respectivamente. O volume basal das patas traseiras foi determinado antes da administração de qualquer droga. A determinação do volume basal se deu após 3 medições de cada pata para cada animal, de modo que os volumes médios dos diferentes grupos fossem semelhantes. As substâncias foram administradas por via oral, uma hora antes da injeção intraplantar (20 µl/pata) de Dextrana 1% (1mg/100µl) na pata posterior direita e veiculo (Salina; 20 µl/pata) na pata posterior esquerda.

O volume da pata foi registrado em 15, 30, 45, 60, 90 e 120 min após a injeção do estímulo indutor da inflamação, com auxílio de um hidropletismômetro elétrico (aparelho que mede o volume de líquido deslocado e o traduz de forma digital) onde para cada hora foram realizado também 3 medições de cada pata para cada animal. Os resultados foram apresentados como média da variação ( $\Delta$ ) da diferença do volume (mL) da pata direita e esquerda em relação aos valores basais; e da diferença do peso (mg) da pata direita e esquerda em relação aos valores basais. (Adaptado a partir LAPA; et al., 2008)

### **3.8.3 Teste de permeabilidade vascular**

Os animais foram divididos em 3 grupos experimentais (n=8) tratados oralmente com veículo (Salina 0,9% 10 mL/kg), EHFTF (200mg/kg) e com indometacina (10mg/kg v.o. como controle positivo), respectivamente. No dia anterior ao teste, foi realizado a depilação do dorso dos animais com uma navalha. Os animais foram anestesiados com éter e receberam

injeção intravenosa (veia lateral da calda) de 25mg/kg de azul de Evans (5%, diluído em salina e filtrada 2X em papel filtro). Logo depois, foi administrado 4 injeções de 20µl de Carragenina (2% em solução salina) por via intradérmica na região dorsal depilada; 1h após foram anestesiados, exsanguinados, e a pele do dorso corada foi retirada e separada do tecido muscular subjacente, sendo em seguida removidas com cortador de couro (diâmetro de 10 mm) e os discos pesados.

Posteriormente, cada disco de pele foi cortado em pequenos fragmentos e colocados em 4 ml de formamida e mantidos em 37°C/24h, para extrair o corante, depois foram centrifugados a 2500rpm/30min. O sobrenadante corado foi estimado colorimetricamente, utilizando o comprimento de onda de 600nm. A leitura da absorbância foi interpolada em curva padrão de corante total extravasado e foi tomado como índice de extravasamento proteico. (LAPA; et al., 2008)

### **3.8.4 Teste de edema de orelha induzido por óleo de cróton**

Os animais foram divididos em 5 grupos experimentais (n=6) tratados topicamente com veículo (Salina 0,9% 10 mL/kg), EHFTF (400, 200 e 100 mg/kg) e com Dexametasona (2mg/kg; como controle positivo), respectivamente. Uma hora após os tratamentos, foram aplicados topicamente 20 µL de óleo de cróton (5% em acetona) na orelha direita e 20 µL de acetona na orelha esquerda. Quatro horas após, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e das suas orelhas esquerda e direita foram retirados discos de 6 mm de diâmetro, sendo estes pesados em balança analítica. Os resultados foram expressos como médias e erros padrões da diferença de peso, em miligramas (mg), entre as orelhas direita e esquerda ( $\Delta$ ) (TUBARO et al., 1986)

## **3.9 Testes para avaliação da resposta gastroprotetora do extrato hidroetanólico das folhas de *Tocoyena formosa* (Cham. & Schlecht.) K. Schum**

### **3.8.1 Lesão gástrica induzida por etanol**

Os camundongos foram separados aleatoriamente, pesados e divididos em cinco grupos (n=6), os mesmos foram pré-tratados com administração de solução salina (0,9%; 0,1 ml/10g v.o; controle negativo), Omeprazol (30 mg/kg v.o.; controle positivo), e EHFTF nas concentrações de 200, 100 e 50 mg/kg v.o. 1 h antes da indução da úlcera. Logo após, foi

administrado o etanol na dose de 0,2 ml v.o. (1h após os tratamentos) em todos os grupos; posterior à indução (30min após o etanol) os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, sendo em seguida laparatomizados para ressecção dos seus estômagos onde estes foram lavados em solução fisiológica de 0,9%, abertos pela grande curvatura (ROBERT, et al., 1979) e analisados conforme item 3.8.5.

### 3.9.2 Lesão gástrica induzida por indometacina

Os camundongos foram separados aleatoriamente, pesados e divididos em cinco grupos (n=6), os mesmos foram pré-tratados com administração de solução salina (0,9%, 0,1 ml/10g v.o.; controle negativo), Omeprazol (30 mg/kg v.o.; controle positivo), e EHFTF nas concentrações de 200, 100 e 50 mg/kg v.o. 1h antes da indução da úlcera. Logo após, foi administrado à indometacina 10 mg/kg na dose de 0,2 ml v.o. (1h após os tratamentos) em todos os grupos; posterior à indução (3h após a indometacina) foi repetido os tratamentos. Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical após 6h da indução, sendo em seguida laparatomizados para ressecção dos seus estômagos onde estes foram lavados em solução fisiológica de 0,9%, abertos pela grande curvatura (DJAHANGUIRI; SCAND, 1969) e analisados a partir de uma adaptação de escores (pontos) (TABELA 1) previamente estabelecidos segundo LAPA, et al. (2008).

**Tabela 1: Determinação de área lesionada através do sistema de Escores.**

Escore Pontos/Tipo de lesão	
0 – normal 1 – hiperêmica 1 - descorada	Colaração da mucosa
1 – leve 2 – moderado 3 - intenso	Petéquias
1 – leve 2 – moderado 3 - intenso	Edema
1 – leve 2 – moderado 3 - intenso	Hemorragia
1 – até 1mm 1,5 x mm – 1mm 5 x mm - perfuradas	Lesões Necro- hemorrágicas (úlceras)

### **3.9.3 Lesão gástrica induzida por etanol acidificado**

Os camundongos foram separados aleatoriamente, pesados e divididos em cinco grupos (n=6), os mesmos foram pré-tratados com administração de solução salina (0,9%, 0,1 ml/10g v.o.; controle negativo), Omeprazol (30 mg/kg v.o.; controle positivo), e EHFTF nas concentrações de 200, 100 e 50 mg/kg v.o. 1h antes da indução da úlcera. Logo após, foi administrado o etanol acidificado (0,3M de HCL em etanol 60%) na dose de 0,2 ml v.o. (1h após os tratamentos) em todos os grupos; posterior à indução (1h após o etanol acidificado) os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, sendo em seguida laparatomizados para ressecção dos seus estômagos onde estes foram lavados em solução fisiológica de 0,9%, abertos pela grande curvatura (MIZUI; SHIMONO; DOTEUCHI, 1987) e analisados conforme item 3.8.5.

### **3.9.4 Teste de barreira física**

Com a finalidade de analisar o possível mecanismo do EHFTF envolvido no efeito gastroprotetor por atuação a nível local e/ou sistêmico realizou-se o teste de barreira física. Neste teste foi utilizada a dose de 200 mg/kg do EHFTF, por apresentar uma significativa proteção gástrica (dose eficaz) em todos os outros testes nos modelos clássicos de lesão gástrica realizados anteriormente.

Os camundongos foram separados aleatoriamente, pesados e divididos em três grupos (n=6), os mesmos foram pré-tratados com administração de solução salina (0,9%, 0,1ml/10g v.o.; controle negativo), EHFTF 200mg/kg v.o. 1h antes da indução da úlcera, e EHFTF 200mg/kg i.p. 30min antes da indução da úlcera. Logo após, foi administrado o etanol na dose de 0,2 ml v.o. em todos os grupos; posterior à indução (30 min após o etanol) os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, sendo em seguida laparatomizados para ressecção de seus estômagos onde estes foram lavados em solução fisiológica de 0,9%, abertos pela grande curvatura (LAPA; et al., 2008) e analisados conforme item 3.8.5.

### **3.9.5 Análise informatizada das lesões gástricas induzidas**

Os estômagos foram estirados em uma placa de Scanner® onde as imagens foram captadas e digitalizadas em um computador para análise, medição e quantificação das áreas totais e das lesões macroscópicas (face glandular) com o uso de um programa de planimetria

computadorizada (ImageJ®), onde as áreas lesadas foram expressas em termos de porcentagem em relação à área total do corpo gástrico.

### **3.10 Testes para avaliação da resposta antinociceptiva do extrato hidroetanólico das folhas de *Tocoyena formosa* (Cham. & Schlecht.) K. Schum**

#### **3.10.1 Teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético**

Os animais foram divididos em 5 grupos experimentais (n=6) tratados com veículo (Salina 0,9% 10 mL/kg v.o.), EHFTF (400, 200 e 100 mg/kg v.o.) e com indometacina (10 mg/kg v.o. como controle positivo) respectivamente. Depois de 60 minutos dos tratamentos, todos os animais receberam injeção de ácido acético diluído em solução salina (1,2%; 100 ml/10 g, i.p.) e durante 30 minutos as contorções foram contadas, cada contorção é definida como uma contração da parede abdominal seguida da extensão de pelo menos uma das patas traseiras. Antes da injeção de ácido acético, funis de vidro foram colocadas para cada camundongo por um tempo de espera de 15 min para sua adaptação. Os resultados foram expressos como o número de contorções por 30 minutos da avaliação experimental ou pela porcentagem de inibição de contorções em relação ao grupo de controle. (KOSTER; ANDERSON, DE BEER, 1959; VACHER; DUCHÉNE-MARULLAZ; BARBOT, 1964)

#### **3.10.2 Teste da formalina**

Os animais foram divididos em 5 grupos experimentais (n=6) tratados com veículo (Salina 0,9% 10 mL/kg v.o.), EHFTF (400, 200 e 100 mg/kg v.o.) e com indometacina (10 mg/kg v.o. como controle positivo) respectivamente. Uma hora após os tratamentos, os animais receberam a administração intraplantar de 20µL de solução de formalina a 2,5% sob o coxim plantar da pata traseira direita. Imediatamente após, foi cronometrado o tempo em segundos que os animais manifestaram sinais dolorosos, como lambe a pata injetada. Estes sinais são respostas nociceptivas promovidas pela formalina durante suas duas fases, no qual a primeira fase de nocicepção, que varia de zero a 5min após a injeção, chamada de fase neurogênica ou inicial, e a segunda chamada de fase inflamatória ou tardia, e avaliada entre 15 e 30 min. (HUNSKAAR et al., 1985)

### 3.10.3 Teste placa quente

Os animais foram divididos em 5 grupos experimentais (n=6) tratados com veículo (Salina 0,9% 10 mL/kg v.o.), EHFTF (400, 200 e 100 mg/kg v.o.) e com morfina (5 mg/kg s.c. como controle positivo) respectivamente. Para determinar a sensibilidade térmica o teste foi realizado através de uma placa quente. Para este fim, cada animal foi inicialmente aclimatizado durante um período de 10 minutos à temperatura ambiente no aparelho. Após esse procedimento, a placa foi aquecida a uma temperatura entre 52-54°C. Cada animal foi colocado na placa e acionado o temporizador do equipamento para medir o tempo de latência de retirada da pata. Uma vez que o animal lambia a pata por reflexo nociceptivo era rapidamente removido da placa para evitar danos teciduais, e o tempo cronometrado até ao início do reflexo de retirada foi observado e considerado como limiar de sensibilidade térmica. (BEIRITH; et al., 1998)

O tempo de permanência máximo caso o animal não mostrasse nenhuma reação foi de 30 segundos, para impedir queimaduras nas patas. Todo teste foi realizado após a obtenção de duas basais (com intervalo de 30 min) e após os tratamentos cada animal foi avaliado 30, 60, 120 e 180 min após a administração. Estes testes foram realizados em uma sala silenciosa e no período da manhã (BEIRITH; et al., 1998). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média do tempo de latência.

### 3.10.4 Teste de retirada da cauda

Os animais foram divididos em 5 grupos experimentais (n=6) tratados com veículo (Salina 0,9% 10 mL/kg v.o.), EHFTF (400, 200 e 100 mg/kg v.o.) e com morfina (5 mg/kg s.c. como controle positivo) respectivamente. Os camundongos foram colocados em um aparelho que possui um aparato que contém uma fonte térmica luminosa e um suporte para encaixe da cauda do camundongo (analgesímetro térmico). O estímulo nociceptivo é produzido por um foco de luz convergente na cauda. A avaliação do tempo se dá em segundos (s), que o animal leva para retirar a cauda do local de incidência do estímulo térmico doloroso. (D'AMOUR e SMITH, 1941).

No mesmo momento que a cauda foi colocada no aparato, a fonte térmica nociva foi acionada e o cronômetro foi disparado, sendo que o tempo até a retirada da cauda (período de latência) foi utilizado como determinação do índice de nocicepção. Todo teste foi realizado após a obtenção de duas basais (com intervalo de 24h) e após os tratamentos cada animal foi

avaliado 30, 60, 120 e 180 min após a administração. Foi estabelecido o período máximo de latência de 15s a fim de se evitar lesão tecidual (D'AMOUR e SMITH, 1941). Estes testes foram realizados em uma sala tranquila e no período da manhã. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média do tempo de latência.

### **3.10.5 Teste de nociceção mecânica por pressão - von frey**

Os animais foram divididos em 5 grupos experimentais (n=6) tratados com veículo (Salina 0,9% 10 mL/kg v.o.), EHFTF (400, 200 e 100 mg/kg v.o.) e com indometacina (10 mg/kg v.o. como controle positivo) respectivamente. Depois de 60 minutos dos tratamentos (exceto o grupo que recebeu morfina - 30 min), todos os animais receberam injeção de formalina. Para determinar a sensibilidade mecânica o teste foi realizado através do aparelho de Von Frey. Para executar este teste, os animais foram colocados individualmente em caixas de vidro (12X20X20cm) apoiados em uma superfície elevada e coberto com uma malha de arame. Após a aclimatação neste ambiente durante 20 minutos, foram aplicados estímulos com uma haste com uma força constante na superfície plantar da pata posterior direita (para avaliar a hipernociceção à lesão dos camundongos lesionados) utilizando o aparelho de resistência de filamento de Von Frey. A força em questão pode ser alcançada pela retirada da pata do filamento pelo o animal. Essa força foi aplicada 6 vezes, onde foi considerado os três valores mais semelhantes. (CUNHA, et al., 2004)

Foram consideradas como respostas positivas, aquelas em que o animal realizou movimentos de retirada do membro posterior direito imediatamente após estimulação mecânica e foram rejeitadas as resposta seguida de caminhada. Este teste foi realizado imediatamente após a administração do agente flogístico (Formalina). Todo teste foi realizado após a obtenção de duas basais (com intervalo de 30 min) e após os tratamentos cada animal foi avaliado 30, 60, e 120 min e 24 h após a administração. Estes testes foram realizados em uma sala tranquila e no período da manhã. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média das respostas de pré e pós lesão nos camundongos, ou seja a partir da média da diferença da pata lesionada com a mesma em estado basal ( $\Delta$ ), nos períodos de tempo considerados neste estudo. (YOWTAK et al., 2011; MARTINOV; et. al., 2013)

### **3.10.6 Teste de Rota Rod**

Esse teste permite avaliar se o EHFTF promove relaxamento muscular ou sedação interferindo no efeito antinociceptivo. Para esta avaliação, os camundongos foram selecionados em uma sessão de treino 24 horas antes do experimento. Os animais foram colocados sobre uma barra giratória de 2,5 cm de diâmetro, elevada a 25 cm, os que foram capazes de permanecer na barra (16rpm/180s) foram selecionados como aptos para o experimento. Decorrido as 24 h, os animais foram divididos em três grupos (n=9) e tratados com veiculo (Salina 0,9% 10 mL/kg v.o.), diazepam (5 mg/kg i.p) e EHFTF (200 mg/kg v.o.). Após 1h a salina ou EHFTF e 30 min para o diazepam cada animal foi testado no aparelho, onde foi registrado o número de quedas sofridas (limite máximo de 3 quedas/animal) e o tempo de permanência durante 1 min (DUNHAM e MIYA, 1957).

### **3.11 Estudo dos possíveis mecanismos de ação do extrato hidroetanólico das folhas de *Tocoyena formosa* (Cham. & Schlecht.) K. Schum na Antinocicepção.**

Com a finalidade de analisar os possíveis mecanismos do EHFTF envolvido no seu efeito antinociceptivo, diferentes formas farmacológicas foram empregadas. O teste de Formalina (1° fase) foi utilizado como modelo para avaliar a nocicepção, pois este modelo é capaz de detectar interferências com a maioria dos mediadores e moduladores químicos da nocicepção (já que a magnitude de uma ação nocicetiva é resultado de uma combinação de numerosos mediadores que atuam a níveis periféricos, medulares e centrais (LAPA; et al., 2008)), também devido à especificidade e sensibilidade que apresenta na avaliação da resposta nociceptiva (LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001), além de singela a execução e reprodução envolvendo a administração de fármacos agonistas e antagonistas (LAPA; et al., 2008). Nesta seção de experimentos foi utilizada a dose de 200 mg/kg do EHFTF, que equivale aproximadamente à concentração que promove 50% do efeito inibitório máximo (DI50), quando administrado por via oral, na nocicepção induzida por Ácido Acético e também por ser a menor dose eficaz em todos os outros testes antinociceptivos realizados anteriormente.

Em todos os testes, os antagonistas foram administrados 15 min antes da salina, extrato e agonistas. O EHFTF foi administrado (v.o.) 1h antes e os fármacos agonistas/antagonistas da nocicepção 30 min antes (injeção i.p.) da injeção i.pl. do agente nociceptivo. A escolha das doses dos agonistas e antagonistas nociceptivos foi baseada em

dados da literatura (por exemplo, SANTOS et al., 1995, 1999, 2005; ABACIOGLU et al., 2001 WALKER et al., 1999) e testes anteriormente realizados em nosso laboratório. Foram investigadas a participação das vias de transmissão nociceptiva: opióide, colinérgica, adrenérgica  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$ , serotoninérgica, óxido nítrico, adenosina, dopaminérgica, glutaminérgica e vanilóide.

### **3.11.1 Participação do sistema opióide**

Com o objetivo de avaliar a participação do EHFTF sobre o sistema opióide no efeito antinociceptivo, os animais foram divididos em 6 grupos experimentais (n=8), onde os três primeiros grupos foram tratados com veículo (Salina 0,9% 10 mL/kg v.o.), EHFTF (200 mg/kg v.o.) e com morfina (agonista opióide; 5 mg/kg s.c.) respectivamente, e os outros três foram tratados da mesma forma, porém com administração prévia de 15 min com o antagonista naloxona (4mg/kg i.p.). Uma hora após os tratamentos com veículo ou EHFTF e 30 min após a morfina os animais foram avaliados em relação à nocicepção induzida pelo o Teste de Formalina, descrito anteriormente.

### **3.11.2 Participação do sistema $\alpha 1$ -adrenérgico**

Para analisar a participação do EHFTF sobre o sistema  $\alpha 1$ -Adrenérgico no efeito antinociceptivo, os animais foram divididos em 6 grupos experimentais (n=8) onde os três primeiros grupos foram tratados com veículo (Salina 0,9% 10 mL/kg v.o.), EHFTF (200 mg/kg v.o.) e fenilefrina (agonista  $\alpha 1$ ; 10mg/kg i.p.) respectivamente, e os outros três foram tratados da mesma forma, porém com administração prévia de 15 min com prazosina (antagonista  $\alpha 1$ ; 0,15mg/kg i.p.). Uma hora após os tratamentos com veículo ou EHFTF e 30 min após a fenilefrina, os animais foram avaliados em relação à nocicepção induzida pelo o Teste de Formalina, descrito anteriormente.

### **3.11.3 Participação do sistema $\alpha 2$ -adrenérgico**

Objetivando avaliar a participação do EHFTF sobre o sistema Adrenérgico no efeito antinociceptivo, os animais foram divididos em 6 grupos experimentais (n=8) onde os três primeiros grupos foram tratados com veículo (Salina 0,9% 10 mL/kg v.o.), EHFTF (200 mg/kg v.o.) e com clonidina (agonista  $\alpha 2$ ; 0,1 mg/kg i.p.) respectivamente, e os outros três foram tratados da mesma forma, porém com administração prévia de 15 min com ioimbina (antagonista  $\alpha 2$ ; 0,15mg/kg i.p.). Uma hora após os tratamentos com veículo ou EHFTF e 30

min após a clonidina, os animais foram avaliados em relação à nocicepção induzida pelo o Teste de Formalina, descrito anteriormente.

#### **3.11.4 Participação do sistema colinérgico**

Para verificar a participação do EHFTF sobre o sistema colinérgico no efeito antinociceptivo, os animais foram divididos em 6 grupos experimentais (n=8), onde os três primeiros grupos foram tratados com veículo (Salina 0,9% 10 mL/kg v.o.), EHFTF (200 mg/kg v.o.) e acetilcolina (agonista colinérgico; 1,0 mg/kg i.p.) respectivamente, e os outros três foram tratados da mesma forma, porém com administração prévia de 15 min com atropina (antagonista colinérgico não seletivo 1,0mg/kg i.p.). Uma hora após os tratamentos com veículo ou EHFTF e 30 min após a acetilcolina os animais foram avaliados em relação à nocicepção induzida pelo o Teste de Formalina, descrito anteriormente.

#### **3.11.5 Participação do sistema serotoninérgico**

Para análise da participação do EHFTF sobre o sistema Serotoninérgico no efeito antinociceptivo, os animais foram divididos em 4 grupos experimentais (n=8), onde os dois primeiros grupos foram tratados com p-clorofenilalanina (PCPA, 100mg/kg i.p., 1 vez ao dia/4 dias consecutivos) e os outros dois foram tratados com Salina 0,9% (10ml/kg i.p., 1 vez ao dia/4 dias consecutivos). Após 30min do último tratamento com PCPA e salina os animais receberam veículo (Salina 0,9% v.o.) e EHFTF (200mg/kg v.o.). Uma hora após os tratamentos com veículo ou EHFTF os animais foram avaliados em relação à nocicepção induzida pelo o Teste de Formalina, descrito anteriormente.

#### **3.11.6 Participação da via L-arginina/óxido nítrico/GMPc**

Para aferição da participação do EHFTF sobre a via L-arginina/Óxido Nítrico/GMPc no efeito antinociceptivo, os animais foram divididos em 6 grupos experimentais (n=8), onde os três primeiros grupos foram tratados com veículo (Salina 0,9% v.o.), EHFTF (200 mg/kg v.o.), L-NOARG, (inibidor da óxido nítrico sintase - NOS; 75 mg/kg, ip), respectivamente, e os outros três foram tratados da mesma forma, porém com administração prévia de 15 min com L-Arginina (substrato da NOS; 600mg/kg i.p.). Uma hora após os tratamentos com veículo ou EHFTF e 30 min após a L-NOARG os animais foram avaliados em relação à nocicepção induzida pelo o Teste de Formalina, descrito anteriormente.

### **3.11.7 Participação do sistema adenosinérgico**

Com o objetivo de avaliar a participação do EHFTF sobre o sistema Adenosinérgico no efeito antinociceptivo, os animais foram divididos em quatro grupos (n=8) e tratados com veículo (Salina 0,9% 10 mL/kg v.o.), cafeína (antagonista dos receptores A<sub>1</sub>; 10 mg/kg i.p.), EHFTF (200 mg/kg v.o.) e cafeína (10 mg/kg ip) mais EHFTF (200 mg/kg, v.o.). A cafeína foi administrada 15 min antes do tratamento com EHFTF. Uma hora após o tratamento com veículo ou EHFTF e 30 min após a cafeína, os animais foram avaliados em relação à nocicepção induzida pelo o Teste de Formalina, descrito anteriormente.

### **3.11.8 Participação do sistema dopaminérgico**

Objetivando analisar a participação do EHFTF sobre o sistema dopaminérgico no efeito antinociceptivo, os animais foram divididos em quatro grupos (n=8) e tratados com veículo (Salina 0,9% 10 mL/kg v.o.), haloperidol (um antagonista não-seletivo dos receptores de dopamina; 0,2 mg/kg i.p.) EHFTF (200 mg/kg, v.o.), e haloperidol (0,2 mg/kg i.p.) mais EHFTF (200 mg/kg, v.o.). O haloperidol foi dado 15 minutos antes do tratamento com EHFTF. Uma hora após o tratamento com veículo ou EHFTF e 30 min após a haloperidol, os animais foram avaliados em relação à nocicepção induzida pelo o Teste de Formalina, descrito anteriormente.

### **3.11.9 Participação do sistema glutamatérgico**

Na perspectiva de avaliar a participação do EHFTF sobre o sistema Glutaminérgico no efeito antinociceptivo, os animais foram divididos em quatro grupos (n=8) e tratados com veículo (Salina 0,9% 10 mL/kg v.o.), Ácido ascórbico (um antagonista dos receptores de NMDA, 100 mg/kg i.p.), EHFTF (200 mg/kg, v.o.), e Ácido ascórbico (100 mg/kg i.p.) mais EHFTF (200 mg/kg, v.o.). O Ácido ascórbico foi dado 15 min antes do tratamento com EHFTF. Uma hora após o tratamento com veículo ou EHFTF e 30 min após o Ácido ascórbico, os animais foram aferidos em relação à nocicepção induzida pela injeção intraplantar de 20 µl de glutamato tamponado (agonista; 20 µmol/pata) e foram analisados por 15 min. O tempo em segundos que o animal lambeu a pata foi considerado como sugestivo de dor. (BEIRITH; SANTOS; CALIXTO, 2002)

### 3.11.10 Participação do sistema vanilóide (TRPV-1)

Com o intuito de avaliar a participação do EHFTF sobre o sistema Vanilóide no efeito antinociceptivo, os animais foram divididos em quatro grupos (n=8) e tratados com veículo (Salina 0,9% 10 mL/kg v.o.), Vermelho de Rutênio (antagonista TRP não seletivo; 3 mg/kg, i.p.), EHFTF (200 mg/kg, v.o.), e Vermelho de Rutênio (3 mg/kg i.p.) mais EHFTF (200 mg/kg, v.o.). O Vermelho de Rutênio foi dado 15 min antes do tratamento com EHFTF. Uma hora após o tratamento com veículo ou EHFTF e 30 min após o Vermelho de Rutênio, os animais foram aferidos em relação à nocicepção induzida pela injeção intraplantar de 20 µl a 5,2 nmol/pata capsaicina (agonista de receptor TRPV1) e foram analisados por 5 min. O tempo em segundos que o animal lambeu a pata foi considerado como sugestivo de dor. (SANTOS, CALIXTO, 1997)

### 3.12 Análise estatística

Foi empregado o programa *Software GraphPad Prism* versão 6.0, onde os dados paramétricos foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M). Para a verificação das diferenças estatísticas entre os grupos foi realizada análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias conforme o protocolo experimental, seguido do teste de Tukey de múltiplas comparações. Para todas as análises foi considerado significativo  $p < 0,05$ .

***RESULTADOS E  
DISCUSSÃO***

---

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 ARTIGO 1:

#### TOXICIDADE AGUDA ORAL E ATIVIDADE ANTINFLAMATÓRIA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS DE *Tocoyena formosa* (Cham. & Schltdl.) *K. Schum*

Francisco Rafael Alves Santana Cesário<sup>1</sup>, Thaís Rodrigues de Albuquerque<sup>1</sup>, Giovana Mendes de Lacerda<sup>1</sup>, Maria Rayane Correia de Oliveira<sup>1</sup>, Bruno Anderson Fernandes da Silva<sup>1</sup>, Lindaiane Bezerra Rodrigues<sup>1</sup>, Anita Oliveira Brito Pereira Bezerra Martins<sup>1</sup>, Irwin Rose Alencar de Menezes<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Química Biológica, Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular, Universidade Regional do Cariri, 63105-000, Crato, CE, Brasil

**RESUMO:** A inflamação é uma resposta de proteção ao organismo frente a um agente agressor, esse processo é controlado por elementos pró e anti-inflamatórios e considerado benéfico, porém em algumas situações essa resposta pode se tornar exacerbada sem qualquer benefício. O estudo de plantas medicinais que tem ação sobre processos inflamatórios assume grande importância, pois estas, além de serem fontes de moléculas farmacológicas com potencial ativo, elas se tornam uma alternativa/complemento para o tratamento de tais processos. Entre as muitas plantas medicinais utilizadas, encontra-se a *Tocoyena formosa* (Cham. E Schlecht.) *K. Schum.* utilizada popularmente na região do Cariri, CE, Brasil, na terapêutica de contusões, torções, dores e como anti-inflamatório no tratamento de dores reumáticas. Este estudo teve como objetivo avaliar os efeitos tóxicos agudos e anti-inflamatório do Extrato Hidroetanólico das Folhas de *Tocoyena formosa* (Cham. & Schlecht.) *K. Schum.* (EHFTF). O extrato por sua vez, não promoveu toxicidade oral aguda segundo os critérios adotados, apresentando DL<sub>50</sub> maior que 5000mg/kg. O extrato nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg reduziu significativamente o edema de pata induzido por carragenina. O EHFTF somente nas doses de 200 e 400mg/kg foi eficaz na redução significativa do volume do edema da pata induzido por dextrana. No teste de permeabilidade vascular o EHFTF (200mg/kg) reduziu a migração proteica/celular na inflamação induzida por carragenina intradérmica no dorso dos animais. Entretanto, o EHFTF não promoveu redução do processo inflamatório

tópico no teste de edema de orelha. Conclui-se, portanto, que o EHFTF apresenta baixa toxicidade aguda e atividade anti-inflamatória sistêmica.

**Palavras-chave:** Toxicidade Aguda, *Tocoyena Formosa*, Inflamação.

## INTRODUÇÃO

A inflamação é caracterizada como uma resposta de proteção ao organismo frente a um patógeno agressor, que visa promover a restauração/cura. A intensidade desse processo é controlada por meio de elementos pró e anti-inflamatórios. A inflamação é um processo considerado benéfico e necessário, uma vez que o funcionamento em conjunto dos hormônios e moléculas de sinalização são responsáveis pela regeneração e reparação de estruturas danificadas. (ZALDIVAR; et al., 2006)

A pesquisa a partir de plantas com conhecido uso popular como agente antiinflamatório ou redutores da dor, pode ser visto como uma excelente estratégia na procura por novas drogas antiinflamatórias (ELISABETSKY et al, 1995). No Brasil existem muitas plantas com ações farmacológicas excelentes, embora a maioria delas são utilizadas pela população sem base científica (FILIPINI; et. al., 2012)

A *Tocoyena formosa* (Cham. & Schlecht.) K. Schum., por exemplo, é uma planta muito utilizada popularmente na terapêutica de feridas, contusões, torções, dores lombares e reumáticas e outros processos inflamatórios na cidade do Crato, na Região do Cariri, sul do Ceará, Brasil, e tem sua importância tradicional muito ressaltada, porém, os indivíduos que fazem uso desta espécie não possui informações concretas das reais ações dessa planta.

A *Tocoyena formosa* (Cham. & Schldl.) K. Schum. é uma espécie sul-americana, encontrada no Paraguai, Bolívia e Brasil, principalmente em formações xeromórficas como cerrado, restinga e caatinga. No Brasil, a espécie tem um gama enorme de distribuição na Região Nordeste (COELHO; AGRA; BARBOSA, 2006), é uma espécie ornamental, que cresce espontaneamente em regiões secas e em Cerrado, é uma savana e possui vegetação fisionomicamente florística diversificada sendo muito impressionante por conta de suas flores amarelas e verde (HAMERSKI; et. al, 2008; BOLZANI, et. al., 1997) e é tradicionalmente conhecido como "Jenipapo do campo" (COELHO; AGRA; BARBOSA, 2006).

Diante dessa importância de avaliar a ação farmacológica deste vegetal com informações restritas a dados etnofarmacológicos na região, a *Tocoyena formosa* (Cham. &

Schltdl.) *K. Schum* pode exibir atividade anti-inflamatória, justificando, o desenvolvimento de estudos para investigar esse potencial terapêutico para controlar e tratar doenças inflamatórias.

A partir disso, este trabalho tem como objetivo avaliar e investigar a toxicidade aguda, atividade anti-inflamatória do Extrato Hidroetanólico das Folhas de *Tocoyena formosa* (*Cham. & Schlecht.*) *K. Schum* (EHFTF) em camundongos.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

### **Coleta do material botânico, preparação do extrato hidroetanólico das folhas de *Tocoyena formosa* (*Cham. & Schlecht.*) *K. Schum*.**

As folhas de *Tocoyena formosa* (*Cham. & Schlecht.*) *K. Schum* foram coletadas na chapada do Araripe, localizada no nordeste do Brasil, sul do Ceará, na região do Cariri, no município de Crato-CE, no Sítio Barreiro Grande (07° 21'44,0''S e 39° 28'41,0''W com altitude de 901m acima do nível do mar), e com proximidade de 65,9 km do município de Serrita-PE e possui uma área total de 76.654,3 km<sup>2</sup> (BRASIL, 2011). Uma amostra representativa da espécie (Exsicata) contendo fruto foi encaminhada para identificação junto ao Herbário Dárdano de Andrade Lima da Universidade Regional do Cariri – URCA sob N° 2.770.

O material botânico (folhas) foi exposto ao sol para secagem, pesado e triturado, sendo em seguida submetido à extração em solvente etanol e água destilada (na proporção 1:1), por 72 h. O extrato hidroetanólico formulado foi filtrado para e submetido à extração da clorofila por adição de carvão ativado no extrato (10g/100ml) no período de 30min, após isso, foi filtrado novamente para retenção do carvão ativado. Depois, concentrado por destilação do solvente em evaporador rotativo e em seguida o foi posto em banho-maria para proporcionar evaporação por completo de etanol, após 24hs foi congelado e colocado em processo de liofilização.

### **Prospecção fitoquímica qualitativa**

A prospecção fitoquímica do extrato e das frações foi realizada para determinação de compostos secundários presentes no EHFTF, segundo a metodologia de Matos (2002), sendo

avaliada a existência das principais classes, como: Fenóis, Taninos, Antocianinas, Antocianidinas, Flavanóides, Leucoantocianidinas, catequinas, flavonas, alcaloides, Esteróides, Triterpenóides e Saponinas. Essa metodologia aborda a observação visual de colorações e formação de precipitados após a exposição a reagentes químicos específicos.

## **Animais**

Foram utilizados camundongos Swiss, machos, de idade adulta e com peso de 20 a 30g provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Juazeiro do Norte - FMJ. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas de polietileno com tampa de aço inox, forradas com maravalha autoclavada. A temperatura ambiente e a quantidade de ruído foram mantidas em condições ideais. O fotoperíodo foi de um ciclo claro/escuro de 12/12 h diárias. Os animais foram mantidos em jejum de sólidos por um período de 8-12 h antes do experimento e a água filtrada foi fornecida *ad libitum*. Foram manipulados de acordo com procedimentos para o uso científico de animais estabelecido pela lei N° 11.794, de 8 de outubro de 2008 e em concordância com os Princípios Éticos para o uso de Animais de Laboratório preconizados pelo COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) e submetido e aprovado pelo Comissão Ética em utilização de animais da Universidade Regional do Cariri – URCA com processo sob N° 00198/2014.1.

## **Investigação da toxicidade aguda oral e *screening* hipocrático**

Os camundongos foram separados aleatoriamente, pesados e divididos em seis grupos (n=3) e deixados em jejum por um período de 6h com acesso livre apenas água, e a ração foi permitida 3 h após a administração. Os extratos foram dissolvidos em solução salina a 0,9% nas concentrações de 5000, 2000, 500, 175, 55 e 17.5mg/kg v.o. (dose única), cada animal recebeu uma concentração diferente com o volume de 0,1mL/10g. Inicialmente foi administrado 5000mg/kg v.o. Havendo ocorrência de óbito, realiza-se as doses decrescentes posteriores. (OECD, 2008)

Os resultados foram registrados de forma sistemática e individualmente. Os parâmetros observados após a administração das drogas, relacionados às ações estimulantes, são: coçar o focinho, convulsão clônica e tônica, exoftalmia, aumento da frequência respiratória, lambar patas, morder cauda, aumento da motilidade, movimentos estereotipados, piloereção, tremores finos e grosseiros; relacionados às ações depressoras, são: alienação ao

meio, analgesia (por teste de compressão da cauda do animal), anestesia (puxando o pêlo e suspendendo o animal), ataxia, diminuição da apreensão da pata, catatonía, dispnéia, exoftalmia, diminuição da frequência respiratória, diminuição da motilidade, diminuição do reflexo corneano, tônus dorsal, ptose palpebral e sedação; e os outros parâmetros observados são: agressividade, contorção, coloração da urina, diâmetro da pupila, diarreia, ereção da cauda, fasciculações, grunhidos, aumento ou diminuição da micção, midríase, orelha (cianótica, hiperêmica ou pálida), passividade, reação de fuga, sialorréia, tremor da cauda, lacrimejamento, sudorese, coma e morte. (MALONE; ROBICHAUD, 1962) Durante o período experimental os animais foram examinados diariamente quanto aos aspectos clínicos citados anteriormente.

O peso corporal dos animais foi verificado no dia da administração, no sétimo e no décimo quarto dia pós-administração.

Ao final dos 14 dias de avaliação, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e seus órgãos (baço, coração, fígado, pulmões e rins) foram extirpados e pesados. Os animais que evoluíram a óbito durante o experimento receberam o mesmo procedimento. (OECD, 2008)

### **Avaliação da resposta anti-inflamatória do extrato hidroetanólico das folhas de *Tocoyena formosa* (Cham. & Schlecht.) K. Schum**

#### **Teste do edema de pata induzido por carragenina**

Os animais foram divididos em 5 grupos experimentais (n=6) tratados oralmente com veículo (Salina 0,9% 10 mL/kg), EHFTE (400, 200 e 100 mg/kg) e com indometacina (10 mg/kg como controle positivo) respectivamente. O volume basal das patas traseiras foi determinado antes da administração de qualquer droga. A determinação do volume basal se dá após as 3 medições para cada animal. As substâncias a serem testadas foram administradas uma hora antes da injeção intraplantar de carragenina 1% (20 µl/pata) na pata posterior direita e veículo-salina (20 µl/pata) na pata esquerda. O volume da pata foi registrado em 1, 2, 3, 4h, com um hidropletismômetro elétrico onde para cada hora foram realizado também 3 medições. Os resultados foram apresentados como média da variação ( $\Delta$ ) da diferença do volume (mL) da pata direita e esquerda em relação aos valores basais; e da diferença do peso (mg) da pata direita e esquerda em relação aos valores basais. (WINTER; RISLEY; NUSS, 1962)

### **Teste do edema de pata induzido por dextrana**

Os animais foram divididos em 5 grupos experimentais de seis camundongos tratados oralmente com veículo (Salina 0,9% 10 mL/kg), EHFTF (400, 200 e 100 mg/kg) e com indometacina (10 mg/kg) (como controle positivo) respectivamente. O volume basal das patas traseiras foi determinado antes da administração de qualquer droga. A determinação do volume basal se dá após as 3 medições para cada animal. As substâncias a serem testadas foram administradas uma hora antes da injeção intraplantar de Dextrana 1% (20 µl/pata) na pata posterior direita e veículo-salina (20 µl/pata) na pata esquerda. O volume da pata foi registrado em 30, 45, 60, 90 e 120min com um hidropletismômetro elétrico, onde para cada hora foram realizado também 3 medições. Os resultados foram apresentados como média da variação ( $\Delta$ ) da diferença do volume (mL) da pata direita e esquerda em relação aos valores basais; e da diferença do peso (mg) da pata direita e esquerda em relação aos valores basais. (LAPA; et al., 2008)

### **Teste de permeabilidade vascular**

No dia anterior ao teste, foi realizado a depilação do dorso dos animais com uma navalha. Os animais foram divididos em 3 grupos experimentais (n=8) tratados oralmente com veículo (Salina 0,9% 10 mL/kg), EHFTF (200mg/kg) e com indometacina (10mg/kg como controle positivo), respectivamente. Os animais foram anestesiados com éter e receberam injeção intravenosa (veia lateral da calda) de 25mg/kg de azul de Evans (5% em salina, filtrada 2X em papel filtro). Logo depois, foi realizada 4 injeções por via intradérmica na região dorsal depilada de 20µl de Carragenina (2% em solução salina), 1h após foram anestesiados, exsanguinados, e a pele do dorso corada foi retirada, sendo em seguida removidas com cortador de couro (diâmetro de 10mm) e os discos foram pesados. Posteriormente, cada disco foi cortado em pequenos fragmentos e colocados em 4ml de formamida e mantidos em 37°C/24h, para extrair o corante, depois foram centrifugados a 2500rpm/30min. O sobrenadante corado é estimado colorimetricamente, utilizando o comprimento de onda de 600nm. A leitura da absorbância do corante total extravasado é tomado como a quantidade de extravasamento proteico. (LAPA; et al., 2008)

### **Teste do edema de orelha induzido por óleo de cróton**

Os animais foram divididos em 5 grupos experimentais de seis camundongos tratados topicamente com veículo (Salina 0,9% 10 mL/kg), EHFTF (400, 200 e 100 mg/kg) e com Dexametasona (2mg/kg como controle positivo) respectivamente. Uma hora após os tratamentos, foram aplicados topicamente 20 µL de óleo de cróton (5% em acetona) na orelha direita e 20 µL de acetona na orelha esquerda. Quatro horas após, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e das suas orelhas esquerda e direita, foram retirados discos de 6 mm de diâmetro com um push metálico, sendo estes pesados em balança analítica. (TUBARO et al., 1986)

### **Análise estatística**

Foi empregado o programa *Software GraphPad Prism* versão 6.0, onde os dados paramétricos serão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M). Para a verificação das diferenças estatísticas entre os grupos será realizada análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias conforme o protocolo experimental, seguido do teste de Tukey de múltiplas comparações. Para todas as análises será considerado significativo um  $p < 0,05$ .

## **RESULTADOS**

### **Prospecção fitoquímica qualitativa**

A análise fitoquímica das folhas de *Tocoyena formosa* (Cham. & Schlecht.) K. Schum (EHFTF) permitiu identificar a presença de metabólitos secundários, conforme evidenciado na Tabela 1.

**Tabela 1: Classes de metabólitos secundários encontradas no extrato hidroetanólico das folhas de *Tocoyena formosa* (Cham. & Schlecht.) K. Schum.**

<b>Classes de Metabólitos</b>	<b>(+) Presença (-) Ausência</b>
Fenóis	-
Taninos pirogálicos	-
Taninos condensados	+
Antocianinas	-
Antocianidinas	-
Flavonas	+
Flavonóis	+
Xantonas	+
Chalconas	+
Auronas	+
Flavononóis	+
Leucoantocianidinas	+
Catequinas	+
Flavononas	+
Alcalóides	-
Esteróides	-
Triterpenóides pentacíclicos	+
Saponinas	+

### **Investigação da toxicidade aguda oral e *screening* hipocrático**

No teste de toxicidade aguda quanto à avaliação comportamental dos camundongos, o EHFTF apresentou baixa toxicidade nos ensaios realizados, quando administrado por via oral. Foram notados nos animais tratados, os seguintes sintomas aumento da motilidade, piloereção, mordida da cauda, ataxia, perda dos reflexos corneanos, passividade e alteração na coloração da urina. Todas essas alterações foram observadas na dose de 5000mg/kg do EHFTF em relação ao grupo controle, no qual revela que a DL50 é maior que 5000mg/kg v.o. Porém não houve morte de nenhum dos animais tratados. Durante todo o período experimental os animais examinados diariamente quanto aos aspectos clínicos também não apresentaram alterações significativas em relação ao grupo controle.

A média do peso corporal nos intervalos (0, 7, 14 dias) não apresentou diferença significativa nos pesos dos animais tratados com 5000 mg/kg do EHFTF, quando comparados ao Controle (Tabela 2)

**Tabela 2: Média do peso corporal (g) dos animais tratados com 5000 mg/kg do EHFTF e do grupo Controle**

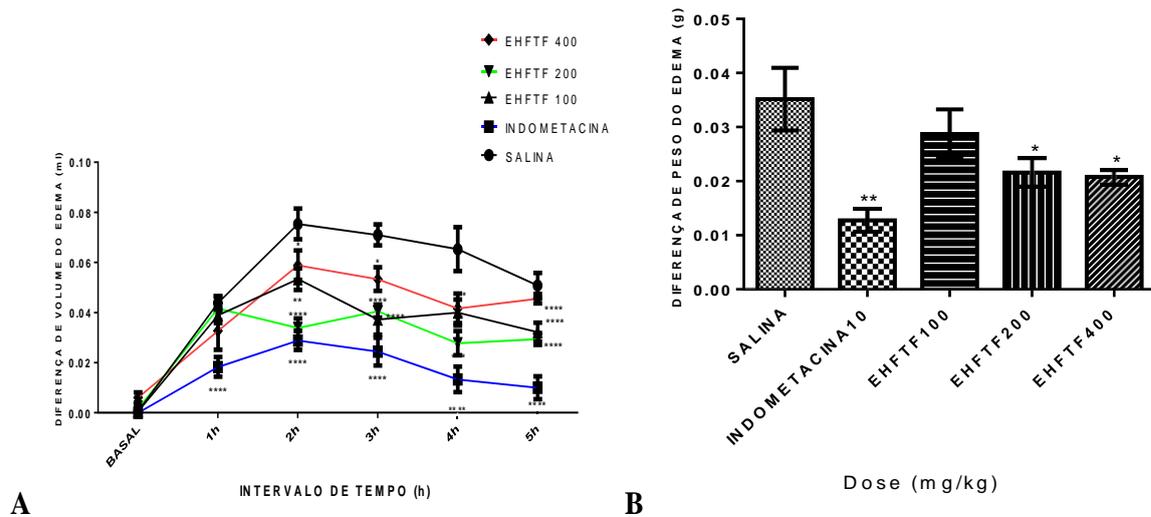
<b>Dias</b>	<b>Controle</b>	<b>EHFTF 5000mg/kg</b>
Dia 0	28,0±1,5g (n = 3)	29,0±2,9g (n = 3)
Dia 7	29,0±2,7g (n = 3)	30,0±4,0g (n = 3)
Dia 14	29,0±5,2g (n = 3)	30,0±4,6g (n = 3)

Na análise macroscópica dos órgãos, os animais tratados com EHFTF na dose de 5000 mg/kg não exibiram alterações orgânicas na coloração, volume e textura, quando comparado com o grupo controle e não houve diferença significativa nos pesos dos órgãos (baço, coração, fígado, pulmões e rins) quando comparados ao controle. Os resultados demonstram que os órgãos essenciais como fígado e rins não foram adversamente afetados durante todo o tratamento. As doses escolhidas para o screening anti-inflamatório foram equivalente a no máximo 10% da DL50, no qual o valor da DL50 é superior a 5000 mg/kg v.o. o que classifica como um composto de baixa toxicidade.

#### **Avaliação da resposta antiinflamatória do extrato hidroetanólico das folhas de *Tocoyena formosa* (Cham. & Schlecht.) K. Schum**

##### **Teste do edema de pata induzido por carragenina**

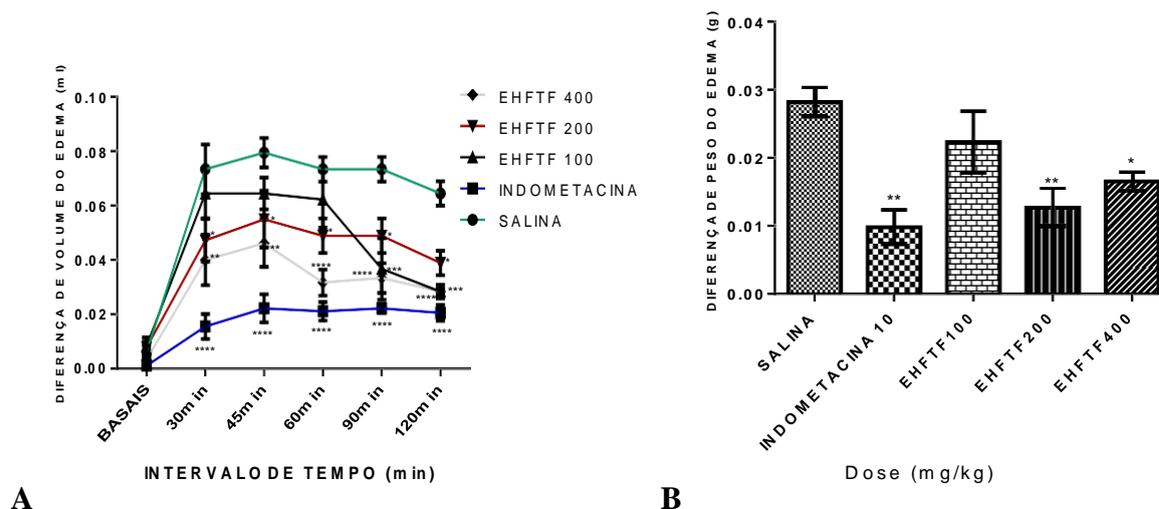
Os resultados mostram que o extrato (100, 200 e 400 mg/kg, v.o.) reduziu significativamente o edema de pata induzido por carragenina após as 2, 3, 4 e 5 horas de sua administração, sendo que a dose mais eficaz (200mg/kg) reduziu em 55,03%, 42,84%, 57,47%, 42,03%, respectivamente e a indometacina reduziu o edema 1, 2, 3, 4 e 5 horas em 58,23%; 61,66%; 65,56%; 79,59% e 80,31%, respectivamente, em relação ao controle (Figura 1A). As doses de 100, 200 mg/kg não alteraram o edema dos animais submetidos ao teste na primeira hora. A indometacina manifestou seu efeito na 1<sup>o</sup> hora após sua administração, mantendo uma redução do edema até a 5<sup>o</sup> hora, assim como o extrato (100 e 200 mg/kg). Foi realizada a pesagem das patas, no qual confirma a ação do extrato como antiedematogênico, principalmente nas doses de 400 e 200 mg/kg que apresenta significância em relação ao controle. (Figura 1B)



**Figura 1:** Efeito do extrato administrado por via oral sobre a inflamação (edema) na pata induzida por carragenina 1% (i.pl.) na pata traseira esquerda e salina na direita (n=6). Os resultados são apresentados como: A: Os símbolos e linhas indicam as médias  $\pm$  erro padrão da Média da variação ( $\Delta$ ) da diferença do volume (ml) da pata direita e esquerda em relação aos valores basais; B: As Barras e linhas indicam as médias  $\pm$  erro padrão da Média da diferença do peso (g) da pata direita e esquerda em relação aos valores basais. \*\*\*\* $p < 0,0001$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$ , quando comparados com o controle negativo (Salina); A: ANOVA Two-Way seguido do Teste de múltiplas comparações de Tukey, B: ANOVA One-Way seguido do Teste de múltiplas comparações de Tukey.

### Teste do edema de pata induzido por dextrana

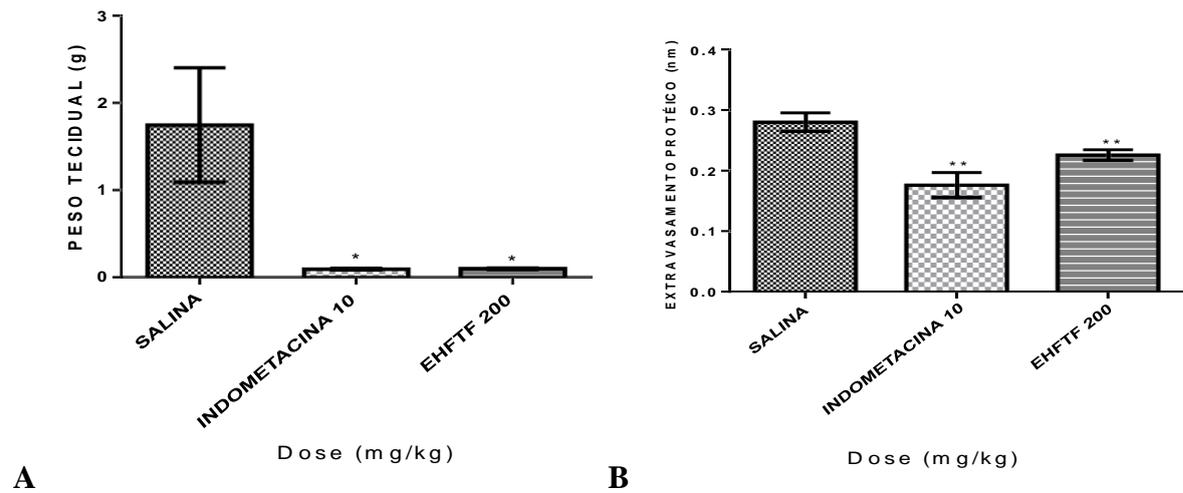
Os dados indicam que o EHFTF (200 e 400mg/kg) foi eficaz na redução significativa do volume do edema da pata induzido por dextrana em relação ao controle. A dose de 200 mg/kg, foi capaz de impedir o desenvolvimento do edema em 35,60%, 30,76%, 33,32%, 33,32% e 39,64%, a dose de 400 mg/kg promoveu uma inibição de 45,45%, 41,95%, 56,81%, 54,54% e 43,86% e a indometacina foi capaz de reduzir o edema em 78,78%, 72,02%, 71,21%, 69,72% e 68,09% nos tempos de 30, 45, 60, 90 e 120 min, respectivamente (Figura 2). A dose de 200 e 400 mg/kg exibiu um efeito anti-inflamatório significativo com ação inicial aos 30 min da administração e ao longo de todo teste, com efeito máximo aos 120 min, ao contrario da dose de 100 mg/kg que apresenta ação tardia com resultado significativo somente aos 90 min. A indometacina manifestou seu efeito máximo nos primeiros 30 min e manteve uma redução do edema até os 120 min. Para ratificar os dados do plestismômetro, foi realizada a pesagem das patas edemaciadas, no qual o EHFTF na dose de 200 e 400mg/kg mostrou-se significativo na redução do processo inflamatório em relação à Salina.



**Figura 2:** Efeito do extrato administrado por via oral sobre a inflamação (edema) na pata induzida por Dextrana 1% (i.p.l.) na pata traseira esquerda e salina na direita (n=6). Os resultados são apresentados como: **A:** Os símbolos e linhas indicam as médias  $\pm$  erro padrão da Média da variação ( $\Delta$ ) da diferença do volume (mL) da pata direita e esquerda em relação aos valores basais; **B:** As Barras e linhas indicam as médias  $\pm$  erro padrão da Média da diferença do peso (g) da pata direita e esquerda em relação aos valores basais. \*\*\*\* $p < 0,0001$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$ , quando comparados com o controle negativo (Salina), A: ANOVA Two-Way seguido do Teste de múltiplas comparações de Tukey, B: ANOVA One-Way seguido do Teste de múltiplas comparações de Tukey.

### Teste de permeabilidade vascular

Para verificar a participação do processo de permeabilidade vascular no potencial antiinflamatório do extrato foi selecionado para esse teste a menor dose efetiva do extrato (200mg/kg) de acordo com os testes supracitados. Os valores ilustram o efeito do extrato sobre a inflamação induzida por carragenina intradérmica no dorso dos animais, no qual foi comparado o efeito do EHFTF sobre a migração proteica/celular (Exsudato), analisada a partir do peso tecidual edemaciado (Figura 3A) e da concentração do Azul de Evans no sobrenadante (Figura 3B) em relação ao controle. O EHFTF e a indometacina reduziu significativamente o edema (g) em 94,32%, 94,56%, respectivamente. Quanto à avaliação do exsudado leucocitário extravasado (nm) o EHFTF e a indometacina, produziu inibição de 19,47%, 37,17%, respectivamente.



**Figura 3:** Efeito do extrato administrado por via oral sobre a inflamação (edema) induzida por injeções de carragenina 1% (i.d.) no dorso de camundongos (n=6). Os resultados são apresentados como: A: As Barras e linhas indicam as médias  $\pm$  erro padrão da Média do peso (g) entre os grupos tratados em relação aos controle (salina); B: As Barras e linhas indicam as médias  $\pm$  erro padrão da Média da absorvância (nm) do Azul de Evans extravasado junto ao conteúdo proteico e leucocitário em relação ao Controle (salina). \*\*\*\* $p < 0,0001$ , \*\* $p < 0,01$ , \* $p < 0,05$ , quando comparados com o controle negativo; A e B: ANOVA One-Way seguido do Teste de múltiplas comparações de Tukey.

### Teste do edema de orelha induzido por óleo de cróton

Os dados mostram que o EHFTF não promoveu redução do processo inflamatório e consequentemente do edema de orelha a nível tópico, onde os valores apresentados não foram significantes em relação ao grupo controle. A dexametasona por sua vez, exerce seu efeito antiedematogênico tópico de maneira significativa e eficaz. (Figura 4)

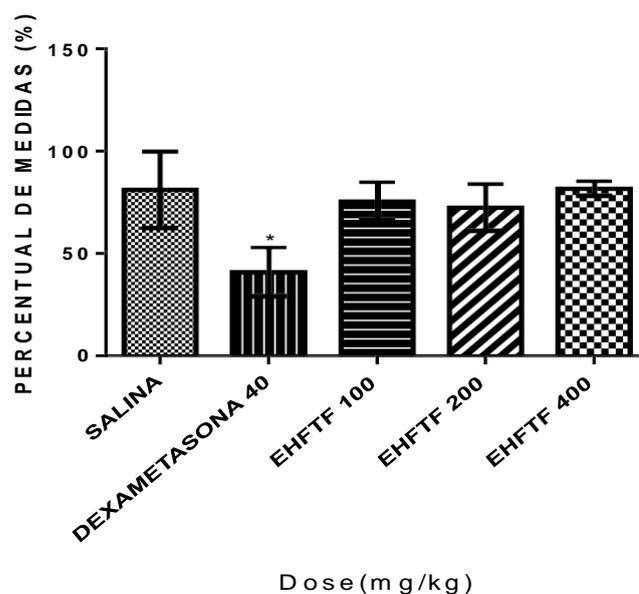


Figura 4: Efeito do extrato administrado por via tópica sobre a inflamação (edema) na orelha induzida por Óleo de Cróton na orelha direita e Acetona na esquerda (n=6). Os resultados foram expressos como médias e erros padrões do percentual da diferença de peso em miligramas entre as orelhas direita e esquerda ( $\Delta$ ) \* $p < 0,05$ , quando comparados com o controle negativo (Salina), ANOVA One-Way seguido do Teste de múltiplas comparações de Tukey.

## DISCUSSÃO

Esse estudo inédito caracterizou quimicamente o Extrato Hidroalcoólico das folhas da *Tocoyena formosa* (Cham. & Schltl.) K. Schum. a partir de um *screening* fitoquímico, e também sua atividade tóxica e antiinflamatória, avaliada a partir de modelos experimentais *in vivo*. O motivo para a escolha da fração Hidroalcoólica deve-se ao fato que o número de compostos ativos é muito maior, além da facilidade de extração e purificação por meio desta fração.

O extrato por sua vez, não promoveu toxicidade apresentando poucos efeitos sobre o SNC e efeitos sistêmicos, diante dos resultados, observamos que a toxicidade oral aguda do EHFTF é maior que 5000 mg/kg, segundo os critérios experimentais adotado. Dessa forma o EHFTF apresenta uma concernente margem de segurança para a utilização como agente terapêutico, porém outros estudos precisam ser realizados para estabelecer sua eficácia sem a promoção de efeitos colaterais, especialmente após a exposição repetida em baixas dosagens, portanto, estudos de toxicidade sub-crônica ou crônica do mesmo precisa ser realizados para determinar seu risco-benefício.

Os dados mostram que o EHFTF apresenta uma eficácia anti-edematogênica significativa principalmente na dose de 200mg/kg, esse efeito foi estimado, utilizando-se o

edema da pata induzido por carragenina, pois é um método que cogita os estágios iniciais do processo inflamatório agudo (LAPA; et. al., 2007). Essa atividade anti-edematogênica reforça a indicação de que mecanismos anti-inflamatórios estão envolvidos na efetividade exercida pelo extrato nesse teste, pois a inibição promovida pelo o EHFTF em cada período de tempo nesse teste mostra que o mesmo tem um efeito antagonista não-seletivo sobre a liberação ou síntese dos mediadores, pois como na 1° hora após a administração de carragenina, o aumento da permeabilidade vascular é mediada por histamina e serotonina, na 2° hora por cininas e na 3° hora por prostaglandinas e óxido nítrico (DI ROSA; GIROUD; WILLOUGHBY, 1971), isso indica portanto, que o EHFTF esteja reduzindo ou inibindo principalmente a liberação das cininas, prostaglandinas (PG's) e óxido nítrico (NO), já que o extrato só começa a agir após a 2° hora da administração da carragenina, dando indícios de que os constituintes do extrato tem ação antiedematogênica por essas vias inflamatórias.

Os resultados revelam que o extrato também apresenta eficácia antiinflamatória significativa no teste de edema de pata induzido por dextrana, tendo como menor dose eficaz a de 200mg/kg, porém, com uma diferença significância em relação ao teste anterior. Uma das possíveis explicações é que a formação deste edema é mediada pela liberação de aminas vasoativas, pela serotonina e histamina, mas também por cininas e prostaglandinas, causando edema osmótico (LAPA; et al. 2008), corroborando com a teste de edema induzido por carragenina, pois na 1° hora de indução da carragenina os mediadores inflamatórios também são serotonina e histamina e o extrato não apresentou efeito significativo, dessa forma a possível ação do extrato também nesse teste pode ter sido pela inibição das vias das cininas e prostaglandinas

Para confirmar ainda mais a hipótese do extrato como anti-inflamatório foi selecionado a menor dose efetiva do extrato (200mg/kg) para avaliação da migração celular. Levando em conta que o processo de inibição da migração de leucócitos é também uma das ações características de compostos com propriedades anti-inflamatórias, o teste da permeabilidade vascular induzida pela carragenina avaliou a ação do EHFTF nessa migração, pois fármacos com efeito anti-inflamatório, potencialmente reduzem e/ou inibem a transmigração leucocitária por bloquear a síntese e/ou liberação de mediadores quimiotáticos ou bloquear o processo de alguma fase da migração (MULLER, 2002). No teste citado a administração do extrato, promoveu redução significativa da migração leucocitária pelo o bloqueio de algumas dessas fases para lesão tecidual induzida. Esse resultado revela a especificidade da ação promovida pelo EHFTF em influenciar o estabelecimento do processo inflamatório por meio da diminuição da migração de leucócitos.

Essa redução fomentada pelo extrato pode ser mediada por bloqueio das vias das prostaglandinas, pois nesse teste o processo de migração pode ser inibido por diversos AINEs que são inibidores das prostaglandinas e parece estar principalmente relacionada com a redução/inibição de  $PGF_{2\alpha}$  (MENEZES; et al., 2005), e como foi demonstrado acima nos testes anteriores o extrato possivelmente apresenta ação sobre as prostaglandinas, o que pode estar inibindo o extravasamento leucocitário por essa via, como também pela via do NO, pois este é responsável também pela interferência no recrutamento leucocitário (MONCADA; PALMER; HIGGS, 1991) podendo o extrato estar inibindo essa via e conseqüentemente a migração dessas células. Isso sugere e reforça que o mecanismo de ação está relacionado com a inibição das PG's e/ou NO.

O desenvolvimento do edema de orelha induzido por óleo de cróton é mediada principalmente pela serotonina e histamina (PARVEEN et al., 2007). Nesse teste o tratamento tópico com EHFTF não inibiu a formação do edema, seguindo perfil semelhante ao obtido com o controle negativo do teste, pois o efeito principal da formação desse edema se deve a serotonina e histamina como citado acima, e nos testes anteriores o extrato tem mostrado inatividade sobre essas aminas, além disso, possa ser que o extrato possua compostos com baixa absorção cutânea, o que pode ser uma possível explicação para a ineficácia do mesmo para a via de administração tópica, dando indícios que o extrato não possui ação antiinflamatória e antiedematogênica a nível tópico, somente a nível sistêmico (v.o.), mas para comprovar isso é indispensável realizar outros modelos de inflamação cutânea ou de edema de orelha induzido por variados agentes irritantes.

Esse estudo demonstrou, a partir dos dados, que as substâncias presentes nesse extrato, tais como: taninos, flavanóides, triterpenóides e saponinas, são responsáveis pelo potencial terapêutico antiinflamatório, já que na literatura essas substâncias, possui esse efeito confirmado como mostra os estudos de Mello e Santos (2001); Emin; Oliveira; Lapa, (1994); Ikeda et al. (2008), Sparg et al. (2004), respectivamente. Assim pode-se inferir que o EHFTF apresenta diversas substâncias de produtos do metabolismo secundário com diferentes propriedades antiinflamatórias e que age por mecanismos de forma sinérgica ou não.

Além disso, os constituintes do EHFTF, como compostos fenólicos (taninos), flavanóides, triterpenóides apresenta excelente atividade antioxidante, comprovado por meio dos estudos de Rocha, et. al, (2011); Fang et. al, (2011); Quiao, et. al (2015), respectivamente. A atividade antioxidante, por sua vez promove redução da formação de radicais livres, no qual estes são responsáveis por promover, facilitar ou coparticipar do desenvolvimento do processo inflamatório e de lesão tecidual (FERREIRA, et. al, 2007).

Por isso o isolamento de maneira apropriada dos constituintes ativos pode ajudar na pesquisa de drogas e novos compostos com atividade anti-inflamatória, onde se faz necessário também estudos com constituinte ativo relacionados com a modulação de enzimas e substâncias pró-inflamatórias para entender o mecanismo de ação em relação ao observado na atividade anti-inflamatória descrita pelo o extrato.

O presente estudo acende perspectivas propedêuticas ao uso do extrato de *Tocoyena formosa* (Cham. & Schlecht.) K. Schum. como agente antiinflamatório com características semelhantes em alguns testes a indometacina, no qual a comprovação deste evento requer outras investigações, e também novos estudos necessitam serem efetivados para detecção e esclarecimento dos possíveis mecanismo de ação da substancia em estudo.

## CONCLUSÃO

Conclui-se, portanto, que o Extrato Hidroetanólico das Folhas de *Tocoyena formosa* (Cham. & Schlecht.) K. Schum apresenta baixa toxicidade aguda e atividade anti-inflamatória aguda com possível ação sobre a via das prostaglandinas e/ou óxido nítrico.

## REFERÊNCIAS

BOLZANI, V. S., IZUMISAWA, C. M., YOUNG, M. C M., et al. Iridoids From *Tocoyena Formosa*. *Phytochemistry*, Vol. 46, No. 2. pp. 305-30, 1997

CASTRO, R. A. Avaliação do Potencial Analgésico e Anti-inflamatório do Composto Pirazólico 1,5-difenil-3-hidrazinopirazol(a) – DHP. UFRRJ . Instituto de Veterinária . Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária – Patologia e Ciências Clínicas. Dissertação. 2011

COELHO, V. P. M., AGRA, M. F., BARBOSA, M. R. V. Estudo farmacobotânico das folhas de *Tocoyena formosa* (Cham. & Schltl.) K.Schum. (Rubiaceae). *Braz J. Pharmacogn.* 16(2):abr/jun. 2006

DI ROSA M, GIROUD JP, WILLOUGHBY DA. Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. *J Pathol* 104: 15-29. 1971

ELIZABETSKY E., AMODOR TA, ALBUQUERQUE RR, NUNES DS, CARVALHO ACT. 1995. Analgesic activity *Psychotria colorata* J Ethnopharmacol 48: 77-83.

EMIN JAS, OLIVEIRA AB, LAPA AJ. Anti-inflammatory activity of hesperidin. *J Pharm Pharmacol* 46:118-122. 1994.

FANG, S.; YANG, W.; CHU, X.; SHANG, X.; SHE, C.; FU. X. Provenance and temporal variations in selected flavonoids in leaves of *Cyclocarya paliurus*. *Food Chemistry*. 2011. v. 124. pp. 1382-1383

FERREIRA, I. C. F. R.; BAPTISTA, P.; BOAS, M. V.; BARROS, L. Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. *Food Chemistry*. 2007.v. 100. pp. 1511-1516

FILIPINI, C. B.; et. al. Avaliação da atividade protetora gástrica do extrato hidroalcoólico da semente de girassol em ratas. *Rev Bras Clin Med*. São Paulo, 2012 mar-abr;10 (2):112-5.

HAMERSKI, L.; et. al. Saponinas triterpênicas de *Tocoyena brasiliensis* Mart. (Rubiaceae). *Quím. Nova*. 2005, vol.28, n.4, pp. 601-604. ISSN 0100-4042. 1590/S0100-40422005000400009.

IKEDA, Y.; MURAKAMI, A.; OHIGASHI, H. Ursolic acid: na anti- and pro-inflammatory triterpenoid. *Molecular Nutrition & Food Research*, v.52, p. 26-42, 2008.

LAPA, A. J. et al. Métodos de Avaliação da Atividade Farmacológica de Plantas Mediciniais. São Paulo, Setor de Produtos Naturais, Departamento de Farmacologia, UNIFESP/EPM, 2008.

LIANG, Y. C., HUANG, Y. T., TSAI, S. H., LIN-SHIAU, S. Y., C. F. CHEN, and J. K. Lin. Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages. *Carcinogenesis*, vol. 20, no. 10, pp. 1945–1952, 1999.

MALONE, M. H. ROBICHAUD, R. C. A hippocratic screen for pure or crude drug materials. *Lloydia*, 25 (4): 320-331, 1962.

MATOS, F.J.A. Introdução à fitoquímica experimental. 2ª ed. Fortaleza. Editora: UFC, 2002.

MELLO, J. C.P.; SANTOS, S. C. Taninos. In: SIMÕES, C.M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 3 ed. Porto Alegre: Ed.UFGRS/Ed.UFSC, 2001. cap. 24, p.517-543.

MENEZES, G.B.; REIS, W.G.; SANTOS, J.M.; DUARTE, I.D. FRANCISCHI, J.N. Inhibition of prostaglandin F (2alpha) by selective cyclooxygenase 2 inhibitors accounts for reduced rat leukocyte migration. *Inflammation*, v.29, p.163-169, 2005.

MONCADA S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacological Reviews*, Baltimore, v. 43, n. 2, p. 109-142, 1991.

MULLER, W.A. Leukocyte-endothelial cell interactions in the inflammatory response. *Laboratory Investigation*, v.82, p.521-533, 2002.

BRASIL, M. D. I. Ministério da Integração Nacional. Lei Nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. Programa de Sustentabilidade de Espaços Sub-Regionais – PROMESO.

OECD. Guidelines for the Testing of Chemicals. Acute Oral Toxicity – Up-and-Down-Procedure (UDP). 425. Adopted: 3 October 2008.

PARVEEN, Z.; DENG, Y.; SAEED, M.K.; DAI, R.; AHAMAD, W.; YU, Y.H. Antiinflammatory and analgesic activities of *Thesium chinese* Turcz extracts and its major flavonoids, kaempferol and kaempferol-3-O-glucoside. *Yakugaku Zasshi*, v.127, p.1275-1279, 2007.

QUIAO, A.; WANG, Y.; XIANG, L.; ZHANG, Z.; HE, X. Novel triterpenoids isolated from hawthorn berries functioned as antioxidant and antiproliferative activities. *Journal of Functional Foods*. 2015. v. 13. pp. 308-313

ROCHA, W. S.; LOPES, R. M.; SILVA, D. B.; VIEIRA, R. F.; SILVA, J. P.; SILVA, J. P.; COSTA, T. S. A.; Compostos Fenólicos Totais e Taninos Condensados em Frutas Nativas do Cerrado. *Rev. Bras. Frutic.* 2011. v. 33. n. 4. pp. 1215-1221

SPARG, S.G.; LIGHAT, M.E.; VAN STADEN, J. Biological activities and distribution of plant saponins. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 94, n. 2-3, p. 219-243, 2004.

TUBARO, A. the croton oil ear test revisited. *Inflammation Research*. v. 17, n. 3. Pp- 347-349, 1986.

WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Experimental Biology and Medicine*, v. 111, n. 3, pp- 544-547, 1962.

ZALDIVAR F, WANG-RODRIGUEZ J, NEMET D, Schwindt C, Galassetti P, Mills PJ, et al. Constitutive pro- and anti- -inflammatory cytokine and growth factor response to exercise in leukocytes. *J Appl Physiol* 2006;100:1124-33.

## 4.2 ARTIGO 2

### **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E GASTROPROTETORA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS DE *Tocoyena formosa* (Cham. & Schlecht.) K. Schum.**

Francisco Rafael Alves Santana Cesário<sup>1</sup>, Thaís Rodrigues de Albuquerque<sup>1</sup>, Maria Rayane Correia de Oliveira<sup>1</sup>, Giovana Mendes de Lacerda<sup>1</sup>, Lindaiane Bezerra Rodrigues<sup>1</sup>, Anita Oliveira Brito Pereira Bezerra Martins<sup>1</sup>, Irwin Rose Alencar de Menezes<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Química Biológica, Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular, Laboratório de Farmacologia e Química Molecular Universidade Regional do Cariri, Universidade Regional do Cariri, 63105-000, Crato, CE, Brasil

**RESUMO:** A úlcera péptica é uma desordem gástrica que afeta milhões de pessoas em todo o mundo, e têm sido uma das causas mais importantes de morbidade e mortalidade. Diversos medicamentos são utilizados para o tratamento da úlcera péptica, contudo, causam muitos efeitos colaterais. Neste sentido, novos estudos se torna necessário para que novas alternativas terapêuticas sejam descobertas. Os produtos naturais representam uma importante alternativa para o descobrimento de compostos com atividade gastroprotetora. Sobre a *Tocoyena formosa* (Cham. & Schltl.) K. Schum não existem estudos em lesões gástricas, sendo esta muito ressaltada na medicina tradicional para morbidades inflamatórias e sintomas gástricos. O presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antioxidante e gastroprotetora do extrato hidroalcoólico das folhas de *Tocoyena formosa* (Cham. & Schlecht.) K. Schum (EHFTF). Para avaliação da atividade antioxidante foram realizados os testes de FRAP e DPPH, e para avaliação da atividade gastroprotetora foram realizados os testes de indução de lesão gástrica por etanol, etanol acidificado, indometacina e barreira física. No teste FRAP, o EHFTF apresentou EC<sub>50</sub> de 558.66 µM FeSO<sub>4</sub>/g e a vitamina C apresentou EC<sub>50</sub> de 867.52 µM FeSO<sub>4</sub>/g. No teste de DPPH, o EHFTF apresentou IC<sub>50</sub> de 189.78 µg/ml e a vitamina C apresentou IC<sub>50</sub> de 89.79 µg/ml. Nos testes de indução de lesão por etanol todas as doses apresentaram significância em relação ao controle; no teste de lesão gástrica induzida por etanol acidificado e indometacina, apenas a dose de 200mg/kg apresentou significância. No teste de barreira física, o EHFTF apresentou evidencias da formação de camada protetora no

muco, agindo na proteção local. Conclui-se, portanto, que o EHFTF possui atividade antioxidante e gastroprotetora.

**Palavras-chave:** Úlceras péptica, *Tocoyena Formosa*, Antioxidante, Gastroproteção.

## INTRODUÇÃO

O estilo de vida moderno influencia e contribui no aparecimento de diversas doenças, principalmente aquelas do trato gastrointestinal (TGI). A úlcera péptica constitui uma desordem TGI que afeta milhões de pessoas em todo o mundo, e têm sido uma das causas mais importantes de morbidade e mortalidade (DONATINI; et. al. 2009). A úlcera péptica é causada devido ao desequilíbrio entre os fatores que agredem e aqueles que defendem a mucosa gástrica (HAFEZ; et al., 2013).

Apesar de já existirem diversos medicamentos para o tratamento da úlcera péptica, os mesmos causam muitos efeitos colaterais, o que torna necessário a realização de estudos para que novos compostos sejam descobertos, e para que esses efeitos colaterais sejam minimizados e talvez totalmente eliminados, trazendo assim uma melhoria na saúde da população (BRAZ; et al., 2013).

O aparecimento das espécies reativas de oxigênio é um processo normal advindo do metabolismo celular, porém quando há excesso dessas espécies, acaba levando a lesões e principalmente na formação de úlceras gástricas (SUZUKI; et al., 2012). Dessa forma, os antioxidantes atuam promovendo a saúde tecidual e prevenção de lesões, uma vez que estes evitam a formação de radicais livres por promoverem sua decomposição. Vários estudos tem mostrado o surgimento de novos antioxidantes naturais, que atuam na redução de doenças (FERREIRA; et al., 2007; DO; et al., 2015; SMITH; et al., 2015).

A *Tocoyena formosa* (Cham. & Schlecht.) K. Schum é uma pequena árvore ornamental popularmente conhecida como "Jenipapo do campo", possui vegetação fisionomicamente florística diversificada sendo muito impressionante e tem flores amarelas e verdes (HAMERSKI; et al., 2008) sendo usada na medicina popular do Nordeste do Brasil como anti-inflamatório no tratamento das dores reumáticas (COELHO; AGRA; BARBOSA, 2006).

Este estudo irá investigar o efeito antioxidante e gastroprotetor contra em lesões gástrica do extrato hidroalcolico das folhas de *Tocoyena formosa* (Cham. & Schlecht.) K. Schum avaliando fatores físicos e químicos induzidos em modelos úlcera gástrica em ratos.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Material botânico**

As folhas de *Tocoyena formosa* (Cham. & Schlecht.) K. Schum foram coletadas na Chapada do Araripe, localizada no município de Crato-CE, região do Cariri, sul do Ceará, nordeste do Brasil. Uma amostra representativa da espécie (Exsicata) contendo fruto foi encaminhada para identificação junto ao Herbário Dárdano de Andrade Lima da Universidade Regional do Cariri - URCA. O material botânico foi seco por 48hs a temperatura ambiente; logo após foi pesado e triturado, sendo em seguida submetido à extração em solvente etanol e água destilada (na proporção 1:1), por um período de 72h. O extrato hidroalcoólico formulado foi filtrado para retenção de material sólido, onde o filtrado, concentrado por destilação do solvente em evaporador rotativo a uma temperatura entorno dos 50°C a 40rpm. O extrato final foi concentrado em banho-maria (50°C) por 72h, após foi congelado e liofilizado. O material final foi acondicionado em frasco âmbar e refrigerado sendo solubilizado antes da experiência e centrifugado, se necessário.

### **Prospecção química qualitativa**

A prospecção fitoquímica do extrato e das frações foi realizada para determinação de compostos secundários presentes no EHFTF, segundo a metodologia de Matos (2002), sendo avaliada a existência das principais classes, como: Fenóis, Taninos, Antocianinas, Antocianidinas, Flavanóides, Leucoantocianidinas, catequinas, flavonas, alcaloides, Esteróides, Triterpenóides e Saponinas. Essa metodologia aborda a observação visual de colorações e formação de precipitados após a exposição a reagentes químicos específicos.

### **Determinação da atividade antioxidante pelo método de Redução do Ferro - Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP)**

O método FRAP baseia-se na redução de elétrons e a reação ocorre pela formação do complexo TPTZ (2,4,6-tris(2-piridil)-s-triazina) mais  $Fe^{3+}$  (cor amarela) com o antioxidante presente, no qual faz com que o ferro seja reduzido (coloração azul). O reagente FRAP foi preparado através da mistura de 25 ml de tampão acetato (300 mM, pH 3,6), 2,5 ml de solução TPTZ (10 mM de TPTZ em HCl 40 mM) e 2,5 ml de  $FeCl_3$  (20 Mm) em solução

aquosa e aquecida a 37°C/30 min em banho Maria. Para análise, alíquotas de 100µL do EHFTF (nas concentrações de 400, 200, 100, 50 e 25 µg/ml), 270µL de água destilada e 3 ml de reagente FRAP foram adicionadas aos tubos de ensaio (em triplicata) por 30min em temperatura ambiente.

A curva de calibração foi feita utilizando uma solução de sulfato ferroso diluída para obter pontos da curva: 200, 500, 1000, 1500 e 2000µM. Para análise, 90 µL de cada ponto da curva, 270 µL de água destilada e 2,7 ml do reagente FRAP foram pipetados nos tubos de ensaio (em triplicata) a 37°C/30 min em banho Maria. A curva de calibração foi determinada por regressão linear para obtenção da equação da reta. As leituras das absorbâncias foram realizadas em espectrofotômetro calibrados a 593 nm de comprimento de onda. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média de micro mols de ferro<sup>2+</sup> por grama da amostra (µmol Fe<sup>2+</sup>SO<sup>4</sup>/g) (RUFINO et al., 2006)

### **Determinação da Atividade Antioxidante pelo método DPPH**

A atividade antioxidante do EHFTF foi determinada através da capacidade do mesmo de sequestrar ou consumir o radical estável livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) por fotocolorimetria *in vitro*. Para análise, as amostras foram colocadas em placas de 96 poços, onde foram adicionadas 50µl de cada concentração do EHFTF (400, 200, 100, 50, 25 µg/ml) + 50µl de solvente (água) e 100µl de solução de DPPH (30mg/ml) em triplicata; como controle positivo foi utilizado 50µl de ácido ascórbico de cada concentração (400, 200, 100, 50, 25 µg/ml) + 50µl de solvente (água) e 100µl de solução de DPPH em triplicata. Para os controles foram utilizados: 100µl dos respectivos solvente em 100µl de solução de DPPH, para cada grupo tratado foram realizados testes em branco com solventes (etanol e água, respectivamente) mais as amostras. Para cada poço da placa o volume final foram de 200 µl. Após o tempo de estabilização de 30min (em ambiente escuro), as leituras foram realizadas usando o comprimento de onda de 517 nm em leitor de placa de ELISA. A curva padrão foi determinada por leituras sucessivas no mesmo comprimento de onda (517nm). A absorbância foi lida sendo a atividade antioxidante convertida em porcentagem de inibição. (RUFINO et al., 2007)

### **Animais**

Foram utilizados camundongos Swiss, machos, de idade adulta, com peso de 20-30g provenientes do Biotério Central da Faculdade de Medicina de Juazeiro do Norte - FMJ. Os

animais foram mantidos em gaiolas coletivas de polietileno com tampa de aço inox, forradas com maravalha autoclavada. O fotoperíodo foi de um ciclo claro/escuro de 12/12 h diárias. Os animais foram mantidos em jejum de sólidos por um período de 16-18 h antes do experimento. A água filtrada foi fornecida *ad libitum* para os animais. Os animais foram manipulados de acordo com procedimentos para o uso científico de animais estabelecido pela lei Nº 11.794, de 8 de outubro de 2008 e submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Utilização de Animais da Universidade Regional do Cariri – URCA com processo sob Nº 00198/2014.1.

### **Lesão gástrica induzida por etanol**

Os camundongos foram separados aleatoriamente, pesados e divididos em cinco grupos (n=6), os mesmos foram pré-tratados com administração de solução salina (0,9%, 0,1ml/10g v.o.; controle negativo); Omeprazol (30mg/kg v.o.; controle positivo) e EHFTF nas concentrações de 200, 100 e 50 mg/kg v.o. 1 h antes da indução da úlcera. Logo após, foi administrado o etanol na dose de 0,2 ml v.o. (1h após os tratamentos) em todos os grupos; posterior à indução (30min após o etanol) os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, sendo em seguida laparatomizados para ressecção dos seus estômagos, lavados em solução fisiológica de 0,9%, abertos pela grande curvatura e analisados pelo o método informatizado. (ROBERT et. al.,1979)

### **Lesão gástrica induzida por etanol acidificado com ácido clorídrico**

Os camundongos foram separados aleatoriamente, pesados e divididos em cinco grupos (n=6), os mesmos foram pré-tratados com administração de solução salina (0,9%, 0,1ml/10g v.o.; controle negativo), Omeprazol (30mg/kg v.o.; controle positivo) e EHFTF nas concentrações de 200, 100 e 50mg/kg v.o. 1h antes da indução da úlcera. Logo após, foi administrado o etanol acidificado (0,3M de HCL em etanol 60%) na dose de 0,2 ml v.o. (1h após os tratamentos) em todos os grupos; posterior à indução (1h após o etanol acidificado) os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, sendo em seguida laparatomizados para ressecção dos seus estômagos, lavados em solução fisiológica de 0,9%, abertos pela grande curvatura e analisados. (MIZUI et.al, 1987)

### **Lesão gástrica induzida por indometacina**

Os camundongos foram separados aleatoriamente, pesados e divididos em cinco grupos (n=6), os mesmos foram pré-tratados com administração de solução salina (0,9%, 0,1ml/10g v.o.; controle negativo), Omeprazol (30mg/kg v.o.; controle positivo) e EHFTF nas concentrações de 200, 100 e 50mg/kg v.o. 1h antes da indução da úlcera. Logo após, foi administrado à indometacina 10mg/kg na dose de 0,2 ml v.o. (1 h após os tratamentos) em todos os grupos; posterior à indução (3h após a indometacina) foram repetidos os tratamentos e os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical após 6h da indução, sendo em seguida laparatomizados para ressecção dos seus estômagos, lavados em solução fisiológica de 0,9%, abertos pela grande curvatura (DJAHANGUIRI et. al, 1969) e analisados a partir de escores (pontos de 1 a 6 de acordo com as lesões apresentadas) previamente estabelecidos segundo o método de LAPA, et al. (2008)

### **Barreira física**

Com a finalidade de analisar o possível mecanismo do EHFTF envolvido no efeito gastroprotetor por atuação a nível local e/ou sistêmico realizou-se o teste de barreira física. Neste teste foi utilizada a dose de 200 mg/kg do EHFTF, por apresentar uma significativa proteção gástrica (dose eficaz) em todos os outros testes nos modelos clássicos de lesão gástrica realizados anteriormente.

Os animais foram separados aleatoriamente, pesados e divididos em três grupos (n=6), os mesmos foram pré-tratados com administração de solução salina (0,9%, 0,1ml/10g; v.o.; controle negativo), EHFTF 100mg/kg v.o. 1h antes da indução da úlcera e EHFTF 100mg/kg i.p. 30min antes da indução da úlcera. Logo após, foi administrado o etanol na dose de 0,2 ml v.o. em todos os grupos; posterior à indução (30 min após o etanol) os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, sendo em seguida laparatomizados para ressecção serão seus estômagos, lavados em solução fisiológica de 0,9%, abertos pela grande curvatura e analisados pelo o método informatizado. (LAPA, et al., 2008).

### **Análise informatizada das lesões gástricas induzidas**

Os estômagos foram estirados em uma placa de Scanner® onde foram captadas imagens e digitalizadas em um computador para análise, medição e quantificação das das

lesões macroscópicas (face glandular) com o uso de um programa de planimetria computadorizada (ImageJ®).

### **Análise estatística**

Foi empregado o programa *Software GraphPad Prism* versão 6.0, onde os dados paramétricos foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M). Para a verificação das diferenças estatísticas entre os grupos foi realizada análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias conforme o protocolo experimental, seguido do teste de Tukey de múltiplas comparações. Para todas as análises foi considerado significativo  $p < 0,05$ .

## **RESULTADOS**

### **Material botânico e prospecção química qualitativa**

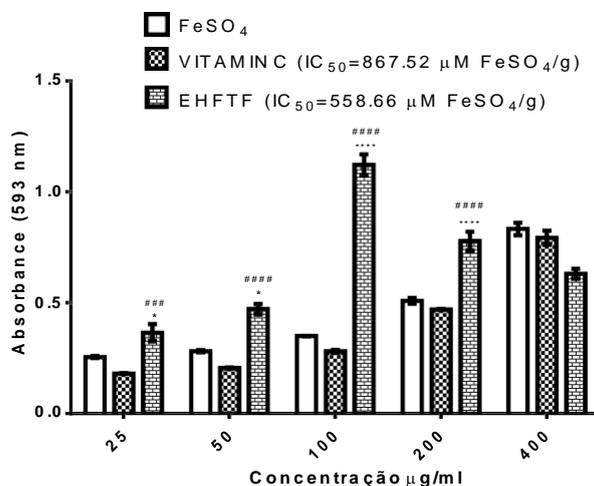
A coleta das folhas de *Tocoyena formosa* (Cham. & Schlecht.) K. Schum teve uma pesagem de 2.240g, após os procedimentos de preparação do material botânico e extração hidroalcoólica obteve-se um resultado de 209,82g, dessa forma, o rendimento obtido foi de 9,36%.

A prospecção química qualitativa do Extrato Hidroalcoólico das folhas de *Tocoyena formosa* (Cham. & Schlecht.) K. Schum foi capaz de identificar as seguintes classes de metabólitos secundários: taninos condensados, flavonóides, flavonóis, xantonas, chalconas, auronas, flavononóis, flavonas, Flavononas, Leucoantocianidinas catequinas, Triterpenóides pentacíclicos, Saponinas.

### **Atividade antioxidante pela redução do ferro (FRAP)**

A atividade antioxidante avaliada através da redução do ferro, em todas as doses testadas do EHFTF, apresentaram significância em relação ao controle negativo ( $\text{FeSO}_4$ ) e positivo (Vitamina C). Quando comparado ao controle negativo, as doses de 25 e 50  $\mu\text{g/mL}$  apresentaram significância de  $p < 0,05$  e as doses de 100, 200 e 400  $\mu\text{g/mL}$  apresentaram significância de  $p < 0,0001$ . Em relação ao controle positivo, as doses de 25 e 400  $\mu\text{g/mL}$  apresentaram significância de  $p < 0,001$ , enquanto que as doses de 50, 100 e 200  $\mu\text{g/mL}$

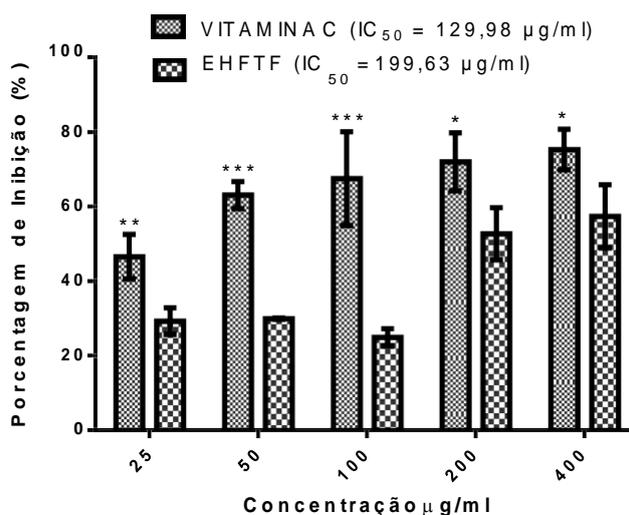
apresentaram significância de  $p < 0,0001$  (Figura 1). Dessa forma, o EHFTF mostrou atividade antioxidante mais eficaz do que a vitamina C.



**Figura 1.** Efeito do extrato na atividade antioxidante pelo método de redução de ferro (FRAP). Cada coluna representa a média da absorbância em relação às concentrações testadas. Dados expressos como Média  $\pm$  Erro Padrão da Média (EPM), \* $p < 0,05$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ , quando comparados com o controle negativo (FeSO<sub>4</sub>); ### $p < 0,001$ , #### $p < 0,0001$ , quando comparados ao Controle Positivo (Vitamina C) ANOVA Two-Way seguido do Teste de múltiplas comparações de Dunnett's.

### Atividade antioxidante pelo método DPPH

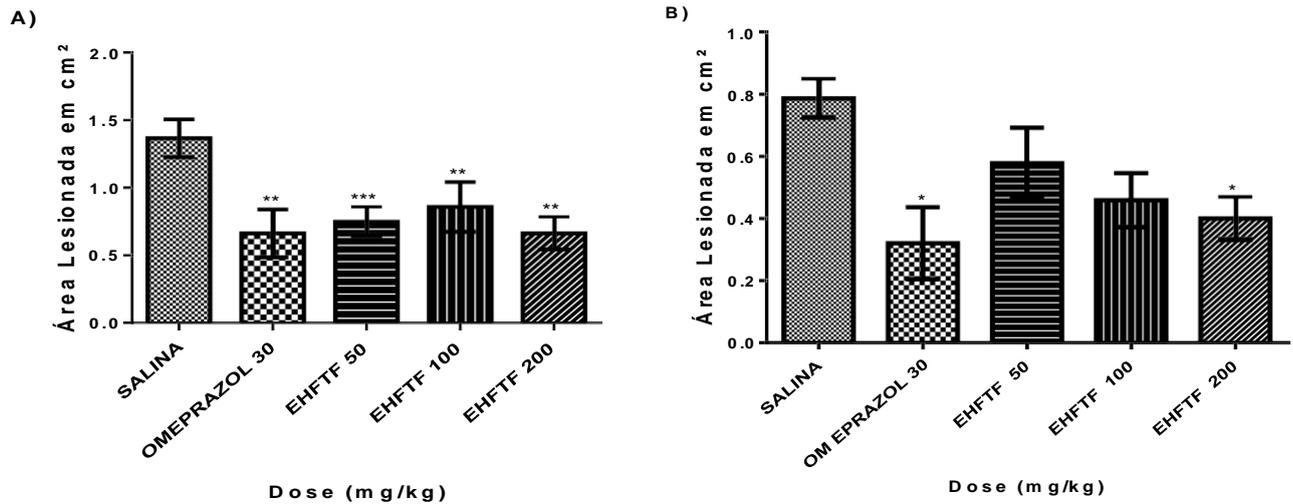
No teste de DPPH, a vitamina C nas diferentes concentrações apresentou significância em relação ao EHFTF em todas as doses testadas. A vitamina C na dose de 25 µg/ml apresentou inibição de 46,53%, o EHFTF de 29,25%; na dose 50 µg/ml a 63,07% , o EHFTTF de 29,93%, 100 µg/ml a vitamina C apresentou inibição de 67,50% e o EHFTF de 24,91%; nas doses de 200 e 400 µg/ml apresentaram inibição de 71,94% e 75,28%, respectivamente para vitamina C, e de 52,69% e 57,36% respectivamente para o extrato (Figura 2).



**Figura 2.** Efeito do extrato na atividade antioxidante pelo método DPPH. Cada coluna representa a média do percentual de inibição em relação às concentrações testadas. Dados expressos como Média  $\pm$  Erro Padrão da Média (EPM), \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , do Controle Positivo (Vitamina C) quando comparados ao EHFTF, ANOVA Two-Way seguido do Teste de múltiplas comparações de Sidak's.

### Lesão gástrica induzida por etanol absoluto e etanol acidificado

No grupo que recebeu solução salina os estômagos apresentaram uma maior área lesionada, com média de  $1,367 \pm 1,38 \text{ cm}^2$ . O grupo que recebeu Omeprazol, fármaco de referência, apresentou média de  $0,6621 \pm 0,12 \text{ cm}^2$ , apresentando uma redução da área ulcerada de 51,56%, com significância  $p < 0,01$  quando comparado ao controle negativo. O grupo que recebeu o EHFTF na dose de 50 mg/kg apresentou uma média de  $0,7497 \pm 0,06 \text{ cm}^2$ , apresentando uma redução da área ulcerada de 44,11%, apresentando significância de  $p < 0,0001$ . No grupo que recebeu o EHFTF na dose de 100 mg/kg, a área ulcerada teve uma média de  $0,8586 \pm 0,12 \text{ cm}^2$ , apresentando uma redução da área ulcerada de 37,19%, com significância de  $p < 0,001$ . O grupo que recebeu o EHFTF na dose de 200 mg/kg, apresentou uma média de  $0,6627 \pm 0,08 \text{ cm}^2$ , apresentando uma redução da área ulcerada de 51,52%, com significância de  $p < 0,01$  em relação ao grupo salina. (Figura 3A)



**Figura 3.** Efeito do extrato administrado por via oral sobre as lesões gástricas Induzidas por Etanol (n=6) (A) e Etanol Acidificado (n=6) (B). Cada coluna representa a média da área lesionada em relação aos grupos tratados. Dados expressos como Média  $\pm$  Erro Padrão da Média (EPM), \*p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001, quando comparados com o Controle Negativo (Salina) A e B: ANOVA One-Way seguido do Teste de múltiplas comparações de Tukey e Teste t pareado.

O grupo que recebeu apenas salina apresentou uma maior área lesionada com média de  $0,7868 \pm 0,11 \text{ cm}^2$ . O grupo que recebeu Omeprazol, fármaco de referência, apresentou uma média de  $0,3204 \pm 0,1158 \text{ cm}^2$ , apresentando uma redução da área ulcerada de 59,28% com significância de  $p<0,05$  em relação ao controle negativo. Os grupos que receberam o EHFTF nas doses 50, 100 e 200 mg/kg apresentaram as respectivas médias  $0,5783 \pm 0,11 \text{ cm}^2$ ;  $0,4588 \pm 0,08 \text{ cm}^2$ ;  $0,3998 \pm 0,06 \text{ cm}^2$ . Onde apenas a dose de 200 mg/kg reduziu a área ulcerada em 49,18% e apresentou significância de  $p<0,05$  em relação ao grupo salina. (Figura 3B)

### Lesão gástrica induzida por indometacina

No grupo que recebeu apenas solução salina as áreas ulceradas apresentaram maior pontuação no escore adotado, com média de  $6 \pm 0,54$  pontos. O grupo que recebeu Omeprazol apresentou média de  $4,125 \pm 2,05$  pontos, com significância de  $p<0,05$  em relação ao controle negativo. Os grupos que receberam o EHFTF nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg apresentaram respectivamente as seguintes médias:  $5,477 \pm 0,43$  pontos;  $4,475 \pm 0,66$  pontos;  $3,425 \pm 0,29$  pontos. Apenas a dose de 200 mg/kg reduziu a área ulcerada em 42,91% e apresentou significância em relação ao grupo salina, de  $p<0,01$  (Figura 4).

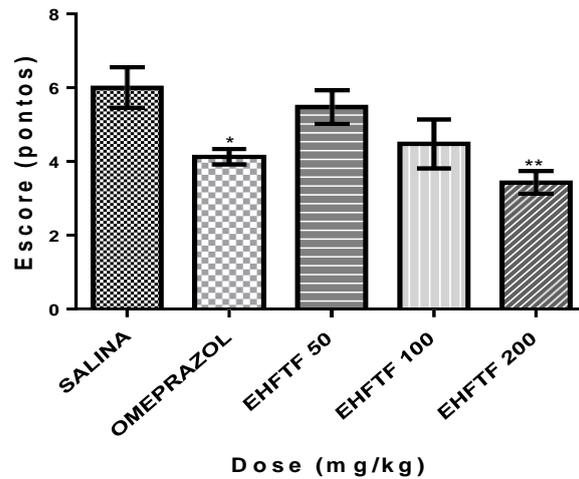
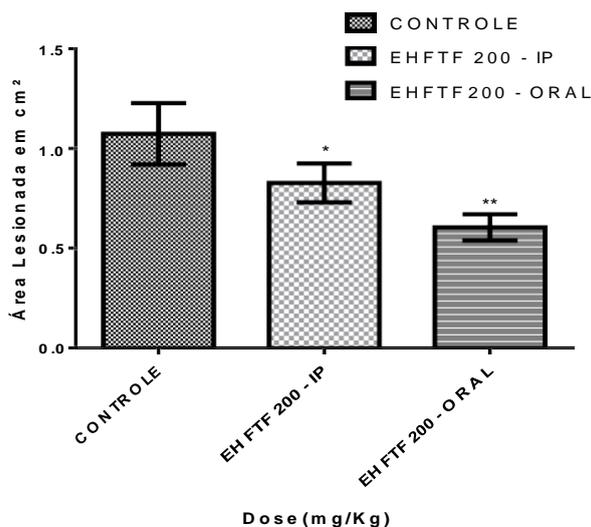


Figura 4. Efeito do extrato administrado por via oral sobre as lesões gástricas Induzidas por Indometacina (n=6). Cada coluna representa a média da área lesionada em relação aos grupos tratados. Dados expressos como Média  $\pm$  Erro Padrão da Média (EPM), \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , quando comparados com o Controle Negativo (Salina), ANOVA One-Way seguido do Teste de múltiplas comparações de Tukey.

### Barreira física

O grupo que recebeu solução salina apresentou uma maior média, a qual foi de  $1,074 \pm 0,15 \text{ cm}^2$ . O grupo o qual recebeu o EHFTF intraperitoneal apresentou média de  $0,827 \pm 0,10 \text{ cm}^2$ , e o grupo que recebeu o EHFTF via oral apresentou média de  $0,604 \pm 0,07 \text{ cm}^2$ . As vias pelas quais o EHFTF foi administrado mostrou significância em relação ao grupo salina, podendo inferir que a contribuição para barreira física é considerável apesar de haver uma discreta ação pela via sistêmica (Figura 5).



**Figura 5.** Efeito do extrato administrado por via oral e intraperitoneal sobre a formação de barreira física (n=6). Cada coluna representa a média da área lesionada em relação aos grupos tratados. Dados expressos como Média  $\pm$  Erro Padrão da Média (EPM), \* $p < 0,05$ , quando comparados com o Controle Negativo (Salina), ANOVA One-Way seguido do Teste de múltiplas comparações de Tukey e Teste t pareado.

## DISCUSSÃO

A pesquisa envolvendo o uso das plantas medicinais para cura e prevenção de doenças está em ocorrendo em todo o mundo (ABDELWAHAB, et. al, 2013), pois os compostos oriundos das plantas têm grande potencial para prevenir e curar doenças. (MALL, 2015). Diante disso, esse estudo foi realizado e mostra pela primeira vez que o extrato obtido a partir das folhas de *Tocoyena formosa* (Cham. & Schlecht.) K. Schum (EHFTF) promove um efeito antioxidante e gastroprotetor significativo em testes experimentais *in vitro* e *in vivo*, respectivamente.

Os resultados mostram que o EHFTF apresentou atividade antioxidante, pois na determinação dessa atividade, quando avaliada através do método de apreensão do radical livre DPPH, o extrato demonstrou capturá-lo, verificado e determinado através da quantidade inibida e do grau de descoloração da amostra com DPPH. Quando estimada pelo método de redução do teor de ferro (FRAP), o EHFTF demonstrou reduzir o  $\text{FeSO}_4$ , verificado e determinado através da leitura das absorbâncias. Ambos os métodos, apresentaram correlação demonstrando atividade antioxidante do EHFTF mesmo seguindo metodologias diferentes.

O EHFTF possui as seguintes classes de metabólitos secundário: taninos condensados, flavonóides, flavonóis, xantonas, chalconas, auronas, flavononóis, flavonas, Flavononas, Leucoantocianidinas catequinas, Triterpenóides pentacíclicos, Saponinas. A atividade

antioxidante do EHFTF pode estar relacionada à sua composição fitoquímica, que apresentam atividade antioxidante.

Essa atividade antioxidante pode estar relacionada aos compostos fenólicos presentes como os taninos. (SOCHOR, et.al, 2010), pois o EHFTF contém taninos condensados que são compostos fenólicos de alto peso molecular e são antioxidantes naturais (KATIKI, et. al, 2013; ROCHA, et. al, 2011; ESPINOZA, et. al, 2015; SMITH, et. al, 2015). A observação de uma relação entre a atividade antioxidante e o conteúdo de fenóis presentes na amostra, indica que os compostos fenólicos se tornam um dos principais componentes responsáveis pela capacidade antioxidante verificada nos testes (RUDNICKI et al., 2007).

O EHFTF contém catequinas, que também apresenta atividade antioxidante descritas na literatura conforme os estudos de Mika et. al, (2015). Além disso, possui também triterpenóides que, de acordo com experimentos realizados por Quiao, et. al (2015), são bastante eficazes como antioxidantes. Além da atividade antioxidante, os triterpenóides possuem diversas atividades farmacológicas comprovadas, tais como: anti-inflamatória, anti-microbiana e anti-ulcerogênica. (NAUMOSKA, et. al, 2015).

Os flavonoides já são conhecidos pela sua potente atividade antioxidante (FANG et. al, 2011; PETERS, et. al, 2015; TRISTCH, et. al, 2015). A ação antioxidante dos flavonoides pode se dar através da sua capacidade de redução ou pela sua interação no meio redox intracelular. (FERREIRA, et. al, 2015). Além disso, os flavonoides são utilizados no tratamento de infecções e em doenças do trato gastrintestinal. (CUSHNIE, 2011).

Esses compostos podem atuar sequestrando ou inibindo a atuação dos radicais livres quando submetidos a análises *in vitro*, sugerindo a possibilidade de diferentes mecanismos responsáveis por esta potencialidade e por atuarem de forma sinérgica ou não (SOCHOR, et al, 2010; FANG et. al, 2011)

A investigação da atividade antioxidante a partir de espécies vegetais em alterações gástricas tem demonstrado elevada importância, em função dessa intensa proeminência de que o estresse oxidativo regula os mecanismos de inúmeras morbidades que afetam o estômago, incluindo a ulcerogênese. Por isso, o estudo farmacológico de plantas com potencial antioxidante leva a investigar também a propriedade antiulcerogênica, pois esta morbidade decorrem do estresse oxidativo. (CARVALHO, 2004). Neste sentido, também buscou-se realizar estudos da atividade antiulcerogênica do EHFTF em modelos experimentais de úlcera gástrica induzida pela administração oral de etanol absoluto, etanol acidificado e indometacina.

O modelo de ulcera induzido por etanol promove uma diminuição nos fatores de defesa, tais como a redução da produção de muco e microcirculação da mucosa e aumento considerável produção de radicais livres, (ABDELWAHAB et. al, 2013; ISHIDA et. al, 2010) a alteração desses fatores é decorrente principalmente da infiltração de neutrófilos, no qual são um dos principais mediadores do processo inflamatório e responsáveis pela liberação das espécies reativas de oxigênio (radicais livres), (ABDULLA, 2009) no qual estas espécies induz a redução da atividade da enzima Superóxido Dismutase (SOD) o que promove danos à mucosa levando a ulceração gástrica em resposta a esse agente lesivo (SZELENYI; BRUNE, 1988). Esses danos iniciam-se com uma lesão microvascular, no qual leva a formação de edema na mucosa e aumento da permeabilidade vascular, com conseqüentemente redução na produção de muco e bicarbonato. Esse efeito causado pelo etanol se deve a sua toxicidade direta (ABDELWAHAB et. al, 2013).

O EHFTF pode estar atuando no aumento da produção de muco e bicarbonato, o que ajuda a proteger a mucosa e como conseqüência reduz a toxicidade direta promovida pelo etanol sobre as lesões, ou pode estar tendo atuação na inibição/redução dos mediadores do processo inflamatório ou neutralizando os radicais livres promovida pela liberação dos neutrófilos, já que o mesmo demonstrou acima atividade antioxidante.

O modelo induzido por etanol acidificado com ácido clorídrico causa graves danos à mucosa gástrica, pois sua administração ocasiona lesões hemorrágicas, causando necrose e edema na mucosa (LIMA, et. al, 2009; AIRASHDI, et. al, 2012). O mecanismo pelo qual age o ácido clorídrico ainda não é bem conhecido, porém, acredita-se que cause a produção de radicais livres, e as espécies de oxigênio que derivam desses radicais, causando a lesão da mucosa (HAMAUZO, et. al, 2007). Desta forma, acelera os danos que são causados pela administração do etanol, que conseqüentemente acarreta na infiltração de células inflamatórias, edema e perda de células epiteliais (BATRAN, et. al, 2013; ABDELWAHAB et. al, 2011; RIBEIRO, et. al, 2013). Além disso, esse modelo de úlcera gástrica promove alterações nos níveis de prostaglandinas, fatores de crescimento, óxido nítrico e muco (KOBAYASHI et al., 2001). A ação gastroprotetora do EHFTF, neste modelo acima pode estar relacionada à sua atividade antioxidante, visto que pode estar agindo na redução dos radicais livres que são produzidos pelo ácido clorídrico e pelo o etanol e/ou por neutralização iônica, tendo em vista que os componentes do extrato podem ter caráter básico.

O dano gástrico induzido por indometacina causa lesão à mucosa devido à inibição da ciclooxigenase (COX), e conseqüente redução de prostaglandinas e muco, dessa forma reduzindo a resistência do epitélio contra os danos causados pelos agentes agressores da

mucosa (WALLACE, 2012). As prostaglandinas são responsáveis pela modulação do fluxo sanguíneo e secreção de muco, bem como pela regulação do pH gástrico sendo assim um importante protetor da mucosa gástrica, devido a sua ação na manutenção da integridade da mucosa (CRISTIANS, et. al, 2013; JUNIOR et. al, 2014).

O EHFTF pode estar agindo no aumento da produção das prostaglandinas, ou mais precisamente os compostos fenólicos do extrato, pois estes promovem uma redução significativa nos danos à mucosa gástrica com envolvimento de prostaglandinas (BARROS et al., 2008). O extrato também por estar envolvido na modulação das enzimas COX's, podendo estar agindo inclusive na COX-2, já que esta tem o potencial de formar a 15-Epi-R-A<sub>4</sub>lipoxina um agente gastroprotetor potente (WALLACE, 2008).

Como citado acima, no modelo experimental de indução por etanol acidificado, Kobayashi et al. (2001) afirma que neste modelo ocorra alterações nos níveis de prostaglandinas e outros fatores causando a lesão, a ação destas pode ser confirmado nesse modelo de indução por indometacina, pois este modelo indica uma possível redução da camada protetora de muco-bicarbonato decorrente da inibição das prostaglandinas. Portanto, ambos modelos evidenciam que o EHFTF apresentou uma significativa proteção gástrica principalmente na maior dose (200 mg/kg) por via das PG's.

No teste de barreira física houve diferença significativa entre as vias de administração, pois o grupo tratado com extrato por administração intraperitoneal demonstrou pouca atividade antiulcerogênica diferentemente da administração por via oral. Neste sentido, os resultados indicam que o EHFTF tem efeito exercido na proteção gástrica por ação local por meio de barreira física, visto que observou-se uma redução dos danos físicos e químicos nos testes. O EHFTF pode estar agindo diretamente na formação da barreira protetora por complexação dos componentes presentes no extrato, mais precisamente os compostos fenólicos com a barreira muco-bicarbonato-fosfolípido, ou seja, uma barreira adicional à mucosa gástrica é formada aderente à camada protetora (complexo tanino-proteína/tanino-polissacárido), sobre a mucosa lesada permitindo o processo de cura (DE JESUS; et al., 2012). Resultados semelhantes também foram observados no trabalho de Dunji; et al. (1993).

Os resultados indicam também que o extrato tem um pequeno efeito exercido na proteção gástrica também por ação sistêmica de forma indireta na formação de barreira física, pois o EHFTF e/ou os compostos fenólicos (taninos) pode estar agindo por via da PG's (pois ambos demonstraram agir por essa via) e as PG's age na secreção de muco-bicarbonato e consequentemente na formação da barreira mucosa protetora.

A ação protetora local e/ou sistêmica do EHFTF também pode estar relacionada com os constituintes do extrato, que por sua vez possuem propriedades antioxidantes. Ou seja, uma significativa parte do efeito protetor observado pode ser devido à proteção mecânica local dos compostos fenólicos e/ou sistemicamente pelas por PG's, e pela atividade antioxidante que pode estar agindo em ambas as vias potencializando ou não a ação gastroprotetora. Porém fazem-se necessários mais estudos para confirmar este fato.

## CONCLUSÃO

A partir dos dados apresentados neste estudo pôde-se concluir que EHFTF demonstrou possuir atividade antioxidante, tanto para o método de FRAP, quanto para o método de DPPH. Para a atividade gastroprotetora, o EHFTF mostrou-se eficaz, apresentando melhor resposta na dose de 200mg/kg em todos os testes de modelos clássicos de indução de ulcera, sendo essa atividade desempenhada possivelmente por atuar através do reforço da camada de muco-bicarbonato com formação de barreira física.

## REFERÊNCIAS

- ABDELWAHAB, S. I.; MOHAM, S.; ABDULLA, M. A.; SUKARI, M. A.; ABDUL, A. B.; TAHA, M. M. E.; SYAM, S.; AHMAD, S.; LEE, K. H. The methanolic extract of *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. and its major compound pinostrobin induces anti-ulcerogenic property in vivo: Possible involvement of indirect antioxidant action. **Journal of Ethnopharmacology**. 2011.
- ABDELWAHAB, S. I.; TAHA, M. M. E.; ABDULLA, M. A.; NORDIN, N.; HADI, A. A. H.; MOHAN, S.; JAYAPALAN, J. J.; HASHIM, O. H. Gastroprotective mechanism of *Bauhinia thonningii* Schum. **Journal of Ethnopharmacology**. 2013; v. 148. pp. 277-286.
- ABDULLA, M. A.; ALI, H. M.; AHMED, K. A. A.; NOOR, S. M.; ISMAIL, S.; Evaluation of the anti-ulcer activities of *Morus alba* extracts in experimentally-induced gastric ulcer in rats. **Biomedical Research**. 2009; v. 20. n. 1. pp. 35-39.

AIRASHDI, A. S.; SALAMA, S. M.; ALKIYUMI, S. S.; ABDULLA, M. A.; HADI, A. H. A.; ABDELWHAB, S. I.; TAHA, M. M.; HUSSIANI, J.; ASYKIN, N. Mechanisms of Gastroprotective Effects of Ethanolic Leaf Extract of *Jasminum sambac* against HCl/Ethanol-Induced Gastric Mucosal Injury in Rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. 2012. pp. 1-15; doi:10.1155/2012/786426.

BARROS, M. P.; LEMOS, M.; MAISTRO, E. L.; Leite, M. F.; Sousa, J. P. B.; Bastos, J. K.; Andrade, S. F. (2008). Evaluation of antiulceractivity of the mains phenolic acids found in Brazilian Green Propolis. **Journal of Ethnopharmacology**. 120:372-377.

BATRAN, R. A.; BAYATY, F. A.; ABDULLA, M. A.; OBAIDI, M. M. J. A.; HAJREZAEI, M.; HASSANDARVISH, P.; FOUAD, M.; GOLBABAPOUR, S.; TALAEE, S. Gastroprotective effects of *Corchorus olitorius* leaf extract against ethanol-induced gastric mucosal hemorrhagic lesions in rats. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**. 2013. v. 28. pp. 1321-1329; doi:10.1111/jgh.12229

BRAZ, D. C.; OLIVEIRA, L.R.S.; VIANA, A.F.S.C. Atividade antiulcerogênica do extrato aquoso da *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Kurz. **Rev. Bras. Pl. Med.** 2013; v.15. n.1. pp.86-90.

BRITO-JUNIOR, F. E.; OLIVEIRA, D. R.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L.; KAMDEM, J. P.; MACEDO, G. E.; SILVA, G. F.; MENEZES, I. R. A.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M.; KERNTOPF, M. R.; POSSER, T. Protective effects of *Croton campestris* A. St-Hill in different ulcer models in rodents: Evidence for the involvement of nitric oxide and prostaglandins. **Journal of Ethnopharmacology**. 2014. v. 153. pp. 469-477

CARVALHO, J. C. T. Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. Tecmedd. Ribeirão Preto-SP. 2004

CARVALHO, W.; LEMÔNICA, A. L. Central Mechanisms Of Transmission And Pain Modulation. A Therapeutic Review. **Rev. Bras. Anesthesiol.** vol. 48. n. 3. Pp: 221-240. 1998.

COELHO, V. P. M., AGRA, M. F., BARBOSA, M. R. V. Estudo farmacobotânico das folhas de *Tocoyena formosa* (Cham. & Schltdl.) K.Schum. (Rubiaceae). **Rev. Bras. Farmacogn.** Braz J. Pharmacogn. 16(2): abr/jun. 2006

CRISTIANS, S.; NAVARRETE, A.; MATA, R. Gastroprotective effect of *Hintonia latiflora* and *Hintonia standleyana* aqueous extracts and compounds. **Journal of Ethnopharmacology**. 2013. v. 145. pp. 530-535.

CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**. 2011. v. 38. pp. 99-107

DE JESUS, N. Z. T., FALCÃO, H. D. S., GOMES, I. F., LEITE, T. J. D. A., LIMA, G. R. D. M., BARBOSA-FILHO, J. M., TAVARES, J. F., DA SILVA, M. S. ATHAYDE-FILHO, P. F., BATISTA, L. M. Tannins, peptic ulcers and related mechanisms. **International journal of molecular sciences**, v. 13. n. 3, 3203-3228. 2012.

DJAHANGUIRI, B.; SCAND, J. The production of acute gastric ulceration by indomethacin in the rat. **Gastroenterology**. 1969. v. 4. pp. 265-257

DO, T. D. T.; COZZOLINO, D.; MUHLHAUSLER, B.; BOX, A.; ABLE, A. J. Antioxidant capacity and vitamin E in barley: Effect of genotype and storage. **Food Chemistry**. 2015. v. 187. pp. 65-74

DONATINI, R. S.; ISHIKAWA, T.; BARROS, S. B. M.; BACCHI, E. M. Atividades antiúlcera e antioxidante do extrato de folhas de *Syzygium jambos* (L.) Alston (Myrtaceae). **Rev. bras. farmacogn.** [online]. 2009, v. 19, n. 1a, pp. 89-94. ISSN 0102-695X.

DUNJI, B. S.; SVENSSON, I.; AXELSON, J.; ADLERCREUTZ, P.; AR'RAJAB, A.; LARSSON, K.; BENGMARK, S. Green Banana Protection of Gastric Mucosa against Experimentally Induced Injuries in Rats. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**. v. 28. n. 10, 894-898. 1993.

ESPINOZA, M. C.F.; ZAFIMAOVA, A.; ALVARADO, P, G, M.; DUBREUCQ, E.; LEGRAND, C. P.; Grape seed and apple tannins: Emulsifying and antioxidant properties. **Food Chemistry**. 2015. v. 178. pp. 38-44.

FANG, S.; YANG, W. ; CHU, X.; SHANG, X.; SHE, C.; FU. X. Provenance and temporal variations in selected flavonoids in leaves of *Cyclocarya paliurus*. **Food Chemistry**. 2011. v. 124. pp. 1382-1383

FERREIRA, I. C. F. R.; BAPTISTA, P.; BOAS, M. V.; BARROS, L. Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. **Food Chemistry**. 2007.v. 100. pp. 1511-1516

FERREIRA, R. Q.; GRECO, S. J.; DELARMELINA, M.; WEBER, K. C. Electrochemical quantification of the structure/antioxidant activity relationship of flavonoids. **Electrochimica Acta**. 2015. v. 163. pp. 161-166

HAFEZ, A. A., TAVASSOLI, E., HASANZADEH, A., REISI, M., JAVADZADE, S. H., IMANZAD, M. Quality of life in peptic ulcer patients referring to Al-Zahra hospital of Isfahan, Iran. **Gastroenterology and Hepatology from bed to bench**, v. 6. n. 1. S87. 2013.

HAMAUZO, Y.; FOREST, F.; HIRAMATSU, K.; SUGIMOTO, M. Effect of pear (*Pyrus communis* L.) procyanidins on gastric lesions induced by HCl/ethanol in rats. **Food Chemistry**. [Online] 2007. v. 100. pp. 265-263

HAMERSKI, L.; CARBONEZI, C. A.; CAVALHEIRO, A. J.; BOLZANI, V. S.; YOUNG, M. C. M Saponinas triterpênicas de *Tocoyena brasiliensis* Mart. (Rubiaceae). **Quím. Nova** [online]. 2005, vol.28, n.4, pp. 601-604. ISSN 0100-4042. 1590/S0100-40422005000400009.

ISHIDA, K.; KOJIMA, R.; TSUBOI, M.; TSUDA, Y.; ITO, M.; Effects of Artichoke Leaf Extract on Acute Gastric Mucosal Injury in Rats. **Bioll. Pharm. Bul.** 2010; v. 33. n. 2. pp. 223-229

KATIKI, L. M.; FERREIRA, J. S. F.; GONZALEZ, J. S. F.; ZAJAC, A. M.; LINDSAY, D. S.; CHAGAS, A. C. S.; AMARANTE, A. F. T. Anthelmintic effect of plant extracts

containing condensed and hydrolyzable tannins on *Caenorhabditis elegans*, and their antioxidant capacity. **Veterinary Parasitology**. 2013. v. 192. pp. 218-227.

KOBAYASHI T, OHTA Y, YOSHINO J, NAKAZAWA S. Teprenone promotes the healing of acetic acid-induced chronic gastric ulcers in rats by inhibiting neutrophil infiltration and lipid peroxidation in ulcerated gastric tissues. **Pharmacological Research**, v. 43, p. 23-30, 2001.

LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; LANDMAN, M. T. R. L.; CASTRO, M. S. A.; LIMA, T. C. M. **Métodos de Avaliação da Atividade Farmacológica de Plantas Medicinais**. 5ª ed. São Paulo. Editora: Sociedade Brasileira de Plantas Medicinais (SBPM), 2008.

LIMA, C. A. H.; BATISTA, L. M.; ALMEIDA, A. B. A.; MAGRI, L. P.; SANTOS, L. C.; VILEGAS, W.; BRITO, A. R. M. S. Antiulcerogenic action of ethanolic extract of the resin from *Virola surinamensis* Warb. (Myristicaceae). **Journal of Ethnopharmacology**. 2009. v. 122. pp. 406-409

MALL, B.; GAUCHAN, D. P.; CHHETRI, R. B. An ethnobotanical study of medicinal plantas used by ethnic people in Parbat district of western Nepal. **Journal of Ethnofarmacology**. v. 165. pp. 103-117. 2015.

MIKA, M.; KOSTOGRYS, R. B.; ZARÓW, M. F.; WIKIERA, A.; MASLAK, E. Anti-atherosclerotic activity of catechins depends on their stereoisomerism. **Atherosclerosis**. 2015. v. 240. pp. 125-130

MIZUI, T.; SHIMONO, N.; DOTEUCHI, M. A possible mechanism of protection by polyamines against gastric damage induced by acidified ethanol in rats: polyamine protection may depend on its antiperoxidative properties. **Japanese Journal Pharmacology**. 1979. v. 44. pp. 43-50.

NAUMOSKA, K.; VOVK, I. Analysis of triterpenoids and phytosterols in vegetables by thin-layer chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. 2015. v. 1381. pp. 229-238

PETERS, C. A.; SGROTT, R. A. G.; PETERS, R. R.; MOTERLE, D.; MADEIRA, F.; EMER, A. A.; PIOVEZAN, A. P.; KANIS, L. A. Production of *Wilbrandia ebracteata* extract standardized in flavonoids and dihydrocurcubitacin and assessment of its topical anti-inflammatory activity. **Industrial Crops and Products**. 2015. v. 69. pp. 123-128

QUIAO, A.; WANG, Y.; XIANG, L.; ZHANG, Z.; HE, X. Novel triterpenoids isolated from hawthorn berries functioned as antioxidant and antiproliferative activities. **Journal of Functional Foods**. 2015. v. 13. pp. 308-313

ROBERT, A.; NEZAMES, J. E.; LANCASTER, C.; HANCHAR, A. J.; Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl, and thermal injury. **Gastroenterology**. 1979. v. 77. n. 3. pp. 433-443

ROCHA, W. S.; LOPES, R. M.; SILVA, D. B.; VIEIRA, R. F.; SILVA, J. P.; SILVA, J. P.; COSTA, T. S. A.; Compostos fenólicos totais e taninos condensados em frutas nativas do cerrado. **Rev. Bras. Frutic**. 2011. v. 33. n. 4. pp. 1215-1221

RUDNICKI, M.; et al. Oliveira, M. R.; Pereira, T. V.; Reginatto, F. H.; Dal-Pizzol, F.; Moreira, J. C. F. Antioxidant and antiglycation properties of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* extracts. **Food Chemistry**. v. 100. n. 2. Pp:719-724. 2007.

RUFINO, M. S. M; et al. Metodologia científica:Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre. Embrapa. Julho, 2007.

RUFINO, M. S. M; et al. Metodologia científica:Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela método de redução de ferro (FRAP). Embrapa. 2006.

SMITH, H.; DOYLE, S.; MURPHY, R. Filamentous fungi as a source of natural antioxidants. **Food Chemistry**. 2015. v. 185. pp. 389-397

SOCHOR, J.; RYVOLOVA, M.; KRYSTOFOVA, O.; SALAS, P.; HUBALEK, J.; ADAM, V.; TRNKOVA, L.; HAVEL, L.; BEKLOVA, M.; ZEHNALÉK, J.; PROVAZNIK, I.; KIZEK, R. Fully Automated Spectrometric Protocols for Determination of Antioxidant Activity: Advantages and Disadvantages. **Molecules**. v. 15. pp. 8618-8640. 2010.

SUZUKI, H., NISHIZAWA, T., TSUGAWA, H., MOGAMI, S., HIBI, T. Roles of oxidative stress in stomach disorders. **Journal of clinical biochemistry and nutrition**, v. 50. n. 1. 35. 2012

SZELENYI, I.; BRUNE, K. Possible role of oxygen free radicals in ethanol-induced gastric mucosal damage in rats. **Digestive Disease Science**, v. 33, n. 07, p. 865-871, 1988.

TRISTCH, D.; ZINGLÉ, C.; ROHMER, M.; BILLIARD, C. G. Flavonoids: True or promiscuous inhibitors of enzyme? The case of deoxyxylulose phosphate reductoisomerase. **Bioorganic Chemistry**. 2015. v. 59, pp. 140-144

VIEIRA, L. M.; SOUSA, M. S. B.; FILHO, J. M.; LIMA, A. Fenólicos totais e capacidade antioxidante in vitro de polpas de frutos tropicais. **Rev. Bras. Frutic.** 2011. v. 33. n. 3. pp. 888-897

WALLACE, J. L. NSAID gastropathy and enteropathy: distinct pathogenesis likely necessitates distinct prevention strategies. **British Journal of Pharmacology**. 2012. v. 165. pp. 67-74

WALLACE, J. L. Prostaglandins, NSAIDs, and gastric mucosal protection: why doesn't the stomach digest itself? **Physiological Reviews**. october, v. 88 (4), p. 1547-1565, 2008.

### 4.3 ARTIGO 3:

#### **MECANISMOS ENVOLVIDOS NA ANTINOCICEPÇÃO CAUSADA PELO EXTRATO HIDROETANÓLICO OBTIDO A PARTIR DAS FOLHAS DE TOCOYENA FORMOSA (CHAM. & SCHLTDL.) K. SCHUM (JENIPAPO-BRAVO) EM CAMUNDONGOS**

Francisco Rafael Alves Santana Cesário<sup>1</sup>, Thaís Rodrigues de Albuquerque<sup>1</sup>, Giovana Mendes de Lacerda<sup>1</sup>, Maria Rayane Correia de Oliveira<sup>1</sup>, Lindaiane Bezerra Rodrigues<sup>1</sup>, Anita Oliveira Brito Pereira Bezerra Martins<sup>1</sup>, Aline Augusti Boligon<sup>2</sup>, Margareth Linde Athayde<sup>2</sup>, Lucindo José Quintans-Júnior<sup>3</sup>, Irwin Rose Alencar de Menezes<sup>1</sup>

1. Departamento de Química Biológica, Programa de Pós-Graduação em Programa de Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri, 63.105-000, Crato, CE, Brasil
2. Laboratório de Pesquisa Fitoquímica do Departamento de Farmácia Industrial, Universidade Federal de Santa Maria, 97105-900, Santa Maria, RS, Brasil.
3. Laboratório Departamento de Fisiologia da Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, Sergipe, Brasil

**RESUMO:** A dor é um meio de sinalização decorrente de episódios de estímulos nocivos, que ativa reações na busca para suprimir a etiologia da dor e restaurar as lesões e/ou agravos. Em tecidos ou órgãos lesionados esse estímulo faz com que ocorra sensibilização de nociceptores a estímulos que são inofensivos ou não causam dor. As plantas medicinais tradicionalmente utilizadas como a *Tocoyena formosa* exibem atividade analgésica, justificando, portanto, o desenvolvimento de estudos para investigar e comprovar esse potencial terapêutico. Este estudo teve como objetivo avaliar por meio de modelos experimentais farmacológicos em camundongos os mecanismos envolvidos na antinocicepção causada pelo Extrato Hidroetanólico das Folhas de *Tocoyena formosa* (Cham. & Schlecht.) K. Schum. (EHFTF). O EHFTF nas doses de 200 e 400mg/kg diminuíram de forma significativa em 93,94% e 60,61% as contorções abdominais por ácido acético. O Extrato somente nas doses de 200 e 400mg/kg produziu uma redução significativa do tempo de nocicepção na fase neurogênica em 57,18% e 47,31% e inflamatória em 42,97% b e 79,43% do teste de formalina. O EHFTF nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg promoveu aumento no tempo de reação da retirada da cauda e da pata em relação ao tempo de 30min a 120 ou 180min nos

testes de nocicepção térmica (Tail Flick e Hot Plate). Quanto à hipernocicepção mecânica avaliada no teste de Von Frey, o EHFTF também apresentou ações antinociceptivas significativas. Por sua vez, o tratamento com o EHFTF não causou alteração significativa no desempenho e coordenação motora verificado no teste de Rota Rod. Quanto aos mecanismos de ação antinociceptivo do EHFTF, os valores indicam o envolvimento dos sistemas opióide, glutamatérgico, óxido nítrico/GMPc e vanilóide, evidente pelo fato de que as substâncias (Naloxona, L-arginina, Ácido Ascórbico e Vermelho de Rutenio, respectivamente) antagonizou as respostas mediadas por ativação de seus receptores e reverteu a antinocicepção do extrato no teste de formalina. Conclui-se que o EHFTF apresenta antinocicepção promovida pelos os mecanismos opióide, glutamatérgico, óxido nítrico/GMPc e vanilóide.

**Palavras-chave:** HPLC, Antinocicepção, *Tocoyena Formosa*, Mecanismos.

## INTRODUÇÃO

A dor é uma modalidade subjetiva que o corpo demonstra quando sujeito a um estímulo que pode ser prejudicial. Em tecidos ilesos, esse estímulo ativa reações fisiológicas que previnem uma possível lesão. Em tecidos ou órgãos danificados ou lesionados esse estímulo faz com que durante o processo inflamatório ocorra sensibilização de nociceptores para responderem a estímulos que são inofensivos ou não causam dor normalmente (SCHAIBLE; EBERSBERGER; NATURA, 2011)

A história da cura de lesões e o uso de plantas medicinais na reparação de processos dolorosos é tão antiga quanto à história da humanidade. Na natureza existem muitas plantas com essa ação farmacológica; no Brasil, nesse sentido, se caracteriza por uma grande variedade de plantas, embora a maioria delas são utilizadas sem base científica (FILIPINI; et. al., 2012). Entre as muitas ervas medicinais, utilizadas pela população com essa finalidade, principalmente na região do Cariri, Crato - CE, Brasil, encontra-se a *Tocoyena formosa* (Cham. E Schlecht.) K. Schum.

Essa espécie pertence a família Rubiaceae e é popularmente conhecido como "Jenipapo do campo" é uma pequena árvore ornamental, que cresce espontaneamente em regiões secas e tem flores amarelas e verde (HAMERSKI; et. al, 2008; BOLZANI, et. al., 1997) sendo usada na medicina popular do Nordeste do Brasil como analgésico no tratamento de dores reumáticas (COELHO; AGRA; BARBOSA, 2006; RIBEIRO et al 2014) e na cidade

do Crato, na Região do Cariri, sul do Ceará, Brasil, para o tratamento de dores lombares, justificando portanto, a realização de estudos para analisar essa potencialidade terapêutica.

A partir disso, e levando em consideração que nenhum estudo farmacológico tenha sido realizado para esta espécie, este trabalho tem como foco avaliar por meio de modelos experimentais farmacológicos em camundongos, os efeitos potenciais antinociceptivos do Extrato Hidroetanólico das Folhas de *Tocoyena formosa* (Cham. & Schlecht.) K. Schum, e investigar alguns dos possíveis mecanismos envolvidos nessa ação do extrato.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Coleta do Material Botânico, Preparação do Extrato Hidroetanólico de *Tocoyena formosa* (Cham. & Schlecht.) K. Schum.**

As folhas de *Tocoyena formosa* (Cham. & Schlecht.) K. Schum foram coletadas na chapada do Araripe, localizada no Nordeste do Brasil, sul do Ceará, na Região do Cariri e no município de Crato-CE, no Sítio Barreiro Grande (07° 21'44,0''S e 39° 28'41,0''W com altitude de 901m acima do nível do mar) (Fonte: *Google Earth*). O material foi coletado com características no arbusto de flor e/ou fruto, no mês de abril de 2014, e foi explorada sem nenhum impacto a sua biodiversidade e sob autorização do IBAMA N° 44.148-1. Uma amostra representativa da espécie (Exsicata) contendo fruto foi encaminhada para identificação junto ao Herbário Dárdano de Andrade Lima da Universidade Regional do Cariri – URCA sob N° 2.770.

As folhas foram expostas aos raios solares para secagem por um período de 48h; logo após foram pesadas e trituradas, sendo em seguida submetido à extração em solvente etanol e água destilada (proporção 1:1), por um período de 72h. O extrato hidroetanólico formulado foi filtrado para retenção de material sólido e submetido à adição de carvão ativado (10g/100ml) por 30min, após isso, foi filtrado novamente para retenção do carvão. Depois, foi concentrado por destilação do solvente em evaporador rotativo a uma temperatura em torno dos 60°C a 40rpm para promover a evaporação do etanol. Em seguida o extrato foi posto em banho-maria (60°C) de 24 a 72h para proporcionar evaporação por completo de etanol, após 24hs foi congelado e quando em estado sólido, foi colocado em processo de liofilização por 72h sob temperatura de -61°C.

### **Análise por HPLC do Extrato Hidroetanólico das Folhas de *Tocoyena formosa* (Cham. & Schlecht.) K. Schum.**

Foram utilizados produtos químicos de grau analítico, como o acetonitrilo, ácido acético, ácido gálico, ácido clorogénico, ácido cafeico e ácido elágico adquiridos da Merck (Darmstadt, Alemanha). A catequina, a quercetina, a luteolina e rutina foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). A CLAE foi realizada com um proeminente amostrador automático Shimadzu (SIL-20A) sistema de HPLC (Shimadzu, Quioto, Japão), equipado com bombas alternativas Shimadzu LC-20AT, ligados a um desgaseificador (DGU 20A5) com um integrador (CBM 20<sup>a</sup>), um detector diodo de arranjo (SPD-M20A) e solução LC, 1,22 software SP1. As análises cromatográficas foram realizadas sob as condições de gradiente utilizando coluna C18 (4,6 mm x 250 mm) de fase inversa, com partículas de diâmetro embalado 5µm; A fase móvel foi água contendo 2% de ácido acético (A) e metanol (B), e o gradiente de composição foi a seguinte: 8% de B até 5 min e alteradas para se obter 20%, 30%, 50%, 60%, 70% , 20% e 10% de B a 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 min, respectivamente, seguindo o método descrito por Silva et al. (2014) com ligeiras modificações.

O extracto hidroalcoólico das Folhas de *Tocoyena formosa* (Cham. & Schlecht.) K. Schum e a fase móvel foram filtrados através de filtro de membrana de 0,45µm (Millipore) e, em seguida, desgaseificou-se por banho de ultrassons antes da utilização, o extracto hidroalcoólico das Folhas de *Tocoyena formosa* (Cham. & Schlecht.) K. Schum foram analisados a uma concentração de 20 mg/mL. A taxa de fluxo foi de 0,6 mL/min, o volume de injeção foi de 50 µL e os comprimentos de ondas foram 270nm para o ácido gálico e ácido elágico, 280 nm para a catequina, a 327 nm para o ácido clorogénico e ácido cafeico e 365 nm para a quercetina, a luteolina e rutina. Todas as amostras e fase móvel foram filtrados através de filtro de membrana de 0,45µm (Millipore) e, em seguida, desgaseificou-se por banho de ultrassons antes da utilização. As soluções estoques de referências padrões foram preparados na fase móvel de HPLC numa gama de concentrações de 0,020-0,350mg/ml para catequina, a quercetina, a luteolina e rutina; e 0,025-0,300 mg/ml para elágico, gálico, cafeico e ácidos clorogénicos. Os picos Cromatograficos foram confirmados por comparação do seu tempo de retenção com os de padrões de referência e por espectros de DAD (200 a 500nm).

A Curva de calibração para ácido gálico:  $Y = 12609x + 1.358,5$  ( $r = 0,9998$ ); catequina:  $Y = 13626x + 1197,6$  ( $r = 0,9995$ ); ácido clorogênico:  $Y = 13074x + 1.258,3$  ( $r = 0,9999$ ); ácido caféico:  $Y = 12745x + 1.236,9$  ( $r = 0,9995$ ); ácido elágico:  $Y = 11873x +$

1.305,6 ( $r = 0,9998$ ); rutina:  $Y = 13670x + 1.271,9$  ( $r = 0,9999$ ), luteolina:  $Y = 12745x + 1.308,5$  ( $r = 0,9991$ ) e quercetina:  $Y = 13165x + 1.175,8$  ( $r = 0,9996$ ). Todas as operações de cromatografia foram realizados a temperatura ambiente e em triplicata. O limite de detecção (LOD) e limite de quantificação (LOQ) foi calculado com base no desvio padrão das respostas e a inclinação por meio de três curvas de análise independentes. O LOD e o LOQ foram calculados como  $3,3$  e  $10 \sigma/S$ , respectivamente, onde  $\sigma$  é o desvio padrão da resposta e  $S$  é o declive da curva de calibração (SILVA; et al., 2014).

## **Animais**

Foram utilizados camundongos Swiss, machos, de idade adulta e com peso de 20 a 30g provenientes do Biotério Central da Universidade Regional do Cariri – URCA. Os animais foram mantidos em gaiolas coletivas de polietileno com tampa de aço inox, forradas com maravalha autoclavada. A temperatura ambiente e a quantidade de ruído foram mantidas em condições ideais. O fotoperíodo foi de um ciclo claro/escuro de 12/12 h diárias. Os animais foram mantidos em jejum de sólidos por um período de 8-12 h antes do experimento e a água filtrada foi fornecida *ad libitum*. Foram manipulados de acordo com procedimentos para o uso científico de animais estabelecido pela lei N° 11.794, de 8 de outubro de 2008 e em concordância com os Princípios Éticos para o uso de Animais de Laboratório preconizados pelo COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) e submetido e aprovado pelo Comissão Ética em utilização de animais da Universidade Regional do Cariri – URCA com processo sob N° 00198/2014.1.

## **Drogas**

Todos os compostos puros foram adquiridos da Sigma-Aldrich Corporation (St. Louis, MO, EUA). Os fármacos foram recentemente preparados no dia dos experimentos e administrado por injeção subcutânea (s.c.), injeção intraperitoneal (i.p.) ou oral (v.o.), num volume de 0,1mL/10g de peso corporal. Os animais do controle receberam o mesmo volume de solução salina estéril, ou veículo.

## **Protocolos Experimentais**

### **Avaliação das Respostas Antinociceptiva do Extrato Hidroetanólico das Folhas de *Tocoyena formosa* (Cham. & Schlecht.) K. Schum**

#### **Teste de Contorções Abdominais Induzidas por Ácido Acético**

Os animais foram divididos em 5 grupos (n=6) tratados com veículo (Salina 0,9%, 10 mL/kg v.o.), EHFTF (400, 200 e 100 mg/kg v.o.) e com indometacina (10 mg/kg v.o., controle positivo) respectivamente. Depois de 60 minutos (exceto o grupo que recebeu morfina - 30 min) dos tratamentos, todos os animais receberam injeção de ácido acético diluído em solução salina (1,2%; 100 ml/10 g, i.p.) e durante 30 minutos, as contorções foram contadas, cada contorção é definida como um contração da parede abdominal seguida de extensão por pelo menos uma das patas traseiras. (KOSTER; ANDERSON, DE BEER, 1959)

#### **Teste da Formalina**

Os animais foram divididos em 5 grupos (n=6) tratados com veículo (Salina 0,9%, 10 mL/kg v.o.), EHFTF (400, 200 e 100 mg/kg v.o.) e com morfina (5 mg/kg s.c., controle positivo) respectivamente. Uma hora após os tratamentos os animais receberam a administração intraplantar de 20µL de solução de formalina a 2,5% sob o coxim plantar da pata traseira direita. Imediatamente após, foi cronometrado o tempo, em segundos, que os animais lambiam a pata injetada. Estes sinais são respostas nociceptivas promovidas pela formalina durante suas duas fases: a primeira fase de nocicepção varia de zero a 5min após a injeção, chamada de fase neurogênica ou inicial, e a segunda fase de inflamatória ou tardia, e avaliada entre 15 e 30min. (HUNSKAAR; et al, 1985)

#### **Teste de placa quente**

Os animais foram divididos em 5 grupos (n=6) tratados com veículo (Salina 0,9%, 10 mL/kg v.o.), EHFTF (400, 200 e 100 mg/kg v.o.) e com morfina (5 mg/kg s.c., controle positivo) respectivamente. Cada animal foi aclimatado durante 10 min à temperatura ambiente no aparelho. Logo após, a placa foi aquecida a uma temperatura entre 52-54 °C. Cada animal foi colocado na placa, e foi acionado o temporizador para medir o tempo de latência de

retirada da pata. O tempo foi cronometrado até ao início do reflexo de retirada observado e considerado como limiar de sensibilidade térmica. O tempo de permanência máximo caso o animal não mostrasse nenhuma reação foi de 30 s, para impedir queimaduras nas patas. O teste foi realizado após a obtenção de duas basais (com intervalo de 30 min) e após os tratamentos cada animal foi avaliado 30, 60, 120 e 180 min. (BEIRITH; et al., 1998)

### **Teste de retirada de cauda**

Os animais foram divididos em 5 grupos (n=6) tratados com veículo (Salina 0,9% 10 mL/kg v.o.), EHFTF (400, 200 e 100 mg/kg v.o.) e com morfina (5 mg/kg s.c., controle positivo) respectivamente. Os camundongos foram colocados em um aparelho de estímulo nociceptivo (analgesímetro térmico) que contém uma fonte térmica luminosa e um suporte para encaixe da cauda do camundongo. A avaliação do tempo (s), que o animal leva para retirar a cauda do local de incidência do estímulo térmico doloroso. A intensidade do calor é regulada para fornecer latências basais entre 4 a 6 s, ou seja, os camundongos com latência basal superior a 7 e inferior a 3 s, foram descartados. A cauda foi colocada no aparato, a fonte térmica nociva foi acionada e o cronômetro foi disparado até a retirada da cauda (período de latência). O teste foi realizado após a obtenção de duas basais (com intervalo de 24h) e após os tratamentos cada animal foi avaliado 30, 60, 120 e 180 min. Após os tratamentos, foi estabelecido o período máximo de latência de 30s a fim de se evitar lesão tecidual (D'AMOUR e SMITH, 1941; LAPA; et al., 2008).

### **Teste de de nocicepção mecânica por pressão - von frey**

Os animais foram divididos em 5 grupos (n=6) tratados com veículo (Salina 0,9% 10 mL/kg v.o.), EHFTF (400, 200 e 100 mg/kg v.o.) e com indometacina (10 mg/kg v.o., controle positivo) respectivamente. Depois de 60 minutos dos tratamentos, todos os animais receberam injeção de 20µL de Formalina (2,5% i.pl.) na pata traseira direita. Os animais foram colocados individualmente em caixas de vidro em uma superfície elevada e coberto com uma malha de arame. Foram aplicados estímulos com o filamento do aparelho de resistência de Von Frey na superfície plantar injetada. A força em questão pode ser alcançada pela retirada da pata do filamento pelo o animal (CUNHA, et al., 2004). Foram consideradas como respostas positivas, aquelas em que o animal realizou movimentos de retirada após estimulação mecânica. Todo teste foi realizado após a obtenção de duas basais (com intervalo

de 30 min) e após os tratamentos cada animal foi avaliado 1h, 2h, 3h 4h e 24 h. (YOWTAK et al., 2011; MARTINOV; et. al., 2013)

### **Teste de Rota Rod**

Esse teste permitiu avaliar se o EHFTF promove relaxamento muscular ou sedação interferindo no efeito antinociceptivo. Para esta avaliação, os camundongos foram selecionados em uma sessão de treino 24 h antes do experimento. Os animais foram colocados sobre uma barra giratória de 2,5 cm de diâmetro, elevada a 25 cm, os que foram capazes de permanecer na barra (16 rpm/180 s) foram selecionados como aptos para o experimento. Decorrido as 24 h, os animais foram divididos em três grupos (n=9) e tratados com veículo (Salina 0,9% 10 mL/kg v.o.), diazepam (5 mg/kg i.p) e EHFTF (200 mg/kg v.o.); após 1h a salina ou EHFTF e 30 min para o diazepam cada animal foi testado no aparelho, onde foi registrado o número de quedas sofridas (limite máximo de 3 quedas/animal) e o tempo de permanência durante 1 min (DUNHAM e MIYA, 1957).

### **Possíveis Mecanismos de Ação do Extrato Hidroetanólico das Folhas de *Tocoyena formosa* (Cham. & Schlecht.) K. Schum na Antinociceção.**

Em todos os testes, os antagonistas foram administrados 15 min antes do extrato e agonistas. O EHFTF (200mg/kg v.o., menor dose eficaz) foi administrado 1h antes e os fármacos agonistas/antagonistas da nociceção 30 min antes (injeção i.p.) da injeção i.pl. do agente nociceptivo. A escolha das doses dos agonistas e antagonistas nociceptivos foi baseada em dados da literatura e testes anteriormente realizados em nosso laboratório. Foram investigadas a participação das vias de transmissão nociceptiva: opióide, colinérgica, adrenérgica  $\alpha 1$  e  $\alpha 2$ , serotoninérgica, óxido nítrico, adenosina, dopaminérgica, glutaminérgica e vanilóide.

### **Participação do sistema Opióide**

Os animais foram divididos em 6 grupos (n=8), onde os três primeiros grupos foram tratados com veículo (Salina 0,9% 10 mL/kg v.o.), EHFTF (200 mg/kg v.o.) e com morfina (agonista opióide; 5 mg/kg s.c.) respectivamente, e os outros três foram tratados da mesmas forma, porém, com administração prévia de 15 min com o antagonista opióide, naloxona

(4mg/kg i.p.). Uma hora após os tratamentos com veículo ou EHFTF e 30 min após a morfina os animais foram avaliados em relação à nocicepção induzida pelo o Teste de Formalina.

### **Participação do Sistema $\alpha$ 1-Adrenérgico**

Os animais foram divididos em 6 grupos (n=8) onde os três primeiros grupos foram tratados com veículo (Salina 0,9% 10 mL/kg v.o.), EHFTF (200 mg/kg v.o.) e fenilefrina (agonista  $\alpha$ 1; 10mg/kg i.p.) respectivamente, e os outros três foram tratados da mesmas forma, porém, com administração prévia de 15 min com o antagonista  $\alpha$ 1 prazosina (0,15mg/kg i.p.). Uma hora após os tratamentos com veículo ou EHFTF e 30 min após a fenilefrina, os animais foram avaliados em relação a nocicepção induzida pelo o Teste de Formalina.

### **Participação do Sistema $\alpha$ 2-Adrenérgico**

Os animais foram divididos em 6 grupos (n=8) onde os três primeiros grupos foram tratados com veículo (Salina 0,9% 10 mL/kg v.o.), EHFTF (200 mg/kg v.o.) e com clonidina (agonista  $\alpha$ 2; 0,1 mg/kg i.p.) respectivamente, e os outros três foram tratados da mesmas forma, porém, com administração prévia de 15 min com antagonista  $\alpha$ 2 ioimbina (0,15mg/kg i.p.). Uma hora após os tratamentos com veículo ou EHFTF e 30 min após a clonidina, os animais foram avaliados em relação a nocicepção induzida pelo o Teste de Formalina.

### **Participação do Sistema Colinérgico**

Os animais foram divididos em 6 grupos experimentais (n=8), onde os três primeiros grupos foram tratados com veículo (Salina 0,9% 10 mL/kg v.o.), EHFTF (200 mg/kg v.o.) e com acetilcolina (agonista colinérgico; 1,0 mg/kg i.p.) respectivamente, e os outros três foram tratados da mesmas forma, porém, com administração prévia de 15 min com o antagonista não seletivo atropina (1,0mg/kg i.p.). Uma hora após os tratamentos com veículo ou EHFTF e 30 min após a acetilcolina os animais foram avaliados em relação a nocicepção induzida pelo o Teste de Formalina.

### **Participação do Sistema Serotoninérgico**

Os animais foram divididos em 4 grupos (n=8), onde os dois primeiros grupos foram tratados com p-clorofenilalanina (PCPA, inibidor da síntese de serotonina;100mg/kg i.p., 1 vez ao dia/4 dias consecutivos) e os outros dois foram tratados com Salina 0,9% (10ml/kg i.p.,

1 vez ao dia/4 dias consecutivos). Após 30min do último tratamento com PCPA e salina os animais receberam veículo (Salina 0,9% v.o.) e EHFTF (200mg/kg v.o.). Uma hora após os tratamentos com veículo ou EHFTF os animais foram avaliados em relação a nocicepção induzida pelo o Teste de Formalina.

### **Participação da via L-arginina/Óxido Nítrico/GMPc**

Os animais foram divididos em 6 grupos experimentais (n=8), onde os três primeiros grupos foram tratados com veículo (Salina 0,9% v.o.), EHFTF (200 mg/kg v.o.), L-NOARG, (inibidor da óxido nítrico sintase- NOS; 75 mg/kg, i.p.), respectivamente, e os outros três foram tratados da mesma forma, porém com administração prévia de 15 min com L-Arginina (substrato da NOS; 600mg/kg i.p.). Uma hora após os tratamentos com veículo ou EHFTF e 30 min após a L-NOARG os animais foram avaliados em relação a nocicepção induzida pelo o Teste de Formalina.

### **Participação do sistema Adenosinérgico**

Os animais foram divididos em quatro grupos (n=8) e tratados com veículo (Salina 0,9% 10 mL/kg v.o.), cafeína (10 mg/kg ip), EHFTF (200 mg/kg v.o.) e cafeína (10 mg/kg ip) mais EHFTF (200 mg/kg, v.o.). A cafeína foi administrada 15 min antes do tratamento com EHFTF. Uma hora após o tratamento com veículo ou EHFTF e 30 min após a cafeína, os animais foram avaliados em relação à nocicepção induzida pelo o Teste de Formalina.

### **Participação do sistema Dopaminérgico**

Os animais foram divididos em quatro grupos (n=8) e tratados com veículo (Salina 0,9% 10 mL/kg v.o.), haloperidol (um antagonista não-seletivo dos receptores de dopamina; 0,2 mg/kg i.p.) EHFTF (200 mg/kg, v.o.), e haloperidol (0,2 mg/kg i.p.) mais EHFTF (200 mg/kg, v.o.). A haloperidol foi dada 15 minutos antes do tratamento com EHFTF. Uma hora após o tratamento com veículo ou EHFTF e 30 min após a haloperidol, os animais foram avaliados em relação à nocicepção induzida pelo o Teste de Formalina, descrito anteriormente.

### **Participação do sistema Glutaminérgico**

Os animais foram divididos em quatro grupos (n=8) e tratados com veículo (Salina 0,9% 10 mL/kg v.o.), Ácido ascórbico (um antagonista dos receptores de NMDA, 100 mg/kg i.p.), EHFTF (200 mg/kg, v.o.), e Ácido ascórbico (100 mg/kg i.p.) mais EHFTF (200 mg/kg, v.o.). O Ácido ascórbico foi dado 15 min antes do tratamento com EHFTF. Uma hora após o tratamento com veículo ou EHFTF e 30 min após o Ácido ascórbico, os animais foram avaliados em relação à nocicepção induzida pela injeção intraplantar de 20 µl a 20 µmol/pata de glutamato tamponado e foram analisados por 15 min. O tempo (s) que o animal lambeu a pata foi considerado como sugestivo de dor. (BEIRITH; SANTOS; CALIXTO, 2002)

### **Participação do sistema Vanilóide (TRPV-1)**

Os animais foram divididos em quatro grupos (n=8) e tratados com veículo (Salina 0,9% 10 mL/kg v.o.), Vermelho de Rutênio (antagonista TRP não seletivo; 3 mg/kg, i.p.), EHFTF (200 mg/kg, v.o.), e Vermelho de Rutênio (3 mg/kg i.p.) mais EHFTF (200 mg/kg, v.o.). O Vermelho de Rutênio foi dado 15 min antes do tratamento com EHFTF. Uma hora após o tratamento com veículo ou EHFTF e 30 min após o Vermelho de Rutênio, os animais foram avaliados em relação à nocicepção induzida pela injeção intraplantar de 20 µl a 5,2 nmol/pata de capsaicina (agonista de receptor TRPV1) e foram analisados por 5 min. O tempo (s) que o animal lambeu a pata foi considerado como sugestivo de dor. (SANTOS, CALIXTO, 1997)

### **Análise estatística**

Foi empregado o programa “*Software GraphPad Prism*” versão 6.0, onde os dados paramétricos serão expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M). Para a verificação das diferenças estatísticas entre os grupos será realizada análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias conforme o protocolo experimental, seguido do teste de Tukey de múltiplas comparações; exceto para os valores da DI50 (ou seja, a dose capaz de promover redução da resposta nociceptiva em 50% em relação ao controle) que foram apresentadas como médias geométricas acompanhadas por seus respectivos limites de confiança de 95%, os valores de DI50 foram determinados por regressão linear a partir de experimentos individuais, usando o software GraphPad. Para todas as análises será considerado significativo um  $p < 0,05$ .

## RESULTADOS

### Análise HPLC do Extrato Hidroetanólico das Folhas de *Tocoyena formosa* (Cham. & Schlecht.) K. Schum

A impressão digital do HPLC do Extrato Hidroalcoólico das Folhas de *Tocoyena formosa* (Cham. & Schlecht.) K. Schum revelou a presença do ácido gálico ( $t_R = 12,39$  min; pico 1), catequina ( $t_R = 17,83$  min; pico 2), o ácido clorogênico ( $t_R = 22,15$  min; pico 3), ácido caféico ( $t_R = 25,67$  min; pico 4), ácido elágico ( $t_R = 33,81$ ; pico 5), a rutina ( $t_R = 42,95$  min; pico 6), quercetina ( $t_R = 52,89$  min; pico de 7 ) e luteolina ( $t_R = 57,73$  min; pico 8), (Figura 1). A curva padrão de calibração foram obtidos por regressão linear da curva: ácido gálico:  $Y = 12609x + 1358.5$  ( $r = 0.9998$ ); quercetina:  $Y = 13626x + 1197.6$  ( $r = 0.9995$ ); ácido clorogênico:  $Y = 13074x + 1258.3$  ( $r = 0.9999$ ); ácido caféico:  $Y = 12745x + 1236.9$  ( $r = 0.9995$ ); ácido elágico:  $Y = 11873x + 1305.6$  ( $r = 0.9998$ ); rutina:  $Y = 13670x + 1271.9$  ( $r = 0.9999$ ), luteolina:  $Y = 12745x + 1308.5$  ( $r = 0.9991$ ) e quercetina:  $Y = 13165x + 1175.8$  ( $r = 0.9996$ ) (Tabela 1; Figura 1).

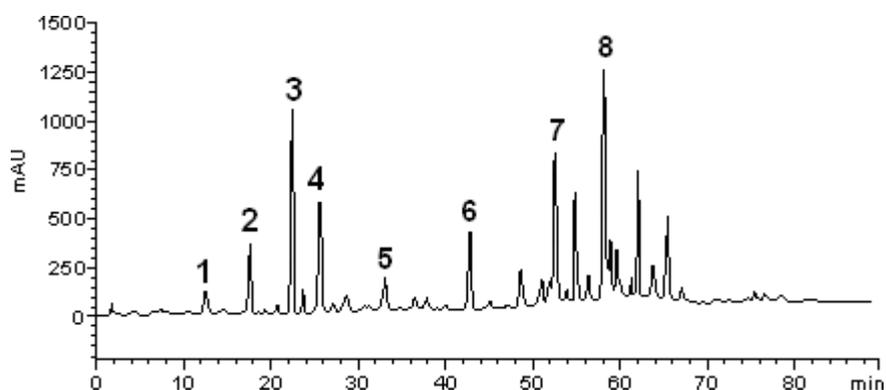


Figura 1: Representação do perfil de cromatografia líquida de alto desempenho do extrato hidroalcoólico das folhas de *Tocoyena formosa* (Cham. & Schlecht.) K. Schum. O ácido gálico (pico 1), catequina (2 pico), ácido clorogênico (3 pico), ácido caféico (4 pico), ácido elágico (pico 5), a rutina (pico 6), quercetina (pico 7) e luteolina (pico 8).

**Tabela 1: Impressão digital da composição química da CLAE do Extrato Hidroalcoólico das Folhas de *Tocoyena formosa* (Cham. & Schlecht.) K. Schum**

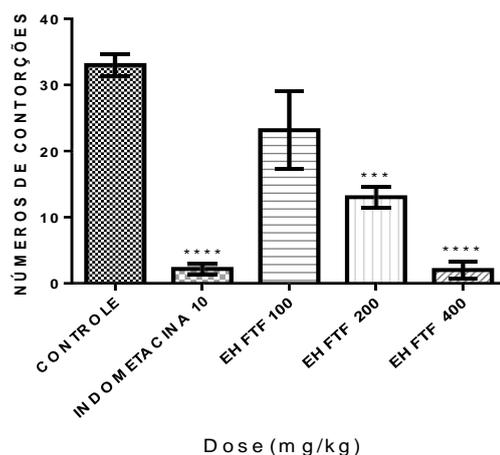
Compostos	Extrato Hidroalcoólico		LOD	LOQ
	mg/g	%	µg/mL	µg/mL
Ácido Gálico	3.49 ± 0.02 <sup>a</sup>	0.34	0.017	0.053
Catequina	9.21 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.92	0.025	0.083
Ácido Clorogênico	21.73 ± 0.01 <sup>c</sup>	2.17	0.009	0.034
Ácido Caféico	13.86 ± 0.03 <sup>d</sup>	1.38	0.018	0.057
Ácido Elágico	3.91 ± 0.01 <sup>a</sup>	0.39	0.023	0.079
Rutina	9.68 ± 0.01 <sup>b</sup>	0.96	0.011	0.036
Quercetina	17.54 ± 0.03 <sup>e</sup>	1.75	0.032	0.105
Luteolina	25.09 ± 0.02 <sup>f</sup>	2.50	0.026	0.091

Os resultados são expressos como média ± desvio padrão (DP) de três determinações. Médias seguidas por letras diferentes, diferenciadas pelo Teste de Tukey  $p < 0,05$ .

### **Avaliação da Atividade Antinociceptiva em Camundongos**

#### **Teste das Contorções Abdominais Induzidas por Ácido Acético**

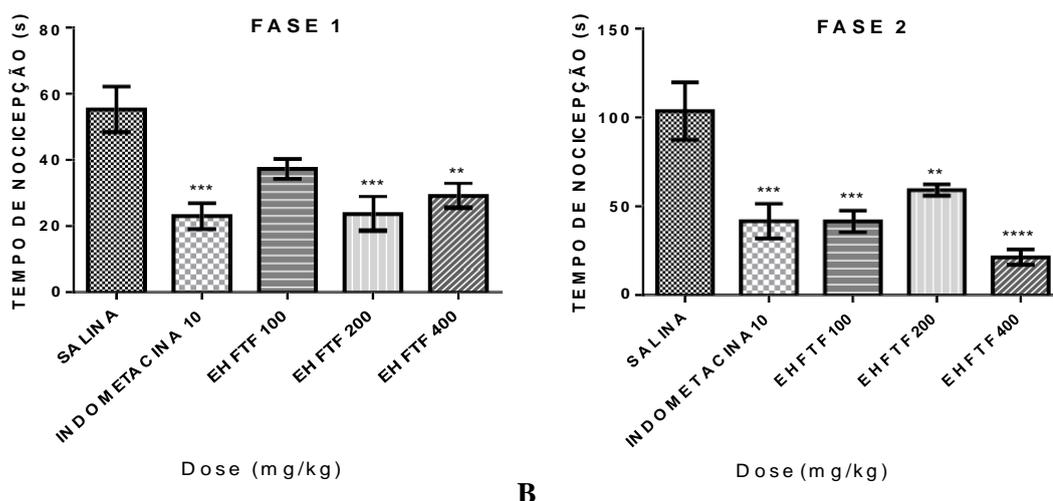
O EHFTF na dose 200 e 400mg/kg diminuiu de forma significativa as contorções abdominais, onde foram constatadas respectivamente reduções de 60,61% ( $13,0 \pm 1,549$  contorções) e 93,94% ( $2,0 \pm 1,291$  contorções) em relação ao grupo tratado com salina ( $33,0 \pm 1,633$  contorções). O controle positivo tratado com indometacina (10mg/kg, v.o.) promoveu inibição de 93,46% ( $2,167 \pm 0,7032$  contorções) (Figura 2). A dose inibitória 50%, obtida foi de 184,98 mg/kg, v.o. (Log Dose mg/kg, v.o.)



**Figura 2:** Efeito do extrato administrado por via oral sobre a nocicepção abdominal induzidas por ácido acético em camundongos (n=6). Cada coluna representa a média do Número de contorções abdominais. Dados expressos como Média  $\pm$  Erro Padrão da Média (EPM) \*\*\*\*p<0,0001, \*\*\*p<0,001, quando comparados com o controle negativo (Salina), ANOVA One-Way seguido do Teste de múltiplas comparações de Tukey.

### Teste da Formalina

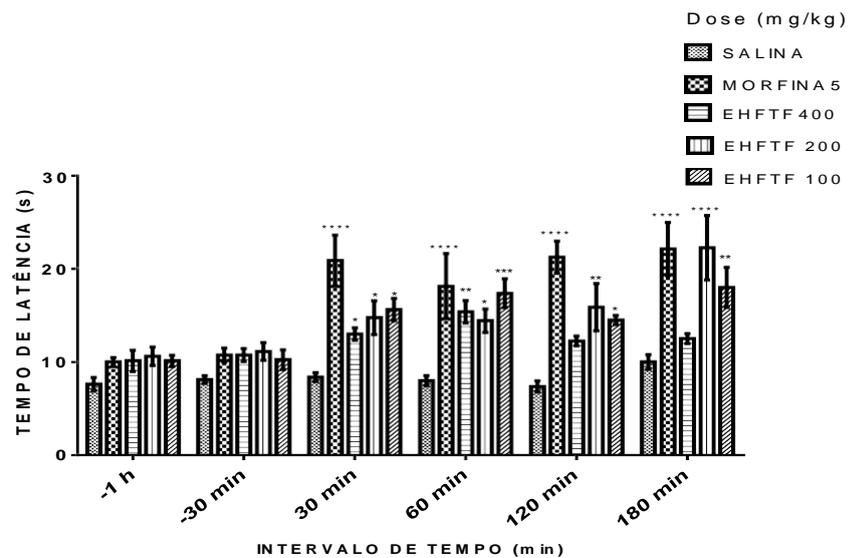
Os resultados mostram que o Extrato (200 e 400mg/kg) administrado por via oral produz uma redução significativa (Figura 3) do tempo de nocicepção na fase neurogênica (FASE 1, 0-5min) e na fase inflamatória (FASE 2, 15-30min). Os valores de inibição para a primeira fase nas respectivas doses de 100mg/kg, 200mg/kg e 400mg/kg foram 39,28%, 57,18% e 47,31%, já para a segunda fase os valores de inibição foram de 59,91% para a dose de 100mg/kg, 42,97% para 200mg/kg e 79,43% para 400mg/kg. A indometacina por sua vez, promoveu uma inibição de 58,40% na fase 1 e de 59,81% na fase 2.



**A** **B**  
**Figura 3:** Efeito do extrato administrado por via oral sobre a nociceção na pata induzida por formalina na Fase 1 (A) e na Fase 2 (B) em camundongos (n=6). A e B: Cada coluna representa a média do Tempo de lambida de pata. Dados expressos como Média  $\pm$  Erro Padrão da Média (EPM) \*\*\*\*p<0,0001, \*\*\*p<0,001, \*\*p<0,01, quando comparados com o controle negativo (Salina), ANOVA One-Way seguido do Teste de múltiplas comparações de Tukey.

### Teste placa quente

Os dados demonstram que o tratamento dos animais com EHFTF nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg, (Figura 4) aumentou de maneira significativa a latência de resposta dos animais ao estímulo térmico do teste após 30min da administração dos tratamentos (respectivamente,  $15,63 \pm 1,20s$ ;  $14,75 \pm 1,81s$ ;  $13,00 \pm 0,65s$ ), onde essa latência aumentou em decorrência do tempo até os 180 min ( $18,00 \pm 2,15s$ ;  $22,25 \pm 3,44$ ;  $12,50 \pm 0,53s$ ) com exceção apenas do grupo de 400mg/kg que regride nas últimas análises. Da mesma forma, os animais tratados com morfina (5mg/kg, i.p.) tiveram a reatividade reduzida significativamente a partir dos 30min ( $20,38 \pm 2,74s$ ) progredindo em relação ao tempo (180 min =  $22,13 \pm 2,83$ ).



**Figura 4:** Efeito do extrato administrado por via oral sobre a nociceção térmica na pata induzida por placa quente em camundongos (n=6). 1° basal: -1h (1h antes dos tratamentos), 2° basal: -30min (30min antes dos tratamentos). Cada coluna representa a média do Tempo de latência de pata em relação ao tempo. Dados expressos como Média ± Erro Padrão da Média (EPM) \*\*\*\*p<0,0001, \*\*\*p<0,001, \*\*p<0,01, \*p<0,05, quando comparados com o controle negativo (Salina), ANOVA Two-Way seguido do Teste de múltiplas comparações de Tukey.

### Teste de retirada de cauda

Os dados apresenta resultados significantes sobre o efeito do tratamento dos camundongos com EHFTF nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg (v.o.), no aumento da resposta ou tempo de reação (retirada da cauda) em relação ao tempo (Figura 4). A latência de retirada da cauda dos animais tratados na dose de 400mg/kg começou a partir de 30min ( $1,833 \pm 0,24s$ ) e em todas as doses (100, 200 e 400 mg/kg) a partir de 60min ( $1,01 \pm 0,21s$ ,  $1,60 \pm 0,28s$ ,  $1,683 \pm 0,2s$ , respectivamente) e teve um aumento significativo até 120 min depois ( $1,80 \pm 0,4s$ ,  $1,917 \pm 0,34$ ,  $2,70 \pm 0,26s$ , respectivamente). Além disso, os resultados indicam que as doses de 100 e 200 mg/kg não alteraram a latência de retirada da cauda dos animais submetidos ao teste nos primeiros 30min. A Morfina 5mg/kg (i.p.) manifesta seu efeito protetor máximo aos 120 min de sua ação inicial.

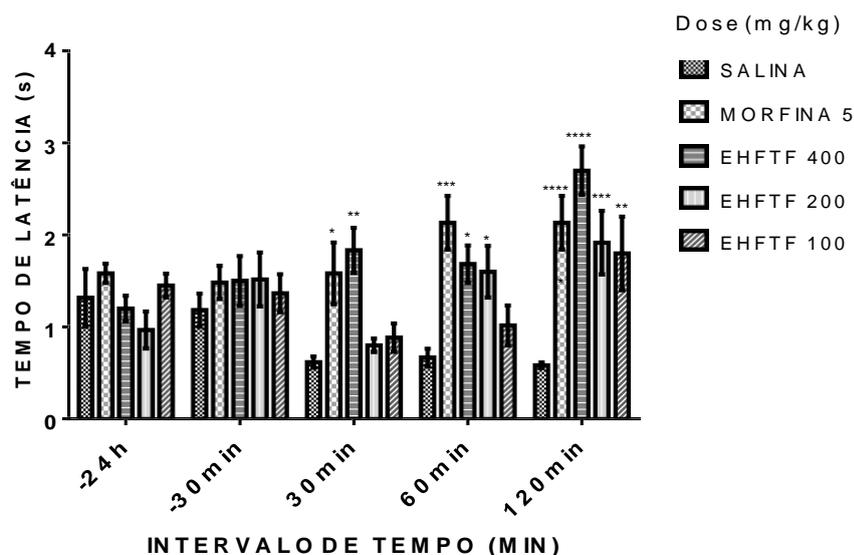
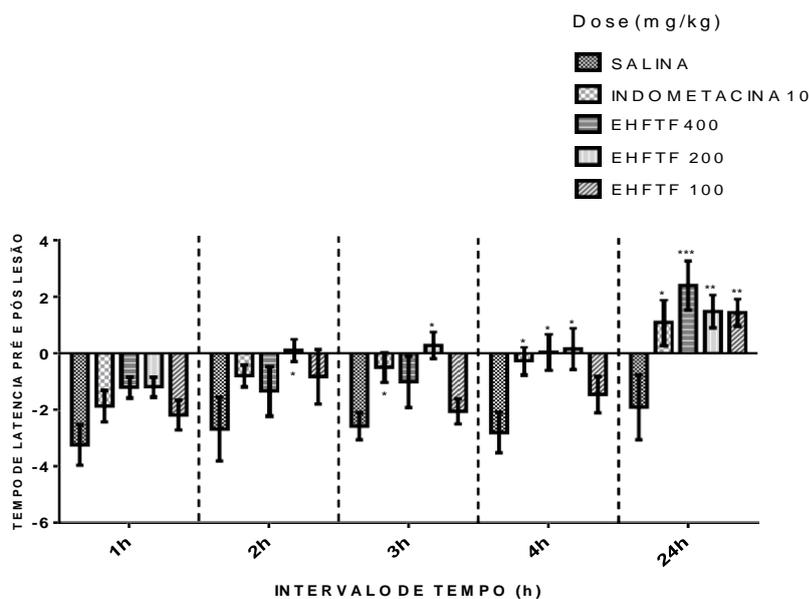


Figura 5: Efeito do extrato administrado por via oral sobre a nociceção térmica na calda induzida por analgesímetro térmico em camundongos (n=6). 1° basal: -24h (24h antes dos tratamentos), 2° basal: -30min (30min antes dos tratamentos). Cada coluna representa a média do Tempo de latência de calda em relação ao tempo. Dados expressos como Média ± Erro Padrão da Média (EPM) \*\*\*\*p<0,0001, \*\*\*p<0,001, \*\*p<0,01, \*p<0,05, quando comparados com o controle negativo (Salina), ANOVA Two-Way seguido do Teste de múltiplas comparações de Tukey.

### Teste de de nociceção mecânica por pressão - von frey

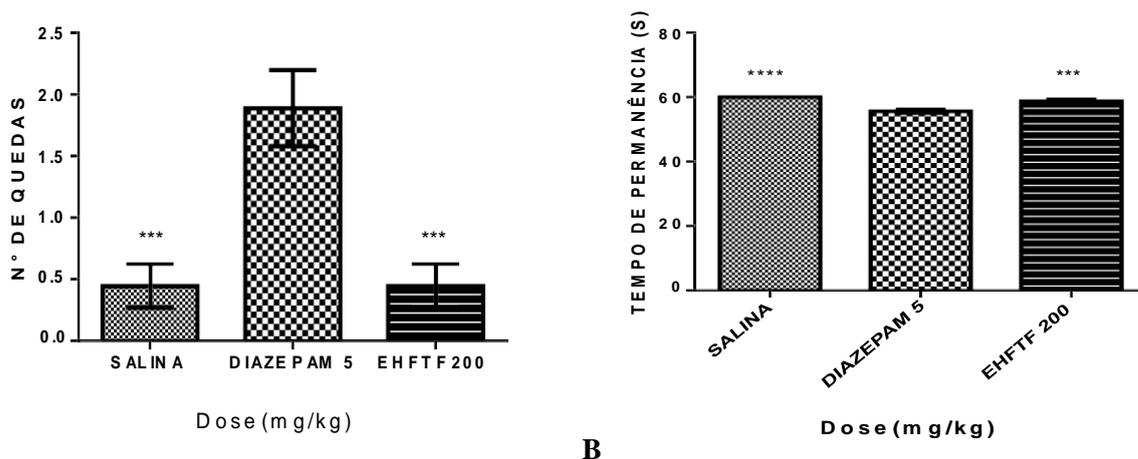
Os resultados demonstram que, quanto à hipernociceção mecânica, o EHFTF administrado por via oral apresenta ações antinociceptivas significativas. Essas ações do extrato e da indometacina durou até 24 h (Figura 6), entretanto o EHFTF na dose de 200mg/kg revelou um efeito antinociceptivo marcante desde a 2h após sua administração ( $0,09524 \pm 0,39$ ), o que foi diferente do obtido para a indometacina que apresenta resultados significantes apenas na 3° hora após sua administração ( $0,5048 \pm 0,52$ ), e para o EHFTF nas doses de 400mg/kg que tem seu efeito inicial na 4° h ( $0,02857 \pm 0,63$ ) e 100mg/kg com 24h após a administração ( $1,433 \pm 0,47$ ) em relação ao grupo controle (Salina), que revelou pouca ou nenhuma diminuição na resposta à pressão.



**Figura 6:** Efeito do extrato administrado por via oral sobre a hipersensibilidade mecânica na pata induzida por formalina em camundongos (n=6) e analisada por aparelho de Von Frey. Cada coluna representa a média do Tempo de latência de pata em relação ao tempo. Dados expressos como Média  $\pm$  Erro Padrão da Média (EPM) da média da diferença da pata lesionada com a mesma em estado basal ( $\Delta$ ), \*\*\*p<0,001, \*\*p<0,01, \*p<0,05, quando comparados com o controle negativo (Salina), ANOVA Two-Way seguido do Teste de Tukey.

### Teste de *Rota Rod*

O tratamento de camundongos com EHFTF, 60 min antes, não causou alteração significativa no desempenho e coordenação motora em comparação com o grupo controle negativo (Salina), quando avaliado o tempo de permanência na barra rotatória (Figura 7B) e o número de quedas do aparelho de Rota-Rod (Figura 7A).



**Figura 7:** Efeito do extrato administrado por via oral sobre a Avaliação do desempenho motor em camundongos (n=6), por meio do teste de *Rota Rod*. **A:** Cada coluna representa a média do número de quedas em relação aos grupos tratados. **B:** Cada coluna representa a média do Tempo de permanência em relação aos grupos tratados. Dados expressos como Média ± Erro Padrão da Média (EPM), \*\*\*\*p<0,0001, \*\*\*p<0,001, quando comparados com o controle positivo (Diazepam). **A e B:** ANOVA One-Way seguido do Teste de múltiplas comparações de Tukey.

### Possíveis Mecanismos de Ação do Extrato Hidroetanólico das Folhas de *Tocoyena formosa* (Cham. & Schlecht.) K. Schum na Antinociceção.

#### Participação do sistema Opióide

Os dados (Figura 8) mostram que o pré-tratamento dos camundongos com o EHFTF apresenta uma significativa antinociceção, mas quando tratados com naloxona previamente a administração do EHFTF houve uma reversão a antinociceção causada pelo mesmo na primeira fase do Teste de Formalina. A administração de naloxona produziu uma inibição significativa da antinociceção induzida por morfina quando avaliado na primeira fase na dor induzida por formalina.

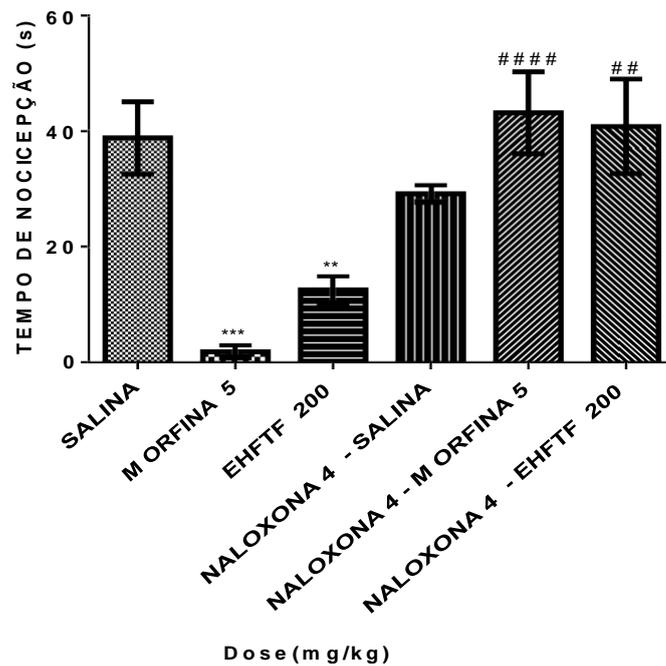


Figura 8: Efeito do extrato administrado por via oral sobre o sistema opióide na nocicepção de pata induzida por formalina em camundongos (n=8). Cada coluna representa a média do Tempo de nocicepção em relação aos grupos tratados. Dados expressos como Média  $\pm$  Erro Padrão da Média (EPM), \*\*\* $p < 0,001$ , \*\* $p < 0,01$ , quando comparados com o controle negativo (Salina); #### $p < 0,0001$ , ## $p < 0,01$ , quando comparados antagonista+agonista vs. Agonista. ANOVA One-Way seguido do Teste de múltiplas comparações de Tukey.

### Participação do Sistema $\alpha 1$ -Adrenérgico

O Tratamento dos camundongos com prazosina 15 min antes, inverteu significativamente a antinocicepção promovida pela fenilefrina, o mesmo tratamento com prazosina não antagonizou o efeito antinociceptivo originado pelo o EHFTF na primeira fase do teste de formalina (Figura 9).

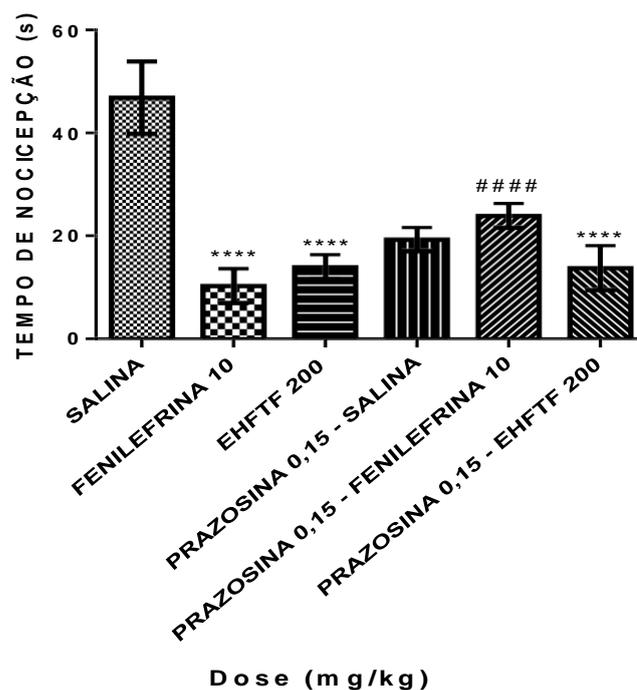
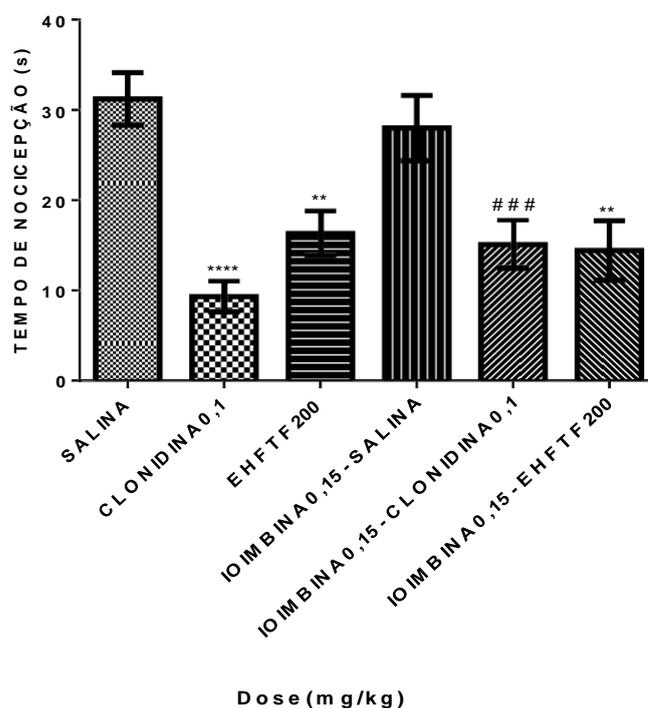


Figura 9: Efeito do extrato administrado por via oral sobre o sistema  $\alpha_1$ -adrenérgico na nocicepção de pata induzida por formalina em camundongos ( $n=8$ ). Cada coluna representa a média do Tempo de nocicepção em relação aos grupos tratados. Dados expressos como Média  $\pm$  Erro Padrão da Média (EPM), \*\*\*\* $p<0,0001$ , quando comparados com o controle negativo (Salina); #### $p<0,0001$ , quando comparados antagonista+agonista vs. Agonista. ANOVA One-Way seguido do Teste de múltiplas comparações de Tukey.

### Participação do Sistema $\alpha_2$ -Adrenérgico

A administração aos camundongos de ioimbina 15 min antes reverteu significativamente a antinocicepção promovida pela clonidina, Em contraste, a ioimbina não modificou o efeito antinociceptivo causado pelo o EHFTF na primeira fase do teste de formalina (Figura 10).



**Figura 10:** Efeito do extrato administrado por via oral sobre o sistema  $\alpha$ 2-adrenérgico na nociceção de pata induzida por formalina em camundongos (n=8). Cada coluna representa a média do Tempo de nociceção em relação aos grupos tratados. Dados expressos como Média  $\pm$  Erro Padrão da Média (EPM), \*\*\*\*p<0,0001, \*\*p<0,01, quando comparados com o controle negativo (Salina); ###p<0,001, quando comparados antagonista + agonista vs. Agonista. ANOVA One-Way seguido do Teste de múltiplas comparações de Tukey.

### Participação do Sistema Colinérgico

O pré-tratamento dos camundongos com atropina previamente a administração do EHFTF não alterou significativamente o efeito antinociceptivo do mesmo, já a administração de atropina produziu uma inibição significativa da antinociceção induzida por acetilcolina quando avaliado na primeira fase do Teste de Formalina (Figura 11).

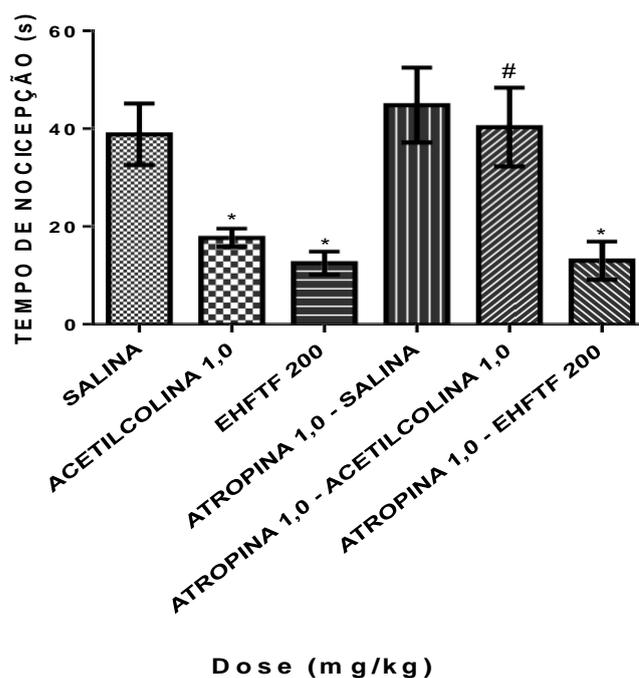
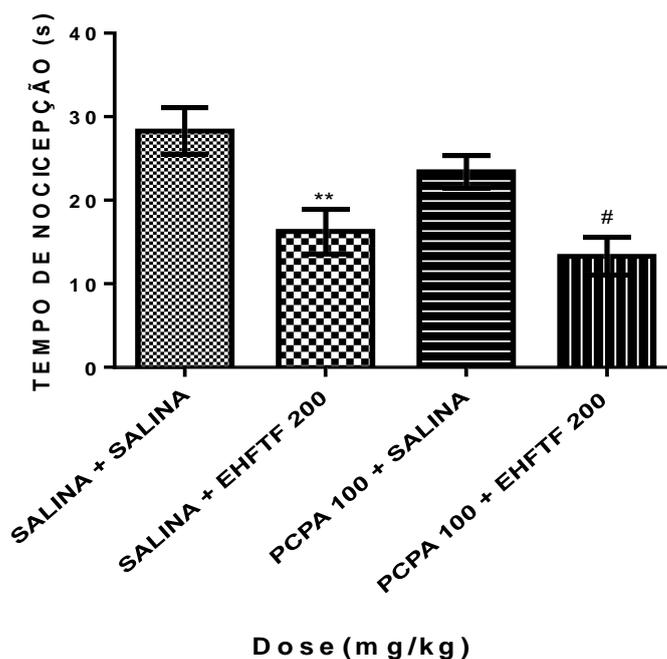


Figura 11: Efeito do extrato administrado por via oral sobre o sistema colinérgico na nociceção de pata induzida por formalina em camundongos (n=8). Cada coluna representa a média do Tempo de nociceção em relação aos grupos tratados. Dados expressos como Média  $\pm$  Erro Padrão da Média (EPM), \* $p < 0,05$ , quando comparados com o controle negativo (Salina); # $p < 0,05$ , quando comparados antagonista+agonista vs. Agonista. ANOVA One-Way seguido do Teste de múltiplas comparações de Tukey.

### Participação do Sistema Serotoninérgico

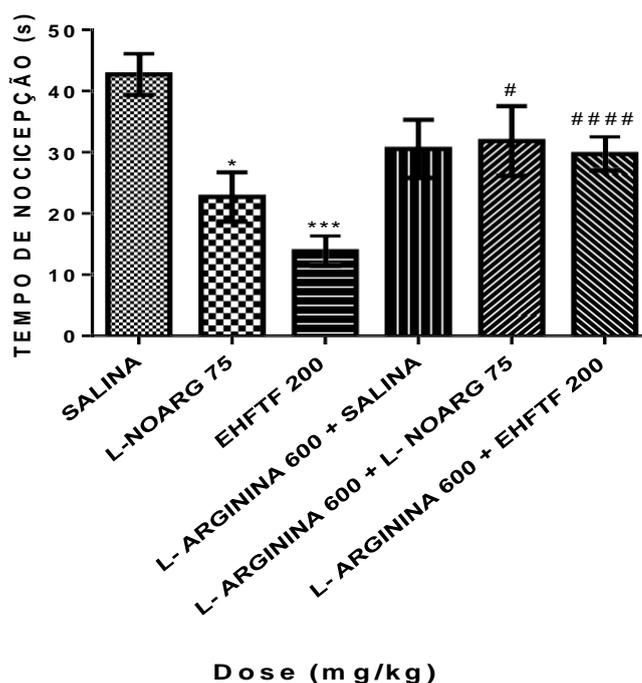
A Figura 12 mostra que o pré-tratamento de animais com Salina (1X por dia/4 dias consecutivos) não alterou a antinociceção causada pelo o EHFTF, e que o pré-tratamento dos animais com PCPA (1X por dia/4 dias) não impediu significativamente a antinociceção causado pelo EHFTF, quando avaliado na primeira fase da dor induzida por formalina.



**Figura 12:** Efeito do extrato administrado por via oral sobre o sistema Serotoninérgico na nociceção de pata induzida por formalina em camundongos (n=8). Cada coluna representa a média do Tempo de nociceção em relação aos grupos tratados. Dados expressos como Média  $\pm$  Erro Padrão da Média (EPM), \*\* $p < 0,01$ , quando comparados com o controle negativo (Salina+Salina); # $p < 0,05$ , quando comparados com o controle negativo (PCPA+Salina). ANOVA One-Way seguido do Teste de múltiplas comparações de Tukey.

### Participação da via L-arginina/Óxido Nítrico/GMPc

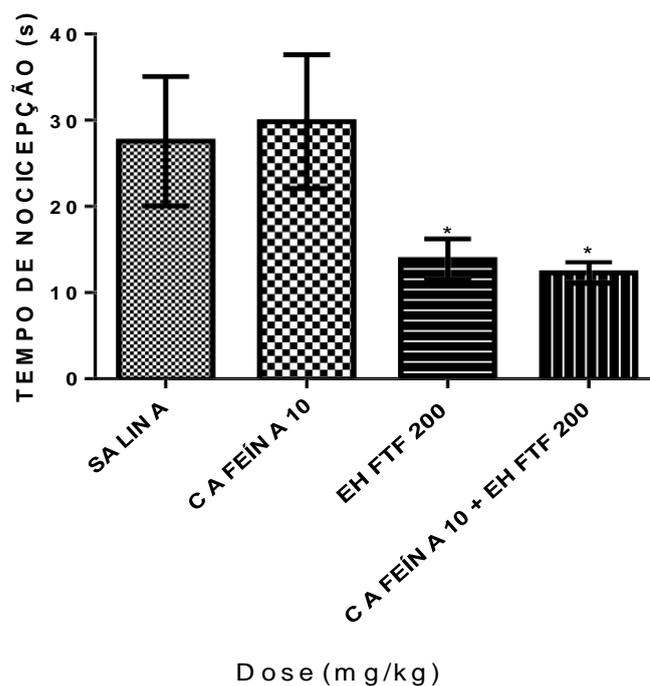
O tratamento dos animais com L-arginina 15 minutos antes, inverteu significativamente o efeito antinociceptivo causado por L-NOARG, mas também alterou significativamente a ação antinociceptiva provocada pelo o EHFTF quando analisado contra a primeira fase do teste de formalina (Figura 13)



**Figura 13:** Efeito do extrato administrado por via oral sobre a via L-arginina - Óxido Nítrico na nocicepção de pata induzida por formalina em camundongos (n=8). Cada coluna representa a média do Tempo de nocicepção em relação aos grupos tratados. Dados expressos como Média  $\pm$  Erro Padrão da Média (EPM), \* $p < 0,05$ , \*\*\* $p < 0,001$ , quando comparados com o controle negativo (Salina); #### $p < 0,0001$ , quando comparados Agonista+agonista vs. Agonista, # $p < 0,05$ , quando comparados Agonista+antagonista vs. Antagonista. ANOVA One-Way seguido do Teste de múltiplas comparações de Tukey.

### Participação do sistema Adenosinérgico

O tratamento dos animais com cafeína 15 minutos antes, não inverteu significativamente o efeito antinociceptivo causado pelo o EHFTF quando analisado na primeira fase do teste de formalina (Figura 14)



**Figura 14:** Efeito do extrato administrado por via oral sobre o sistema Adenosinérgico na nociceção de pata induzida por formalina em camundongos (n=8). Cada coluna representa a média do Tempo de nociceção em relação aos grupos tratados. Dados expressos como Média  $\pm$  Erro Padrão da Média (EPM), \* $p < 0,05$ , quando comparados com o controle negativo (Salina). ANOVA One-Way seguido do Teste de múltiplas comparações de Tukey.

### Participação do sistema Dopaminérgico

O tratamento dos animais com Haloperidol previamente a administração do EHFTF não modificou o efeito antinociceptivo causado pelo o EHFTF quando analisado contra a primeira fase do teste de formalina (Figura 15)

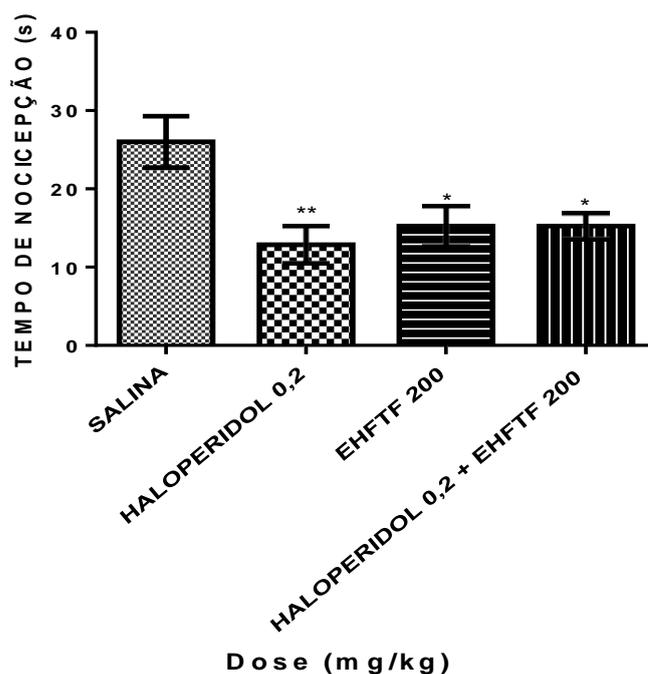
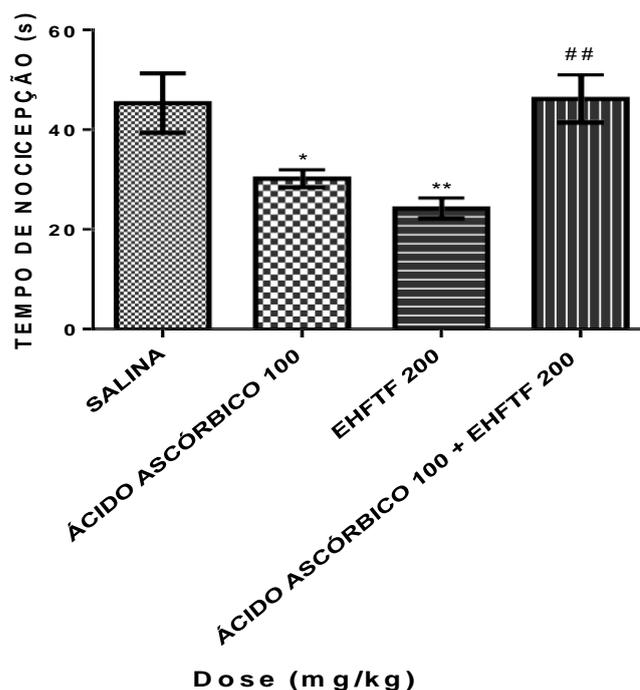


Figura 15: Efeito do extrato administrado por via oral sobre o sistema Dopaminérgico na nocicepção de pata induzida por formalina em camundongos (n=8). Cada coluna representa a média do Tempo de nocicepção em relação aos grupos tratados. Dados expressos como Média  $\pm$  Erro Padrão da Média (EPM), \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , quando comparados com o controle negativo (Salina). ANOVA One-Way seguido do Teste de múltiplas comparações de Tukey.

### Participação do sistema Glutamatérgico

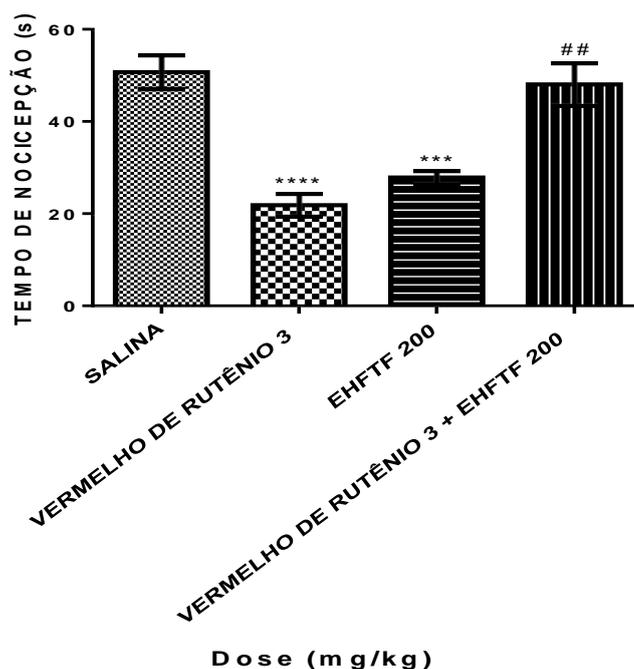
Os dados demonstram que o tratamento dos animais com o EHFTF exibe um significativo efeito antinociceptivo no processo de nocicepção induzida por glutamato, porém quando tratados com Ácido Ascórbico 15 min antes da administração do EHFTF, ocorre uma inversão dessa antinocicepção (Figura 16).



**Figura 16:** Efeito do extrato administrado por via oral sobre o sistema Glutamatérgico na nociceção de pata induzida por glutamato em camundongos (n=8). Cada coluna representa a média do Tempo de nociceção em relação aos grupos tratados. Dados expressos como Média ± Erro Padrão da Média (EPM), \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , quando comparados com o controle negativo (Salina). ## $p < 0,01$ , quando comparados Antagonista + Agonista vs. Agonista (controle positivo). ANOVA One-Way seguido do Teste de múltiplas comparações de Tukey.

### Participação do sistema Vanilóide (TRPV-1)

Os dados (Figura 17) mostram que o pré-tratamento dos camundongos com o EHFTF apresenta um significativo efeito antinociceptivo na nociceção induzida por capsaicina, mas quando tratados com Vermelho de Rutênio previamente a administração do EHFTF, ocorre uma reversão dessa antinociceção.



**Figura 17:** Efeito do extrato administrado por via oral sobre o sistema Vanilóide (TRPV-1) na nocicepção de pata induzida por capsaicina em camundongos (n=8). Cada coluna representa a média do Tempo de nocicepção em relação aos grupos tratados. Dados expressos como Média  $\pm$  Erro Padrão da Média (EPM), \*\*\*\* $p < 0,0001$ , \*\*\* $p < 0,001$ , quando comparados com o controle negativo (Salina). ## $p < 0,01$ , quando comparados com o controle positivo. ANOVA One-Way seguido do Teste de múltiplas comparações de Tukey.

## DISCUSSÃO

Esse estudo exhibe pela primeira vez, a ação antinociceptiva do extrato hidroetanólico das folhas de *Tocoyena formosa* (Cham. & Schlecht.) K. Schum (EHFTF) e sua influência em diferentes vias nociceptivas.

Quando administrado por via oral este promoveu um efeito antinociceptivo significativo em teste químico experimental de nocicepção por ácido acético em camundongos, com uma possível ação central (LAPA; et al., 2008). A administração do mesmo também gerou uma redução significativa contra as duas fases (dor neurogênica e inflamatória) na indução de nocicepção por formalina intraplantar, sugerindo que o EHFTF possui um efeito analgésico neurogênico e inflamatório assim como central e periférico (OKPO; FATOKUN; ADEYEMI, 2001), respectivamente.

O EHFTF também foi significativamente eficaz na produção da antinocicepção em relação aos estímulos físicos de nocicepção térmica: no teste de Tail Flick e Hot Plate, a resposta nocifensiva reflexa de retirada da fonte de calor foi prolongada tendo efeito equivalente à morfina. Nesse sentido, o EHFTF demonstrou um efeito analgésico de ação

rápida e prolongada com predominância de atuação a nível medular e central, pois ambos os testes possuem mediação a esse nível (LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001)

Em relação à hipernocicepção mecânica, o Extrato apresentou significativa eficácia antinociceptiva, no qual esta evidência baseia-se na observação das latências da sensibilidade tecidual em relação à linha de base em todos os pontos de tempo testados. Essa ação confirma o efeito do extrato a nível medular e central, pois a hipernocicepção avaliada pelo teste de Von Frey é realizado a nível cutâneo, onde os dermatômos sensoriais, que são territórios inervados por cada nervo espinhal, são responsáveis pela sensibilidade e apresentam substancial sobreposição na região da pele (PURVES, et al. 2005), mas com administração do EHFTF esta hipersensibilidade pode estar sendo revertida com sua ação a nível medular.

Os resultados demonstram que o sistema Opióide está envolvido na antinocicepção produzida pelo EHFTF por meio da modulação deste sobre os receptores opióides. Essa ação já era esperada pelo o extrato, pois em testes anteriores o mesmo revelou resultados equivalentes à morfina e apresentou uma ação antinociceptiva de integração central (nos Testes de Contorções, Formalina, Hot Plate, Tail Flick) (LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001; LAPA; et al., 2008), o que é característica do mecanismo de ação dos analgésicos opióides (SCHUMACHER; BASBAUM; WAY, 2012)

A via L-arginina/Óxido nítrico/GMPc está relacionada também à antinocicepção ocasionada pelo extrato. Esta afirmação deriva do fato que, o substrato da síntese de óxido nítrico (NO), a L-arginina, inverteu significativamente a antinocicepção promovida pelo o EHFTF; dando fortes indícios que o mesmo promove inibição ou redução da síntese e/ou liberação de NO para promover a inibição da nocicepção.

O NO, por sua vez, modula o mecanismo de dor também por meio de neurônios na medula espinhal através da ativação de receptores de NMDA (MELLER; GEBHART, 1993). Como o extrato mostrou inibir essa via, isso revela que sua ação ocorre ou inibindo diretamente o NO suficiente para evitar a ativação nociceptiva da via glutamatérgica ou age inibindo diretamente a via glutamatérgica. Ou seja, o extrato pode atuar em ambas as vias, pois o mesmo também reduziu de forma significativa à resposta nociceptiva causada pelo glutamato (via glutamatérgica), ou pode estar agindo em uma única via e uma pode estar inibindo a outra, já que as duas tem ação conjunta e interligada na transmissão aferente nociceptiva como mostra os estudos de Carvalho e Lemônica (1998). Resultados semelhantes também foram observados no trabalho de Beirith et al. (2002) pois ele mostra que a resposta nociceptiva provocada pelo glutamato esta relacionado com sítios espinhais e supra-espinhais e sua ação é mediada pela liberação de NO ou outra via regulada por um nitro derivado.

O estudo da via glutamatérgica mostra que Extrato pode atuar por interação direta por antagonismo dos receptores de NMDA, impedindo a transdução da dor. Isso explica o poder antinociceptivo do mesmo no modelo de indução por ácido acético, pois este ácido é responsável por estimular o aumento da liberação de glutamato no fluido cerebrospinal (FENG et al., 2003). Além disso, acredita-se que haja uma facilitação produzida por NMDA nos reflexos térmicos agudos (MELLER; GEBHART, 1993), o que pode explicar a atividade antinociceptiva do EHFTF nos testes de Tail Flick e Hot Plate.

Os resultados fornecem dados sólidos também a cerca do envolvimento do sistema Vanilóide na antinocicepção causado pelo extrato, esse fato é evidenciado pelo o Vermelho de rutênio que numa dose conhecida por promover antinocicepção e antagonizar a ação da capsaicina no receptor TRPV-1 (SANTOS; CALIXTO, 1992) reduziu eficazmente as respostas antinociceptivas provocada pelo o extrato de forma consistente.

A inibição da via vanilóide pelo o EHFTF confirma o que ocorreu no modelo de indução por ácido acético, pois esse ácido é responsável pela ativação direta de canais catiônicos não-seletivos como o TRPV1 (JULIUS; BASBAUM, 2001). Já era esperado que o extrato tivesse ação por essa via, pois esses receptores são ativados por calor a uma temperatura a partir de 43°C (TOMINAGA; et al., 1998), e o extrato apresentou atividade antinociceptiva nos testes de Tail Flick e Hot Plate em que os camundongos são submetidos a temperatura em torno de 52-54°C.

A ativação de varias vias supracitadas pode ser devido ao fato do extrato agir a nível de SNC o que leva sua ação se propagar por outros sistemas que atuam centralmente e que podem ou não estarem exercendo esse efeito antinociceptivo de forma sinérgica, além disso, o EHFTF é um extrato bruto, no qual possui vários tipos de compostos bioativos, em comparação com as drogas de referência, por isso faz-se necessário estudos com os constituintes isolados do extrato.

A luteolina, por exemplo, um flavanóide que é um dos principais compostos do extrato, pode estar envolvido na ação antinociceptiva observada pelo o EHFTF, já que essa substancia tem ação farmacológica antinociceptiva comprovada conforme os estudos de Büyükokuroglu; et al. (2008), podendo atuar na antinocicepção por modular a expressão da óxido nítrico sintase induzível (NOS induzível) (LIANG; et al., 1999) o que pode levar a redução ou inibição do óxido nítrico.

Além disso, a luteolina pode inibir diretamente a proteína quinase C (PKC) (HEITZ et al., 2000) e/ou podem inibir o IP<sub>3</sub>-quinase (Fosfoinositidio 3-quinase) com subsequente inibição da PKC (AGULLO et al., 1997), essa ação também pode explicar o mecanismo de

antinociceção do EHFTF, já que a PKC está envolvida em múltiplas vias de transmissão aferente da dor. A luteolina também mostrou melhorar a hipernociceção pelo menos em parte, através da ativação de receptores GABA A (HARA et al., 2014).

O ácido clorogênico, um composto fenólico que é um dos principais compostos do extrato também demonstrou ter atividade antinociceptiva conforme os estudos de Santos et al. (2006). Da mesma forma, o ácido cafeico e seus derivados revelaram ter ação antinociceptiva (SANTOS et al., 2005) por promover inibição da atividade da proteína quinase C e A (PKC e PKA) (NARDINI et al., 2001), podendo seu efeito antinociceptivo também está relacionado à LOX/COX e/ou receptores Opióides (GAMARO, et al., 2011; SHIN et al. 2004)

A quercetina também apresentou efeitos antinociceptivos significativos (SANTOS, 2000) e demonstrou agir possivelmente pela modulação das vias adrenérgicas (KAUR et al., 2005), ou por inibição de COX e de NO (MUTOH et al., 2000) ou por inibir significativamente a atividade de IP<sub>3</sub>-quinase com conseqüente inibição da PKC (AGULLO et al., 1997), o que por sua vez, promove efeito na redução da nociceção já que esses fatores (PG's, NO e PKC) estão implicados no mecanismo de transmissão aferente da dor de algumas vias.

Diante dos dados literários apresentados acima, a ação dos principais constituintes presentes no EHFTF demonstra estarem envolvidos nos mecanismos de ação antinociceptivo desse estudo.

Assim, muitos outros estudos utilizando outros modelos nociceptivos são necessárias para conclusão final sobre os mecanismos de antinociceção de EHFTF e de seus principais constituintes, no qual permitirá compreender ações subjacentes aos efeitos obtidos nesse estudo.

## CONCLUSÃO

Conclui-se, portanto, que o Extrato Hidroalcoólico das Folhas de *Tocoyena formosa* (*Cham. E Schlecht.*) *K. Schum.* possui atividades antinociceptiva com caráter predominante a nível central/medular, envolvendo como mecanismo de ação a ativação dos sistemas opióide, glutamatérgico, L-Arginina/NO e Vanilóide (TRPV1) sendo que para essa atividade são atribuídos à possível ação dos flavonoides, em especial a luteolina, presente no extrato. Ao todo, o presente estudo indica claramente que as aplicações tradicionais e farmacológicas do conhecimento medicinal desta espécie pode ser de potencial interesse no desenvolvimento de novos agentes clinicamente relevantes para o tratamento da dor aguda e sub-crônica.

## REFERÊNCIAS

ABACIOGLU N, OZMEN R, CAKICI I, TUNÇTAN B, KANZIK I. Role of L-arginine/nitric oxide pathway in the antinociceptive activities of morphine and mepyramine in mice. *Arzneimittel forschung* 2001;51:977–83.

AGULLO, G.; GAMET-PAYRASTRE, L.; MANENTI, S.; VIALA, C.; RÉMÉSY, C.; CHAP, H.; PAYRASTRE, B. Relationship between flavonoid structure and inhibition of phosphatidylinositol-3-kinase: a comparison with tyrosine kinase and protein kinase C inhibition. *Biochem Pharmacol*, 53: 1649-1657, 1997.

ALVES-NETO O; COSTA CMC; TEIXEIRA MJ. **Dor**: Princípios e Prática. Porto Alegre: Artmed, 2009. p. 265-279.

BÜYÜKOKUROGLU, M. E. et al. Antiinflammatory and Antinociceptive Properties of Luteolin Diglucuronide and Apigenin Diglucuronide Obtained from *Perilla nankinensis*. *Asian Journal of Chemistry* vol. 20, n. 3. Pp- 1900-1906. 2008.

BEIRITH A, SANTOS ARS CALIXTO JB. Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. *Brain Res* 2002b;924:219–28.

BEIRITH A, SANTOS ARS, RODRIGUES ALS, CRECZYNSKI-PASA TP and CALIXTO JB. Spinal and supraspinal antinociceptive action of dipyrone on formalin, capsaicin and glutamate tests. Study of the mechanism of action. **Eur J Pharmacol** 345:233–245, 1998.

BOLZANI, V. S., IZUMISAWA, C. M., YOUNG, M. C M., et al. Iridoids From *Tocoyena Formosa*. *Phytochemistry*, Vol. 46, No. 2. pp. 305–310, 1997

CARVALHO, W.; LEMÔNICA, A. L. Central Mechanisms Of Transmission And Pain Modulation. A Therapeutic Review. *Rev. Bras. Anesthesiol.* vol. 48. n. 3. Pp: 221-240. 1998.

COELHO, V. P. M., AGRA, M. F., BARBOSA, M. R. V. Estudo farmacobotânico das folhas de *Tocoyena formosa* (Cham. & Schltdl.) K.Schum. (Rubiaceae). *Rev. Bras. Farmacogn. Braz J. Pharmacogn.* 16(2):abr/jun. 2006

D'AMOUR, F.E.; SMITH, D.L. A method for determining loss of pain sensation. *J Pharmacol. Exp. Ther.* 72; 74-79, 1941.

DAVID, J. M.; SANTOS, F. A.; GUEDES, M. L. S.; DAVID, J. P. Flavonóide e triterpenos de *Stigmaphyllon paralias*. *Quím. Nova* [online]. 2003, vol.26, n.4, pp. 484-487.

DRAY, A., Mechanism of action of capsaicin-like molecules on sensory neurons. *Life Sciences*, vol. 51, no. 23, pp. 1759–1765, 1992.

DUNHAM, N.W. MIYA, T.S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *Journal of the American Pharmacists Association*, v. 46, p. 208-209, 1957.

EMIN J.A.S, OLIVEIRA A.B., LAPA A.J. Anti-inflammatory activity of hesperidin. *J Pharm Pharmacol* 46:118-122. 1994.

FENG Y, CUI M, WILLIS W. Gabapentin markedly reduces acetic acid-induced visceral nociception. *Anesthesiology* 2003;98:729–33.

FILIPINI, C. B.; PAIXÃO, D. R., ÁVILA, M. A. P., et. al. Avaliação da atividade protetora gástrica do extrato hidroalcoólico da semente de girassol em ratas. *Rev Bras Clin Med. São Paulo*, 2012 mar-abr;10 (2):112-5.

GAMARO, G. D. et al. Effect of Rosmarinic and Caffeic Acids on Inflammatory and Nociception Process in Rats. *International Scholarly Research Network Pharmacology*. 2011.

HAMERSKI, L.; et. al. Saponinas triterpênicas de *Tocoyena brasiliensis* Mart. (Rubiaceae). *Quím. Nova* [online]. 2005, vol.28, n.4, pp. 601-604. ISSN 0100-4042. 1590/S0100-40422005000400009.

HARA, K. et al. Effects of intrathecal and intracerebroventricular administration of luteolin in a rat neuropathic pain model. Pharmacology Biochemistry and Behavior. Pp-125. 10/ 2014;

HEITZ, A.; CARNAT, A.; FRAISSE, D.; CARNAT, A.P.; LAMAISON, J.L. Leotelin 3'-glucoronide, the major flavonoid from *Melissa officinalis* subsp. *officinalis*. *Fitoterapia*, 71: 201-202, 2000.

HUNSKAAR, S., FASMER, O. B., HOLE, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. **J. Neurosci. Meth.** v. 14, p. 69-76. 1985

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*. 413. 13. September 2001

KATZUNG B. G.; MASTERS S. B.; TREVOR A. J. Basic e clinical pharmacology. 12 ed. Mc Graw Hill Lange, 2012.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; DE BEER, E.J. Acetic acid for analgesic screening. **Federation Proceedings**, v.18, p.412, 1959.

KAUR, R. SINGH, D. CHOPRA, K. Participation of alfa2 receptors in the antinociceptive activity of quercetin. *J. Med. Food*. v. 8. n. 4. Pp-: 529-32. 2005.

LAPA, A. J. et al. Métodos de Avaliação da Atividade Farmacológica de Plantas Medicinais. São Paulo, Setor de Produtos Naturais, Departamento de Farmamcologia, UNIFESP/EPM, 2008.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S.W. Animal models of nociception. **Pharmacological Reviews**, v.53, p.597-652, 2001.

LIANG, Y. C., HUANG, Y. T., TSAI, S. H., LIN-SHIAU, S. Y., C. F. CHEN, and J. K. Lin. Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages. *Carcinogenesis*, vol. 20, no. 10, pp. 1945–1952, 1999.

MARTINOV, T. et al. Measuring Changes in Tactile Sensitivity in the Hind Paw of Mice Using an Electronic von Frey Apparatus. **J. Vis. Exp.** v. 82. e51212, doi:10.3791/51212 (2013).

MELLER, S. T.; GEBHART, G. F., Nitric oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord, *Pain*, vol. 52, no. 2, pp. 127–136, 1993.

MUTOH, M. et al. Suppression by flavonoids of cyclooxygenase-2 promoter-dependent transcriptional activity in colon cancer cells: structure-activity relationship. *Jpn. J. Cancer Res.*, v. 91, p. 686-91, 2000

OKPO SO, FATOKUN F, ADEYEMI OO. Analgesic and anti-inflammatory activity of *Crinum glaucum* aqueous extract. *J Ethnopharmacol* 78: 207-211, 2001.

PURVES, D., AUGUSTINE, G.J., FITZPATRICK, D, et al. Neurociências . Unidade II, Capítulo 9. 2 ed. Artmed, 2005.

SANTOS ARS, GADOTTI VM, OLIVEIRA G, TIBOLA D, PASZUK AF, Neto A, et al. Mechanisms involved in the antinociception caused by agmatine in mice. *Neuropharmacology* 2005;48:1021–34.

SANTOS ARS, MIGUEL OG, YUNES OG, CALIXTO JB. Antinociceptive properties of the new alkaloid, cis-8, 10-di-Npropyllobelidiol hydrochloride dihydrate isolated from *Siphocampylus verticillatus*: evidence for the mechanism of action. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;289:417–26.

SANTOS, A. R.; CALIXTO, J. B. Further evidence for the involvement of tachykinin receptor subtypes in formalin and capsaicin models of pain in mice. **Neuropeptides**, v. 31, n. 4, p. 381-9, 1997

SANTOS, A.R.S.; CALIXTO, J.B. Ruthenium red and capsazepine antinociceptive effect in formalin and capsaicin models of pain in mice. **Neurosci. Lett.** 235:73-76, 1992.

SANTOS, A.R.S.; FILHO, V.C.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. Analysis of the mechanisms underlying the antinociceptive effect of the extracts of plants from the genus *Phyllanthus*. **Gen. Pharmacol.** 26: 1499-1506, 1995.

SANTOS, M. D. et al. Evaluation of the anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the natural polyphenol chlorogenic acid. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 29. n. 11, p.2236-2240, 2006.

SANTOS, M. D.; GOBBO-NETO, L. ALBARELLA, L. SOUZA, G. E. P. LPES, N. P. Analgesic activity of di-caffeoylquinic acids from roots of *Lachnophora ericoides* (Arnica da Serra). **Journal of ethnopharmacology**. v. 96. Pp- 545-549. 2005.

SCHAIBLE, H-G., EBERSBERGER, A., NATURA, G. Update on peripheral mechanisms of pain: beyond prostaglandins and cytokines. **Arthritis Research and Therapy**, v. 13, p. 210, 2011.

SCHUMACHER, M. A.; BASBAUM, A. I.; WAY, W. L. Opioid Analgesics & Antagonists. In: KATZUNG B. G.; MASTERS S. B.; TREVOR A. J. Basic e clinical pharmacology. 12 et. Mc Graw Hill Lange, 2012.

SHIN, K. M., KIM, I. T., PARK, Y. M. et al. Anti-inflammatory effect of caffeic acid methyl ester and its mode of action through the inhibition of prostaglandin E, nitric oxide and tumor necrosis factor- $\alpha$  production. *Biochemical Pharmacology*, vol. 68, no. 12, pp. 2327–2336, 2004.

SILVA, A.R.H.; MOREIRA, L.R.; BRUM, E.S.; FREITAS, M.L.; et al.. Biochemical and hematological effects of acute and sub-acute administration to ethyl acetate fraction from the stem bark *Scutia buxifolia* Reissek in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 153: 908-916, 2014.

TJØLSEN, A; BERGE, O. G.; HUSKAAR, S.; et al. The formalin test: na evaluation ofthe method. *Pain*, v. 51, p.5-17, 1992.

TOMINAGA, M.; et al. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron*. 21 (3): 531-543.

WALKER, E.A.; TIANO, M.J.; BENYAS, S.I.; DYKSTRA, L.A.; Picker, M.J. Naltrexone and beta-funaltrexamine antagonism of the antinociceptive and response rate-decreasing effects of morphine, dezocine, and dpropoxyphene. **Psychopharmacology**. 144: 45-53, 1999.

YOWTAK, J. et. al. Reactive Oxygen Species Contribute of Neuropathic Pain by Reducing Spinal GABA release. **International Association for the Study of Pain**. v. 152. n. 4. Pp. 844-852. 2011

# *CONCLUSÃO*

---

## 5. CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho podemos concluir que:

- O EHFTF revelou os seguintes compostos químicos a partir da prospecção fitoquímica: Taninos condensados, Flavonas, Flavonóis, Xantonas, Chalconas, Auronas, Flavononóis, Leucoantocianidinas, Catequinas, Flavononas, Triterpenóides pentacíclicos, Saponinas.
- A CLAE do EHFTF quantificou os seguintes compostos fenólicos: ácidos gálico, clorogênico, elágico e cafeico, e os flavonoides: quercetina, rutina e luteolina.
- O EHFTF demonstrou possuir atividade antioxidante, tanto para o método de FRAP, quanto para o método de DPPH.
- O extrato apresenta baixa toxicidade nas doses testadas, através da administração por via oral, com DL50 acima de 5000mg/kg
- Apresenta atividade antiinflamatória aguda com possível ação sobre a via das prostaglandinas e óxido nítrico a partir dos constituintes ativos do extrato.
- Não demonstra atividade antiedematogênica e antiinflamatória tópica verificado no Teste de Edema de orelha.
- O EHFTF mostrou atividade gastroprotetora em todos os testes de modelos clássicos de indução de ulcera, apresentando melhor resposta na dose de 200mg/kg
- O EHFTF demonstrou agir: na gastroproteção: localmente por formação de barreira física, sendo essa atividade desempenhada possivelmente pelos compostos fenólicos por reforço da camada de muco-bicarbonato (por meio do complexo tanino-complexo de proteína/tanino-polissacárido); e de forma sistêmica por meio das PG's e/ou sua atividade antioxidante agindo em ambas as vias de forma sinérgica ou não.
- Possui atividade antinociceptiva detectados a partir dos Testes de Formalina, Contorções Abdominais, Tail Flick, Hot Plate e Von Frey, com caráter predominante a nível medular e central.
- A administração sistêmica (v.o) na dose testada não produz disfunção motora ou qualquer efeito colateral detectável verificado no teste de Rota Rod.
- Tem como mecanismo de ação a ativação dos sistemas opióide, glutamatérgico, L-Arginina/NO e Vanilóide (TRPV1) sendo que para essa atividade é atribuída à possível ação dos flavonoides, em especial a luteolina, presente no extrato.

# ***REFERÊNCIAS***

---

## 6. REFERÊNCIAS

- ABACIOGLU N.; et al. Role of L-arginine/nitric oxide pathway in the antinociceptive activities of morphine and mepyramine in mice. **Arzneimittel Forschung**. vol. 51. Pp: 977–83. 2001.
- ABBAS, A. K. **Imunologia celular e molecular**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.
- ABDELWAHAB, S. I.; et al. The methanolic extract of *Boesenbergia rotunda* (L.) Mansf. and its major compound pinostrobin induces anti-ulcerogenic property in vivo: Possible involvement of indirect antioxidant action. **Journal of Ethnopharmacology**. 2011.
- ABDELWAHAB, S. I.; et al. Gastroprotective mechanism of *Bauhinia thonningii* Schum. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 148. Pp: 277-286. 2013.
- ABDULLA, M. A.; et al. Evaluation of the anti-ulcer activities of *Morus alba* extracts in experimentally-induced gastric ulcer in rats. **Biomedical Research**. vol. 20. n. 1. pp. 35-39. 2009.
- AGUAYO, O; et. al. Causes of non-variceal upper gastrointestinal bleeding. **Rev. Cir. Parag.** vol. 37. n.1. 2013.
- AGULLO, G.; et al. Relationship between flavonoid structure and inhibition of phosphatidylinositol-3-kinase: a comparison with tyrosine kinase and protein kinase C inhibition. **Biochem Pharmacol**. vol. 53. Pp: 1649-1657, 1997.
- AIRASHDI, A. S.; et al. Mechanisms of Gastroprotective Effects of Ethanolic Leaf Extract of *Jasminum sambac* against HCl/Ethanol-Induced Gastric Mucosal Injury in Rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. Pp: 1-15. 2012.
- ALVES-NETO, O .; COSTA, C. M. C .; TEIXEIRA, M. J. **Pain: Principles and Practice**. Porto alegre: Artmed, 2009. cap.19, p.265-279.
- BABA, H.; SHIMOJI, K.; YOSHIMURA, M. Norepinephrine facilitates inhibitory transmission in substantia gelatinosa of adult rat spinal cord (part 1): effects on axon terminals of GABAergic and glycinergic neurons. **Anesthesiology**. vol. 92. Pp: 473–484. 2000.
- BACIGALUPO, N.M. Rubiecaea. In: BURKART, A. (Ed.). *Illustrated Flora of Entre Rios (Argentina): Volume VI, Part VI, Dicotiledôneas Metaclamídeas*. Buenos Aires: Coleccion Científica del I.N.T.A, 1974. Pp: 3-50.
- BARROS, M. P; et al. Evaluation of antiulceractivity of the mains phenolic acids found in Brazilian Green Propolis. **Journal of Ethnopharmacology**. vol. 120. Pp: 372-377. 2008
- BATRAN, R. A.; et al. Gastroprotective effects of *Corchorus olitorius* leaf extract against ethanol-induced gastric mucosal hemorrhagic lesions in rats. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**. vol. 28. Pp: 1321-1329. 2013

- BEIRITH A.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO J. B. Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. **Brain. Res.** vol. 924. Pp: 219–28. 2002.
- BEIRITH, A.; et al. Spinal and supraspinal antinociceptive action of dipyrone on formalin, capsaicin and glutamate tests. Study of the mechanism of action. **Eur. J. Pharmacol.** vol. 345. Pp: 233–245, 1998.
- BIRDANE, F. M; et. al. Beneficial effects of *Foeniculum vulgare* on ethanol-induced acute gastric mucosal injury in rats. **World J. Gastroenterol.** vol. 13. n. 4. Pp: 607-11. 2007.
- BOESS, F.G.; MARTIN, I. L. Molecular biology of 5-HT receptors. **Neuropharmacology.** vol. 33. Pp: 275–317, 1994.
- BOLZANI, V. S.; et al. Iridoids From *Tocoyena Formosa*. **Phytochemistry**, vol. 46, n. 2. Pp: 305-30, 1997.
- BRAZ, D. C.; OLIVEIRA, L. R. S.; VIANA, A. F. S. C. Antiulcerogenic activity of aqueous extract of *Bryophyllum pinnatum* (Lam.) Kurz. **Rev. Bras. Pl. Med.** vol. 15. n. 1. pp.86-90. 2013.
- BRITO-JUNIOR, F. E.; et al. Protective effects of *Croton campestris* A. St-Hill in different ulcer models in rodents: Evidence for the involvement of nitric oxide and prostaglandins. **Journal of Ethnopharmacology.** vol. 153. Pp: 469-477. 2014.
- BÜYÜKOKUROGLU, M. E. et al. Antiinflammatory and Antinociceptive Properties of Luteolin Diglucuronide and Apigenin Diglucuronide Obtained from *Perilla nankinensis*. **Asian Journal of Chemistry.** vol. 20, n. 3. Pp: 1900-1906. 2008.
- CARVALHO, J. C. T. **Fitoterápicos anti-inflamatórios**: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. Ribeirão Preto, SP, Tecmedd, 2004.
- CARVALHO, W.; LEMÔNICA, A. L. Central Mechanisms Of Transmission And Pain Modulation. A Therapeutic Review. **Rev. Bras. Anesthesiol.** vol. 48. n. 3. Pp: 221-240. 1998.
- CASTRO, L. P. Mecanismos de defesa da mucosa gastroduodenal: uma visão atual. **AMB Rev. Assoc. Med. Bras.** São Paulo. vol. 34. n. 1. Pp: 5-13, jan.- fev. 1988.
- CASTRO, R. A. **Avaliação do Potencial Analgésico e Anti-inflamatório do Composto Pirazólico 1,5-difenil-3-hidrazinopirazol(a) – DHP**. UFRRJ. Instituto de Veterinária. Curso de Pós-Graduação em Medicina Veterinária. Dissertação. 2011
- CHIQUIERI, A., DI MAIO, F. R., PEIXOTO, A. L. A distribuição geográfica da família Rubiaceae Juss. na Flora Brasiliensis de Martius. **Rodriguésia.** vol. 55. n. 84. Pp: 47-57. 2004.
- COELHO, V. P. M., AGRA, M. F., BARBOSA, M. R. V. Estudo farmacobotânico das folhas de *Tocoyena formosa* (Cham. & Schltdl.) K.Schum. (Rubiaceae). **Rev. Bras. Farmacogn.** vol. 16. n. 2: abr/jun. 2006

COTRAN, R. S. ; KUMAR, V. ; COLLINS, T. Structural and Functional Pathology. 6th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

CRISTIANS, S.; NAVARRETE, A.; MATA, R. Gastroprotective effect of *Hintonia latiflora* and *Hintonia standleyana* aqueous extracts and compounds. **Journal of Ethnopharmacology**. 2013. vol. 145. Pp: 530-535.

CRUVINEL, W. M.; et al. Sistema imunitário – parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Rev. Bras. Reumatologia**, vol. 50, n. 4. Pp: 434-461, 2010.

CUNHA, T. M.; et. al. Dual Role of Hydrogen Sulfide in mechanical inflammatory Hipernociception. **European Journal of Pharmacology**. vol. 590. Pp: 127-135, 2004.

CUSHNIE, T. P. T.; LAMB, A. J. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**. vol. 38. pp. 99-107. 2011.

D'AMOUR, F.E.; SMITH, D.L. A method for determining loss of pain sensation. **J Pharmacol. Exp. Ther.** vol. 72. Pp: 74-79, 1941.

DAVID, J. M.; et al. Flavonóide e triterpenos de *Stigmaphyllon paralias*. **Quím. Nova**. vol. 26. n.4. pp: 484-487. 2003.

DE JESUS, N. Z. T., et al. Tannins, peptic ulcers and related mechanisms. **International journal of molecular sciences**, vol. 13. n. 3. Pp: 3203-3228. 2012.

DELPRETE, P. G. Rubiaceae. In: SMITH, N. P.; et al. **Flowering Plant Families of the American Tropics**. Pp: 328-333. Princeton University Press/New York Botanical Garden Press. 2004.

DI ROSA, M.; GIROUD, J. P.; WILLOUGHBY D. A. Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **J. Pathol.** vol. 104. Pp: 15-29. 1971.

DIAS, Q. M.; PRADO, W. A. **Envolvimento dos sistemas descendentes noradrenérgico e serotoninérgico no controle GABAérgico espinal da dor induzida por ligadura de nervo em ratos**. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Universidade de São Paulo (USP). Ribeirão Preto, SP, Brasil. 2009.

DJAHANGUIRI, B.; SCAND, J. The production of acute gastric ulceration by indomethacin in the rat. **Gastroenterology**. vol. 4. Pp: 265-257. 1969.

DO, T. D. T.; et al. Antioxidant capacity and vitamin E in barley: Effect of genotype and storage. **Food Chemistry**. 2015. v. 187. pp. 65-74

DONATINI, R. S.; e al. Atividades antiúlcera e antioxidante do extrato de folhas de *Syzygium jambos* (L.) Alston (Myrtaceae). **Rev. bras. farmacogn.** vol. 19, n. 1a, pp: 89-94. 2009.

DRAY, A. Mechanism of action of capsaicin-like molecules on sensory neurons. **Life Sciences**, vol. 51. n. 23. pp: 1759–1765, 1992.

DRUMMOND, J. P. Neurophysiology. In: DRUMMOND, J. P. Acute pain: clinical pathophysiology and therapy. Sao Paulo: Atheneu. 2000.

DUNHAM, N.W.; MIYA, T. S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **Journal of the American Pharmacists Association**, vol. 46. pp: 208-209, 1957.

DUNJI, B. S.; et al. Green Banana Protection of Gastric Mucosa against Experimentally Induced Injuries in Rats. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**. vol. 28. n. 10. Pp: 894-898. 1993.

ELIZABETSKY, E.; et al. Analgesic activity *Psychotria colorata*. **J. Ethnopharmacol.** vol. 48. Pp: 77-83. 1995.

EMIN, J. A. S; OLIVEIRA, A. B.; LAPA, A. J. Anti-inflammatory activity of hesperidin. **J. Pharm. Pharmacol.** vol. 46. Pp:118-122. 1994.

ESPINOZA, M. C. F.; et al. Grape seed and apple tannins: Emulsifying and antioxidant properties. **Food Chemistry**. 2015. vol. 178. Pp: 38-44.

EVERAERTS W.; et al. (). "The capsaicin receptor TRPV1 is a crucial mediator of the noxious effects of mustard oil". *Curr. Biol.* 21. vol. 4. Pp: 316–21. February, 2011.

FANG, S.; et al. Provenance and temporal variations in selected flavonoids in leaves of *Cyclocarya paliurus*. **Food Chemistry**. vol. 124. Pp: 1382-13832011.

FENG, Y.; CUI, M., WILLIS, W. Gabapentin markedly reduces acetic acid-induced visceral nociception. **Anesthesiology**. vol. 98. Pp: 729–33. 2003

FERREIRA, S. H. **Between understanding and confusion: allodynia and hyperalgesia**. vol. 31. n. 3. 2003.

FERREIRA, I. C. F. R.; et al. Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal: Individual cap and stipe activity. **Food Chemistry**. vol. 100. Pp: 1511-1516. 2007.

FERREIRA, S. H. et al. Inflammatory pain. In: ALVES-NETO, O .; COSTA, C. M. C .; TEIXEIRA, M. J. **Pain: Principles and Practice**. Porto alegre: Artmed, 2009. cap.19, p.265-279.

FERREIRA, R. Q.; GRECO, S. J.; DELARMELINA, M.; WEBER, K. C. Electrochemical quantification of the structure/antioxidant activity relationship of flavonoids. **Electrochimica Acta**. 2015. v. 163. pp. 161-166

FILIPINI, C. B.; et. al. Avaliação da atividade protetora gástrica do extrato hidroalcoólico da semente de girassol em ratas. **Rev. Bras. Clin. Med.** São Paulo. vol. 10. n. 2. Pp: 112-5. 2012.

FRANKLIN, K. B. J.; ABBOTT, F. V. Pentobarbital, diazepam and ethanol abolish the interphase diminution of pain in the formalin test: evidence for pain modulation by GABA<sub>A</sub> receptors. **Pharmacol. Biochem. Behav.** vol. 46. Pp: 661-66. 1993.

FRITSCHY, J. M. et al. GABA<sub>B</sub>-receptor splice variants GB1a and GB1b in rat brain: developmental regulation, cellular distribution and extrasynaptic localization. **European Journal of Neuroscience.** vol 11, n. 3. Pp: 761 –768. March 1999.

FÜRST, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. **Brain Res. Bull.** vol. 48. Pp: 129-141, 1999.

GAMARO, G. D. et al. Effect of Rosmarinic and Caffeic Acids on Inflammatory and Nociception Process in Rats. **International Scholarly Research Network Pharmacology.** 2011.

GANGADHARAN, V.; et al. Conditional gene deletion reveals functional redundancy of GABA<sub>B</sub> receptors in peripheral nociceptors *in vivo*. **Molecular Pain.** vol. 5. Pp: 68. 2009.

GASSMANN, M.; BETTLER, B. Regulation of neuronal GABA<sub>B</sub> receptor functions by subunit composition. **Nature Reviews Neuroscience.** Vol 13. Pp: 380-394. June 2012.

GIRAUD, A. S. Gastric mucosal healing: The role of the mTor pathway. Infection and Immunity, Murdoch Childrens Research Institute, Royal Childrens Hospital, Parkville, Victoria, Australia. **J. Gastroenterol. Hepatol.** vol. 27. pp. 1411–1416. 2012.

GOTTSBERGER, G.; EHRENDORFER, F. Hybrid speciation and radiation in the neotropical woody genus *Tocoyena* (Rubiaceae). **Plant. Syst. Evol.** vol.181. Pp: 143-169. 1992

GRIVENNIKOV S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. **Immunity, Inflammation and cancer.** vol. 140. n. 6. Pp: 883-99, 2010.

GUERRA; Y. P.; et. al. Scavenger effect of D-002 on hydroxyl radicals in the gastric mucosa. **Revista Cubana de Farmacia.** vol. 46. n. 1. PP-87-96. 2012.

GUYTON, A. C.; HALL, J. E. **Treaty of Medical Physiology.** 12 nd. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. 1216 p.

HAFEZ, A. A., et al. Quality of life in peptic ulcer patients referring to Al-Zahra hospital of Isfahan, Iran. **Gastroenterology and Hepatology from bed to bench,** vol. 6. n. 1. S87. 2013.

HAMAUZO, Y.; et al. Effect of pear (*Pyrus communis* L.) procyanidins on gastric lesions induced by HCl/ethanol in rats. **Food Chemistry.** vol. 100. Pp: 265-263. 2007.

HAMERSKI, L.; et. al. Saponinas triterpênicas de *Tocoyena brasiliensis* Mart. (Rubiaceae). **Quím. Nova.** vol. 28, n.4, pp. 601-604. 2005.

- HARA, K. et al. Effects of intrathecal and intracerebroventricular administration of luteolin in a rat neuropathic pain model. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**. Pp:125. 10/2014.
- HEITZ, A.; et al. Leotelin 3'-glucuronide, the major flavonoid from *Melissa officinalis* subsp. *officinalis*. **Fitoterapia**. vol. 71. Pp: 201-202, 2000.
- HOWE, J. R.; WANG, J. T.; YAKSH, T. L. Selective antagonism of the antinociceptive effect of intrathecally applied  $\alpha$ -adrenergic agonists by intrathecal prazosin and intrathecal yohimbine. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** vol. 224. Pp: 552-558, 1983.
- HUNSKAAR, S., FASMER, O. B., HOLE, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. **J. Neurosci. Meth.** vol. 14, pp: 69-76. 1985
- IKEDA, Y.; MURAKAMI, A.; OHIGASHI, H. Ursolic acid na anti- and pro-inflammatory triterpenoid. **Molecular Nutrition & Food Research**, vol. 52, Pp: 26-42, 2008.
- INDRAN, M.; MAHMOOD, A. A.; KUPPUSAMY, U. R. Protective effect of *Carica papaya L* leaf extract against alcohol induced acute gastric damage and blood oxidative stress in rats. **West. Indian med. J.** vol. 57. n. 4. Pp: 323-326. 2008.
- INTERNATIONAL Association for Study of Pain (IASP). Concensus development conference statement: the integrated approach to the management of pain. **J. Accid. Emerg. Med.** vol. 6. n. 3. 1994.
- ISHIDA, K.; et al. Effects of Artichoke Leaf Extract on Acute Gastric Mucosal Injury in Rats. **Bioll. Pharm. Bul.** vol. 33. n. 2. Pp: 223-229. 2010.
- JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**. vol. 413. n. 13. September 2001.
- KATIKI, L. M.; et al. Anthelmintic effect of plant extracts containing condensed and hydrolyzable tannins on *Caenorhabditis elegans*, and their antioxidant capacity. **Veterinary Parasitology**. vol. 192. Pp: 218-227. 2013.
- KATZUNG B. G.; MASTERS S. B.; TREVOR A. J. **Basic e clinical pharmacology**. 12 et. Mc Graw Hill Lange, 2012.
- KAUR, R. SINGH, D. CHOPRA, K. Participation of alfa-2 receptors in the antinociceptive activity of quercetin. **J. Med. Food**. vol. 8. n. 4. Pp: 529-32. 2005.
- KELLENDONK C.; et al. Transient and selective overexpression of dopamine D2 receptors in the striatum causes persistent abnormalities in prefrontal cortex functioning. **Neuron**. vol. 49. Pp: 603-615. 2006.
- KLINGER, M.; FREISSMUTH, M.; NANOFF, C. Adenosine receptors: G protein-mediated signalling and the role of accessory proteins. **Cell. Signal**. vol. 14. 99-108, 2002.

KOBAYASHI T.; et al. Teprenone promotes the healing of acetic acid-induced chronic gastric ulcers in rats by inhibiting neutrophil infiltration and lipid peroxidation in ulcerated gastric tissues. **Pharmacological Research**, vol. 43, pp: 23-30, 2001.

KONTINEN, V. K.; et al. Electrophysiological evidence for increased endogenous GABAergic but not glycinergic inhibitory tone in the rat spinal nerve ligation model of neuropathy. **Anesthesiology**. vol. 94. Pp: 333-339, 2001.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; DE BEER, E.J. Acetic acid for analgesic screening. **Federation Proceedings**, vol.18, pp: 412, 1959.

LAPA, A. J .; et al. Evaluation methods of the Pharmacological Activity of Medicinal Plants. Sao Paulo, Sector of Natural Products, Department of Farmamcologia, UNIFESP / EPM, 2008.

LARA, D. R .; SOUZA, THE hypofunction adenossinérgica model for schizophrenia: interactions between purinergic systems, glutamate and dopamine. *Journal of Clinical Psychiatry*. 2001.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S.W. Animal models of nociception. **Pharmacological Reviews**, vol. 53, pp: 597-652, 2001.

LENT, R. **One hundred billion neurons: Fundamental Concepts of Neuroscience**. 2 nd. São Paulo: Atheneu. 2010. 786 p.

LIANG, Y. C., et al. Suppression of inducible cyclooxygenase and inducible nitric oxide synthase by apigenin and related flavonoids in mouse macrophages. **Carcinogenesis**, vol. 20, n. 10, pp: 1945–1952, 1999.

LIMA, C. A. H.; et al. Antiulcerogenic action of ethanolic extract of the resin from *Virola surinamensis* Warb. (Myristicaceae). **Journal of Ethnopharmacology**. vol. 122. Pp: 406-409. 2009.

LIU, C.; CRAWFORD, J. M. O Trato Gastrointestinal. In: COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Patologia Estrutural e Funcional**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

LUO, Z. D.; CIZKOVA, D. The Role of Nitric Oxide in Nociception. *Basic Science and Other Topics on Pain*. **Current Review of Pain**, vol. 4. Pp:459–466. 2000.

MALL, B.; GAUCHAN, D. P.; CHHETRI, R. B. An ethnobotanical study of medicinal plants used by ethnic people in Parbat district of western Nepal. **Journal of Ethnofarmacology**. vol. 165. pp. 103-117. 2015.

MALONE, M. H. ROBICHAUD, R. C. A hippocratic screen for pure or crude drug materials. **Lloydia**. vol. 25. n. 4. Pp: 320-331, 1962.

MARTINOV, T.; et al. Measuring Changes in Tactile Sensitivity in the Hind Paw of Mice Using an Electronic Von Frey Apparatus. **J. Vis. Exp**. vol. 82. 2013.

MARTINS, M. A. Effect of glycine microinjection in the periaqueductal gray dorsolateral mice in deep somatic pain model. Dissertation. Graduate Program in Biological Sciences Center of Pharmacology. Federal University of Santa Catarina. Florianópolis, SC. 2005.

MATOS, F. J. A. **Introduction to Experimental Phytochemistry**. 2nd ed. Fortaleza. publishing: UFC, 2002.

MEDZHITOV, R. origin and physiological roles of inflammation. **Nature**. vol. 454. Pp: 428-435, 2008.

MELLER, S. T.; GEBHART, G. F., Nitric oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord. **Pain**. vol. 52, n. 2, Pp. 127-136, 1993.

MELLO, J. C. P.; SANTOS, S. C. Taninos. In: SIMÕES, C. M.; et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3 ed. Porto Alegre: UFGRS/Ed.UFSC, 2001. cap. 24, p.517-543.

MENEZES, G. B.; et al. Inhibition of prostaglandin F (2-alpha) by selective cyclooxygenase 2 inhibitors accounts for reduced rat leukocyte migration. **Inflammation**, vol. 29. Pp:163-169. 2005.

MENSE, S.; GERWIN, R. Central Nervous Mechanisms of Muscle Pain. Understanding the Mechanisms: **Springer-Verlag**. 2010. Pp: 105-75.

MERSKEY, H.; BOGDUK, N. Classification of chronic pain: description of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. Seattle: **IASP Press**, 1994.

MIKA, M.; KOSTOGRYS, R. B.; ZARÓW, M. F.; WIKIERA, A.; MASLAK, E. Anti-atherosclerotic activity of catechins depends on their stereoisomerism. **Atherosclerosis**. 2015. vol. 240. Pp: 125-130

MILLAN, M. J. Descending control of pain. **Neurobiology**. vol. 66. Pp: 355-474, 2002.

MILLAN, M. J.; et al. Pro and antinociceptive actions of serotonin (5-HT) 1A agonists and antagonists in rodents: relationship to algesiometric paradigm. **Behav. Brain Res**. vol. 73. Pp: 69-77. 1995.

MISSALE, C.; et al. Dopamine receptors: from structure to function. **Physiol. Rev**. vol. 78. Pp:189-225. 1998.

MIZUI, T; SHIMONO, N; DOTEUCHI, M. A possible mechanism of protection by polyamines against gastric damage induced by acidified ethanol in rats: polyamine protection may depend on its antiperoxidative properties. **Japanese Journal Pharmacology**. vol. 44. Pp: 43-50, 1987.

MONCADA, S.; PALMER, R. M. J.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. **Pharmacological Reviews**. vol. 43. n. 2. Pp: 109-142, 1991.

MONTEIRO, E. C. A.; et. al. Os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs). **Temas de Reumatologia Clínica**. vol. 9. n. 2. Maio de 2008.

MULLER, W. A. Leukocyte-endothelial cell interactions in the inflammatory response. **Laboratory Investigation**. vol. 82. Pp: 521-533, 2002.

MUTOH, M. et al. Suppression by flavonoids of cyclooxygenase-2 promoter-dependent transcriptional activity in colon cancer cells: structure-activity relationship. **Jpn. J. Cancer Res.**, vol. 91. pp: 686-91, 2000.

BRASIL. M. D. I. Ministério da Integração Nacional. **Lei Nº 11.794, de 8 de outubro de 2008**. Programa de Sustentabilidade de Espaços Sub-Regionais – PROMESO.

NAUMOSKA, K.; VOVK, I. Analysis of triterpenoids and phytosterols in vegetables by thin-layer chromatography coupled to tandem mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**. vol. 1381. Pp: 229-238. 2015.

NEGUS, S. S., et al., Preclinical assessment of candidate analgesic drugs: recent advances and future challenges. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** vol. 319. n. 2. Pp: 507-14. 2006.

NEUGEBAUER, V. Metabotropic glutamate receptors – important modulators of nociception and pain behavior. **Pain**. vol. 98. Pp: 1–8. 2002.

NICOLL, R. A. Introduction to Pharmacology of Drugs that act in the Central Nervous System. In: KATZUNG B. G.; MASTERS S. B.; TREVOR A. J. **Basic e clinical pharmacology**. 12 ed. Mc Graw Hill Lange, 2012.

OECD. **Guidelines for the Testing of Chemicals. Acute Oral Toxicity – Up-and-Down-Procedure (UDP)**. 425. Adopted: 3 October 2008.

OKPO, S. O.; FATOKUN, F.; ADEYEMI, O. O. Analgesic and anti-inflammatory activity of *Crinum glaucum* aqueous extract. **J. Ethnopharmacol.** vol. 78. Pp: 207-211, 2001.

OLIVEIRA, L. F. S. Prospecção de novos produtos naturais e sintéticos bioativos com atividade antimicrobiana frente à *Helicobacter Pylori*. **Monografia**. Universidade Bandeirante de São Paulo. São Paulo, 2010.

OLIVEIRA, L. M; SILVA, L. F. S. Mecanismos neurais e modulação da dor. In: ALVES-NETO. et al. **Dor: Princípios e Prática**. São Paulo: ARTMED, 2009.

PAN, H. L., et al., Modulation of pain transmission 1 by G-protein-coupled receptors. **Pharmacol. Ther.** vol. 117 n. 1. Pp: 141-61. 2008.

PARVEEN, Z.; et al. Antiinflammatory and analgesic activities of thesium chinese Turcz extracts and its major flavonoids, kaempferol and kaempferol-3-O-glucoside. **Yakugaku Zasshi**, vol.127. Pp:1275-1279, 2007.

PATAPOUTIAN, A., TATE, S., WOOLF C. J., Transient receptor potential channels: targeting pain at the source. **Nat. Rev. Drug. Discov.** vol. 8. n. 1. Pp: 55-68. 2009.

PETERS, C. A.; et al. Production of *Wilbrandia ebracteata* extract standardized in flavonoids and dihydrocurcubitacin and assessment of its topical anti-inflammatory activity. **Industrial Crops and Products**. vol. 69. Pp: 123-128. 2015.

PETROFF, E. Y.; et al. Acid-sensing ion channels interact with and inhibit BK K<sup>+</sup> channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. vol. 105. n. 8. Pp: 3140-4, 2008.

PETROIANU, A.; SILVA, S. V.; ALBERTI, L. R. Mudanças nos padrões epidemiológicos das úlceras pépticas nos últimos 20 anos. **Revista Brasileira de Medicina e Revista Pediatria Moderna**. São Paulo. vol. 59. n. 9. Pp: 667-669. 2002.

PRADO, A. L. Revisão taxonômica do gênero *Tocoyena aubl.* (Rubiaceae) no Brasil. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. Programa de Pós-graduação em Biologia Vegetal. Dissertação (mestrado). UNICAMP. 1987

PRUET, C. W, et al. Management of the airway in patients with angioedema. **Laryngoscope** vol. 93. Pp:749-754.1983.

PURVES, D.; et al. **Neurosciences**. Unit I, Chapter 7. 4 nd. Artmed, 2008.

QUIAO, A.; et al. Novel triterpenoids isolated from hawthorn berries functioned as antioxidant and antiproliferative activities. **Journal of Functional Foods**. vol. 13. Pp: 308-313. 2015.

RANG, H. P. et al. **Pharmacology: Basic & Clinical**. 12 nd. Rio de Janeiro: Elsevier, 2014.

RAO, C.V. et. al. Antiulcer activity of *Urtica salicifolia* rhizome extract. **Journal Ethnopharmacology**. vol. 91. Pp 243-249. Elsevier Ireland Ltd, 2004.

RATHMELL, J. P.; LAIR, T. R.; NAUMAN, B. The role of intrathecal drugs in the treatment of acute pain. **Anesth. Analg**. vol. 101. n. 5. Pp: 30-43. 2005.

REIS, L. R. S. et al. Avaliação de plantas da família Rubiaceae existentes no horto de plantas medicinais da Embrapa Amazônia Oriental. In: Congresso Nacional de Botânica, 54; Reunião Amazônica de Botânica, 3, 2003.

ROBBRECHT, E. Tropical woody Rubiaceae. **Opera Botanica Belgica**. vol. 1. Pp: 1-271. 1988.

ROBERT, A.; et al. Cytoprotection by prostaglandins in rats: Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl and thermal injury. **Gastroenterology**. vol. 77. Pp: 433-443. 1979.

ROCHA, A. P. C; et al. Dor: aspectos atuais da sensibilização periférica e central. **Rev. Bras. Anesthesiol**. vol.57, n.1, pp. 94-105. 2007.

ROCHA, W. S.; et al. Compostos fenólicos totais e taninos condensados em frutas nativas do cerrado. **Rev. Bras. Frutic**. vol. 33. n. 4. Pp: 1215-122. 2011.

ROTH, J.; et al. Molecular aspects of fever and hyperthermia. **Immunol. Allergy Clin. N. Am.** vol. 29. Pp: 229- 245, 2009.

ROVA J. H. E.; et al. A trnLFcpDNA sequence study of the Condamineae-Rondeletieae-Sipaneae complex with implications on the phylogeny of the Rubiaceae. **Amer J Bot.** vol 89. Pp-145-159. 2002.

RUDNICKI, M.; et al. Antioxidant and antiglycation properties of *Passiflora alata* and *Passiflora edulis* extracts. **Food Chemistry.** vol. 100. n. 2. Pp: 719-724. 2007.

RUFINO, M. S. M; et al. Metodologia científica:Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre. **Embrapa.** Julho, 2007.

RUFINO, M. S. M; et al. Metodologia científica:Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela método de redução de ferro (FRAP). **Embrapa.** 2006.

SALATINO A.; OLIVEIRA, A. F. M. Major constituents of the foliar apicuticular waxes of species from the Caatinga and Cerrado. *Zeitschrift fur Naturforschung C-A J. Biosci.* vol. 55. n. 9-10. Pp: 688-92. 2000.

SANTOS A. R. S, et al. Antinociceptive properties of the new alkaloid, cis-8, 10-di-Npropyllobelidiol hydrochloride dihydrate isolated from *Siphocampylus verticillatus*: evidence for the mechanism of action. **J Pharmacol Exp Ther.** 1999; vol. 289. Pp: 417–26.

SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. Ruthenium red and capsazepine antinociceptive effect in formalin and capsaicin models of pain in mice. **Neurosci. Lett.** vol. 235. Pp: 73-76, 1992.

SANTOS, A. R. S.; et al. Analysis of the mechanisms underlying the antinociceptive effect of the extracts of plants from the genus *Phyllanthus*. **Gen. Pharmacol.** vol. 26. Pp: 1499-1506, 1995.

SANTOS, A. R. S.; et al. Antinociceptive properties of the new alkaloid, cis-8, 10-di-Npropyllobelidiol hydrochloride dihydrate isolated from *Siphocampylus verticillatus*: evidence for the mechanism of action. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** vol. 289. Pp:417–26. 1999.

SANTOS, A. R. S; et al. Mechanisms involved in the antinociception caused by agmatine in mice. **Neuropharmacology.** vol. 48. Pp:1021–34. 2005.

SANTOS, A. R.; CALIXTO, J. B. Further evidence for the involvement of tachykinin receptor subtypes in formalin and capsaicin models of pain in mice. **Neuropeptides**, vol. 31, n. 4, pp: 381-9, 1997.

SANTOS, M. D. et al. Evaluation of the anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the natural polyphenol chlorogenic acid. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, vol. 29. n. 11, pp: 2236-2240, 2006.

SANTOS, M. D.; et al. Analgesic activity of di-caffeoylquinic acids from roots of *Lachnophora ericoides* (Arnica da Serra). **Journal of ethnopharmacology.** vol. 96. Pp: 545-549. 2005.

SANTOS, L. B.; et al. Efficacy of extracts from plants of the Brazilian Pantanal against *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Rev. Bras. Parasitol. Vet.** vol. 22, n. 4, pp: 532-538. 2013.

SASAKI, M.; et al. effects of 5-HT<sub>2</sub> and 5-HT<sub>3</sub> receptor on the modulation of nociceptive transmission in rat spinal cord according to the formalin test. **Eur. J. Pharmacol.** vol. 424. Pp: 45-52, 2001.

SAUL, C.; et. al. Redução da prevalência de úlcera duodenal: um estudo brasileiro (análise retrospectiva na última década: 1996-2005). **Arq. Gastroenterol.** vol. 44. n. 4, Pp. 320-324. 2007.

SCHAIBLE, H. G.; EBERSBERGER, A.; NATURA, G. Update on peripheral mechanisms of pain: beyond prostaglandins and cytokines. **Arthritis Research and Therapy**, vol. 13. Pp: 210. 2011.

SCHAIBLE, H. G.; RICHTER, F. Pathophysiology of pain. **Langenbecks. Arch. Surg.** vol. 389. Pp: 237-243, 2004.

SCHUMACHER, M. A.; BASBAUM, A. I.; WAY, W. L. Opioid Analgesics & Antagonists. In: KATZUNG B. G.; MASTERS S. B.; TREVOR A. J. **Basic e clinical pharmacology**. 12 ed. Mc Graw Hill Lange, 2012.

SERHAN, C. N.; CHIANG, N. Novel endogenous small molecules as the checkpoint controllers in inflammation and resolution: entree for resolomics. **Rheum Dis Clin. North. Am.** vol. 30 n. 1. Pp: 69-95. 2004.

SHIN, K. M.; et al. Anti-inflammatory effect of caffeic acid methyl ester and its mode of action through the inhibition of prostaglandin E, nitric oxide and tumor necrosis factor- $\alpha$  production. **Biochemical Pharmacology**, vol. 68, n. 12, pp: 2327–2336, 2004.

SILVA, A. R. H.; et al. Biochemical and hematological effects of acute and sub-acute administration to ethyl acetate fraction from the stem bark *Scutia buxifolia* Reissek in mice. **Journal of Ethnopharmacology**. vol. 153. Pp: 908-916, 2014.

SILVA, L. P.; ANGELIS, C. D.; TOMA, W. Avaliação da dos mecanismos de ação envolvidos nas atividades antiulcerogênica e cicatrizante do extrato etanólico obtido a partir das folhas de *Terminalia Catappa L.* (combretaceae). Universidade Santa Cecília. **Revista Ceciliana**. vol. 2. n. 2. Pág. 20-22, 2010.

SMITH, H.; DOYLE, S.; MURPHY, R. Filamentous fungi as a source of natural antioxidants. **Food Chemistry**. v. 185. pp. 389-397. 2015.

SOCHOR, J.; et al. Fully Automated Spectrometric Protocols for Determination of Antioxidant Activity: Advantages and Disadvantages. **Molecules**. vol. 15. Pp: 8618-8640. 2010.

SOUZA, R. K. D. Etnofarmacologia de plantas medicinais do carrasco no Nordeste do Brasil. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri – URCA. Crato, 2012. 84p.

SPARG, S. G.; LIGHAT, M. E.; VAN STADEN, J. Biological activities and distribution of plant saponins. **Journal of Ethnopharmacology**. vol. 94. n. 2-3. Pp: 219-243, 2004.

SUZUKI, H., et al. Roles of oxidative stress in stomach disorders. **Journal of clinical biochemistry and nutrition**, vol. 50. n. 1. Pp: 35. 2012.

SZELENYI, I.; BRUNE, K. Possible role of oxygen free radicals in ethanol-induced gastric mucosal damage in rats. **Digestive Disease Science**, vol. 33, n. 7, pp: 865-871, 1988.

TEDGUI, A.; MALLAT, Z. Anti-inflammatory mechanisms in the vascular wall. **Cir. Res.** vol. 88, Pp: 877-887, 2001.

TIDBALL, J. G. Inflammatory processes in muscle injury and repair. **Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.** vol. 288. n. 2. Pp: 345-53. 2005.

TJØLSEN, A; et al. The formalin test: na evaluation ofthe method. **Pain**, vol. 51, pp: 5-17, 1992.

TODD A. J. Neuronal circuitry for pain processing in the dorsal horn. **Nat. Rev. Neurosci.** vol. 11. Pp: 823–836. 2010.

TOMINAGA, M. et al. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. **Neuron**. vol. 21. n. 3. Pp: 531-543.

TOSTES, R. **Inflamação**: eventos essenciais. Universidade Federal do Paraná. Disciplina de patologia veterinária. 2011.

TRISTCH, D.; et al. Flavonoids: True or promiscuous inhibitors of enzyme? The case of deoxyxylulose phosphate reductoisomerase. **Bioorganic Chemistry**. vol. 59, pp: 140-144. 2015.

TUBARO, A. the croton oil ear test revisited. **Inflammation Research**. vol. 17. n. 3. Pp: 347-349, 1986.

VACHER, P. J.; DUCHÉNE-MARULLAZ, P.; BARBOT, P. A. propos de quelques produits usuels – comparaison de deux méthodes d'étude des analgésiques. **Medicina Experimentalis**. vol.11. Pp:51-58, 1964.

VALLE CLARA, M.; et. al. Effects of D-002 on aspirin-induced ulcers and neutrophil infiltration on the gastric mucosa. **Rev. cuba. Farm.** vol. 46. n. 2. Pp: 249-258, Apr.-June 2012.

VERRI-JR., W. A.; et al. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development? **Pharmacology & Therapeutics**. vol. 112. n. 1, Pp: 116-138, 2006.

VIEIRA, L. M.; et al. Fenólicos totais e capacidade antioxidante in vitro de polpas de frutos tropicais. **Rev. Bras. Frutic.** vol. 33. n. 3. pp. 888-897. 2011.

VOMERO, N. D.; COLPO, E. Cuidados Nutricionais na Úlcera Péptica. **Arq. Bras. Cir. Dig.** vol. 27. n. 4. Pp: 298-302. 2014.

WALKER, E. A.; et al. Naltrexone and beta-funaltrexamine antagonism of the antinociceptive and response rate-decreasing effects of morphine, dezocine, and dpropoxyphene. **Psychopharmacology**. vol. 144. Pp: 45-53, 1999.

WALLACE, J. L. NSAID gastropathy and enteropathy: distinct pathogenesis likely necessitates distinct prevention strategies. **British Journal of Pharmacology**. vol. 165. Pp: 67-74. 2012.

WALLACE, J. L. Prostaglandins, NSAIDs, and gastric mucosal protection: why doesn't the stomach digest itself? **Physiological Reviews**. october, vol. 88. n. 4. Pp: 1547-1565, 2008.

WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. **Experimental Biology and Medicine**, vol. 111. n. 3, Pp: 544-547, 1962.

YOWTAK, J.; et. al. Reactive Oxygen Species Contribute of Neuropathic Pain by Reducing Spinal GABA release. **International Association for the Study of Pain**. vol. 152. n. 4. Pp. 844-852. 2011.

ZALDIVAR, F.; et al. Constitutive pro- and antiinflammatory cytokine and growth factor response to exercise in leukocytes. **J. Appl. Physiol**. vol. 100. Pp: 1124-33. 2006.