UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "Júlio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

JULIANA AGOSTINHO LOPES

AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO, ANTI-INFLAMATÓRIO E GASTROPROTETOR DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS ENTRECASCAS DE *Machaerium hirtum* (Vell.) Stellfeld

Botucatu – SP

2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "Júlio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU

JULIANA AGOSTINHO LOPES

AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTINOCICEPTIVO, ANTI-INFLAMATÓRIO E GASTROPROTETOR DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS ENTRECASCAS DE *Machaerium hirtum* (Vell.) Stellfeld

ORIENTADORA: PROF. ADJ. CLÉLIA AKIKO HIRUMA LIMA

Dissertação apresentada ao Departamento de Farmacologia do Instituto de Biociências de Botucatu UNESP, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (área de concentração: Farmacologia).

Botucatu – SP

2013

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ***ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE***

Lopes, Juliana Agostinho.
Avaliação do efeito antinociceptivo, anti-inflamatório e gastroprotetor do extrato hidroalcoólico das entrecascas de *Machaerium hirtum* (Vell.) Stellfeld / Juliana Agostinho Lopes. - Botucatu, 2013

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu
Orientador: Clélia Akiko Hiruma-Lima
Capes: 21001006

1. Dor – Tratamento alternativo. 2. Agentes anti-inflamatórios. 3. Jacaranda – Uso terapêutico. 4. Resposta imune. 5. Plantas medicinais – Uso terapêutico.

Palavras-chave: *Machaerium hirtum*; Antinociceptivo; Anti-inflamatório; Gastroprotetor

BANCA EXAMINADORA

_____

1º. Titular/ Presidente

Profa Dra Clélia Akiko Hiruma-Lima (UNESP/Botucatu)

_____

2º. Titular

Prof Dr Carlos Alan Cândido Júnior (UNESP/Botucatu)

_____

3º. Titular

Profa Dra Elen Landgraf Guiguer (UNIMAR/Marília)

Auxílio Financeiro:

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

BIOTA- FAPESP/SP

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus** por permitir que tudo pudesse ser realizado.

A **minha família** pelo apoio incondicional durante todo este trajeto, sempre acreditando no meu potencial.

Ao **meu namorado Rodrigo** pela compreensão, paciência e incentivo para realização deste trabalho.

A **Cinthia M. Ormond** pela verdadeira amizade e companheirismo, que surgiram no momento em que fomos aprovadas para ingressar no mestrado, e que permanecerão pela vida.

A minha orientadora **Prof[a] Dra.Clélia Akiko Hiruma-Lima** por sua orientação e confiança ao me receber em seu laboratório e acreditar na minha capacidade.

A **Prof[a] Dra Lúcia Regina Machado da Rocha** por sua confiança, por suas observações didáticas e por ceder seu laboratório para realização deste projeto.

Aos professores do **Departamento de Farmacologia** que contribuíram para a minha formação.

Aos professores **Dr. Luiz Fernando Rolim de Almeida** (UNESP – Botucatu-SP) e **Dra. Miriam Sannomyia** (USP- São Paulo-SP) pela coleta, extração e análise fitoquímica da planta que foi objeto de estudo deste trabalho.

Aos meus professores da graduação **Dra Elen Landgraf Guiguer e Dr. Adriano Cressoni Araújo** que despertaram em mim a paixão pela pesquisa e pela farmacologia.

A equipe do laboratório **Larissa, Fernando (Paraíba), Flávia (Kalose), Catarine (Cat), Tamires, Raquel, Ellen, Patrícia, Celi, Rosanna, Vinícus, Júlia e Stefanni** pelo apoio e ajuda prestados. Em especial agradeço a **Cat** por sua amizade, experiência, orientação e ensinamentos que tanto me fizeram crescer no mestrado; a **Kalose**, também por sua amizade, ajuda e seu bom humor tão contagiante que era difícil não dar boas risadas, mesmo quando tudo parecia muito difícil; a **Vânia**, que já não está mais no grupo, mas que descobri ser uma pessoa maravilhosa e amiga e que muito me ajudou dentro e fora do laboratório; a **Larissa e ao Paraíba** pela união e companheirismo durante os experimentos, pelas fofocas e pelas conversas animadas que proporcionaram mais alegria nesta estadia.

Aos funcionários e ex-funcionários do Departamento de Fisiologia **Liliam, Juliano e Sr Júnior** pelos cuidados com os animais, e a **Janete ("Jajá")** pelos cuidados com o departamento e por ser uma pessoa tão irreverente e animada. Em especial ao técnico do departamento, **Dr. Hélio Kushima (Pon-Pon ou "Pai"),** pelas inúmeras ajudas e pelos conhecimentos e habilidades que vão além da farmacologia, passados sempre de forma humilde, independente da sua titulação.

Aos **funcionários da Seção de Pós-Graduação** por todos os auxílios e informações prestadas.

A **CAPES e ao Projeto Biota/FAPESP** pelo apoio financeiro.

OBRIGADA!

"O mais importante é nunca deixar de se perguntar. A curiosidade tem sua própria razão de existir."

Albert Einsten

PRÓLOGO

O desenvolvimento do projeto de mestrado possibilitou a formação especifica em farmacologia, com estudos direcionados para a caracterização de atividade farmacológica de produtos naturais no tratamento da dor e inflamação. Durante a execução do projeto de mestrado, foram realizas outras atividades, no intuito de enriquecer a formação profissional e cientificada aluna.

Trabalhos apresentados na forma de painel em eventos científicos

- Lopes, J.A.; Nishijima, C. M.; de Souza Maria, N, C. V.; Sannomiya, M.; Rocha, L.R. M.; Hiruma-Lima, C.A. Antinociceptive and anti-edematogenic effects of *Machaerium hirtum* (Vell.) Stell. (inner barks) and the involvement of glutamate and L-arginine - NO pathways. In: V Simpósio Internacional de Pós-Graduação e Pesquisa (SInPosPq), 2012, Ribeirão Preto-SP.

- Lopes, J.A.; Nishijima, C.M.; de Souza-Maria, N. C. V.; Tangerina, M. M. P.; Sannomiya, M.; Vilegas, W; Rocha, L.R.M.; Hiruma-Lima, C.A. Antinociceptive and antidiarrheal effect of hidroalcoolic extract from *Machaerium hirtum* (inner barks) and the involvement of opiod system. In: 44° Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica Experimental (SBFTE), 2012, Foz do Iguaçu-PR.

- Beserra, F.P.; Périco, L.C.; Polo, C.M.; Lopes, J.A.; Saldanha, L.L.; Rocha, L.R.M.; Dokkedal, A.L.; Hiruma-Lima, C.A. Efeito do extrato hidroalcoólico das folhas de *Cissus sicyoides* l. (Vitaceae) sobre os parâmetros bioquímicos em modelos agudos de úlcera gástrica. In: XII Workshop da Pós-Graduação do Instituto de Biociências de Botucatu-UNESP, 06/ 2013, Botucatu-SP.

- Périco, L. L.; Beserra, F. P.; Lopes, J. A; Heredia Vieira, S. C.; Vilegas, W.; Rocha, L. R. M.; Hiruma-Lima, C. A. Anti-edematogenic activity of hydroalcoholic extract from S*erjania marginata* casar. (Sapindaceae): role of PGE_2**.** In: III Internacional Symposium on Drug Discovery, 07/2013, Araraquara-SP.

Participação em eventos científicos

- ➔ 44° Congresso Brasileiro de Farmacologia e Terapêutica (SBFTE) – 11/2012 - Foz do Iguaçu/PR

- ➔ V Simpósio Internacional de Pós-Graduação e Pesquisa (SInPosPq) – USP –09/2012- Ribeirão Preto/SP

- ➔ XI Workshop da Pós-Graduação– UNESP- 05/ 2012 – Botucatu/SP

- ➔ II Simpósio Anual de Farmacologia (SIMFAR)– UNESP –06/2012 - Botucatu/SP

- ➔ III Simpósio Anual de Farmacologia (SIMFAR)– UNESP – 06/2013 – Botucatu/SP- Certificado de Menção Honrosa de 2° lugar pela apresentação do painel.

Cursos realizados

- ➔ Curso: Busca profissional de patentes: Técnicas, estratégias e aplicações práticas Foco no Questel Orbit realizado pela Axonal Consultoria Tecnológica, A Agência Unesp de Inovação – AUIM e a Coordenadoria Geral de Bibliotecas da Unesp - GGB, 10/2011, Botucatu- SP.

- ➔ Mini-curso: Inflamação, dor e novas perspectivas terapêuticas. Modelos experimentais, durante o XI Workshop da Pós-graduação do Instituto de Biociências de Botucatu-UNESP, 05/ 2012, Botucatu-SP.

- ➔ Palestra: "Pipetas – Dicas práticas de como pipetar melhor e cuidados com sua pipeta" e "Consumíveis – Como os consumíveis podem influenciar em seus resultados" - Eppendorf Brasil. UNESP, 06/2012 – Botucatu-SP.

- ➔ Mini-curso: "Iniciação à docência", durante o 5th International Symposium of Post Graduation and Research (V SINPOSPq), 09/2012, Ribeirão Preto-SP.

- ➔ Mini-curso: "Como escrever artigos científicos", durante o 5th International Symposium of Post Graduation and Research (V SINPOSPq), 09/2012, Ribeirão Preto-SP.

- ➔ Seminário Técnico: "Cromatografia – HPLC; CG e SP" – Allcrom –UNESP, 04/2013 - Botucatu-SP.

Disciplinas cursadas

- Interação entre a Pós-Graduação e o Ensino Básico de Ciências e Biologia (6 créditos)
- Reatividade Vascular: Papel da Célula Endotelial em Diferentes Fisiopatologias (3 créditos)
- Farmacocinética (5 créditos)
- Farmacodinâmica: Receptores e Interação Droga-Receptor (3 créditos)
- Farmacologia Celular e Molecular da Junção Neuromuscular (3 créditos)
- Farmacologia do Sistema Nervoso Autônomo Simpático (3 créditos)

RESUMO

A dor é uma experiência multidimensional, uma qualidade sensorial subjetiva e pessoal, difícil de ser descrita e interpretada, pois não inclui apenas a nocicepção, mas também componentes cognitivos, afetivos e emocionais. A propagação da dor é iniciada com a ativação dos nociceptores por intensos estímulos térmicos, mecânicos ou químicos. Quando ocorre lesão tecidual é desencadeada a resposta inflamatória. A inflamação é uma resposta imune complexa relacionada ao dano tecidual e/ou celular causada por estímulos químicos, físicos, imunológicos ou microbianos. No processo inflamatório diversas substâncias são liberadas pelos tecidos danificados, destacando-se as prostaglandinas, os leucotrienos, substância P, as citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, dentre outros, que são capazes de estimular e sensibilizar nociceptores que provocam a dor. Se houver falha neste processo de reparo tecidual pode haver a perda da função através de um processo inflamatório crônico. A abordagem mais comum para reduzir a dor e a inflamação é através da utilização de drogas anti-inflamatórias não esteroidais (AINEs). Entretanto, o uso destes fármacos sem as devidas orientações médicas e/ou farmacêuticas, ou por longos períodos, pode levar ao aparecimento de sérias reações adversas. Devido a estes fatores, a busca por novas alternativas terapêuticas para o tratamento da dor e inflamação, como o uso de espécies vegetais tem sido fomentada pelo Ministério da Saúde brasileiro. O gênero *Machaerium* é comumente encontrado no Cerrado brasileiro e muito utilizado popularmente para o tratamento de tosse, aftas e diarreia. A espécie *Machaerium hirtum* (Vell.)Stellfeld, conhecida popularmente como "bico-de-andorinha", é utilizada na medicina popular no combate as úlceras e diarreia, e estudos fitoquímicos desta espécie comprovaram a presença de flavonas e triterpenos na sua composição, que são metabólitos secundários conhecidos pelo potencial farmacológico anti-inflamatório e antinociceptivo. O objetivo geral do projeto foi avaliar o potencial antinociceptivo e anti-inflamatório do extrato hidroalcoólico das entrecascas de *Machaerium hirtum* (EHMe). Neste trabalho foram realizados os testes de toxicidade aguda, avaliação da performance motora, avaliação da atividade antinociceptiva do EHMe através de estímulos térmicos e químicos (teste da placa quente e do teste da formalina), bem como a caracterização dos mecanismos de ação, através da avaliação do envolvimento das vias nitrérgica, glutamatérgica, opiodérgica, e TRPs (receptores de potencial transitório) e ASICs (canais iônicos sensíveis ao ácido) na antinocicepção. Foram também realizados estudos acerca da ação antiedematogênica e anti-inflamatória do EHMe nos modelos de edema de orelha induzido por xilol ou ácido araquidônico (em camundongos), e edema de pata induzido por carragenina (em ratos), além da avaliação do efeito do extrato sobre o trato gastrointestinal. Os resultados obtidos com EHMe demonstram a ausência de toxicidade aguda do extrato e do efeito analgésico supraespinhal em teste de nocicepção térmica. O tratamento oral com o extrato (62.5mg/Kg) reduziu a nocicepção química causada pela injeção intraplantar de formalina, glutamato, cinamaldeído e salina acidificada, caracterizando o envolvimento das vias opiodérgica e nitrérgica, bem como dos receptores TRPA-1 e ASIC no mecanismo de ação. O EHMe reduz a motilidade intestinal através da via opiodérgica, indicando o potencial efeito antidiarreico do extrato. O extrato também possui efeito antiedematogênico no edema de orelha induzido por xilol, sugerindo envolvimento de receptores TRPA-1 e/ou efeito antioxidante do EHMe. Na inflamação induzida pela aplicação

tópica de ácido araquidônico, o EHMe apresentou expressivo efeito anti-inflamatório com envolvimento da via da COX (ciclooxigenase). Porém, o extrato não exerce efeito antiedematogênico e/ou anti-inflamatório no edema de pata induzido pela carragenina em ratos, fato este que pode estar relacionado com a diferença metabólica entre as espécies de roedores no processo farmacocinético de absorção do extrato. Foi observado também efeito gastroprotetor da maior dose nos modelos de úlcera gástrica induzida por etanol ou indometacina, corroborando com a indicação popular de uso desta espécie. Os resultados obtidos até o presente momento indicam que o EHMe é bastante promissor para a utilização terapêutica na dor, inflamação e distúrbios do trato gastrointestinal.

Palavras-chave: *Machaerium hirtum;* Antinociceptivo; Anti-inflamatório; Gastroprotetor.

ABSTRACT

Pain is a multidimensional experience, a subjective and personal sensorial quality, difficult to be described and understood, because it does not include only nociception, but also cognitive, affective and emotional components. Propagation of pain begins with the nociceptors activation by intense thermal, mechanical or chemical stimulus. When tissue damage occurs the inflammatory response is triggered. Inflammation is a complex immune response related to tissue and/or cellular damage caused by chemical, physical, immunological or microbial stimuli. Several substances are released by the damaged tissues in inflammatory process, especially prostaglandins, leukotrienes, substance P, cytokines, chemokines, growth factors, among others, that are able to stimulate and sensitize nociceptors causing pain. If the tissue repair process fails there can be a loss of function through a chronic inflammatory process. The most common approach to reduce pain and inflammation is through the use of anti-inflammatory non-steroidal drugs (NSAIDs). However the use of these drugs without proper medical and/or pharmaceutical guidelines, or for long periods, can lead to the onset of serious adverse reactions. Due to these factors, the search for new therapeutic alternatives for the treatment of pain and inflammation, such as the use of plant species, has been supported by the Brazilian Health Ministry. The gender *Machaerium* (Fabaceae) found in the Brazilian Cerrado is very popularly used to combat cough, aphthas and diarrhea. The species *Machaerium hirtum* (Vell.) Stellfeld, popularly known as "bico-de-andorinha", is used in folk medicine against ulcers and diarrhea, and phytochemical studies from this specie have shown the presence of flavones and triterpenes in its composition, that are secondary metabolites known for their anti-inflammatory and antinociceptive pharmacological potential. The general aim of this project was to evaluate the antinociceptive and anti-inflammatory potencial of the hydroalcoholic extract from the inner bark of *Machaerium hirtum* (EHMe). In this work were performed tests of acute toxicity; evaluation of motor performance; evaluation of antinociceptive activity from the EHMe through thermal and chemical stimuli (hot plate test and formalin test), as well as characterization of the mechanisms of action by assessing the involvement of nitrergic, gluamatergic, opiodergic pathways, and TRPs (transient receptor potencial) and ASICs (acid sensitive ion channels) in antinociception. Studies were also carried out on the antiedematogenic and anti-inflammatory action from the EHMe in ear edema models induced by xylene or arachidonic acid (in mice), and paw edema induced by carrageenan (in rats); and the evaluation of the effect of the extract on the gastrointestinal tract. The results obtained with EHMe demonstrate the absence of toxicity of the extract and supraspinal analgesic effects of EHMe in thermal nociception tests. Oral treatment with the extract (62.5mg/Kg) decreased nociception caused by intraplantar injection of formalin, glutamate, cinnamaldehyde and acidified saline, featuring the involvement of opiodergic and nitrergic pathways, as well as TRPA-1 and ASIC receptors in the mechanism of action. The EHMe reduces the intestinal motility through opiodergic pathway, indicating a potencial antidiarrheal effect. The extract also has antiedematogenic effect in xylene-induced ear edema, suggesting the involvement of TRPA-1 receptor and/or an antioxidant effect of the EHMe. In the inflammation induced by topical application of arachidonic acid, the EHMe has shown significant anti-inflammatory effect with the involvement of the cyclooxigenase (COX)- pathway. However the extract does not produce antiedematogenic and/or anti-

inflammatory effect in the carragenan-induced paw edema in rats, which may be associated with the metabolic difference between rodent species in the pharmacokinetic process of the extract absorption. It was also observed gastroprotective effect of the highest dose in gastric ulcer models induced by ethanol or indomethacin, confirming the popular indication of use of this specie. The results obtained until the present moment indicate that the EHMe is quite promising for therapeutic use in pain, inflammation and gastrointestinal tract disorders.

Key-words: *Machaerium hirtum*; Antinociceptive, Antiinflammatory; Gastroprotective.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AA	**– ácido araquidônico**
AINES	**– anti-inflamatório não esterioidal**
AMPA	**– ácido-α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiônico**
ASIC	**- canais iônicos sensíveis ao ácido**
ATP	**– trifosfato de adenosina**
Ca^{2+}	**- Cálcio $^{2+}$**
CGRP	**– peptídeo relacionado ao gene da calcitonina**
cm	**– centímetros**
COX	**– ciclooxigenase**
COX-1	**– ciclooxigenase-1**
COX-2	**– ciclooxigenase-2**
EHMe	**– extrato hidroalcoólico de *Machaerium hirtum* (entrecasca)**
EP	**- receptor de prostaglandina E**
EROs	**- espécies reativas do oxigênio**
g	**– grama**
GABA	**– ácido gama aminobutírico**
IL-1 β	**– interleucina – 1 β**
IL-6	**– interleucina – 6**
IL-8	**– interleucina – 8**
IL-10	**- interleucina - 10**
i.p.	**– intraperitonial**
iNOS	**– óxido nítrico sintase induzida**
Kg	**– quilograma**
L-NAME	**– L-Nitro-L-arginina metil ester**
LTB_4	**- leucotrieno B_4**
mg	**– miligrama**

mM	**- milimolar**
min	**– minutos**
mL	**– mililitro**
NMDA	**– N-metil-D-aspartato**
NO	**– óxido nítrico**
NOS	**– óxido nítrico sintase**
PAG	**– substância cinzenta periaquidutal**
PGE2	**– prostaglandina E2**
PGI2	**– prostaglandina I2**
pH	**– potencial de hidrogênio iônico**
PKC	**- proteína cinase C**
RVM	**– medula rostral ventromedial**
r.p.m	**– rotação por minuto**
s	**– segundos**
s.c.	**– subcutâneo**
SP	**– substância P**
TGF-β	**- fator de crescimento transformador -β**
TNF- α	**– fator de necrose tumoral α**
TRP	**– receptor de potencial transitório**
TRPA1	**– receptor de potencial transitório relacionado à proteína anquirina 1**
TRPV	**– receptor de potencial transitório vanilóide**
TRPV1	**– receptor de potencial transitório vanilóide 1**
TRPM8	**- receptor de potencial transitório melastatina 8**
v.o.	**– via oral**
µl	**– microlitro**
µmol	**– micromol**
µM	**– micromolar**

ºC	**– graus Celsius**
5-HT	**– 5-hidroxitriptamina**

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO 22

1.1. DOR E INFLAMAÇÃO 22

2. JUSTIFICATIVA 27

2.1. TERAPÊUTICA ATUAL NA DOR E INFLAMAÇÃO 27

2.2. PLANTAS MEDICINAIS NA TERAPÊUTICA DA DOR E INFLAMAÇÃO 29

3. OBJETIVOS 32

3.1. OBJETIVO GERAL 32

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS 32

4. MATERIAL E MÉTODOS 33

4.1.MATERIAL VEGETAL 33

4.2 PREPARAÇÃO DO EXTRATO 33

4.3 ANIMAIS 33

4.4. TOXICIDADE AGUDA E "SCREENING" HIPOCRÁTICO 34

4.5. AVALIAÇÃO DA PERFORMACE MOTORA 34

4.6. TESTE DA PLACA QUENTE OU "HOT PLATE" 34

4.7. TESTE DA FORMALINA 35

4.8. AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO ÓXIDO NÍTRICO NA ANTINOCICEPÇÃO DO EHMe 35

4.9. AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA GLUTAMATÉRGICO NA ANTINOCICEPÇÃO DO EHMe 36

4.10. AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DE RECEPTORES ASSOCIADOS À CANAIS IÔNICOS – TRPs (TRPV-1; TRPA-1, TRPM-8 e ASIC) NA ANTINOCICEPÇÃO DO EHMe ... 36

4.11. AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA OPIODÉRGICO NA ANTINOCICEPÇÃO DO EHMe: 36

4.12. DETERMINAÇÃO DA MOTILIDADE INTESTINAL 37

4.13. AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DE RECEPTORES OPIÓIDES NA REDUÇÃO DA MOTILIDADE INTESTINAL 37

4.14. EDEMA DE ORELHA INDUZIDO PELO XILOL 37

4.15. EDEMA DE ORELHA INDUZIDO POR ÁCIDO ARAQUIDÔNICO (AA) 38

4.16. QUANTIFICAÇÃO DE PGE_2 DAS ORELHAS 38

4.17. QUANTIFICAÇÃO DE LTB_4 DAS ORELHAS 39

4.18. EDEMA DE PATA INDUZIDO PELA CARRAGENINA 39

4.19. AVALIAÇÃO DO EFEITO GASTROPROTETOR DO EHMe NO MODELO DE ÚLCERA GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL 39

4.20. AVALIAÇÃO DO EFEITO GASTROPROTETOR DO EHMe NO MODELO DE ÚLCERA GÁSTRICA INDUZIDA POR INDOMETACINA 40

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA 40

6. RESULTADOS 40

6.1. TOXICIDADE AGUDA E "SCREENING" HIPOCRÁTICO 40

6.2. AVALIAÇÃO DA PERFORMANCE MOTORA 42

6.3. TESTE DA PLACA QUENTE OU "HOT PLATE" 43

6.4. TESTE DA FORMALINA 46

6.5. AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA NITRÉRGICO NA ANTINOCICEPÇÃO DO EHMe 47

6.6. AVALIAÇÃO DO SISTEMA GLUTAMATÉRGICO NA ANTINOCICEPÇÃO DO EHMe 49

6.7. AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DE RECEPTORES ASSOCIADOS A CANAIS IÔNICOS - TRPs (TRPV-1; TRPA-1 E TRPM-8) E ASIC NA ANTINOCICEPÇÃO. 49

6.8. AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DE RECEPTOR OPIÓIDE NA ANTINOCICEPÇÃO DO EHMe 51

6.9. DETERMINAÇÃO DA MOTILIDADE INTESTINAL 53

6.10. AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DE RECEPTORES OPIÓIDES NA REDUÇÃO DA MOTILIDADE INTESTINAL 53

6.11. EDEMA DE ORELHA INDUZIDO PELO XILOL 54

6.12. EDEMA DE ORELHA INDUZIDO POR ÁCIDO ARAQUIDÔNICO 55

6.13. QUANTIFICAÇÃO DE PGE_2 DAS ORELHAS 56

6.14. QUANTIFICAÇÃO DE LTB_4 DAS ORELHAS 56

6.15. EDEMA DE PATA INDUZIDO PELA CARRAGENINA 57

6.16. AVALIAÇÃO DO EFEITO GASTROPROTETOR DO EHMe NO MODELO DE ÚLCERA GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL 58

6.17. AVALIAÇÃO DO EFEITO GASTROPROTETOR DO EHMe NO MODELO DE ÚLCERA GÁSTRICA INDUZIDA POR INDOMETACINA 58

7. DISCUSSÃO 59

8. CONCLUSÃO 77

9. REFERÊNCIAS 78

10. ANEXOS 104

1.INTRODUÇÃO

1.1. DOR E INFLAMAÇÃO

A dor é uma experiência complexa, uma qualidade sensorial subjetiva e pessoal, difícil de ser descrita e interpretada, pois inclui não só a codificação e processamento neural de estímulos nocivos, denominado nocicepção, como também componentes cognitivos, afetivos e emocionais (Julius & Basbaum, 2001; Schaible & Richter, 2004; Neugebauer et al*.,* 2009). Além disso, a sensação de dor não necessariamente requer experiência prévia para ser percebida (Silva, 2011).

A propagação da dor é iniciada com a ativação dos nociceptores (neurônios sensoriais primários especializados) por estímulos nocivos como calor, pressão mecânica intensa e substâncias químicas irritantes que são capazes de causar lesão tecidual (Sherrington, 1906; Basbaum & Jessel, 2000). Esses estímulos nocivos sensibilizam os nociceptores encontrados em diversos tecidos como pele, mucosas, tecidos conjuntivo de órgãos viscerais, cápsulas articulares, periósteo, músculos, tendões, dentre outros, diminuindo assim o limiar de excitabilidade e aumentando a magnitude da resposta aos estímulos supralimiares, transformando-se em potenciais de ação que serão transmitidos para o sistema nervoso central (Besson, 1999; Almeida, 2004).

Os nociceptores são extremamente heterogêneos, diferindo quanto, aos tipos de neurotransmissores que contem, os receptores e canais iônicos que expressam, a velocidade de condução, suas propriedades de resposta ao estímulo nocivo e sua capacidade de serem sensibilizados durante a inflamação, lesão e doença (Stucky et al*.,* 2001).

As fibras aferentes primárias ou nociceptores que inervam regiões da cabeça e do corpo surgem de corpos celulares presentes nos gânglios do trigêmio e da raiz dorsal, respectivamente, e podem ser classificados em 3 grupos, de acordo com sua anatomia e função (Julius & Basbaum, 2001). As **fibras Aβ** que são mielinizadas, de amplo diâmetro, rápida condutância e em sua maioria respondem por estímulos mecânicos inócuos, como um toque suave na pele (Meyer et al*.,* 2008). As **fibras Aδ** são pouco mielinizadas, com diâmetro de 2,0 a 6,0 μm, e propagam o impulso mais rapidamente (responsáveis pela dor rápida ou primeira dor). Existem duas principais subclasses de nociceptores Aδ e ambas respondem aos estímulos mecânicos intensos, mas podem ser diferenciados pela sua responsividade ao calor intenso (tipo I- ativadas a temperaturas de 53 °C; e tipo II - ativadas a 43°C) (Millan, 1999;

Basbaum et al., 2009). E as **fibras do tipo C** que são amielinizadas, com diâmetro de 0,4 a 1,2 μm, e capazes de propagar o impulso nervoso de maneira mais lenta (responsáveis pela dor lenta ou segunda dor). As terminações desse tipo de fibra são polimodais, termossensíveis ao calor e frio, sensíveis aos estímulos mecânicos e por substâncias químicas como acetilcolina, serotonina, histamina, bem como a capsaicina, e são consideradas fibras importantes no estudo da dor clínica (Almeida, 2004; Rocha et al., 2007; Stein et al*.,* 2009; Guyton & Hall, 2011).

A primeira sinapse realizada entre as fibras aferentes primárias e os neurônios de segunda ordem ocorre no corno dorsal da medula espinhal na via da dor, sendo a chave na regulação da transmissão da nocicepção (Heinricher et al*.,* 2009). O corno dorsal sensibilizado é o fator mais importante na indução e na manutenção da nocicepção. A sensibilização do corno dorsal ocorre devido à liberação pré-sináptica de mediadores, tais como glutamato, substância P e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), que atuam sobre seus respectivos receptores e agem sinergicamente para promover a excitabilidade neuronal no corno dorsal através de mecanismos que envolvem, por exemplo, aumento da síntese de óxido nítrico (NO) (Sakurada et al., 1996), prostaglandinas, IL-1β e TNF-α (Carvalho & Lemonica, 1998).

O glutamato quando liberado pelas fibras aferentes primárias atua instantaneamente em receptores glutamatérgicos (NMDA - N-metil-D-aspartato, AMPA - ácido-α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiônico, cainato e metabotrópicos), estimulam a atividade de enzimas intracelulares e a produção de segundos mensageiros hiperalgésicos, tal como o NO (Beirith et al*.,* 2002). Esta ação persiste somente por alguns milissegundos, gerando uma sensação de dor rápida. Já a substância P é liberada mais lentamente, tendo sua concentração aumentada em um período de segundos ou mesmo minutos, sugerindo uma sensação de dor mais duradoura (Guyton & Hall, 2011). O CGRP juntamente com a substância P pode agir em outras células-alvo como mastócitos e músculo liso vascular, produzindo inflamação neurogênica com sintomas como rubor, edema e hipersensibilidade (Richardson & Vasko, 2002).

Os axônios dos neurônios de segunda ordem encontrados no trato espinotalâmico constituem os feixes aferentes que transmitem os impulsos nociceptivos às estruturas do tronco cerebral e diencéfalo incluindo o tálamo, substância cinzenta periaquedutal (PAG), hipotálamo, entre outros (Almeida et al*.,* 2004). No sistema tálamo-cortical os neurônios de

segunda ordem fazem sinapse com os de terceira ordem que transmitem o estímulo doloroso ao córtex somatossensorial no qual ocorre a percepção da dor (Schaible & Richter, 2004).

Porém, o corno dorsal da medula espinhal sofre a influência da via supraespinal (ou via descendente) do controle da nocicepção, que se origina em muitas regiões cerebrais, tais como a PAG, núcleos medianos da rafe e medula ventromedial rostral (RVM) . Todas as regiões citadas possuem papéis críticos na determinação da dor crônica e aguda (Heinricher et al., 2009). O sistema PAG-RVM é importante no comportamento e nos aspectos terapêuticos da dor, uma vez que pode suprimir a informação nociceptiva através de interneurônios inibitórios que liberam opióides endógenos no corno dorsal da medula espinhal. Este sistema é alvo de alguns medicamentos analgésicos como os compostos opióides, inibidores de ciclooxigenase e canabinóides (Basbaum & Jessel, 1999; Hohmann et al., 2005; Leith et al., 2007).

Quando os estímulos nocivos responsáveis pela dor tais como agentes químicos, mecânicos, térmicos, bactérias ou processo imunológicos, provocam lesões teciduais diversas, ocorre a liberação de substâncias pelos tecidos danificados, resultando em alterações locais, chamadas de inflamação (Guyton & Hall, 2011).

A inflamação foi caracterizada clinicamente em 30 a.C. pelo médico romano Aulus Cornélius Celsus por quatro sinais cardinais: calor, rubor, edema e dor. Posteriormente, Cláudio Galeno acrescentou a perda da função do membro afetado. A inflamação tem como objetivo levar a resolução do dano tecidual, contribuindo assim para o processo de homeostasia. Porém, quando esta resposta não é modulada, ocorre a exacerbação do processo, e o quadro pode se tornar crônico, culminando com a perda de função do tecido e diminuição da qualidade de vida do organismo (Gilroy et al., 2004).

A resposta inflamatória consiste em dois componentes principais: uma reação vascular e uma reação celular. Muitos tecidos e células estão envolvidos nessas reações, incluindo o fluido e proteínas do plasma, as células circulantes, os vasos sanguíneos e os componentes celulares e extracelulares do tecido conjuntivo, além da ativação enzimática, sensibilização e ativação de receptores, lise e reparo tecidual. (Carvalho & Lemônica, 1998; Kumar et al., 2005).

As alterações no fluxo sanguíneo e no calibre vascular se iniciam logo após a lesão, na seguinte ordem: vasodilatação, induzida principalmente pela histamina, bradicinina e NO,

responsável pelo calor e rubor; e extravasamento vascular de fluido rico em proteínas, responsável pelo edema (Kumar et al., 2005).

A vasodilatação e o extravasamento de fluidos são acompanhados pela marginação, rolamento, adesão e transmigração endotelial de leucócitos para a área lesada, sendo uma das características da resposta inflamatória associada à dor (Sherwood & Toliver-Kinsky, 2004; Gosslau et al*.,* 2011). Os leucócitos liberam substâncias algiogênicas, dentre elas a acetilcolina, bradicinina, histamina, serotonina, substancia P, PGE_2, leucotrienos, TNF-α, IL-1β, e adenosina monofosfato cíclico (AMPc). Essas substâncias sensibilizam os nociceptores que transmitem o impulso nervoso para o sistema nervoso central e também liberam a substância P no sítio da inflamação, um neuropeptídeo de primeira ordem que estimula a vasodilatação juntamente com a continuidade do próprio processo inflamatório (Taiwo & Levine,1991; Guieu et al., 1996; Millan, 1999; Calixto et al., 2000; Calixto et al., 2001;Teixeira, 2001).

Outro mediador inflamatório liberado no sítio da inflamação é o NF-κB, um fator de transcrição gênica responsável por regular a produção de citocinas como IL-1β, IL-6, iNOS, COX-2 e TNF-α (Barnes & Karin, 1997, Tak & Firestein, 2001). O TNF-α pode induzir a dor diretamente ou via estimulação da síntese de IL-1β, IL-6 e/ou IL-8 (Cunha et al., 2005). A interleucina IL-1β é conhecida pela modulação na excitabilidade neuronal via receptores TRPV-1, canal de sódio, GABA e NMDA (Schafers & Sorkin, 2008). A fosforilação de receptores NMDA sinaliza a transmissão da dor, e essa fosforilação tem sido atribuída a citocina IL-1β (Breenner et al., 2004).

Os leucócitos também são responsáveis por produzir e liberar citocinas anti-inflamatórias. Entre elas estão a IL-10 e o fator de crescimento transformador beta (TGF- β), que interagem com outros fatores, como hormônios adrenocorticais, proteínas de fase aguda, temperatura, dentre outros, mediando a resposta inflamatória através da inibição da ativação de macrófagos e a síntese de citocinas pró-inflamatórias (Oke & Tracey, 2009)

O ácido araquidônico (AA) liberado a partir de fosfolipídeos de membrana através da enzima fosfolipase A2 (ativada por diversos estímulos: químico, inflamatório, traumático ou mitogênico), possui um papel regulador na fisiologia celular e é fundamental na inflamação, uma vez que serve como substrato para diferentes enzimas produtoras de eicosanóides (Balsinde et al., 1998; Kummer & Coelho, 2002). Este ácido graxo é metabolizado por três sistemas enzimáticos principais: a cicloxigenase (COX), responsável pela produção de

prostaglandinas (PGs), tromboxanos e prostaciclinas; a lipoxigenase (LOX), que produz leucotrienos e lipoxinas; e as epoxigenases do citocromo P-450, que originam os ácidos epoxieicosatrienóicos (EET) (Spector et al*.,* 2004; Rocha et al, 2007).

A COX possui duas isoformas principais: COX-1, a isoforma constitutiva, responsável pela produção de prostaglandinas (PGs) que controlam os processos fisiológicos normais (Lages et al., 1998); COX-2, isoforma induzida que tem sua expressão aumentada nos processos inflamatórios (Smith et al., 2000), e a COX-3, isoforma funcional variante da COX-1 responsável pela produção de susbtâncias anti-inflamatórias (Willoughby et al, 2000; Schwab et al, 2003).

As prostaglandinas, metabólitos derivados da ação das COXs sobre o AA, desenvolvem ações importantes nos processos fisiológicos normais e também nos processos patológicos, através de receptores EP1, EP2, EP3 e EP4 (Kobayashi & Narumiya, 2002). Os efeitos biológicos das prostaglandinas incluem a regulação vascular, modulação das funções neuronais e renais, o processo de ovulação, a proteção da mucosa gástrica, a dor e inflamação (Samuelsson et al*.,* 2007; Levy et al., 2001; Rocha et al., 2007; Wallace, 2008).

A PGE_2, produto da reação de metabolização do AA pela COX-1 e 2 catalisada pela mPGES-1 (PGE sintase de membrana-1) (Samuelsson et al*.,* 2007), é responsável pela vasodilatação e pelo edema no processo inflamatório, e também age como um mediador lipídico importante no processamento dos sinais dolorosos periféricos ou centrais, uma vez que os receptores de PG são expressos nas fibras sensoriais (Zeilhofer & Brune, 2006; Vanegas & Schaible, 2001).

Os leucotrienos são metabólitos oxigenados derivados do ácido araquidônico através da via da 5-lipoxigenase (5-LOX). A enzima 5-LOX em associação com a proteína de ativação (5-LAP), cataliza os primeiros dois passos de conversão do AA em leucotrieno A_4 (LTA_4), que subsequentemente são metabolizados pela LTA_4-hidrolase nos neutrófilos à LTB_4, e pela LTC_4-sintase nas plaquetas à LTC_4 (Lewis et al.,1990; Kumar et al., 2005). Eles são potentes mediadores inflamatórios, formados nos pulmões, nas plaquetas, nos mastócitos e nos leucócitos (neutrófilos e macrófagos), e estão envolvidos em diversos processos fisiopatológicos (Henderson, 1994, Eppler et al*.,* 2007), além de atuarem como importante fator quimiotático tanto para neutrófilos quanto para macrófagos (Rang & Dale, 2007) . O LTB_4 também modula a dor causando hiperalgesia (Guerrero et al., 2013)

A resposta inflamatória está intimamente ligada ao processo de reparo através de uma série de eventos que tentam reparar e reconstruir o tecido danificado (Rocha et al., 2007). A falha, nestes processos, faz com que o processo inflamatório agudo persista, levando a um estado inflamatório crônico, que envolve a formação de granuloma, necrose e fibrose (Medzhitov, 2008). A persistência do processo inflamatório culmina no desenvolvimento de algumas doenças e distúrbios complexos como as doenças autoimunes e cardiovasculares, síndrome metabólica, processos neurodegenerativos e câncer (Sherwood & Toliver-Kinksy, 2004; Murakami & Hirano, 2012).

2. JUSTIFICATIVA

2.1. TERAPÊUTICA ATUAL NA DOR E INFLAMAÇÃO

A classe dos analgésicos opióides, ainda é bastante prescrita para tratamento clínico em casos de dor severa aguda, dor pós-operatória e crônica, apesar dos conhecidos efeitos adversos, como náusea, constipação, depressão respiratória, tolerância, vício e, em longo prazo hipogonadismo, osteoporose, imunossupressão e hiperalgesia (Mao, 2002; Yunes, 2005; Cunha et al*.,* 2010; Raghavan et al*.,* 2011). Estima-se que 205 milhões de analgésicos opióides, entre eles a codeína, fentanil, hidrocodona, oxicodona, oximorfina, tramadol e propoxifeno, foram prescritos em 2008 nos EUA (McDonald et al*.,* 2012).

Entretanto, a abordagem terapêutica mais comum para reduzir a dor e a inflamação envolve o uso de drogas anti-inflamatórias não esteroidais (AINEs), como aspirina ou ibuprofeno (Kummer & Coelho, 2002; Basbaum, 2009; McGettigan & Henry, 2013).

Em 2004, nos Estados Unidos, mais de 111 milhões de prescrições de AINEs foram feitas (Shaheen et al*.,* 2006), enquanto que na Europa os AINEs correspondem a 7.7% do total de prescrições, não estando incluidas neste compto as vendas de AINEs isentos de prescrição (Laine, 2001; Jones, 2001). No Brasil, diferentes estudos de utilização de medicamentos descrevem os AINEs entre os mais utilizados pela população, e a automedicação para o tratamento da dor é altamente prevalente no país (Beria et al., 1993; Noronha, 1999; Demétrio et al.,2012).

Os AINEs apresentam atividade analgésica, antipirética e anti-inflamatória (Teixeira, 2001), e são capazes de reduzir a dor inflamatória e a hiperalgesia principalmente pela inibição da COX-1 e COX-2, envolvidas na síntese de prostaglandinas (Basbaum et al., 2009), produzindo alívio da dor por um período significativo (Katzung, 2007). Os AINEs

ainda possuem mecanismos adicionais de ação, incluindo a inibição da quimiotaxia e a produção de citocinas, relacionados com o mecanismo de inibição da síntese de PGE2, responsável por induzir a produção de IL-6 por monócitos (Rhind et al., 2002), além de serem capazes de inibir a ação de mastócitos e bloquear a atuação do fator de transcrição NF-κB (Carr & Goudas, 1999; Mortaz et al., 2005).

As reações adversas provocadas pelos AINEs já são bem compreendidas, estando amplamente relacionadas com o mecanismo de ação (Grosser et al., 2006). A inibição da COX-1 leva ao aparecimento de efeitos gastrointestinais que podem variar de dispepsia a sangramentos do estômago e duodeno, ativação de doenças inflamatórias intestinais quiescentes e dano tecidual, como úlceras, no trato gastrointestinal. As úlceras gástricas são decorrentes do efeito tópico e sistêmico de alguns AINEs que promovem a alteração do pH, redução da secreção de muco e bicarbonato, alterações microvasculares e indução de infiltração leucocitária na mucosa gástrica (Akiko et al., 2001; Wallace, 2008). Normalmente estes efeitos aparecem após um longo período de uso (Brenol et al., 2000), e podem ser agravados por fatores como estresse, alcoolismo, fumo e infecção por *Helicobacter pylori* (Konturek et al., 2005a). Os danos no trato gastrointestinal, provocados pelos AINEs, podem ser reduzidos com a administração concomitante deste medicamento com inibidores da bomba de prótons (Rostom et al., 2009).

Carvalho & Lemonica, (1998) descrevem que os efeitos terapêuticos dos AINEs foram relacionados com a inibição da COX-2, portanto, surgiu no mercado os inibidores específicos da COX-2 (Coxibes) que teoricamente impediriam o processo inflamatório sem causar os efeitos colaterais indesejáveis, principalmente os distúrbios gastrointestinais, advindos do bloqueio inespecífico da COX (Kummer & Coelho, 2002; Monteiro et al., 2008).

Em 1999, baseado em resultados de estudos clínicos, o FDA aprova a comercialização do celecoxibe e o rofecoxibe, drogas inibidoras seletivas da COX-2, que atingiram US$ 10 bilhões em vendas, por serem eficazes no tratamento de sinais e sintomas de osteoartrite e artrite reumatoide, da dor aguda em adultos e dismenorreia (Bombardier, 2002; Fitzgerald, 2004).

Entretanto, o mecanismo de inibição da COX-2 promovidos pelos Coxibes acarreta a diminuição da produção de prostaciclinas (PGI_2) antitrobóticas e vsodilatadoras produzidas no endotélio (Fitzgerald, 2003), predispondo os pacientes a eventos cardiovasculares (Saraiva, 2007). Além disso, Konturek et al., 2005b demostraram que as prostaglandinas derivadas da

COX-2 podiam ser geradas nas bordas da úlcera gástrica, desenvolvendo papel importante na ativação de mecanismos de cicatrização e reparo da mucosa.

Em 2004 a Merck Sharp & Dohme anunciou a retirada do rofecoxib do mercado mundial em razão do risco de infarto do miocárdio e acidentes vasculares cerebrais. No Brasil são comercializados 6 medicamentos do grupo dos coxibes, que em 2008, foram incluídos na Lista C1 (substâncias sujeitas a controle especial) da Portaria 344/98, pelo decreto da RDC n° 79/2008 pela ANVISA (ANVISA, 2008).

Estes dados demonstram que o surgimento dos Coxibes representou grande avanço farmacológico no tratamento de processos inflamatórios e dolorosos agudos e crônicos. No entanto, persistem os efeitos adversos que tornam as terapias atuais insuficientes, sendo essencial o desenvolvimento de novas moléculas potencialmente úteis no tratamento da dor e inflamação (Carvalho & Lemonica, 1998; Bourinet et al., 2005).

2.2. PLANTAS MEDICINAIS NA TERAPÊUTICA DA DOR E INFLAMAÇÃO

Os produtos naturais, principalmente os de origem vegetal, tem sido desde a antiguidade uma importante fonte de ativos terapêuticos. As plantas são uma fonte importante de biomoléculas ativas, muitas das quais se constituem em modelos para a síntese de um grande número de fármacos, podendo contribuir para o desenvolvimento de novas alternativas terapêuticas (Coutinho et al., 2009; Simões et al., 2010).

Em muitos países do mundo, o uso de plantas medicinais representa uma das únicas alternativas para a assistencia primária a saúde das populações, sendo utilizadas para tratar diferentes patologias como bronquite, pneumonia, úlceras, diarreia, e diferentes condições inflamatórias, em particular, inflamações de pele (Sosa, 2002; Lima et al., 2006).

O Brasil possui grande biodiversidade, detendo 20-22% do total de plantas existente no planeta, e muitas plantas tem sido utilizada na forma de extratos brutos, infusões ou emplastros para tratar de diferentes infecções. Estima-se que aproximadamente 80% da população brasileira encontra, especialmente nas plantas medicinais, a principal ou a única fonte de recursos terapêuticos (Di Stasi, 1996; Calixto, 2000; Lima et al., 2006,). O reconhecimento do uso de plantas na medicina popular no Brasil foi evidenciado em 2010 com a aprovação de uma lista com mais de 60 plantas medicinais com ação terapêutica comprovada pela Associação Nacional de Vigilância Sanitária, e que podem ser utilizadas pelo sistema único de saúde (SUS) do país na assistência primária a saúde (ANVISA, 2010).

Aproximadamente 25-30% de todas as drogas disponíveis no mercado são derivados de produtos naturais, incluindo plantas, animais e micro-organismos (Calixto, 2005), e aproximadamente 13% apresentam potencial efeito anti-inflamatório (Calixto, 2000).

As moléculas farmacologicamente ativas derivadas de plantas são comumente os metabólitos secundários produzidos por elas a partir de metabólitos primários como os aminoácidos (Duffy, 2012). Dentre eles destacam-se os terpenos, taninos, alcalóides, lignanas, saponinas, cumarinas e flavonóides (Simões et al., 2010), sendo que todos apresentam potencial farmacológico no tratamento da dor e inflamação (Yunes, 2005;Yuan et al*.,* 2006). Entre estes compostos os flavonóides representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural e são encontrados em frutas, vegetais, sementes, cascas de árvores, raízes, talos, flores e em seus produtos de preparação, tais como os chás e vinhos (Coutinho et al., 2009; Simões et al*.,* 2010). Os flavonóides apresentam um núcleo característico C6-C3-C6 (Kanadaswami, 2005), e variações heterocíclicas nos anéis dão origem a flavonóis, flavonas, catequinas, flavononas, antocianidinas e isoflavonóides (Rotelli et al*.,*2003). Os flavonóides exibem efeitos antioxidantes e sequestrantes de radicais livres, antimicrobiano, antiviral, antiulcerogênico, anti-inflamatório, antinociceptivo, hipolipidêmico e antineoplasico (Nijveldt et al., 2001). Estudos mostram que flavonóides como a apigenina (flavona) e seus derivados glicosilados possuem atividade anti-inflamatória, anticarcinogênica, antioxidante e antinociceptiva (Zyian et al*.,* 2007; Gerritsen et al., 1995; Liang et al., 1999; Thirugnanasambantham et al., 1990; Fernandez et al*.,* 2001; Manthey et al*.,* 2001; Pietrovski et al*.,* 2006).

Além dos flavonóides, os terpenos também merecem atenção, já que correspondem a 55% dos metabólitos secundários. Eles são constituídos de unidades de isopreno e ao sofrerem modificações, como adição de um oxigênio, passam a ser denominados terpenóides, servindo de base para outros metabólitos como hormônios vegetais, carotenoides, látex, entre outros (Zwenger & Basu, 2008). Triterpenos pentacíclicos como a α e β-amirina são encontrados em diversas plantas espalhadas por regiões tropicais, e trabalhos tem mostrado seus efeitos antinociceptivo, anti-inflamatório, antipruriginoso, hepato e gastroprotetor *in vivo* (Oliveira et al*.,* 2004a; 2004b; Otuki et al*.,* 2005a;2005b).

A família Fabaceae possui 482 gêneros e 12000 espécies de ampla distribuição nas regiões temperadas e tropicais (Di Stasi & Hiruma-Lima, 2002), e as espécies desta família são ricas

em flavonóides, alcalóides, saponinas e terpenos (Harbone et al., 1971) com interessantes atividades farmacológicas e terapêuticas (Al Meshal et al., 1982).

Segundo Lewis, (2005), o gênero *Machaerium* (Fabaceae) produz principalmente flavonóides como isoflavonas, pterocarpanos, neo- flavonóides, flavanonas, isoflavanas, chalconas e ainda, benzoquinonas, arilcoumarinas e cinamilfenóis.

De acordo com a literatura, algumas espécies de *Machaerium* são de uso etnofarmacológico para tratamento da diarreia, distúrbios menstruais, tosse e aftas ulcerosas na boca (Medeiros & Zanon, 2000). A espécie *Machaerium hirtum* (Vell.) Stellfeld (Fig. 1) encontra-se amplamente distribuída na região do Cerrado brasileiro. Este bioma é rico em espécies com substâncias ativas, utilizadas pelas comunidades locais para tratar várias doenças (Albernaz et al.,2010; Hansen et al., 2010). *M. hirtum* é conhecido popularmente como "barreiro", bico-de-andorinha e "jacarandá bico de pato" (Lorenzi, 1998) e suas cascas são utilizadas popularmente contra úlcera (Bieski et al., 2012), diarreia e câncer (Pott & Pott, 2004).

O perfil fitoquímico do extrato hidroalcoólico das entrecascas se caracteriza pela presença de uma mistura de triterpenos (α-β-amirina), alantoína, e flavonas C-glicosilada (apigenina) (Sannomiya et al.,2011; Bento et al., 2011).

Em estudos *in vivo* previamente realizados em nosso laboratório, observou-se que o tratamento oral de camundongos Swiss com o extrato hidroalcoólico da entrecasca da *Machaerium hirtum* nas doses de 125 e 250mg/Kg produziram potente efeito antinociceptivo contra o agente químico nociceptivo (formalina) em ambas as fases do teste. Ignoato et al., (2012) demonstrou que o extrato metanólico bruto das folhas e galhos de *Machaerium hirtum*, bem como as frações possuem efeito anti-inflamatório em modelos animais. Estes dados sugerem que a *Machaerium hirtum* pode ser uma nova alternativa terapêutica em processos de dor e inflamação, sendo necessária a realização de testes mais aprofundados para caracterizar os mecanismos de ação envolvidos com este efeito.

Fig.1. *Machaerium hirtum* (Vell.) Stelfelld

http://www6.ufrgs.br/fitoecologia/florars/open_sp.php?img=2144

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o efeito antinociceptivo, anti-inflamatório e gastroprotetor do extrato hidroalcoólico das entrecascas de *Machaerium hirtum* (Vell.) Stellfeld

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito da administração do extrato hidroalcoólico das entrecascas de *Machaerium hirtum* sobre parâmetros de toxicidade aguda e comportamentais através do *screening* hipocrático;
- Avaliar a atividade analgésica e/ou anti-inflamatória *in vivo* do extrato utilizando o modelo de nocicepção induzida por agentes químicos e térmicos em camundongos.
- Identificar possíveis mecanismos de ação analgésica exercidos pelo extrato através da investigação do sistema nitrérgico, sistema glutamatérgico, os canais iônicos sensíveis ao ácido, os receptores TRPs e do sistema opiodérgico.
- Avaliar o efeito do extrato sobre a performance motora de camundongos no modelo de Rota Rod e também sobre a motilidade intestinal .
- Determinar o potencial efeito antiedematogênico e anti-inflamatório do extrato em modelo de inflamação aguda induzida pela carragenina, xilol e ácido araquidônico, e caracterizar os mediadores envolvidos através dosagens bioquímicas.
- Determinar se o extrato exerce efeito gastroprotetor através dos modelos de úlcera induzida por etanol ou indometacina.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1.MATERIAL VEGETAL

As entrecascas de *Machaerium hirtum* (Vell.) Stellfeld foram coletadas na cidade de Botucatu - São Paulo, Rodovia João Hipólyto Martins, km 3, Brasil, em dezembro de 2012 pelo Prof. Dr. Luis Fernando Rolim de Almeida do Departamento de Botânica da UNESP de Botucatu, e identificadas pelo mesmo. Um voucher de *M. hirtum* (BOTU 027643) foi depositado no Herbário do Departamento de Botânica do Instituto de Biociências de Botucatu na Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho" – UNESP, São Paulo, Brasil (BOTU).

4.2 PREPARAÇÃO DO EXTRATO

As entrecascas, secas ao ar, de *M. hirtum* (500g) foram trituradas em moinho de faca e colocadas em contato com o solvente hidroalcoólico (água: etanol 30:70 p/v). A extração foi realizada por maceração durante sete dias com solvente , protegida da luz e percolada em 20 gotas/min. Em seguida foi realizada a filtração do conteúdo e o extrato foi concentrado por evaporação a vácuo com rotaevaporador a 45°C. Ao final foi obtido um resíduo negro (79,1g) designado como **extrato hidroalcoólico de *Macheaerium hirtum* (entrecascas) (EHMe)**. O rendimento do extrato foi de 15,8% p/p da planta moída. O preparo do extrato bem como a caracterização fitoquímica do EHMe foram realizados pelo laboratório da Profa Dra Miriam Sannomyia na Escola de Artes, Ciências e Humanidade da USP de São Paulo-SP. Posteriormente o EHMe foi solubilizado em solução aquosa de cloreto de sódio 0.9% (salina) para a realização dos experimentos.

4.3 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos Swiss machos e fêmeas (25-40g) e ratos Wistar machos (160 a 200g) para os experimentos, provenientes do Biotério Central da UNESP-Botucatu e do Biotério Anilab (Paulínia-SP) aclimatados às condições do biotério setorial por pelo menos sete dias antes da manipulação experimental, sob temperatura (23± 2°C) e ciclo claro-escuro de 12 horas, controlados. Os animais foram alimentados com ração Presence® e água *ad libitum*. Todos os experimentos obedeceram ao protocolo experimental que foi submetido ao Comitê de Ética na Experimentação Animal, do Instituto de Biociências da UNESP – Botucatu (**Protocolo número 367-CEUA – Anexo 1**). Após a realização dos experimentos os animais foram eutanasiados por método químico (agente inalatório- CO_2) ou

físico (deslocamento cervical), aprovados pelo CONCEA (Brasil - Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação, 2013).

4.4. TOXICIDADE AGUDA E "SCREENING" HIPOCRÁTICO *(*Brito, 1994*)*

Foram utilizados camundongos Swiss albinos machos e fêmeas (n=10), divididos em grupos: um grupo macho ou fêmea tratados com o veículo (salina) e um grupo macho ou fêmea tratados com uma dose aguda de 5000 mg/Kg do EHMe. Os tratamentos foram realizados oralmente e os parâmetros comportamentais (Anexo 2 e 3), descritos por Brito (1994) – foram observados aos 30, 60, 120, 240 e 360 min. após a administração do extrato, bem como foi observado o número de mortes. O peso corporal dos animais foi avaliado diariamente por 14 dias após o início dos experimentos. No décimo quarto dia, os animais foram mortos em câmara de CO2 e os seguintes órgãos foram retirados: coração, fígado, pulmão, baço, rins, testículos, ovários e úteros. Estes órgãos foram pesados para se realizar uma determinação analítica e comparativa em relação aos animais submetidos ao tratamento com o veículo indicando ou não efeito tóxico agudo dos extratos vegetais.

4.5. AVALIAÇÃO DA PERFORMACE MOTORA (Dunham & Miya, 1957 com modificações):

Com a finalidade de excluir a possibilidade de um resultado falso positivo (ação relaxante muscular ou sedativo) do efeito do EHMe na avaliação da ação antinociceptiva, os camundongos foram submetidos ao teste de atividade forçada - rota-rod (Ugo Basile), que consiste em uma barra giratória com o diâmetro de 2,5 cm subdividida em compartimentos, baseados em Dunham & Miya (1957). A rotação da barra tem velocidade constante de 06 revoluções por min. Os animais foram pré-selecionados 24 horas antes do experimento, eliminando-se os camundongos que não permaneceram na barra por 3 períodos consecutivos de 60 segundos. Os animais (n=8-10) foram tratados com EHMe (62.5 mg/Kg v.o) ou veículo (salina) 1 hora antes, ou com diazepam (2mg/Kg i.p, controle positivo) 30 min antes de serem submetidos ao teste de performance motora. Foi analisado o número de quedas de cada animal durante os 3 min de observação.

4.6. TESTE DA PLACA QUENTE OU "HOT PLATE" (Eddy & Leimback, 1953*).*

Esse modelo foi utilizado para avaliar o possível efeito de *Machaerium hirtum* na dor neurogênica. Para isso, a placa (Insight®) foi aquecida e mantida a temperatura de 50±1°C ou 56± 1°C. Os camundongos foram colocados em um cilindro de vidro de 24 cm de diâmetro em uma superfície quente e o tempo para que o animal tivesse a resposta de lamber,

chacoalhar, retirar a pata ou pular foi registrado como tempo de latência. Os animais foram previamente selecionados 24h antes do experimento, estabelecendo-se um padrão de tempo de latência (5-15s), dependendo da temperatura a que foram expostos. Além disso, foi determinado o tempo limite de 30 s para que não houvesse lesão tissular. Os animais (n=8-10) foram tratados com veículo (salina) ou EHMe (62.5mg/Kg v.o) 1 hora antes, e morfina (5 mg/Kg s.c) 30min antes do início da avaliação (60, 90, 120 e 150min).

4.7. TESTE DA FORMALINA (Hunskaar & Hole, 1987; Tjolsen, 1992 com modificações).

O modelo mais específico de dor aguda é caracterizado pelo teste de formalina. Este modelo possui uma resposta distinta (bifásica) de resposta de dor: 1) Fase inicial: inicia-se logo após a administração de formalina e desaparece após aproximadamente 5 min. É uma fase indicativa de dor neurogênica (mecanismo central), que sofre ação principalmente de drogas narcóticas (opióides). 2) Fase tardia: inicia-se entre 15-30min após administração de formalina e permanece até cerca de 60min. Esta fase é indicativa de dor inflamatória, e sofre ação de drogas periféricas (AINEs) e narcóticas. Foi utilizada uma câmara de observação, que consiste em um funil com 20 cm de diâmetro. Cada animal foi previamente colocado no funil câmara por 30 min antes da injeção intraplantar de formalina para permitir aclimatação com o novo ambiente. Os animais (camundongos machos, n=8-10) foram pré-tratados oralmente com veículo (salina) e com o EHMe nas doses de 31.25, 62.5, 125, 250 e 500 mg/Kg. Após uma hora foi administrado 20 μL de solução de formalina 1 % em solução salina, injetada intraplantarmente na pata traseira direita. Logo após a injeção de formalina, os animais foram observados na câmara até 30 min. O tempo (segundos) que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada foi considerado como índice de nocicepção. Através deste teste foi selecionada a menor dose efetiva para a avaliação dos mecanismos de ação do EHMe.

4.8. AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA NITRÉRGICO NA ANTINOCICEPÇÃO DO EHMe (Santos et al., 1999 e Santos et al., 2005 com modificações).

Para a avaliação do papel do óxido nítrico na antinocicepção do extrato, os animais (camundongos machos, n=8-10) foram pré-tratados com L-arginina (substrato da síntese de NO) 500 mg/Kg (i.p) 30 min antes dos tratamentos orais veículo (salina) ou EHMe (62.5mg/Kg). Como controle da reversão da antinocicepção do EHMe foi administrado L-NAME (inibidor da óxido nítrico sintase) 65 mg/Kg (i.p) 30 min após a injeção de L-arginina e os animais foram submetidos ao teste da formalina como descrito anteriormente.

4.9. AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA GLUTAMATÉRGICO NA ANTINOCICEPÇÃO DO EHMe (Beirith et al., 2002; Meotti et al., 2010).

Com o intuito de avaliar o papel do sistema glutamatérgico na atividade antinociceptiva do EHMe, foi administrado injeção intraplantar de 20 µl de 30 µmol de solução de glutamato (pH=7,0). Os animais (camundongos machos, n=8-10) foram tratados por via oral com veículo (salina) ou EHMe (62.5mg/Kg), foram observados por 15 min seguidos. O tempo (segundos) que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada foi considerado como índice de nocicepção.

4.10. AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DE RECEPTORES ASSOCIADOS À CANAIS IÔNICOS - TRPs (TRPV-1; TRPA-1, TRPM-8 e ASIC) NA ANTINOCICEPÇÃO DO EHMe (Sakurada et al., 1992 com modificações; Andrade et al., 2008, Bautista et al., 2006; Baggio et al., 2012 com modificações).

Para investigar se na atividade antinociceptiva do EHMe existe a participação dos receptores TRPs (TRPV-1; TRPA-1; TRPM-8) ou dos canais iônicos sensíveis ao ácido (ASIC), os animais (camundongos machos, n=8-10) receberam injeção intraplantar de 20 µl de capsaicína (agonista TRPV-1) (2µg/pata), cinamaldeído (agonista TRPA-1) (40 nmol/pata), mentol (agonista TRPM-8) (2µmol/pata) ou salina acidificada (ativador de receptor TRPV1 e ASIC) (3% de ácido acético; pH=2.0/pata). Os animais foram tratados por via oral com veículo (salina) ou EHMe (62.5 mg/Kg), foram observados por 6 min seguidos (para capsaícina ou cinamaldeído) ou 20 min seguidos (para mentol ou salina acidificada). O tempo (segundos) que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada foi considerado como índice de nocicepção.

4.11. AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA OPIODÉRGICO NA ANTINOCICEPÇÃO DO EHMe *(*Santos et al., 1999 e Santos et al., 2005 com modificações*).*

Para avaliar a participação de receptores opióides na atividade antinociceptiva do EHMe os animais (camundongos machos, n=8-10) foram pré-tratados com naloxona (antagonista não seletivo de receptor opióide) 1 mg/Kg (i.p) 30 min antes aos tratamentos orais com veículo (salina) ou EHMe (62.5 mg/Kg) do teste da formalina como descrito anteriormente. Morfina 2,5 mg/Kg (s.c) foi utilizada para o controle da reversão da antinocicepção.

4.12. DETERMINAÇÃO DO EFEITO DO EHMe SOBRE A MOTILIDADE INTESTINAL (Baggio et al., 2003 com modificações).

Para a avaliação do efeito do EHMe sobre a motilidade intestinal os animais (camundongos machos, n=7), em jejum de 6h, foram tratados por via oral com veículo (salina) ou EHMe (62.5, 125 e 250 mg/Kg), e por via subcutânea com morfina 2,5mg/Kg (controle positivo). Trinta minutos após o tratamento com morfina e 1 hora após os tratamentos orais, os animais receberam por via oral carvão ativado (10% em solução salina - 10 ml/Kg). Meia hora após a administração do carvão, todos os animais foram mortos. O intestino delgado foi removido juntamente com o estômago, para a realização da medição do comprimento total do intestino e a distância percorrida (cm) pelo carvão ativado, para a obtenção da relação entre a distância percorrida e comprimento total do intestino.

4.13. AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DE RECEPTORES OPIÓIDES NA REDUÇÃO DA MOTILIDADE INTESTINAL (Baggio et al., 2003; Howd et al., 1978).

Com intuito de avaliar a participação dos receptores opióides no efeito redutor da motilidade intestinal pelo EHMe, os animais (camundongos machos, n=7), em jejum de 6h, foram pré-tratados com naloxona (15 mg/Kg i.p). Decorridos 15 min, os animais foram tratados por via oral com veículo (salina) ou EHMe (62.5 mg/Kg), e por via subcutânea com morfina 2,5mg/Kg (controle positivo).Trinta minutos após o tratamento com morfina e 1 hora após os tratamentos orais, os animais receberam carvão ativado 10% v.o. (10mL/Kg) como marcador e depois de 30min, foram mortos (Reddy et al., 2006). O intestino delgado foi removido juntamente com o estômago, para a realização da medição do comprimento total do intestino e a distância percorrida (cm) pelo carvão ativado, para a obtenção da relação entre a distância percorrida e comprimento total do intestino.

4.14. EDEMA DE ORELHA INDUZIDO PELO XILOL (Swingle et al., 1981 com modificações).

Para avaliar o efeito anti-edematogênico e anti-inflamatório do EHMe foi utilizado o modelo experimental de indução de edema com o uso tópico do xilol. A aplicação de xilol induz uma reação inflamatória cutânea na orelha do camundongo e causa significante aumento do peso da orelha tratada em comparação a não tratada com xilol. Para indução de edema de orelha, 40 µl de xilol foram aplicados topicamente na orelha direita dos camundongos machos (20 µl na face anterior da orelha, 20 µl na face posterior). A orelha esquerda é utilizada como controle. Os animais (n=8-10), submetidos ao jejum por 2 horas, foram tratados 2 horas antes da indução com dexametasona (5 mg/Kg, i.p) e uma hora antes

da indução do edema tratados por via oral com veículo (salina) ou EHMe (62.5, 125 e 250 mg/Kg). Após uma hora de indução do edema, os animais foram mortos e foi retirada uma secção circular (7 mm de diâmetro) de suas orelhas esquerda e direita com o auxilio de um puncher (perfurador). Logo em seguida as orelhas foram pesadas. O edema foi expresso pela diferença de massa (mg) entre a orelha direita e orelha esquerda.

4.15. EDEMA DE ORELHA INDUZIDO POR ÁCIDO ARAQUIDÔNICO (AA) (Young et al., 1984 com modificações).

Para avaliar a participação do AA na ação anti-inflamatória do EHMe, foi utilizado o modelo experimental de indução de edema com o uso tópico do AA. Para indução desse edema de orelha, 20 µl de AA diluído em acetona na concentração de 2mg/20µl, foram aplicados topicamente na orelha direita dos camundongos machos (10 µl na face anterior da orelha, 10 µl na face posterior). A orelha esquerda foi utilizada como controle. Os animais (n=8-10), submetidos ao jejum por 2 horas, foram tratados 2 horas antes da indução do edema com dexametasona (5 mg/Kg, i.p) e uma hora antes da indução do edema tratados oralmente com veículo (salina) ou EHMe (62.5, 125 e 250mg/Kg). Após uma hora da indução do edema, os animais foram mortos e foi retirada uma secção circular (7 mm de diâmetro) de suas orelhas esquerda e direita com o auxílio de um puncher (perfurador). Logo em seguida as orelhas foram pesadas e o edema foi expresso pela diferença de massa (mg) entre a orelha direita e a orelha esquerda.

4.16. QUANTIFICAÇÃO DE PGE_2 DAS ORELHAS (Xian et al.,2012 com modificações)

Para avaliar se o efeito anti-inflamatório do EHMe no edema de orelha induzido por AA está relacionado com a via da COX, foi realizada a quantificação de PGE_2 das orelhas. Após a retirada das orelhas, foi obtida uma secção circular de 7mm de diâmetro com auxílio de um perfurador. Cada orelha direita foi homogeneizada vigorosamente em 0,7mL de solução tampão fosfato 0,1M (pH= 7,25) contendo 1mM de EDTA. As amostras foram incubadas a temperatura de 0°C por 15min e posteriormente centrifugadas a 10.000 rpm x 15min x 4°C. O sobrenadante foi coletado e transferido para tubo eppendorf e armazenado em freezer -80°C até o momento da determinação da concentração de PGE_2, através do teste imunoenzimático, ELISA (kit R&D System KGE004B).

4.17. QUANTIFICAÇÃO DE LTB_4 DAS ORELHAS *(*Xian et al.,2012 com modificações; Huang et al., 2006 com modificações).

Para avaliar se o efeito anti-inflamatório do EHMe no edema de orelha induzido por AA está relacionado com a via da LOX,, foi realizada a quantificação de LTB_4 das orelhas. Após a retirada das orelhas, foi obtida uma secção circular de 7mm de diâmetro com auxílio de um perfurador. Cada orelha direita foi homogeneizada vigorosamente em 0,7mL de solução tampão fosfato 0,1M (pH= 7,25) contendo 1mM de EDTA. As amostras foram incubadas a temperatura de 0°C por 15min e posteriormente centrifugadas a 10.000 rpm x 15min x 4°C. O sobrenadante foi coletado e transferido para tubo eppendorf e armazenado em freezer -80°C até o momento da determinação da concentração de LTB_4 através do teste imunoenzimático, ELISA (kit R&D System KGE006B).

4.18. EDEMA DE PATA INDUZIDO PELA CARRAGENINA (Winter et al., 1962, Levy, 1969):

O modelo de edema de pata induzido pela carragenina é altamente sensível aos (AINEs) e tem sido uma ferramenta aceitável para avaliação de novas drogas anti-inflamatórias (Just et al., 1998).

Para verificar a possível atividade antiedematogênica e anti-inflamatória do EHMe, foi utilizado o método de indução de edema de pata com carragenina em ratos Wistar (Winter et al*.,* 1962; Levy, 1969; Henriques et al., 1987). Os animais (n=7), em jejum de 4 horas, foram tratados oralmente 1 hora antes da indução do edema com veículo (salina), piroxicam (30 mg/Kg; AINE não seletivo para COX-1 e COX-2 - controle positivo) ou EHMe (62.5 mg/Kg - menor dose efetiva no modelo de edema de orelha por AA). Após 1 hora dos tratamentos os animais receberam injeção intraplantar subcutânea de 100 µl/pata de carragenina (1% em solução salina estéril) na pata posterior direita e 100 µl/ pata de salina estéril na pata posteiror esquerda. Fez- se a medição de ambas as patas de hora em hora, durante 4 horas, utilizando o pletismômetro Insight®. O resultado foi expresso pela diferença de volume (ml) deslocado entre as patas avaliadas.

4.19. AVALIAÇÃO DO EFEITO GASTROPROTETOR DO EHMe NO MODELO DE ÚLCERA GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL (Robert et al., 1979).

Para avaliar o efeito gastroprotetor do EHMe, foi realizado o modelo de úlcera gástrica induzida por etanol. Os animais (ratos Wistar machos, n=7) foram tratados oralmente com veículo (salina), carbenoxolona (100mg/Kg) ou EHMe (62.5, 125 ou 250mg/Kg). Decorridos 60 min., 1mL do agente lesivo (etanol P.A.) foi admnistrado oralmente em todos os animais.

Após 1 hora do tratamento com etanol todos os animais foram mortos e os estômagos retirados para análise das áreas das lesões gástricas utilizando-se o programa V-Brane Labs: LabIris Pro 2012 –Full Version.

4.20. AVALIAÇÃO DO EFEITO GASTROPROTETOR DO EHMe NO MODELO DE ÚLCERA GÁSTRICA INDUZIDA POR INDOMETACINA (Guidobono et al., 1997 com modificações).

Para avaliar se o efeito gastroprotetor do EHMe ainda era mantido na presença de um AINE, foi realizado o modelo de úlcera gástrica induzida pelo AINE indometacina. Os animais (ratos Wistar machos, n=7), em jejum de 16 horas, foram tratados oralmente com veículo (salina), lansoprazol (30mg/Kg) ou EHMe (62.5, 125 ou 250mg/Kg). Após 30 min., foi administrado por via oral o agente lesivo indometacina (50 mg/Kg solubilizada em solução aquosa de Carbonato de Sódio 0,5%, pH 7,4- ajustada com HCl puro) para todos os grupos. Após 6 horas da administração da indometacina, todos os animais foram mortos e os estômagos retirados para análise das áreas de lesões gástricas, utilizando-se o programa V-Brane Labs: Labiris Pro 2012 – Full Version.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

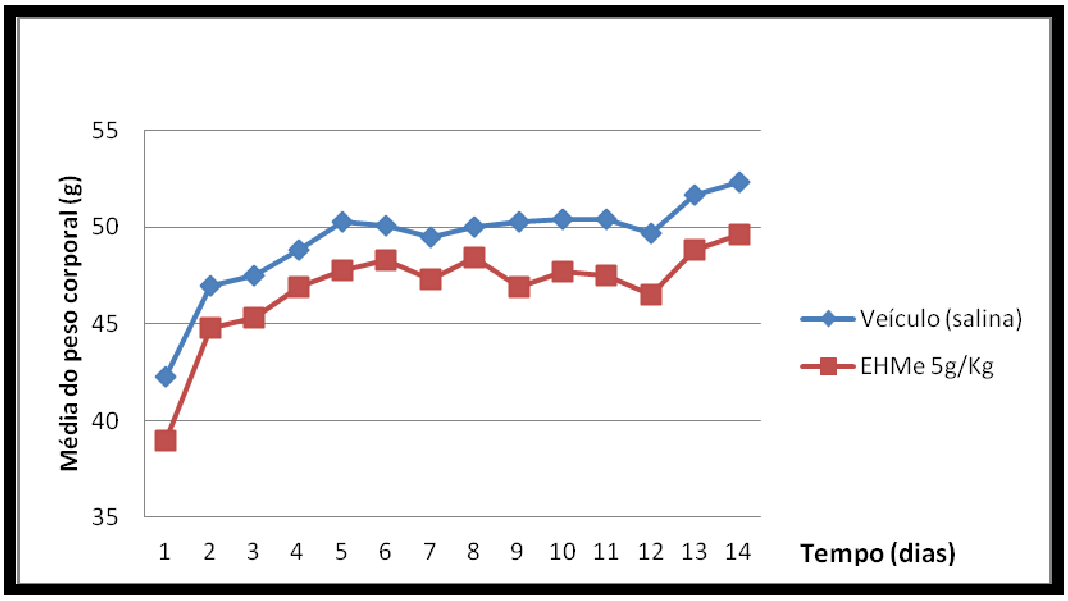
Os resultados foram expressos na forma de média ± erro padrão da média dos parâmetros obtidos. Os valores médios obtidos foram submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA), seguida do teste de Dunnett para comparação entre três grupos ou mais em relação ao grupo controle, ou Tukey para comparação entre todos os grupos; ANOVA de duas vias, seguida de teste de Bonferroni para múltiplas comparações; ou teste de Student (t) para comparação entre dois grupos. Valores de $p<0.05$ foram considerados estatisticamente significantes.

6. RESULTADOS

6.1. TOXICIDADE AGUDA E “SCREENING” HIPOCRÁTICO

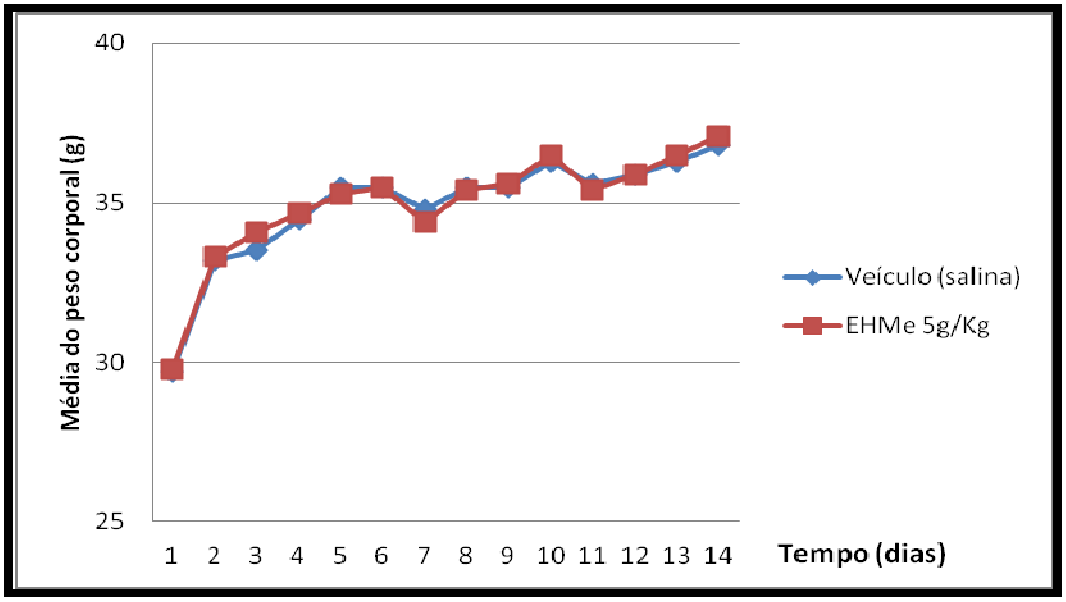
A administração oral do EHMe na dose de 5000mg/Kg para camundongos machos e fêmeas não provocou mortes e não foram observadas alterações nos parâmetros comportamentais avaliados (Anexo 2 e 3) quando comparados ao grupo controle (veículo). Quanto à evolução diária do peso corporal de machos e fêmeas, acompanhada por 14 dias, não foi observada variação em relação ao grupo controle (veículo) (Fig.2 e 3).

Fig.2. Evolução do peso corporal (g) de camundongos machos tratados com dose única do EHMe (5000mg/Kg). Média do peso (g) dos animais monitorados durante 14 dias.



Os pontos representam as médias de peso dos grupos para cada dia de observação. Teste t "Student".

Fig.3. Evolução do peso corporal (g) de camundongos fêmeas tratadas com dose única do EHMe (5000mg/Kg). Média do peso (g) dos animais monitorados durante 14 dias.



Os pontos representam as médias de peso dos grupos para cada dia de observação. Teste t "Student.

Outro parâmetro analisado foi o peso relativo dos órgãos obtidos pela razão entre o peso do órgão e peso total do animal transformado em arcoseno para adequação estatística. Após a realização do teste estatístico (teste de Student (t)), verificou-se ausência de diferença significativa entre os grupos tratados com o EHMe e tratados com o veículo (Tabela 1 e 2), tanto para machos quanto para fêmeas.

Tabela 1. Efeito do tratamento agudo com o EHMe (5000 mg/Kg) sobre os órgãos de camundongos machos (g) no modelo de toxicidade aguda**.**

Sexo	Tratamentos	Coração (g)	Rins (g)	Pulmões (g)	Fígado (g)	Baço (g)	Testículos (g)
Machos ♂	Veículo	3,83±0,07	6,62±0,10	4,20±0,12	12,73±0,27	2,96±0,11	4,06±0,14
	M. hirtum	3,8±0,05	6,80±0,10	4,25±0,05	12,90±0,14	3,32±0,15	4,07±0,06

Os resultados foram expressos como média ± e.p.m (n=8-10). Teste t de Student.

Tabela 2. Efeito do tratamento agudo com o EHMe (5000 mg/Kg) sobre os órgãos de camundongos fêmeas (g) no modelo de toxicidade aguda**.**

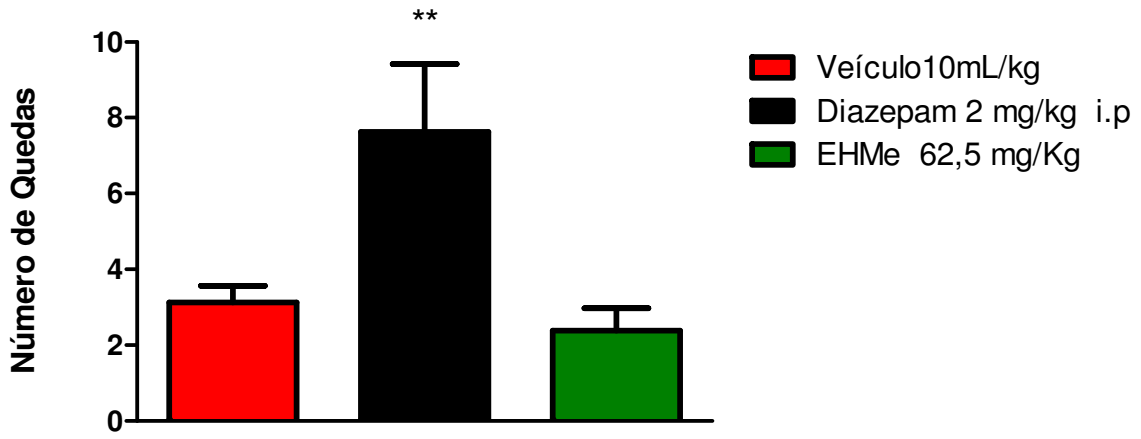
Sexo	Tratamentos	Coração (g)	ins (g)	Pulmões (g)	Fígado (g)	Baço (g)	Ovários *100 (g)	Útero (g)
Fêmeas ♀	Veículo	4,01±0,12	6,32±0,19	5,29±0,48	12,77±0,34	3,31±0,12	10,86±3,33	1,9±0,33
	M. hirtum	4,03±0,08	6,66±0,35	4,90±0,25	12,55±0,25	3,40±0,11	5,76±1,06	2,27±0,27

Os resultados foram expressos como média ± e.p.m (n=8-10). Teste t de Student.

6.2. AVALIAÇÃO DA PERFORMANCE MOTORA

No modelo experimental para avaliação da performance motora, o EHMe 62.5mg/Kg não produziu alterações no número de quedas (2.37 ± 0.59) dos animais durante o período avaliado, quando comparado ao grupo controle (veículo) (3.12 ± 0.44). O grupo tratado com diazepam apresentou aumento significante no número de quedas (7.62±1.79), como mostra a figura 4.

Fig.4. Avaliação do número de quedas dos camundongos tratados oralmente com EHMe (62.5 mg/Kg) no modelo de Rota Rod.

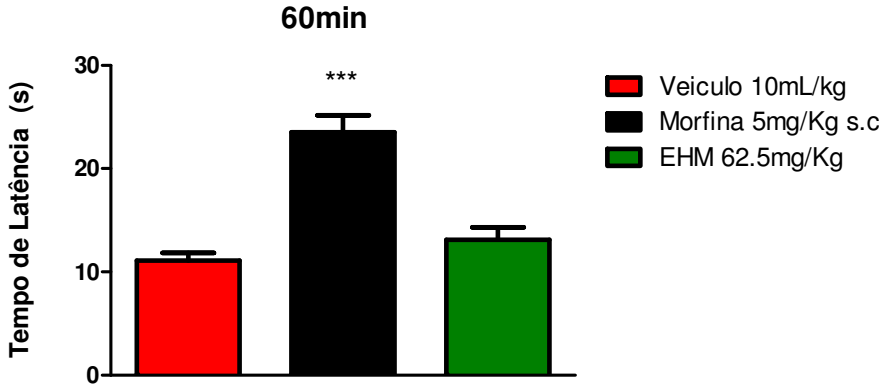


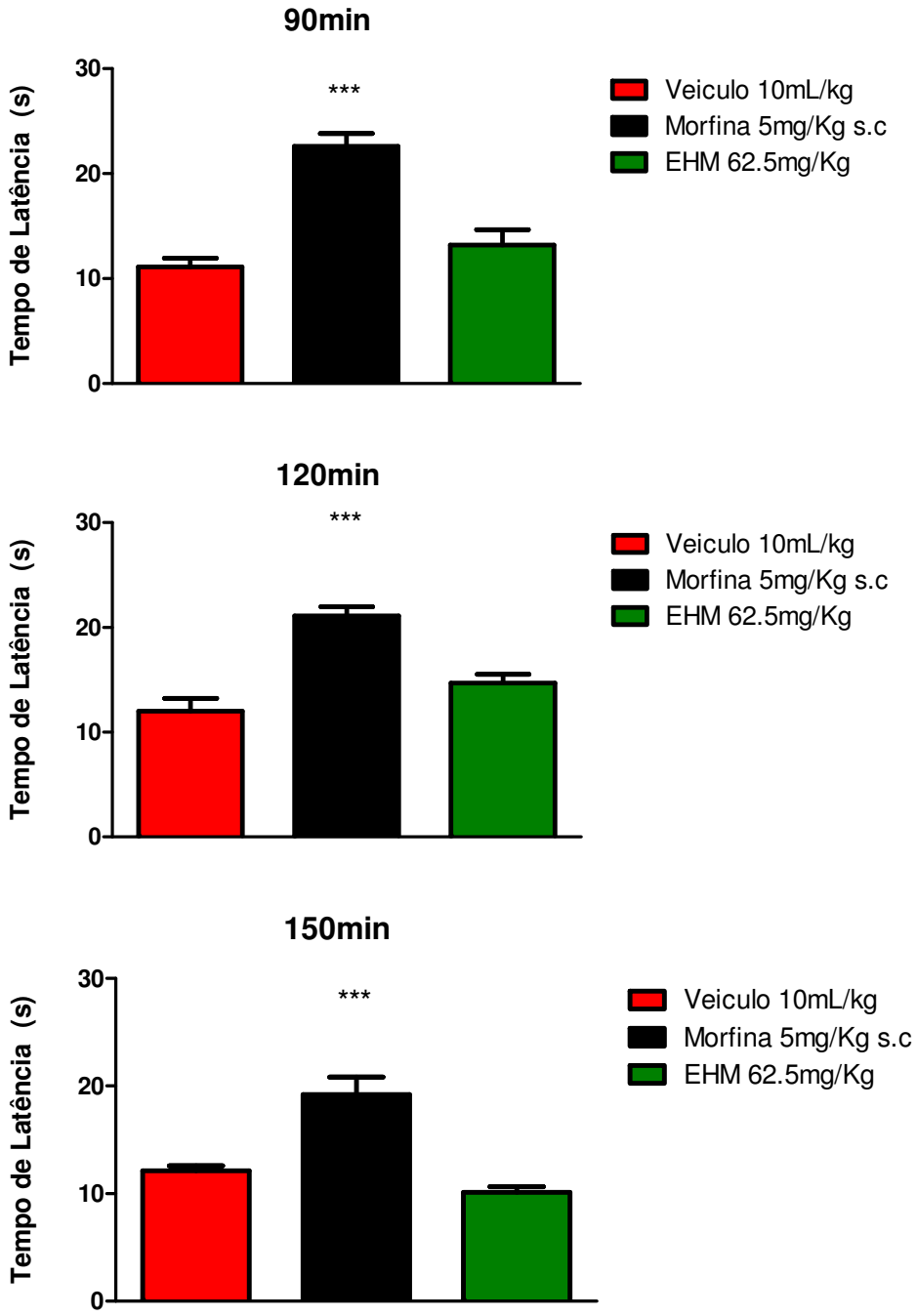
Os resultados foram expressos como média ± e.p.m (n=8-10). ANOVA seguida de teste de Dunnet;**p <0.01.

6.3. TESTE DA PLACA QUENTE OU "HOT PLATE"

No teste da placa quente, os animais tratados com morfina 5mg/Kg s.c aumentaram significativamente o tempo de reação dos animais ao estímulo térmico tanto a 50°C quanto a 56°C, durante todo o tempo de observação. Já o tratamento prévio dos animais com EHMe na dose de 62.5mg/Kg não aumentou o tempo de permanência dos animais na placa em ambas as temperaturas, em todos os tempos de observação, quando comparado ao grupo controle, como mostram as Fig .5 e Fig. 6.

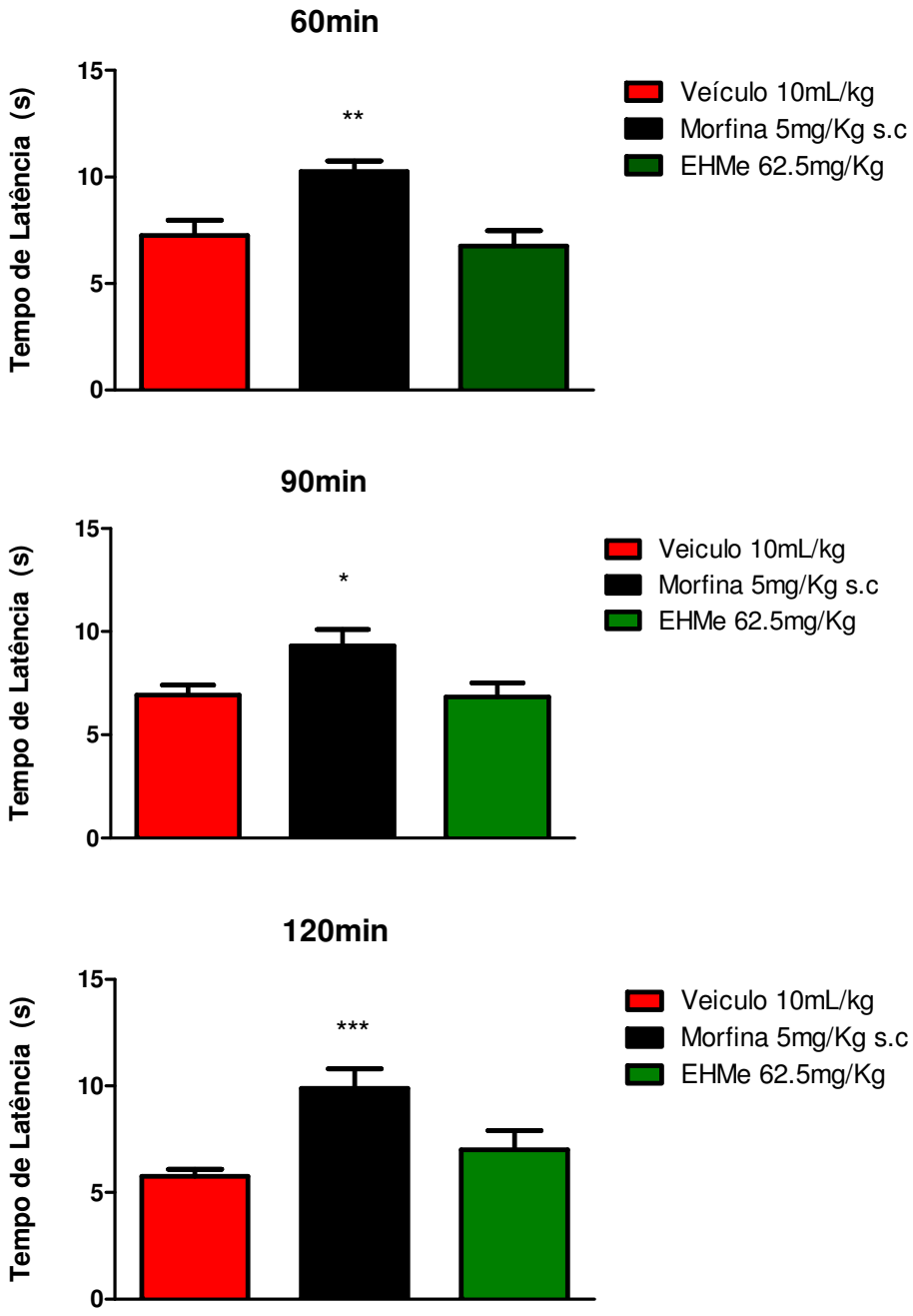
Fig.5 Avaliação do efeito antinociceptivo do EHMe (62.5 mg/Kg) sobre o tempo de latência (s) no teste de placa quente a 50ºC .

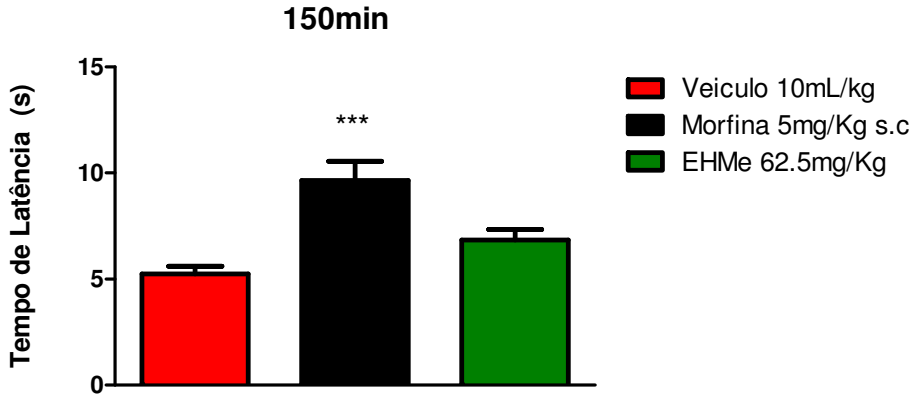




Os resultados foram expressos como média ± e.p.m (n=8-10). ANOVA seguida de teste de Dunnet; ***p<0.001 comparado com o grupo controle (Veículo).

Fig.6. Avaliação do efeito antinociceptivo do EHMe (62.5 mg/Kg) sobre o tempo de latência (s) no teste de placa quente a 56ºC.



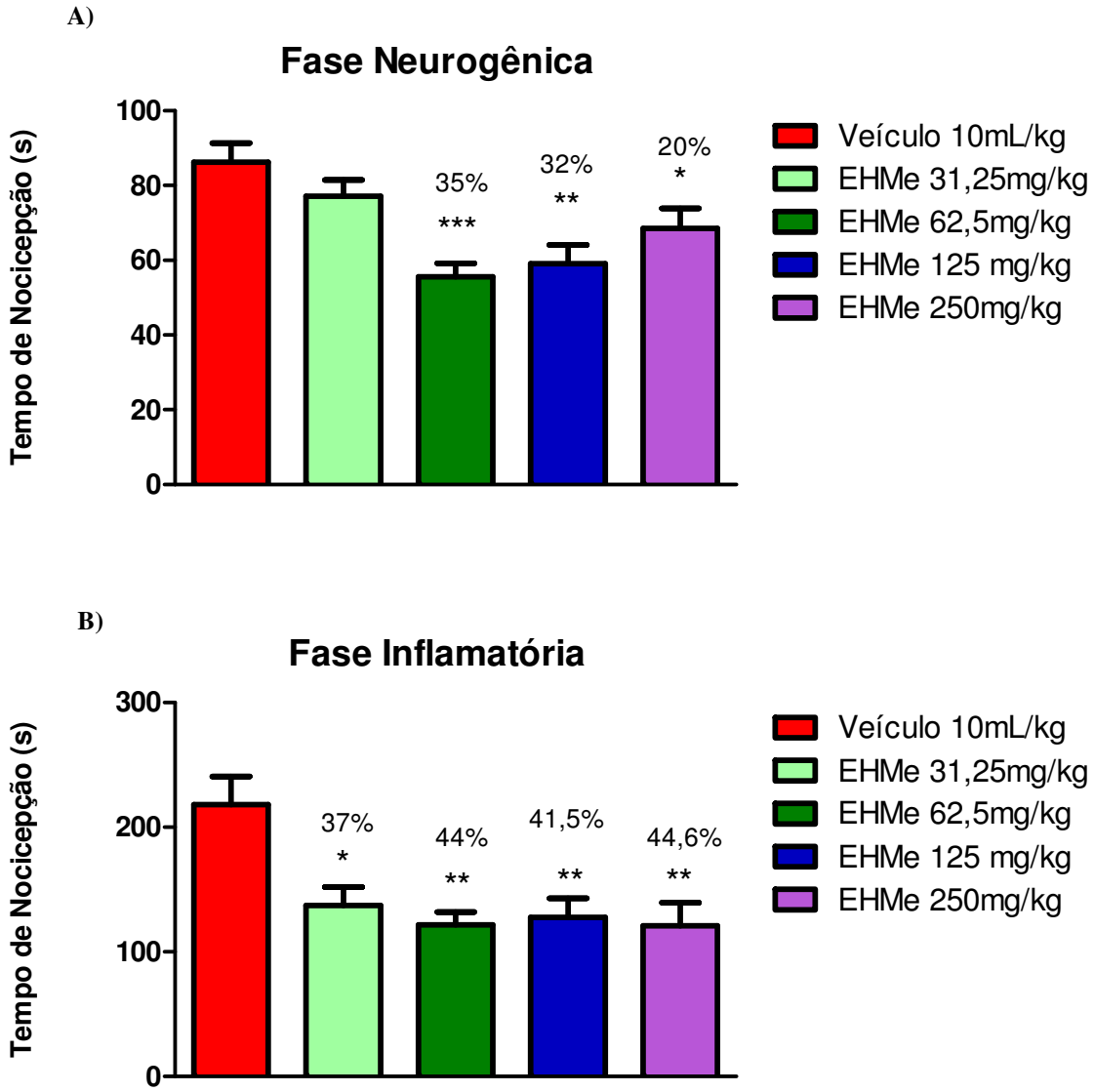


Os resultados foram expressos como média ± e.p.m (n=8-10). ANOVA seguida de teste de Dunnet; *p<0.05; **p<0.01 e ***p<0.001 comparado com o grupo controle (veículo).

6.4. TESTE DA FORMALINA

Neste modelo experimental de nocicepção, verificou-se que o EHMe administrado oralmente nas doses de 62.5, 125 e 250 mg/Kg, possui significativo efeito antinociceptivo em ambas as fases neurogênica 35% (55.5 ± 3.72s); 32% (59.19 ± 4.96s) e 20% (68.5±5.40s), respectivamente) e inflamatória 44% (121.5 ± 10.31s); 41.5% (127.5 ± 15.47s) e 44.6% (120.8 ± 18.56s), respectivamente, como mostra a Fig.7. O grupo de animais tratados com a dose de 31.25 mg/Kg do extrato foi capaz de reduzir a nocicepção somente na fase inflamatória. Portanto, os resultados apresentados neste teste foi determinante para a caracterização da menor dose efetiva (62.5 mg/Kg) para a realização dos demais modelos experimentais.

Fig.7. Avaliação do efeito antinociceptivo do EHMe administrado oralmente na nocicepção induzida pela formalina (**Gráfico A** – Fase Neurogênica; **Gráfico B** – Fase Inflamatória) em camundongos.

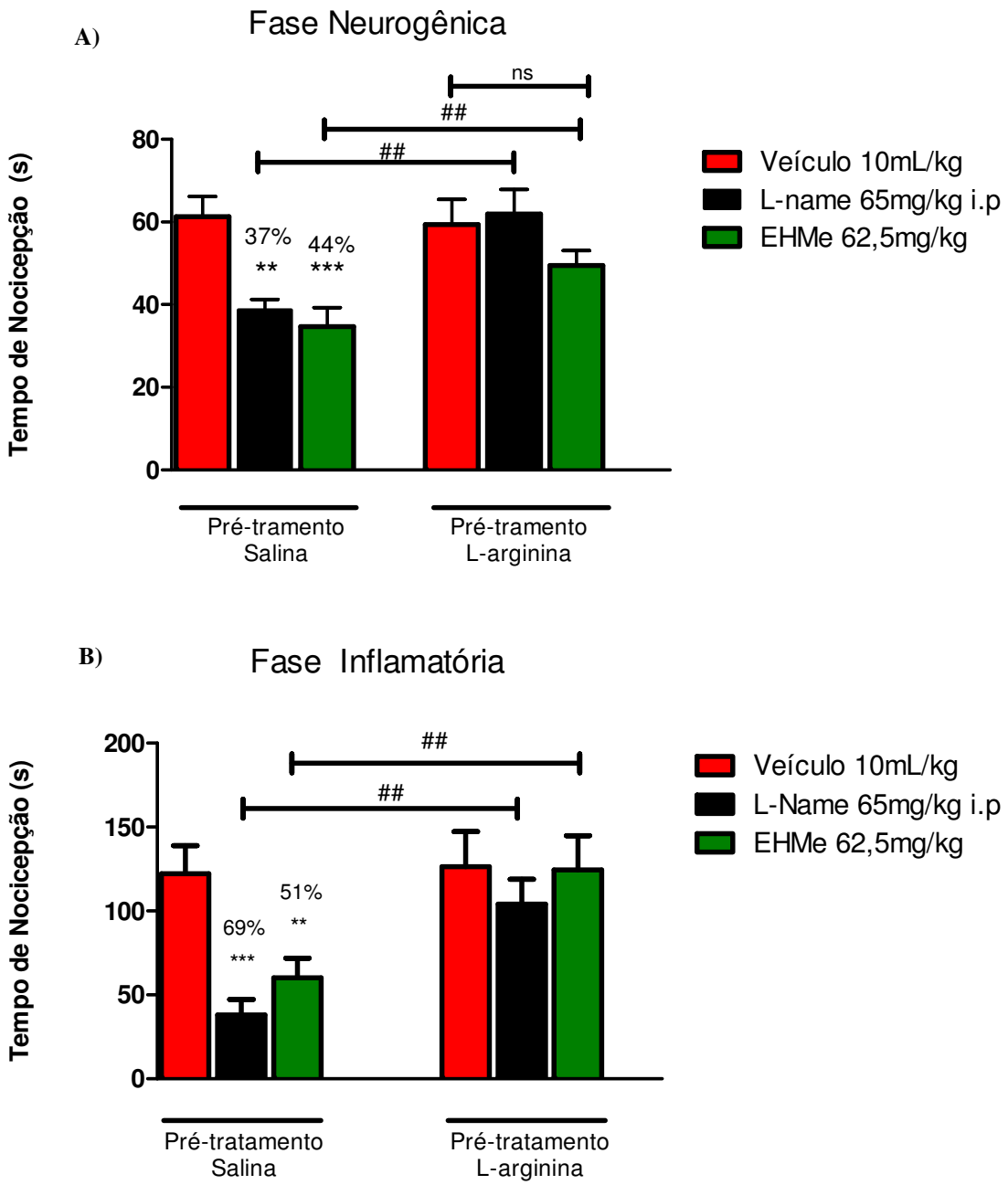


Os resultados foram expressos como média ± e.p.m (n=8-10). ANOVA seguida de teste de Dunnet; *p<0.05; **p <0.01 e ***p<0.001 comparado com o grupo controle (veículo). Porcentagem indica a inibição da resposta nociceptiva (tempo de nocicepção).

6.5. AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA NITRÉRGICO NA ANTINOCICEPÇÃO DO EHMe

O tratamento sistêmico dos animais com L-arginina (500mg/Kg i.p) reverteu significantemente o efeito antinociceptivo do L-NAME (65 mg/Kg i.p, inibidor da óxido nítrico sintase) e do EHMe (62.5mg/Kg v.o) em ambas as fases do teste de formalina (Fig.8) demonstrando o envolvimento desta via no mecanismo antinociceptivo do EHMe.

Fig.8. Avaliação da participação do sistema nitrérgico na atividade antinociceptiva do EHMe (62.5mg/Kg) administrado oralmente na nocicepção induzida pela formalina (Gráfico A – Fase Neurogênica; Gráfico B – Fase Inflamatória).

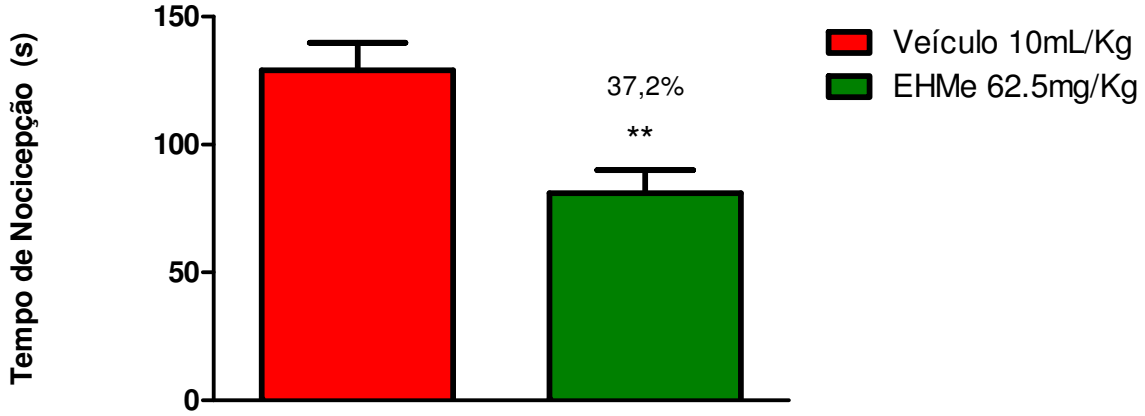


Os resultados foram expressos como média ± e.p.m (n=8-10). ANOVA seguida de teste de Dunnet ou Tukey; **p <0.01; ***p<0.001 comparado com o grupo controle (veículo); ##p<0.01 em relação ao grupo L-NAME ou EHMe pré-tratados com salina ou L-arginina. Porcentagem indica a inibição da resposta nociceptiva (tempo de nocicepção); ns representa a ausência de significância estatística entre grupos.

6.6. AVALIAÇÃO DO SISTEMA GLUTAMATÉRGICO NA ANTINOCICEPÇÃO DO EHMe

A Fig.9 mostra o efeito antinociceptivo do EHMe (62.5mg/Kg) administrado por via oral ao inibir significantemente o tempo de nocicepção induzida pelo glutamato em 37,2% (81.0 ± 9.03s).

Fig.9. Avaliação da participação do sistema glutamatérgico na atividade antinociceptiva do EHMe (62.5mg/Kg) administrado oralmente na nocicepção induzida por glutamato (30µmol/pata).



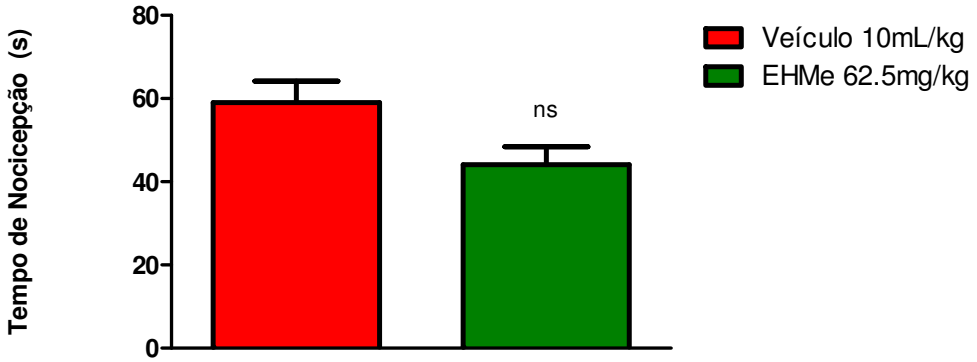
Os resultados foram expressos como média ± e.p.m (n=8-10). Teste t de Student. **p < 0.01 comparado com o grupo controle (veículo). Porcentagem indica a inibição da resposta nociceptiva (tempo de nocicepção).

6.7. AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DE RECEPTORES ASSOCIADOS A CANAIS IÔNICOS -TRPs (TRPV-1; TRPA-1 E TRPM-8) E ASIC NA ANTINOCICEPÇÃO DO EHMe.

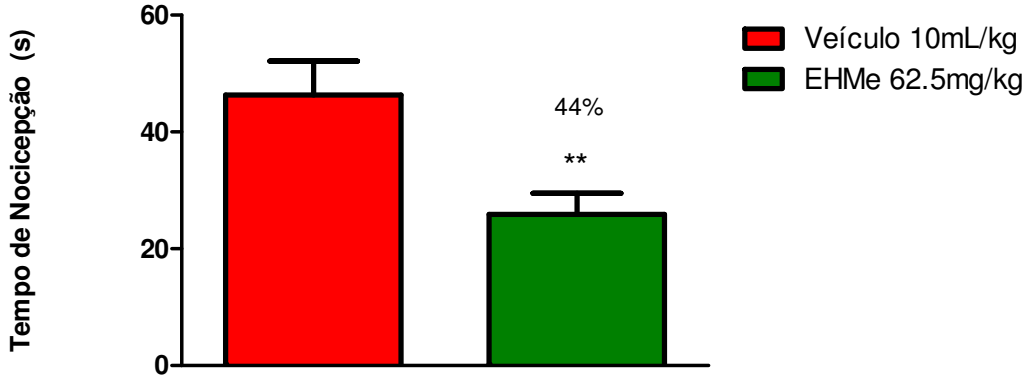
Os resultados apresentados na Fig.10 mostram que a administração oral do EHMe (62.5mg/Kg) não apresentou efeito antinociceptivo contra os agentes químicos capsaicina e mentol, mas inibiu significantemente a nocicepção induzida pelo cinamaldeído em 44% (25.88 ± 3.65s) e pela salina acidificada em 49% (65.33 ± 9.58s), demonstrando o envolvimento de receptores TRPA-1 e ASICs na antinocicepção do extrato.

Fig.10. Avaliação da participação dos receptores TRPs e ASIC na atividade antinociceptiva do EHMe (62.5mg/Kg) administrado oralmente na nocicepção induzida por por capsaícina (2µg/pata – **Gráfico A**); cinamaldeído (40nmol/pata – **Gráfico B**); mentol (2µmol/pata **– Gráfico C)** ou salina acidificada (3% de ácido acético, pH=2,0/pata – **Gráfico D)**

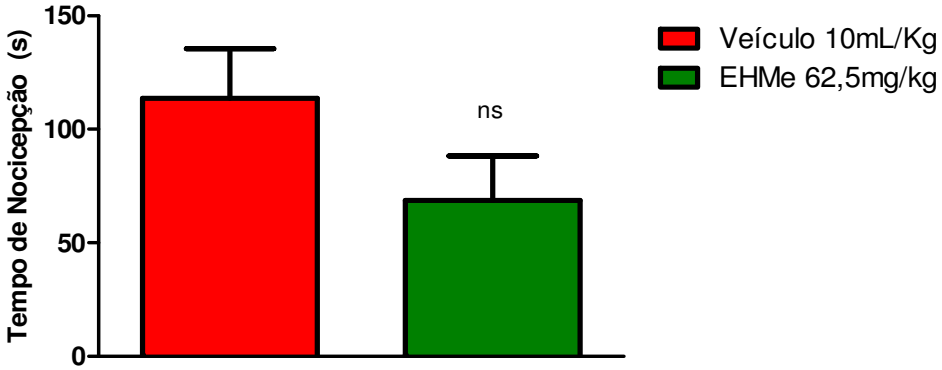
A)



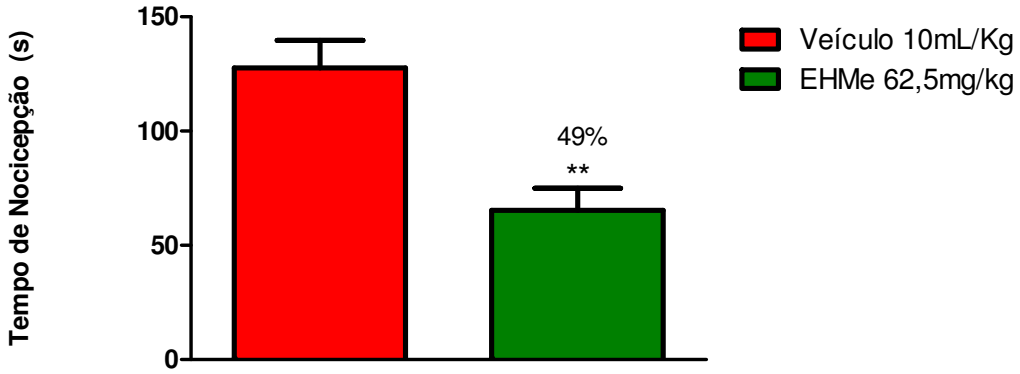
B)



C)



D)

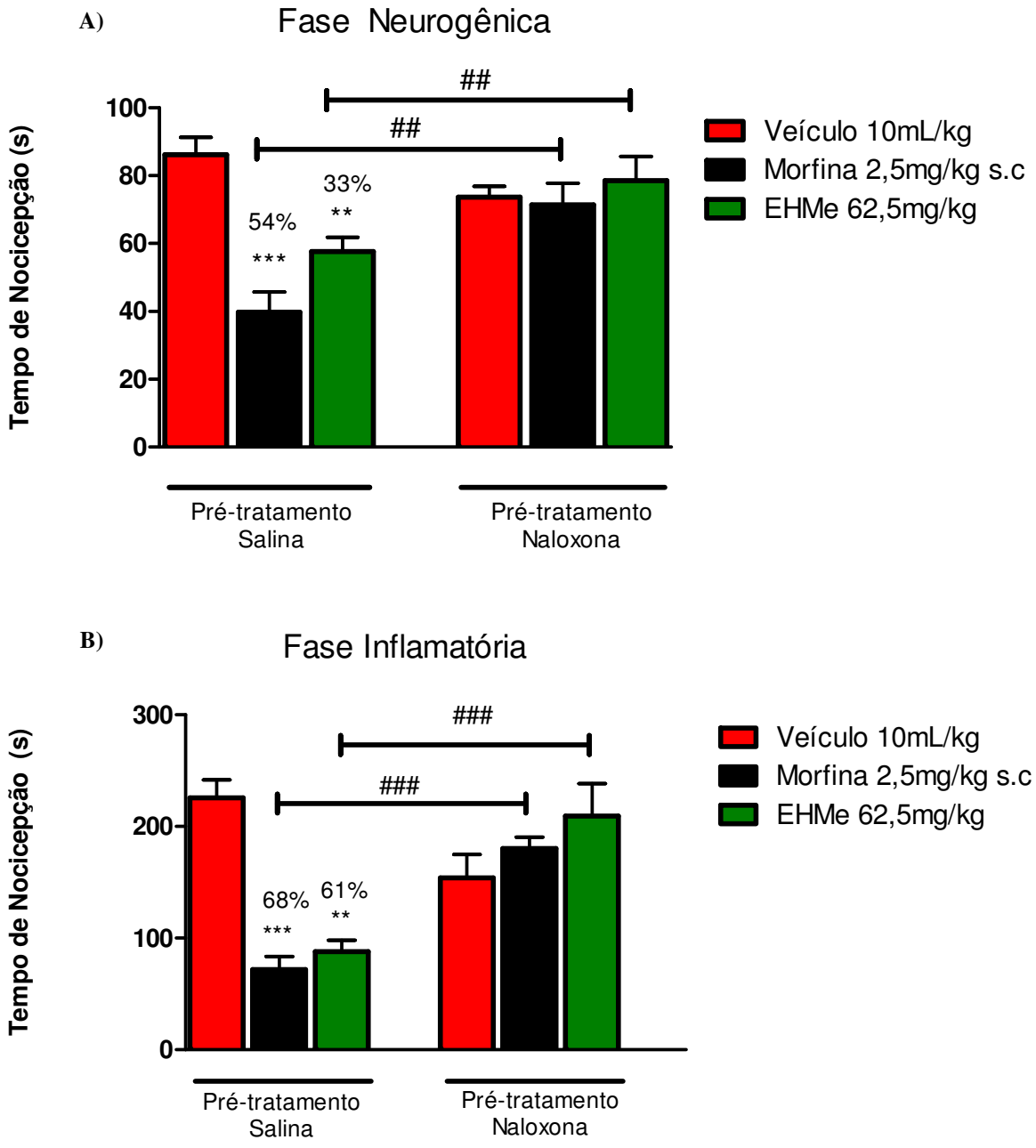


Os resultados foram expressos como média ± e.p.m (n=8-10). Teste t de Student. **p <0.01 comparado com o grupo controle (veículo). Porcentagem indica a inibição da resposta nociceptiva (tempo de nocicepção); ns representa a ausência de siginificância estatística em comparação ao grupo controle (veículo).

6.8. AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DE RECEPTOR OPIÓIDE NA ANTINOCICEPÇÃO DO EHMe.

Os resultados apresentados na Fig.11 mostram que o pré-tratamento dos animais com naloxona (1mg/Kg i.p; antagonista não seletivo de receptor opióide), reverteu significantemente o efeito antinociceptivo causado pela morfina (2.5mg/Kg s.c) ou pelo EHMe (62.5mg/Kg v.o) em ambas as fases do teste de formalina, demonstrando o envolvimento desta via no mecanismo de ação do EHMe.

Fig.11. Avaliação da participação do sistema opiodérgico na atividade antinociceptiva do EHMe (62.5mg/Kg) administrado oralmente na nocicepção induzida pela formalina (Gráfico A -Fase Neurogênica; Gráfico B - Fase Inflamatória)

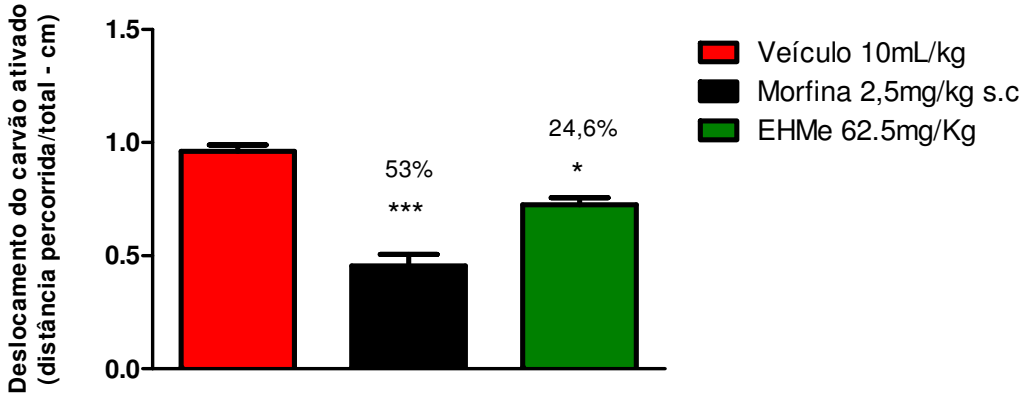


Os resultados foram expressos como média ± e.p.m (n=8-10). ANOVA seguida de teste de Dunnet; **p <0.01; ***p<0.001 comparado com o grupo controle (veículo); ##p<0.01; ### p<0.01 em relação ao grupo morfina ou EHMe pré-tratados com salina ou naloxona. Porcentagem indica a inibição da resposta nociceptiva (tempo de nocicepção).

6.9. DETERMINAÇÃO DA MOTILIDADE INTESTINAL

Na avaliação da motilidade intestinal a Fig.12 mostra que os animais que receberam morfina (2.5mg/Kg s.c) apresentaram significativa redução da motilidade intestinal de 53% (45 ± 5,2cm), quando comparados com o grupo veículo (96±2,7cm). Os animais tratados com EHMe (62.5mg/Kg v.o) também apresentaram redução significante da motilidade intestinal de 24,6% (72 ± 3,1cm).

Fig.12. Avaliação do efeito do EHMe (62.5 mg/Kg v.o) sobre a motilidade intestinal de camundongos com a utilização de carvão ativado.

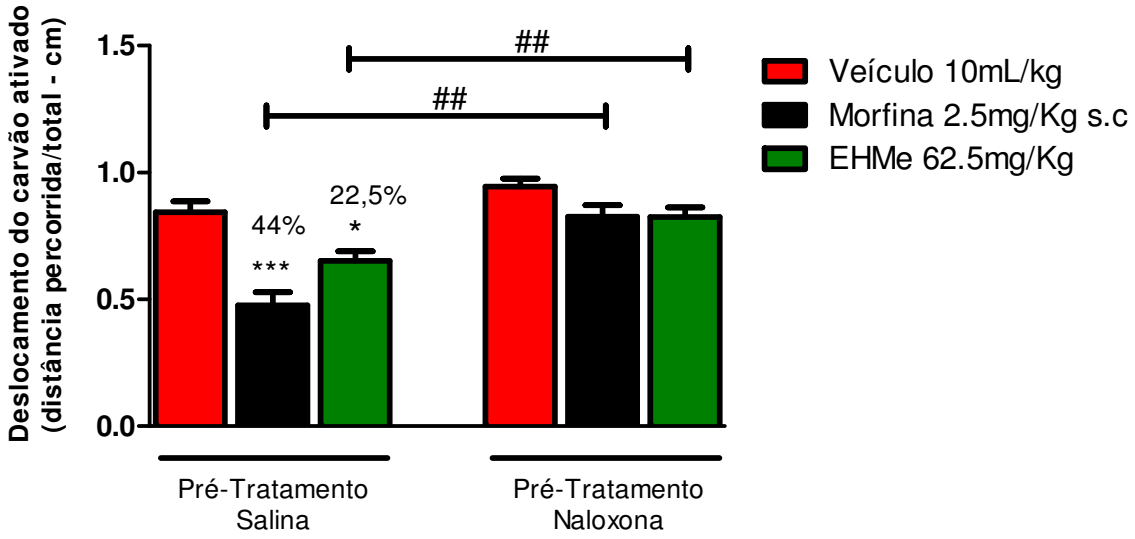


Os resultados foram expressos como média ± e.p.m (n=7). ANOVA seguida de teste de Dunnet;*p< 0.05; **p <0.01 (n=7). Porcentagem corresponde á redução da média do deslocamento do carvão ativado em relação ao grupo controle (veículo).

6.10. AVALIAÇÃO DA PARTICIPAÇÃO DE RECEPTORES OPIÓIDES NA REDUÇÃO DA MOTILIDADE INTESTINAL

A Fig.13 mostra que o efeito de redução da motilidade intestinal pelo EHMe (62.5mg/Kg v.o) tem o envolvimento de receptores opióides, uma vez que o pré-tratamento dos animais com naloxona (15mg/Kg i.p; antagonista não seletivo de receptores opióides) reverteu significantemente o efeito do EHMe.

Fig.13. Avaliação da participação do sistema opióide no efeito do EHMe (62.5 mg/Kg v.o) sobre a redução da motilidade intestinal de camundongos com a utilização de carvão ativado.

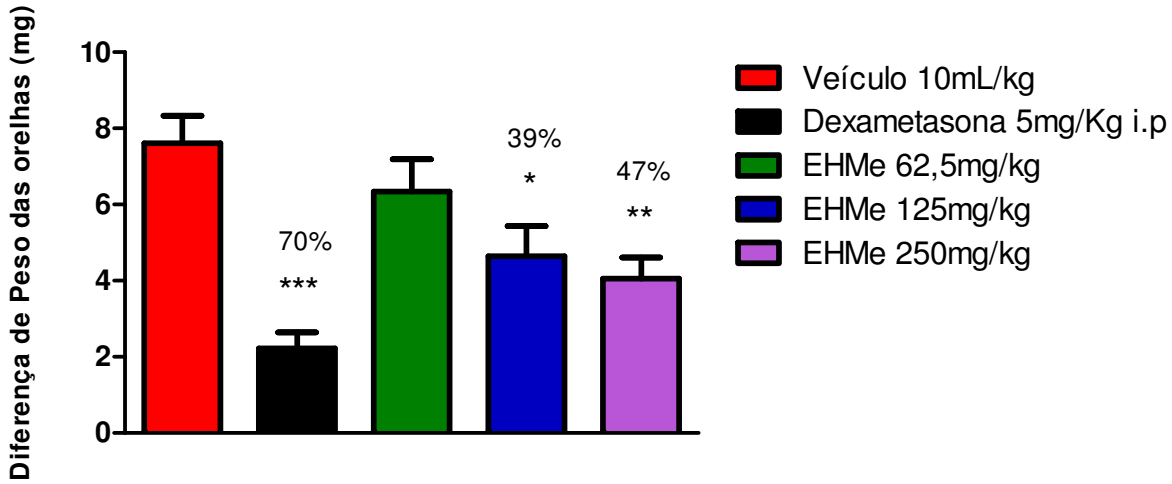


Os resultados foram expressos como média ± e.p.m (n=7). ANOVA seguida de teste de Dunnet;**p <0.01 (n=7). Porcentagem corresponde á redução da média do deslocamento do carvão ativado em relação ao grupo controle (veículo); ## p<0.01 em relação ao grupo morfina e EHMe pré-tratados com salina ou naloxona.

6.11. EDEMA DE ORELHA INDUZIDO PELO XILOL

No modelo do edema de orelha induzido pela aplicação tópica de xilol, os animais tratados com EHMe apresentaram significativa redução do edema apenas nas doses de 125 e 250 mg/Kg, inibindo em 39% (4.64 ± 0.68 mg) e 47% (4.05± 0.56mg), respectivamente, quando comparados ao grupo tratado com o veículo (salina). O controle positivo, dexametasona (5 mg/Kg, i.p.), apresentou inibição do edema de 70% (2.22 ± 0.41mg), como mostra a Fig.14.

Fig. 14. Avaliação do efeito antiedematogênico do EHM (62.5, 125, 250 mg/Kg) no modelo de edema de orelha induzido pelo xilol.

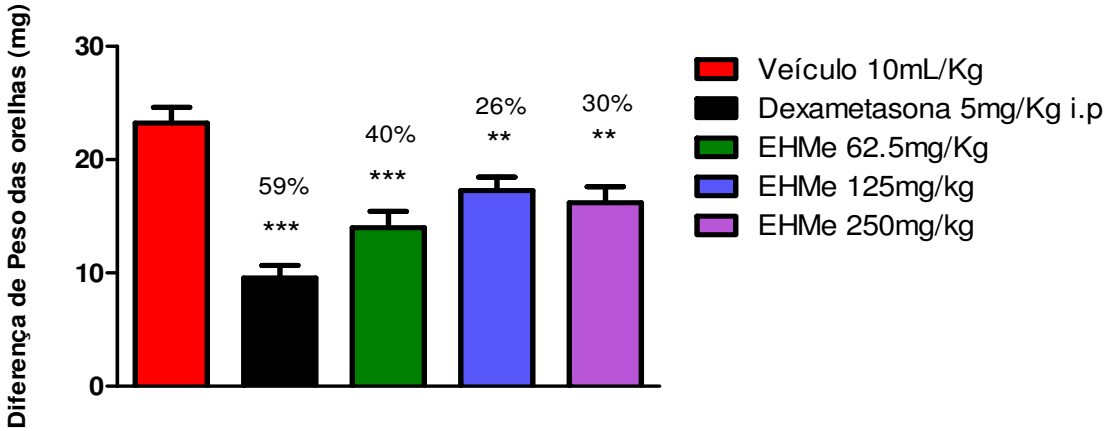


Os resultados foram expressos como média ± e.p.m (n=8-10). ANOVA seguida de teste de Dunnet; *p<0.05; **p <0.01; ***p<0.001. Porcentagem corresponde á redução da média da diferença de peso (mg) das orelhas em relação ao grupo controle (veículo).

6.12. EDEMA DE ORELHA INDUZIDO POR ÁCIDO ARAQUIDÔNICO

No modelo do edema de orelha induzido pela aplicação tópica de ácido araquidônico, os animais tratados com EHMe apresentaram significativa redução do edem em todas as doses testadas(62.5; 125 e 250 mg/Kg), inibindo em 40% (13.99 ± 1.45 mg) ; 26% (17.25 ± 1.22mg) e 30% (16.19 ± 1.43mg) respectivamente, quando comparados ao grupo tratado com o veículo (salina). O grupo controle positivo tratado com dexametasona (5 mg/Kg, i.p.), apresentou inibição do edema de 59% (9.57 ± 1.09mg), como mostra a Fig.15.

Fig. 15. Avaliação do efeito anti-inflamatório do EHMe (62.5, 125 e 250 mg/Kg) no modelo de edema de orelha induzido pelo ácido araquidônico.

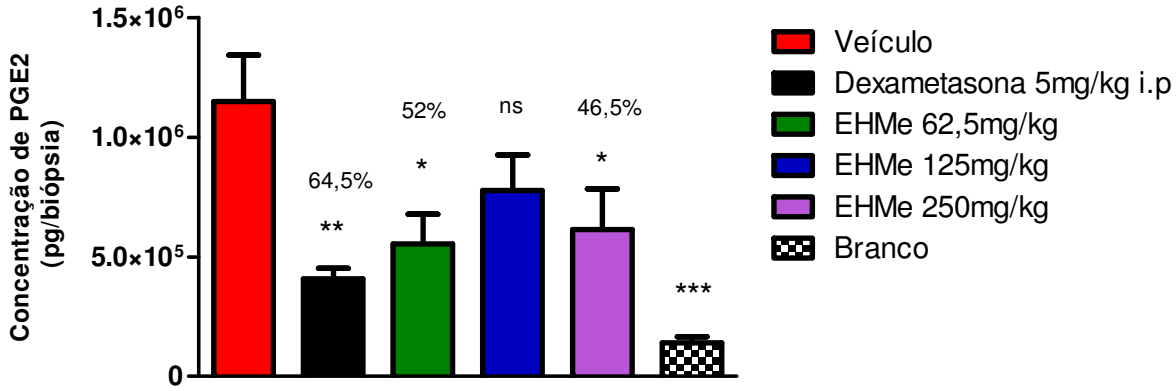


Os resultados foram expressos como média ± e.p.m (n=8-10). ANOVA seguida de teste de Dunnet; **p <0.01; ***p<0.001. Porcentagem corresponde á redução da média da diferença de peso (mg) das orelhas em relação ao grupo controle (veículo).

6.13. QUANTIFICAÇÃO DE PGE_2 DAS ORELHAS

Os resultados apresentados na Fig.16 mostram que o tratamento dos animais com EHMe reduziu significativamente os níveis de PGE_2 do edema de orelha induzido por ácido araquidônico nas doses de 62.5 e 250mg/Kg, em 52% e 46.5%, respectivamente. O controle positivo dexametasona (5mg/Kg i.p) reduziu em 64.5% os níveis de PGE_2 quando comparado ao grupo controle (veículo).

Fig.16. Avaliação do efeito do EHMe (62.5, 125 e 250 mg/Kg) na produção de PGE_2 em orelhas de camundongos no modelo de edema de orelha induzido pelo ácido araquidônico.

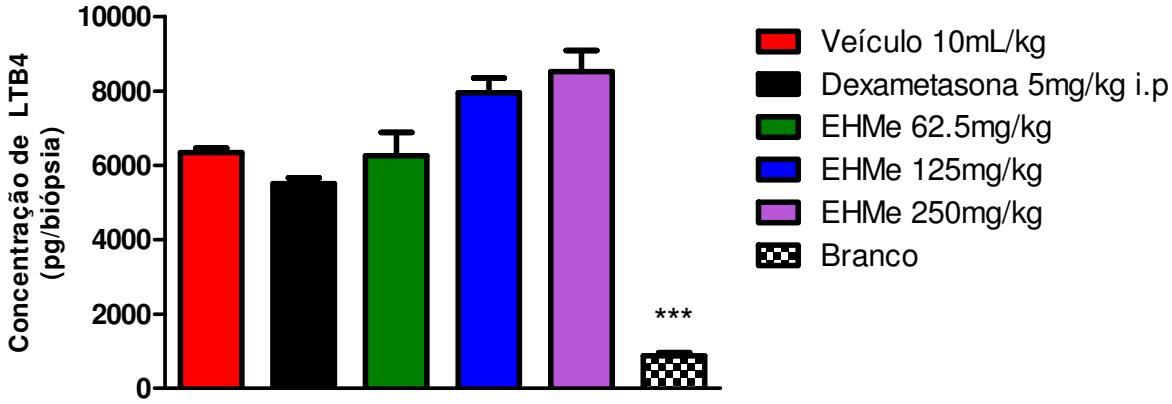


Os resultados foram expressos como média ± e.p.m (n=8-10). ANOVA seguida de teste de Dunnet; *p<0.05; **p <0.01; ***p<0.001. Porcentagem corresponde á redução da quantidade de PGE_2 das orelhas em relação ao grupo controle (veículo); n.s representa a ausência de sigiificância em comparação ao grupo controle (veículo).

6.14. QUANTIFICAÇÃO DE LTB_4 DAS ORELHAS

Os resultados apresentados na Fig.17 mostram que o controle positivo dexametasona (5mg/Kg i.p) e todas as doses de EHMe não foram capazes de reduzir os níveis de LTB_4 do edema de orelha induzido por ácido araquidônico quando comparados ao grupo controle (veículo).

Fig.17. Avaliação do efeito do EHMe (62.5, 125 e 250 mg/Kg) na produção de LTB_4 em orelhas de camundongos no modelo de edema de orelha induzido pelo ácido araquidônico.

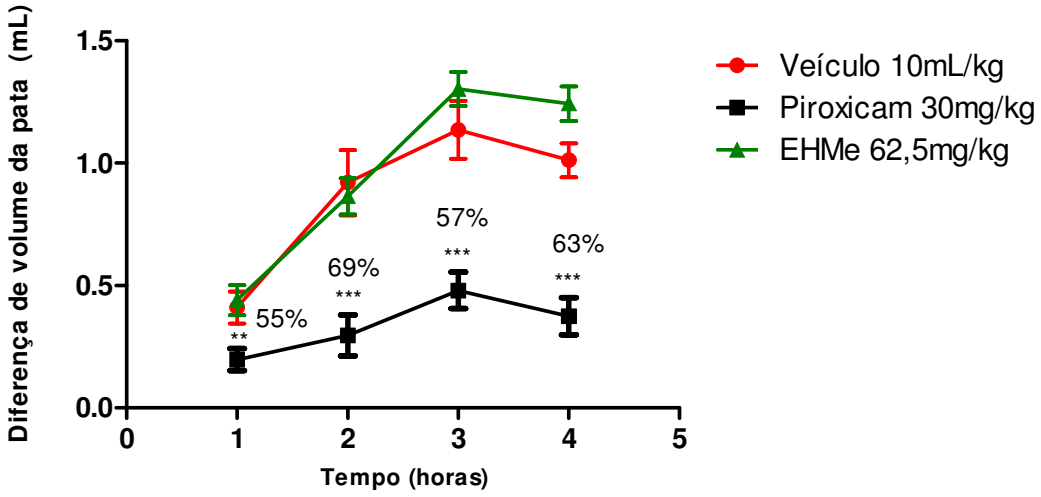


Os resultados foram expressos como média ± e.p.m (n=8-10). ANOVA seguida de teste de Dunnet; ***p<0.001 em relação ao grupo controle (veículo).

6.15. EDEMA DE PATA INDUZIDO PELA CARRAGENINA

No modelo de edema de pata induzido pela carragenina, o EHMe (62.5 mg/Kg v.o) não inibiu o edema de pata induzido pela carragenina quando comparado ao grupo veículo. O grupo controle positivo (piroxicam, 30 mg/Kg, v.o.) reduziu o edema durante 4 horas de avaliação, inibindo respectivamente em 55% (0,18 ± 0,04 mL), 69% (0,26 ± 0,09 mL), 57% (0,48 ± 0,07 mL) e 63% (0,37 ± 0,07 mL) quando comparado ao grupo controle (veículo), como mostra a Fig.18.

Fig. 18. Avaliação do efeito antiedematogênico do EHMe (62.5 mg/Kg v.o) no modelo de edema de pata em ratos induzido pela carragenina.

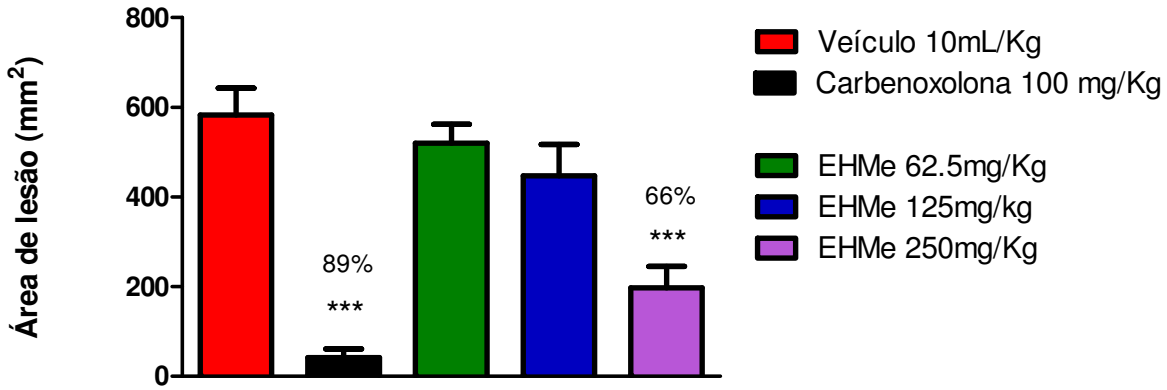


Os resultados foram expressos como média ± e.p.m (n=7). ANOVA de 2 vias seguido de teste de Bonferroni. **p<0.01;***p<0.001 comparado com grupo controle (veículo).

6.16. AVALIAÇÃO DO EFEITO GASTROPROTETOR DO EHMe NO MODELO DE ÚLCERA GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL

O resultado deste modelo demonstra que o EHMe na dose de 250 mg/Kg protegeu significativamente a mucosa gástrica do agente lesivo etanol absoluto em 66%, como mostrado na Fig.19. O controle positivo, carbenoxolona (100mg/Kg), inibiu em 89% o aparecimento de lesões na mucosa gástrica quando comparado ao grupo controle (veículo).

Fig.19. Efeito gastroprotetor do EHMe (62.5; 125 e 250mg/Kg v.o) frente ao modelo de úlcera gástrica induzida por etanol absoluto em ratos.

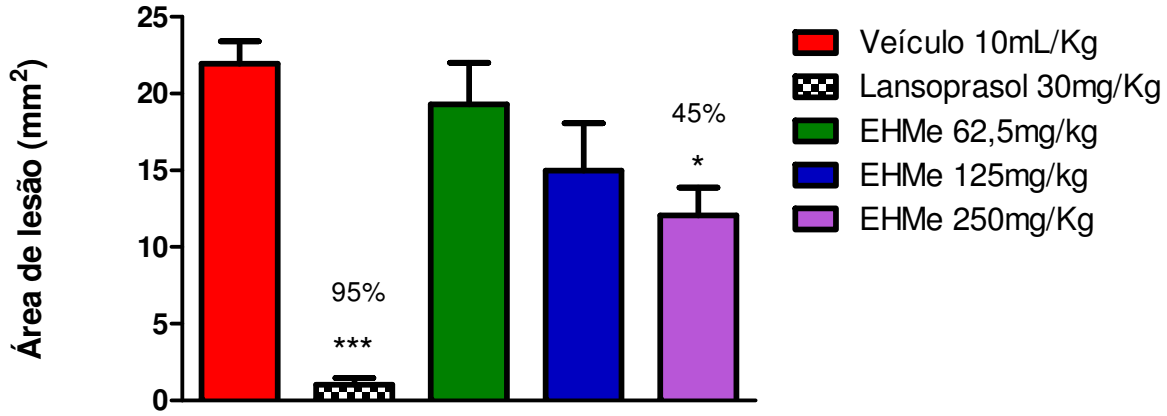


Os resultados foram expressos como média ± e.p.m (n=7-8). ANOVA seguida de teste de Dunnet; ***p<0.001 comparado com o grupo controle (veículo). Porcentagem indica a proteção em relação ao veículo.

6.17. AVALIAÇÃO DO EFEITO GASTROPROTETOR DO EHMe NO MODELO DE ÚLCERA GÁSTRICA INDUZIDA POR INDOMETACINA

O resultado deste modelo demonstra que o EHMe na dose de 250 mg/Kg protegeu significativamente a mucosa gástrica do agente lesivo indometacina (AINE) em 45%, como mostrado na Fig.20. O grupo controle positivo tratado com lansoprazol (30mg/Kg), inibiu em 95% o aparecimento de lesões na mucosa gástrica quando comparado ao grupo controle (veículo).

Fig.20. Efeito gastroprotetor do EHMe (62.5; 125 e 250 mg/Kg v.o) frente ao modelo de úlcera gástrica induzida por indometacina em ratos.



Os resultados foram expressos como média ± e.p.m (n=7-8). ANOVA seguida de teste de Dunnet; *p<0.05; ***p<0.001 comparado com o grupo controle (veículo). Porcentagem indica a proteção em relação ao veículo.

7. DISCUSSÃO

A dor reduz a qualidade de vida e implica em elevados custos com os tratamentos de saúde, sendo considerada problema de saúde pública (Mäntyselkä et al., 2001). No Brasil a dor está presente em mais de 70% dos pacientes que buscam os consultórios médicos, sendo a razão das consultas em um terço dos casos (Rocha et al., 2007). As drogas disponíveis para o tratamento da dor e inflamação possuem muitos efeitos adversos, tornando as terapias disponíveis ineficazes. Estudos ainda sugerem que o insucesso terapêutico surge também da discrepância entre o julgamento do paciente e do médico sobre a severidade da dor (Ferreira et al., 2011)

A busca por novos agentes farmacologicamente ativos obtidos de fontes naturais, como extratos vegetais, tem levado a descoberta de muitas drogas clinicamente úteis no tratamento de várias doenças, inclusive no alívio da dor (Shu, 1998; Calixto, 2003; Yunes et al., 2005; Maroon et al., 2010). Além disso, a OMS reconhece que embora a medicina esteja bem desenvolvida, grande parte da população de países em desenvolvimento, como o Brasil, depende da medicina tradicional para a atenção primária, tendo em vista que 85% utilizam plantas ou preparações destas (Brasil- Ministério da Saúde, 2006).

As indústrias farmacêuticas também reavaliaram conhecimentos tradicionais e etnofarmacológicos para a descoberta de novas drogas, e desenvolveram programas de pesquisa na área de produtos naturais, obtendo entre outras vantagens a possibilidade de

utilização das diversas estruturas químicas como banco de moléculas, além da economia de tempo e de recursos (Calixto, 2003; Patwardhan & Vaidya, 2010).

Atualmente tem sido sugerido que a descoberta de drogas não precisa estar restrita apenas a uma molécula, considerando o fato de que a maioria das doenças normalmente é poligênica e não simplesmente isolada. Os extratos vegetais possuem uma grande diversidade de moléculas que podem atuar sinergicamente em múltiplos alvos, e podem ser uma alternativa mais econômica através da farmacologia reversa. Esta ciência se inspira no conhecimento tradicional e integra experiências clínicas documentadas e observações experimentais, invertendo a rotina laboratório-clínica no processo de desenvolvimento de novas drogas, economizando em média de 5-10 anos e, até 75 vezes menos em investimentos (Patwardhan & Vaidya, 2010).

Um exemplo interessante é do fitomedicamento brasileiro Acheflan® (Aché), produzido a partir da *Cordia verbenacea,* indicado como anti-inflamatório de uso tópico para dores musculares e tendinites. Aprovado pela ANVISA em 2004 e lançado no mercado em 2005, o Acheflan® é resultado de pesquisa e desenvolvimento 100% nacionais (Calixto, 2005; Calixto 2008). De acordo com informativos da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), o Laboratório Biosintética em parceria com esta universidade, está investindo R$1milhão em estudos clínicos para o desenvolvimento de um potencial medicamento fitoterápico para memória.

Portanto, considerando a grande biodiversidade brasileira, acompanhada da necessidade da descoberta de biomoléculas terapeuticamente eficazes na dor e inflamação, sem tantos efeitos adversos, este trabalho teve por objetivo caracterizar a segurança e eficácia farmacológica do extrato hidroalcoólico das entrecascas de *Machaerium hirtum* (Vell.) Stellfeld em modelos experimentais de dor, inflamação, úlcera gástrica e de motilidade intestinal em roedores.

No modelo experimental utilizado para avaliação da toxicidade aguda e *screening* hipocrático, foram analisados os possíveis efeitos tóxicos decorrentes da administração oral da dose única de 5000mg/Kg do EHMe, durante um período curto de tempo (14 dias). Este teste é determinante para dar continuidade à pesquisa, uma vez que fornece subsídios sobre a toxicidade da substância testada (Brito, 1994).

O *screening* hipocrático é um teste bastante útil e comumente usado na triagem preliminar de plantas para detectar atividades farmacológicas e toxicológicas (Lucio et al., 2000) . A via de administração escolhida também deve ser baseada na via utilizada pelos humanos, considerando que vias diferentes de administração exibem diferentes perfis de absorção, pH, irrigação sanguínea, entre outros, justificando portanto a escolha da via oral (Klaassen & Watkins, 2001).

A dose única de 5000mg/Kg v.o do EHMe não mostrou toxicidade aguda, pois não houve mortes e tanto os animais machos quanto fêmeas tratados, não apresentaram sinais clínicos de alterações nos parâmetros comportamentais observados no *screening* hipocrático (Anexo1), bem como no peso relativo dos órgãos, durante todo o tempo de observação.

Apesar da ausência de sinais de toxicidade aguda, é necessário realizar testes de toxicidade subaguda e crônica com doses repetidas para descartar completamente o efeito tóxico do extrato.

Os modelos experimentais de dor em animais avaliam o comportamento nociceptivo, e a maioria dos testes envolve respostas motoras, que podem ser suprimidas por drogas sedativas ou relaxantes musculares (Le Bars, 2001). Para descartar a hipótese do EHMe ter efeito miorrelaxante e/ou sedativo foi utilizado o teste de performance motora Rota Rod.

O Rota Rod é um dispositivo que mede a atividade forçada, através da avaliação da coordenação motora dos animais (processada primeiramente pelo córtex cerebral e associada com cerebelo e fatores cognitivos) (Gasbarri et al., 2003), e do equilíbrio, parâmetros esses indicativos de transtornos neurológicos decorrentes de neurotoxicidade (Rosland et al., 1990a; Almeida, 2006). Os benzodiazepínicos, como o diazepam, utilizado como controle positivo deste modelo, afetam negativamente a coordenação motora e o equilíbrio, produzindo efeito miorrelaxante. O diazepam age como um modulador alostérico positivo de receptores $GABA_{A,}$ e a ativação das subunidades γ, α1 e α5 do receptor, potencializa os efeitos do GABA, levando a ataxia e relaxamento muscular (Milic et al., 2012; Rang & Dale, 2007).

O resultado obtido mostra que o EHMe na dose de 62.5mg/Kg v.o (menor dose efeitva selecionada em ensaios preliminares) não alterou a performance motora dos animais, caracterizando assim a segurança do uso do extrato e, que o efeito antinociceptivo em ensaios prévios no teste de formalina, não é decorrente de uma redução do desempenho motor, excluindo a possibilidade de um resultado falso positivo nos testes de nocicepção.

O primeiro modelo de caracterização da atividade farmacológica do EHMe foi no modelo de nocicepção térmica através do teste da Placa Quente ou “Hot Plate”.

O teste da Placa Quente é um modelo central, válido para drogas derivadas de opióides (De Queiroz et al*.,* 2010; Morucci et al*.,* 2012), e é caracterizado por respostas supraespinhais através de dois componentes comportamentais: a lambida de pata (*licking)* e o salto (*jumping*). A lambida de pata é suprimida por analgésicos opióides, enquanto que o salto pode ser inibido por analgésicos menos potentes, como ácido acetilsalicílico ou paracetamol (Le Bars, 2001). A especificidade e a sensibilidade do teste podem ser aumentadas mensurando-se o tempo de reação do animal no primeiro comportamento apresentado, sejam eles a lambida ou o salto (Carter, 1991). De acordo com Gunn et al*.,* (2011) este modelo experimental é objetivo, fácil de ser desenvolvido e pode ser usado repetidamente, além de prover medidas de respostas nociceptivas supraespinhais, semelhantes a dor humana, mediada por respostas supraespinhais que se diferem dos reflexos nociceptivos espinhais.

Entretanto, podem ser observadas respostas espinhais, uma vez que as fibras aferentes primárias encontradas na pele são ativadas em diferentes temperaturas, sendo então avaliado o comportamento de retitada de pata. Aproximadamente 45% dos nociceptores térmicos de pequeno e médio diâmetro (fibras C e Aδ tipo II) tem correntes de membrana evocadas a ~45°C, enquanto que 5-10% das fibras Aδ tipo I, tem correntes evocadas a ~52°C e são insensíveis a capsaicina (Nagy & Rang, 1999; Kirschtein et al*.,* 1999). As fibras C e Aδ tipo II respondem ao estímulo térmico devido a ativação de receptores vanilóides tipo 1 (VR1), canais iônicos de membrana não seletivos a cátions e sensíveis a capsaicina, que possuem limiar de ativação térmica de ~43°C (Julius & Basbaum, 2001).

De acordo com os resultados o EHMe na dose de 62.5mg/Kg v.o não foi capaz de aumentar o tempo de latência dos animais na placa em ambas as temperaturas analisadas (50°C e 56°C), mostrando que o efeito antinociceptivo da planta não é mediado por mecanismos supraespinhais e nem espinhais por interação com receptores VR-1.

Depois de avaliar o efeito do EHMe frente a estímulos térmicos, foram realizados testes de nocicepção química.

A estimulação química envolve a administração de substâncias algogênicas, que se diferencia claramente da estimulação por outros meios, sendo progressiva e com características específicas quando aplicadas. Este tipo de teste pode ser mensurado em

unidade de tempo, em resposta a um estímulo supralimiar. Os comportamentos evocados variam, mas são relativamente padronizados em roedores. Sem dúvida os modelos de nocicepção química são os que mais se assemelham a dor humana (Le Bars, 2001).

O teste de formalina, descrito primeiramente por Dubuisson & Dennis, (1978), é um modelo de dor aguda satisfatório para a avaliação do efeito de drogas analgésicas, bem como os possíveis mecanismos de ação (Hunskaar et al*.,* 1985). De acordo com Tjolsen et al., (1992) este é um dos modelos mais utilizados em ensaios de dor, pois mensura a capacidade de uma substância em suprimir ou atenuar a dor gerada pela lesão tecidual, além de ser o que mais se assemelha a dor clínica.

A nocicepção induzida pelo agente químico formalina caracteriza-se por 2 fases: a primeira fase de origem neurogênica e a segunda de origem inflamatória (Hunskaar e Hole, 1987).

A dor neurogênica é causada pela ativação direta de receptores TRPA-1 (um membro da família de receptores de potencial transitório (TRP), altamente expressos nas fibras C, pela formalina, que acarreta na liberação de substância P e CGRP. A SP produz hiperalgesia de maneira dependente de mensageiros intracelulares como NO, ácido araquidônico e PKC (Coderre & Yashpal,1994). O CGRP sensibiliza os neurônios do corno dorsal da medula espinhal, e este efeito pode ser bloqueado por inibidores de PKA ou PKC (Sun et al*.,* 2004)

Já a dor inflamatória é caracterizada pela liberação de mediadores pró-inflamatórios como PGs, NO, bradicinina, serotonina, histamina e glutamato, que sensibilizam a medula espinhal. (Hunskaar & Hole, 1987; Tjolsen et al., 1992; McNamara et al*.,* 2007; Trevisani et al*.,* 2007; Chen et al*.,*2012). A injeção intraplantar de formalina resulta também em comportamentos relacionados à dor, tais como a lambida e a mordida da pata lesada (Shibata et al*.,*1989; Le Bars, 2001).

Drogas anti-inflamatórias esteroidais e não-esteroidais são capazes de diminuir o comportamento nociceptivo durante a segunda fase enquanto a primeira fase parece não ser afetada (Hunskar et al., 1985; Rosland et al., 1990b). Entretanto, drogas de ação central como os narcóticos são capazes de inibir ambas as fases (Hunskar et al., 1985).

Os resultados deste trabalho apontaram um efeito antinociceptivo do extrato nas doses de 62.5, 125 e 250 mg/Kg v.o em ambas às fases do teste da formalina. Porém, como as porcentagens de inibição foram semelhantes e não existem diferenças estatisticamente

significantes entre eles, a dose de 62.5 mg/Kg foi escolhida como menor dose efetiva para avaliar os mecanismos de ação do EHMe.

Os primeiros mecanismos de ações elucidados foram a participação da via nitrérgica e glutamatérgica na antinocicepção produzida pelo EHMe.

O NO é uma molécula gasosa pequena e muito reativa, produzido a partir da L-arginina sob a ação da NO-sintase, e é capaz de atravessar barreiras neuronais, desempenhando importante papel na transmissão sináptica central e periférica, e também no desenvolvimento e manutenção da dor (Jin et al*.,* 2010; LaBuda et al., 2006). No teste de formalina a L-arginina causa efeito nociceptivo devido ao aumento da síntese de NO (Kitto et al., 1992). O NO pode agir como um transmissor retrógrado, uma vez que ativação do receptor glutamatérgico -NMDA, resulta na produção de NO em um neurônio pós-sináptico, que se difunde rapidamente para o neurônio pré-sináptico modulando a excitabilidade neuronal e as conexões sinápticas. Porém, o NO também pode agir no próprio neurônio onde é produzido (Meller & Gebhart, 1993; Freire et al*.,* 2009). Além disso, o NO produz peroxinitrito quando reage com ânion superóxido, que fosforila os receptores NMDA e consequentemente provoca sensibilização central e estimulação direta dos terminais nociceptivos periféricos (Freire et al*.,* 2009*).* Estudos também mostram que o NO produz efeito nociceptivo periférico por ativar diretamente receptores TRPV-1 e TRPA-1 (receptores de potencial transitório associados a canais iônicos permeáveis a cátions) (Miyamoto et al., 2009).

O glutamato é um aminoácido excitatório amplamente encontrado no sistema nervoso central, onde participa de processos fisiológicos e patológicos. Na medula espinhal é encontrado em concentrações de μM, e é originado de fibras aferentes primárias mielinizadas e não mielinizadas, em adição aos interneurônios intrínsecos (Battaglia & Rustioni, 1988). A excitação é causada pela ativação tanto de receptores ionotrópicos quanto metabotrópicos. Os receptores ionotrópicos podem ser divididos em: AMPA- presentes em todos os neurônios; KA (cainato) – expressos em níveis elevados no hipocampo, cerebelo e medula espinhal; e NMDA – encontrados essencialmente em neurônios periféricos, espinhais e supraespinhais. Os receptores AMPA e KA são permeáveis ao Na^+ e ao K^+, enquanto que o NMDA é altamente permeável ao Ca^{2+}, assim como ao Na^+ e ao K^+. Já os receptores metabotrópicos são acoplados a proteínas G, e agem indiretamente nos canais iônicos. Estes receptores só são

ativados quando os níveis de glutamato estão elevados durante a estimulação repetitiva da sinapse (Beirith et al., 2002; Rang & Dale, 2007; Katzung, 2007).

Muitos estudos tem mostrado que os receptores de glutamato estão envolvidos na transmissão do estímulo nociceptivo da periferia até regiões supraespinhais (Beirith et al., 2002), agindo tanto no desenvolvimento quanto na manutenção da responsividade a dor (Aanonsen et al., 1987; Aanonsen et al., 1990; Ferreira et al., 1999).

A nocicepção gerada pela injeção intraplantar de glutamato é atribuída à ativação de receptores ionotrópicos NMDA que causa a liberação de SP e CGRP por seus terminais centrais (Liu et al., 1994; Liu et al., 1997). Essa ação do NMDA pode ser mediada pelo NO dos terminais das fibras aferentes primárias. A despolarização gerada pela SP se associa com os potenciais excitatórios rápidos produzidos pelo glutamato. A ativação dos receptores NMDA promove o influxo de cálcio, a ativação da síntese de prostanóide e também de NO nas células do corno dorsal, que ao serem difundidos para fora das células, aumentam a excitação dos neurônios da medula (Sorkin, 1993; Liu et al., 1994; Liu et al., 1997).

Os resultados obtidos nestes experimentos mostram que os animais tratados com EHMe ou L-NAME (potente inibidor não seletivo da NOS), que receberam o pré-tratamento com L-arginina tiveram o efeito antinociceptivo completamente revertido, mostrando que o bloqueio da síntese de NO diminui a transmissão nociceptiva. No modelo de injeção intraplantar de glutamato, o EHMe foi capaz de inibir a nocicepção. Estes dados sugerem que o EHMe possa interagir com receptores glutamatérgicos e/ou TRPs, e/ou bloquear a síntese e/ou liberação de NO, contribuindo para o efeito antinociceptivo do extrato frente aos agentes químicos formalina e glutamato (Luiz et al., 2007).

Sabe-se que a liberação de glutamato e outros aminoácidos excitatórios pelos terminais pré-sinápticos dos nociceptores também é modulada por receptores TRP (Patapoutian et al., 2009). Sendo assim foi avaliado se o mecanismo de ação antinociceptivo do EHMe também envolvia esta família de receptores.

Os membros da família dos TRPs (receptor de potencial transitório) são canais iônicos permeáveis a cátions, que desenvolvem papel importante na resposta a uma grande variedade de estímulos, incluindo luz, som, temperatura, substâncias químicas e toque. As subfamílias TRPV (receptor de potencial transitório vanilóide), TRPA (receptor de potencial transitório anquirina) e TRPM (receptor de potencial transitório melastatina) pertencem ao grupo 1 dos

receptores TRPs, devido a forte homologia de sequência, e são ativados principalmente por estímulos térmicos e químicos (Venkatachalam & Montell, 2007).

Os receptores TRPV- subtipo 1 (TRPV-1) são ativados pela capsaicina, substância pungente derivada da pimenta vermelha, nas fibras sensoriais aferentes do tipo C e Aδ. A ativação deste receptor associado a um canal iônico não seletivo para cátions (Na^+ e Ca^{2+}) promove a liberação de glutamato, neuropeptídeos, óxido nítrico e mediadores inflamatórios na periferia, que transmitem a informação nociceptiva para a medula espinhal (Pietrovski, et al*.,* 2006, Sakurada, et al., 2003). A capsaicina quando aplicada topicamente produz intensa irritação associada com eritema, ardência e hiperalgesia térmica e mecânica (Sakurada et al., 2003). Os TRPV-1 também podem ser ativados por produtos derivados da metabolização do AA pela 5-LOX (Balaban et al*.,* 2003).

Os receptores TRPA- subtipo1 (TRPA-1) são co-expressos com TRPV-1 nas fibras C, e são ativado por frio nocivo (Story et al*.,* 2003), e substâncias irritantes como alil isotiocianato (AITC), alicina e cinamaldeído, substâncias pungentes da mostarda, alho e canela, respectivamente (Andrade et al*.,* 2008). Estes receptores estão envolvidos não só na dor e hiperalgesia (McNamara et al*.,* 2007), mas também do desenvolvimento da inflamação neurogênica através do aumento de Ca^{2+} intracelular, induzindo a liberação de neuropeptídeos sensoriais como a substância P e o CGRP, que contribuem para vasodilatação e edema (Trevisani et al*.,* 2007). O cinamaldeído age como agonista seletivo de TRPA-1 nas fibras aferentes primárias provocando nocicepção (Tsagareli, et al*.,* 2010). Em animais *knockout* para TRPV-1 observa-se a manutenção da nocicepção induzida pelo cinamaldeído, indicando que os agonistas parecem interagir através de diferentes mecanismos moleculares com os nociceptores, apesar da forte homologia de sequência entre os receptores (Caterina et al*.,*2000; Bandell et al*.,* 2004).

Os receptores TRPM-subtipo 8 (TRPM-8) são sensíveis ao frio moderado (15-25°C) e ao mentol, álcool terpênico natural encontrado nas folhas da menta, e são raramente co-expressos com receptores TRPA-1 e TRPV-1 nos gânglios da raiz dorsal (Kobayashi et al*.,* 2005; Bautista et al*.,* 2007). A aplicação tópica do mentol em baixas concentrações reduz a irritação pela capsaicina, a hipersensibilidade ao calor, torsões e cefaleia. Porém, a injeção intraplantar de altas concentrações induz a alodínia ao frio e a hiperalgesia, além de poder ativar receptores TRPA-1 (Pan et al*.,* 2012).

Em condições de dor inflamatória, ocorre a acidificação do tecido com pH<5 e os prótons estão envolvidos na sensibilização de nociceptores polimodais e hiperalgesia. Os receptores TRPV-1, bem como uma outra família de canais catiônicos sensíveis ao ácido (ASICs), são ativados pelos prótons e por outros estímulos nocivos específicos (McCleskey & Gold, 1999; Tominaga, 2007; Marcon et al*.,* 2009).

Os receptores ASICs são canais catiônicos pertencentes à família dos canais DEG/ENaC, e são detectores não só de prótons H^+ , como também são permeáveis a cátions (Na^+ e Ca^{2+}, Li^+, K^+). São descritos pelo menos 5 subtipos de receptores ASICs (1a, 1b,2a, 2b e 3), e a maioria deste subtipos é expressa no gânglio da raiz dorsal, com expressão preferencial dos 1b e 3, onde estão envolvidos na nocicepção mecânica e por acidose tecidual (Julius & Basbaum, 2001; Bashari et al*.,* 2009).

O resultados obtidos neste trabalho revelam que o EHMe não é capaz de inibir a nocicepção induzida pela capsaicina e mentol, mas tem efeito antinociceptivo frente ao cinamaldeído e salina acidificada.

A potência do efeito inibitório do EHMe sobre a nocicepção produzida pelo cinamaldeído corrobora com o resultado previamente obtido no teste de formalina (McNamara et al*.,* 2007), sugerindo a ação do extrato na modulação do receptor TRPA-1 e/ou na inibição indireta da liberação de mediadores inflamatórios (Rodrigues et al*.,* 2012).

Apesar da homologia de sequência entre TRPV-1 e TRPA-1, e que ambos os receptores TRPV-1 e ASIC são ativados por prótons, o EHMe não é capaz de bloquear os efeitos da capsaicina sobre o TRPV-1. Este dado está de acordo com o resultado obtido no teste da placa quente, lembrando que receptores VR-1 são ativados em limiares de temperaturas ~43°C (Julius & Basbaum, 2001). Além disso, a apigenina presente no extrato é conhecida por ser um ativador de receptores TRPV-4, que se assemelha muito aos TRPV-1 nas propriedades estruturais e de ativação (Ma et al*.,* 2012), o que pode ter contribuído para EHMe não ter efeito antinociceptivo neste modelo.

A antinocicepção do EHMe frente a salina acidificada pode ser explicada pela capacidade de interação com receptores ASIC. Porém, como não houve efeito sobre TRPV-1, não podemos excluir a possibilidade de modulação de outros receptores metabotrópicos sensíveis ao ácido no efeito antinociceptivo (Huang et al*.,* 2007).

Como já esta bem estabelecido que a sensação de dor é modificada por sistema endógenos inibitórios da dor, tal como a liberação de opióides endógenos (β-endorfina e dinorfina), foi avaliado se o efeito antinociceptivo do EHMe poderia estar relacionado com o sistema opióide.

Os receptores opióides estão amplamente distribuídos em diversos tecidos periféricos como trato gastrointestinal e nervos cutâneos, bem como no sistema nervoso central, modulando a via da transmissão da dor no corno dorsal da medula espinhal (Longhi-Balbinot et al*.,* 2011). Foram identificados 3 classes principais de receptores opióides (μ,κ,δ), sendo que todos eles são acoplados a proteína G e sinalizam de forma muito semelhante, afetando a regulação de canais iônicos, modulando o processamento de Ca^{2+} intracelular e alterando a fosforilação de proteínas (Katzung, 2007). Todos esses receptores têm sido associados com analgesia espinhal e supraespinhal (Todd e Spike, 1993; Coggeshall & Carlton, 1997; Fürst, 1999), além de produzirem constipação intestinal (Katzung, 2007; Rang & Dale, 2007; Goodman & Gilmam, 2007). É importante salientar que os receptores μ1, predominantes no sistema nervoso central, são responsáveis pela analgesia, enquanto o μ2 está presente na medula espinhal e também no tubo digestivo sendo responsável pela depressão respiratória e disfunção intestinal (Becker & Blum, 2009).

Tanto os opióides endógenos quanto os exógenos, como a morfina, agem como agonistas dos receptores opióides, produzindo analgesia através da inibição pré e pós-sináptica. Nas fibras pré-sinápticas (Aδ e C) a ativação de receptores opióides é responsável pelo fechamento de canais de Ca^{2+} regulados por voltagem, reduzindo a liberação de transmissor (ex. glutamato), e nas fibras pré-sinápticas promove hiperpolarização da membrana através da abertura de canais de K^{+}. (Goodman & Gilman, 2007; Katzung, 2007).

A naloxona, um análogo da morfina, fornece ferramentas farmacológicas para o estudo dos receptores envolvidos, pois age como antagonista não seletivo de receptores opióides, revertendo os efeitos da morfina (Rang & Dale, 2007; Longhi-Balbinot et al*.,* 2011).

Os dados obtidos mostram que o sistema opióide esta envolvido na antinocicepção, baseando-se no fato de que a naloxona reverteu o efeito do EHMe e da morfina em ambas as fases do teste de formalina.

Considerando o envolvimento do sistema opióide no efeito antinociceptivo do EHMe, que há uma alta densidade de receptores opióides no trato gastrointestinal, e que as cascas de

Machaerium hirtum são utilizadas popularmente no tratamento da diarreia (Pott & Pott, 2004), avaliou-se a ação do EHMe sobre a motilidade intestinal.

A motilidade intestinal está relacionada com a velocidade de esvaziamento gástrico, a contínua situação de contração, relaxamento e secreção. Essas funções são controladas pelo sistema neuromotor, que é regulado por vários sistemas de receptor, entre eles o sistema opióide, bem como o colinérgico, adrenérgico e serotonérgico (Kamm, 2000). Um grande número de fatores como agentes químicos, estresse emocional e condições patológicas, pode alterar a motilidade intestinal e o tempo do trânsito, levando ao aparecimento de eventos diarreicos. Drogas redutoras da motilidade (loperamida, difenoxilato, anticolinérgicos, etc) tem sido utilizadas contra diarreia, mas possuem efeitos adversos depois do uso prolongado (Paul & Saha, 2012), incluindo constipação, cólicas abdominais, sonolência e tontura (Rang & Dale, 2007).

Os principais agentes farmacológicos que reduzem a motilidade são os opiáceos. A ação da morfina, o protótipo dos opiáceos, sobre o trato alimentar é complexa, pois aumenta o tônus e as contrações rítmicas do intestino, porém diminui a atividade contrátil propulsiva, atrasando a passagem do conteúdo intestinal, além de reduzir a atividade secretora (Greenwood-Van Meerveld et al*.,* 2004).

Os animais tratados com EHMe e morfina tiveram a motilidade intestinal reduzida, e a participação dos receptores opióides foi confirmada pela reversão provocada pelo efeito antimotilidade da naloxona. Estes resultados sugerem que o EHMe possa interagir com os receptores opióides periféricos (espinhais e intestinais), uma vez que o EHMe é desprovido de atividade supraespinhal comprovado pelo teste da placa quente, validando a participação da via opiodérgica como mecanismo de ação do EHMe no teste de formalina. Esta atividade também indica um potencial efeito antidiarreico, havendo a necessidade da realização de outros testes que melhor elucidem e confirmem o uso popular da *M. hirtum*.

Para caracterizar a atividade do EHMe sobre o processo inflamatório foram realizados vários modelos experimentais, nos quais o EHMe foi desafiado frente a diversas substâncias edematogênicas e inflamatórias.

O primeiro modelo avaliado foi o edema de orelha induzido por xilol, um composto aromático irritante que produz uma inflamação de origem predominantemente neurogênica mediada por fibras aferentes sensíveis a capsaicina. A nocicepção provocada pelo xilol é

dependente de receptores do tipo TRPV-1 (receptores ativados por capsaicina). A inflamação parece estar relacionada com a ativação de receptores do tipo TRPA-1 por espécies reativas do oxigênio geradas pelo xilol (Julius & Basbaum, 2001; Trevisani et al., 2007; Sandor et al., 2009), que aumenta o Ca^{2+} intracelular e induz a liberação de neuropeptídeos sensoriais como a substância P e o CGRP (Trevisani et al., 2007). A substância P provoca extravasamento de plasma (e consequentemente edema) através da ativação de receptores NK_1 (neurocininas) nas células do endotélio vascular, enquanto que CGRP potencializa o efeito da substância P através da indução de vasodilatação e edema, que caracteriza o estágio inicial da inflamação aguda (Geppetti et al., 1996; Lin et al., 2007).

O edema de orelha induzido por xilol é um método vantajoso nos testes com produtos naturais e no *screening* de agentes anti-inflamatórios (Jacobs et al., 1985), especialmente aqueles que inibem a fosfolipase A2 (Zaninir et al., 1992).

Os animais tratados com EHMe apresentaram significativa redução do edema de orelha nas dose de 125 e 250 mg/Kg, de maneira dose dependente. Como o EHMe produziu efeito antinociceptivo através de receptores TRPA-1 e os flavonóides agem como antioxidantes e sequestrantes de radicais livres (Crozier et al., 2009; Mustafa et al.,2010), o efeito antiedematogênico do EHMe pode estar relacionado com a regulação da ativação do receptor TRPA-1 e o aumento de Ca^{2+} intracelular, e/ou por agir como sequestrante de radicais livres.

Para uma melhor elucidação do efeito anti-inflamatório do EHMe foi utilizado um modelo mais específico, no qual foi feita a indução do edema de orelha com o uso do AA.

O AA aplicado topicamente induz uma reação inflamatória intensa na pele de curta duração, na qual pode ser observada a vasodilatação e a hiperemia após 5 minutos da aplicação, enquanto que o edema atinge a maior intensidade aos 60 minutos, coincidindo com o extravasamento de proteínas e leucócitos. Os principais produtos metabólicos do AA que estão envolvidos com processos inflamatórios são a PGE_2 e os leucotrienos B_4, C_4 e D_4 (Young et al., 1983; Chang et al., 1986; Humes et al., 1986; Crummey et al., 1987).

A PGE_2 tem papel importante na geração da resposta inflamatória, causando vasodilatação e potencialização do edema, além de contribuir para a dor inflamatória (Kumar et al., 2005; Ricciotti & FitzGerald, 2011; Kawabata, 2011; Chen et al., 2012). O LTB_4 sintetizado nos neutrófilos exerce efeito autócrino sobre eles, além de estar envolvido na quimiotaxia dos leucócitos (Carlson et al.,1985; McDonald et al., 1994; Kumar et al., 2005).

O edema de orelha induzido por AA pode ser inibido por drogas anti-inflamatórias esteroidais, como a metilprednisolona e dexametasona, e também por AINEs, como a indometacina (Carlson et al*.,* 1985).

Os glicorticóides, como a dexametasona, produzem efeito anti-inflamatório através da indução da formação de anexina-1 e diminuição da expressão da COX-2 (induzida) (Fu et al*.,*1990). A anexina-1 inibe a atividade da fosfolipase A2 citosólica sobre a liberação do AA, substrato enzimático para COX-1/COX-2 e 5-LOX na formação de eicosanoides envolvidos na inflamação: prostaglandinas e leucotrienos (Hong et al*.,* 1976; Hirata et al*.,*1980; Masferrer et al*.,* 1990). Entretanto, eles parecem ter algumas propriedades pró-inflamatórias.

Estudos realizados para investigar o efeito dos glicocorticoides na expressão da via da 5-LOX demonstram resultados conflitantes (Riddick et al*.,*1997).

Avaliações prévias com leucócitos fracionados e leucócitos em modelo *ex vivo* mostraram que a administração de dose única de dexametasona (Freeland et al*.,* 1987), e o tratamento por uma semana com prednisona (Sebaldt et al*.,*1990), respectivamente, não tiveram efeito sobre a liberação estimulada de LTB_4. De acordo com Riddick et al*.,*1997, a expressão da via da 5-LOX é aumentada pela dexametasona, devido a ativação da codificação do mRNA para síntese de 5-lipoxigenase e 5-LAP, e não por um desvio do ácido araquidônico para a via da 5-LOX por inibição da COX. Stankova et al*.,*2002 comprovou que a dexametasona, assim como o LTB_4, previne a apoptose dos neutrófilos através de mecanismos de suprarregulação (*up regulation*) dos receptores BLT_1 de alta afinidade pelo LTB_4 encontrados nos leucócitos polimorfonucleares.

Os resultados apresentados mostram que o controle positivo usado (dexametasona 5mg/Kg i.p) e o EHMe, em todas as doses testadas, produziram efeito anti-inflamatório no edema de orelha induzido por AA.

Nas dosagens bioquímicas, a dexametasona e o EHMe (62.5 e 250mg/Kg v.o), foram capazes de diminuir a síntese de PGE_2. Entretanto, nenhuma das substâncias teste foi capaz de diminuir a síntese de LTB_4.

O mecanismo de ação está relacionado com o envolvimento da via da COX, através da diminuição da síntese de PGE_2, mas não pela ação sobre a via da 5-LOX, uma vez que nem o EHMe ou a dexametasona não foram capazes de diminuir a síntese de LTB_4.

Este potente efeito anti-inflamatório exercido pelo EHMe pode ser devido a presença de flavonas glicosiladas, como a apigenina , e triterpenos saponínicos (α e β-amirina), conhecidamente capazes de suprimir a expressão do mRNA da COX-2 e iNOS e, assim diminuir os níveis de PG e NO (Liang et al*.,* 1999; Al-Fayez et al*.,* 2006; Medeiros et al*.,* 2007).

Outro modelo para avaliar a atividade antiedematogênica e anti-inflamatória do EHMe foi o edema de pata induzido por carragenina.

De acordo com Winter et al*.,* 1962 e Garcia et al*.,* 1993, a carragenina, um mucopolissacarídeo encontrado nas algas vermelhas nas costas do Atlântico da Europa e na América do Norte, é a melhor substância indutora de reação inflamatória em animais experimentais, como o edema de pata, uma vez que a resposta depende totalmente do estímulo inflamatório local, sem produzir efeitos sistêmicos e com alto grau de reprodutibilidade. A carragenina induz a migração de células inflamatórias para o local da injeção que, juntamente com células residentes, produzem mediadores importantes para o desenvolvimento do processo inflamatório (Cuzzocrea et al., 2004).

Este modelo experimental é bifásico, decorrente de um efeito proteolítico que libera na fase inicial (1-2 horas) mediadores cinina-like, altas concentrações de histamina e serotonina, com aumento na síntese de PGs, e na fase tardia (3-4horas) é sustentada pela liberação de prostaglandinas no tecido (Di Rosa et al*.,* 1968, Di Rosa et al*.,* 1971; Brito e Antonio, 1998). O edema pode ser inibido por drogas anti-inflamatórias esteroidas e não esteroidais, anti-histamínicos, antagonistas serotonérgicos, anticonvulsivantes (clorpromazina) e antireumáticos (hidroxicloroquina) (Winter, et al*.,* 1962; Levy, 1969). O piroxicam, utilizado como controle positivo, é classificado como um AINE derivado do *oxicam,* que possui atividade anti-inflamatória e antinociceptiva através da inibição das ciclo-oxigenases COX-1 e COX-2, de forma não seletiva (Santos et al, 2011).

Estudos mostram que o edema causado pela carragenina envolve mecanismos inflamatórios não- neurogênicos e neurogênicos, que tem sido associados com a produção de PGs, diferentes expressões da eNOS, iNOS, COX-1 e COX-2 e formação de espécies reativas nitrogenadas e oxigenadas, citocinas e outros mediadores inflamatórios, além da interação indireta com receptores TRPA-1 (Posadas, 2004; Moilanen et al*.,* 2012;).

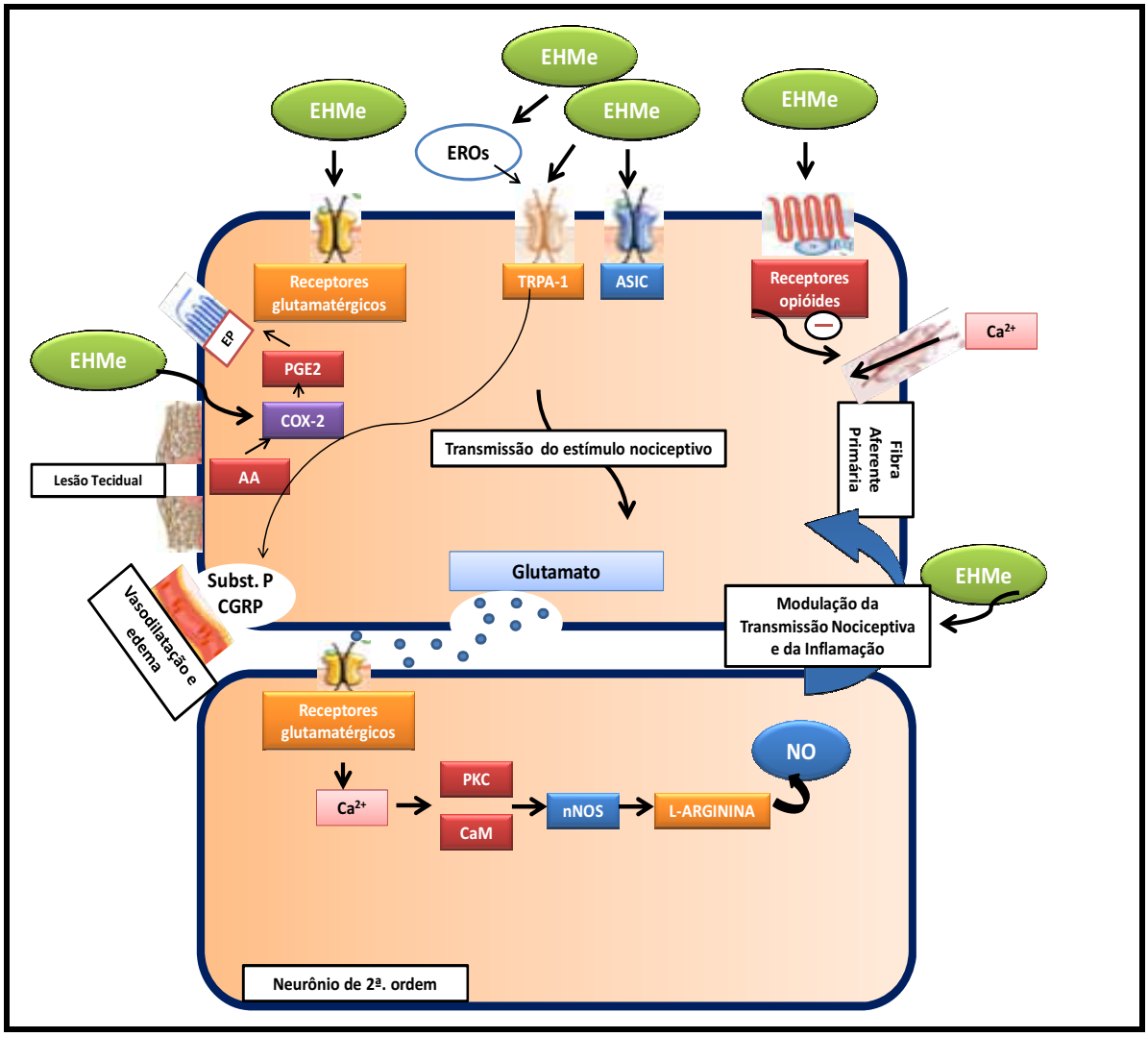
O uso do rato neste modelo justifica-se pela maior sensibilidade destes animais a reação inflamatória produzida pela carragenina (Winter, et al*.,* 1962). O camundongo

apresenta, além da menor sensibilidade (Levy, 1969), diferenças no processo exudativo provocado pela carragenina (Garcia Leme et al., 1973; Franco & Morley, 1976).

Neste trabalho o EHMe (62.5mg/Kg v.o) não foi capaz de inibir o edema de pata induzido pela carragenina durante todo o tempo de avaliação (4h), indicando que não há ação nem na fase inicial nem na fase tardia do modelo experimental. Porém, considerando que o EHMe diminui os níveis de PGs no modelo de edema de orelha induzido por AA em camundongos, torna-se evidente a ação anti-inflamatória do extrato e sua inibição na síntese de prostanglandinas. Este resultado aparentemente contraditório com o obtido no modelo de edema de pata induzido pela carragenina pode ser decorrente da diferença metabólica entre as espécies de roedores. Os estudos de Menahan & Sobocinski, 1983 revelam que os níveis plasmáticos de glicose, glicerol e ácidos graxos livres em camundongos é sempre maior que em ratos quando alimentados, mostrando que o metabolismo dos camundongos é mais rápido que dos ratos. Além disso, de acordo com Gradollato et al*,* .2004, a apigenina, na dose única de 10mg/Kg, tem uma lenta absorção quando administrada por via oral em ratos, aparecendo no sangue após 24horas da ingestão, com tempo de meia-vida de 91.8h, confirmando a hipótese da baixa absorção e excreção da flavona. Portanto, a dose do EHMe de 62.5mg/Kg v.o pode ser baixa para exercer efeito antiedematogênico e/ou anti-inflamatório em ratos.

Os prováveis mecanismos de ação do EHMe na nocicepção química e na inflamação são mostrados na Fig. 21.

Fig. 21. Efeito do EHMe na nocicepção química e na inflamação: possíveis alvos de ação.



As cascas de *Machaerium hirtum* são popularmente utilizadas no tratamento de úlceras gástricas e o presente trabalho mostra que o EHMe possui um potente efeito anti-inflamatório através da ação sobre a via da COX. Como as drogas AINEs são reconhecidamente indutoras de úlcera (Goodman & Gilman, 2007), foi avaliado o efeito gastroprotetor do EHMe em modelos de indução de úlcera gástrica por etanol e indometacina.

A úlcera gástrica é uma desordem comum do sistema gastrointestinal, com alta prevalência em todo mundo. Estima-se que 10% da população sejam afetadas por essa doença (Calam & Baron, 2001; Zapata-Colindres, 2006). Caracterizada por ser uma lesão profunda e necrótica, surge de um desequilíbrio entre fatores protetores da mucosa como, a barreira de muco e bicarbonato, oxido nítrico (NO), fluxo sanguíneo, prostaglandinas, agentes antioxidantes, entre outros, e fatores agressores, por exemplo, secreção de ácido, pepsina, leucotrineos e radicais livres (Belagihally et al., 2010 . A mucosa gástrica está sujeita a

contínuas mudanças e os fatores agressores se originam de uma variedade de estímulos tanto endógenos como exógenos, entre os quais estão o estilo de vida estressante, o consumo de álcool, o tabagismo, dieta inadequada, os AINEs e a presença, no local, da bactéria *Helicobacter pylori* (Bandyopadhyay et al*.,* 2001; Beserra, 2011).

Quando ocorre o dano da mucosa gástrica, existem mecanismos fisiológicos que servem para reverter à lesão, como a inflamação, proliferação celular, re-epitelização, formação de tecido de granulação e interações entre várias células, matriz e tecido de remodelamento (Tarnawski, 2005). Estes diferentes processos de cicatrização e reparo da úlcera são controlados e regulados por citocinas, fatores de crescimento, e alguns fatores de transcrição superexpressos ou ativados próximo à área da lesão (Luo et al*.,* 2004).

Como fator protetor as protaglandinas parecem execer papel importante no processo de cicatrização e estão envolvidas com o *up-regulation* da síntese de muco no estômago, ativação da proliferação de células da mucosa, promoção da angiogênese e outras funções para restaurar a integridade da mucosa (Brzozowski et al*.*, 2005).

O álcool como fator agressor, quando aplicado topicamente na mucosa gástrica, causa estresse oxidativo, gerando de espécies reativas do oxigênio, que levam ao desequilíbrio entre agentes pró-oxidantes e antioxidantes (La Casa et al*.*, 2000; Pan et al*.*, 2008). Dentre os agentes antioxidantes os compostos sulfidrílicos não proteicos (NP-SH), principalmente a glutationa reduzida (GSH), são importantes para a gastroproteção e manutenção da mucosa gástrica (Nagy & Szabo, 2007). O etanol, ainda afeta a barreira de muco encontrada na parede gástrica, tornando o epitélio gástrico mais sensível ao ataque do ácido produzido pelo estômago (Wallace, 2001). Quando esse agente lesivo alcança o epitélio da mucosa, através do rompimento da barreira muco-bicarbonato, provoca a ruptura da parede dos vasos sanguíneos, gerando as hemorragias e os focos hiperêmicos comumente observados nos modelos experimentais (Mincis et al*.*, 1995).

De acordo com Goel & Sairam, 2002, o modelo experimental de úlcera induzida por etanol tem sido amplamente utilizado para investigar o efeito gastroprotetor de plantas medicinais.

A carbenoxolona usada como controle positivo do experimento é um triterpenoide semissintético obtida da *Glycyrrhiza glaba,* com atividade antiulcerogência conhecida. A citoproteção gástrica exercida pela carbenoxolona é mediada pela participação de

prostaglandinas endógenas, aumento óxido nítrico, muco, aumento do pH e da secreção de bicarbonato, já descritos como fatores de proteção da mucosa (Takeuchi et al.,1998; Chávez-Piña et al., 2011).

Outro modelo utilizado para avaliar a atividade gastroprotetora do extrato foi o de úlcera gástrica induzida pelo AINE indometacina.

A indometacina, um derivado indólico, age como potente AINEs, através da inibição não seletiva das COXs, além de inibir as fosfolipases A e C, reduzir a migração de neutrófilos e a proliferação de células T e B. Esta droga esta indicada para uso em doenças reumáticas e é particularmente popular nos casos de gota (Katzung, 2007).

O uso prolongado dos AINEs, principalmente no caso de doenças articulares, resulta em uma série de efeitos colaterais, em sua maioria relacionados com distúrbios do trato gastrointestinal, como dispepsia, diarreia, náuseas, vômitos e ulceração gástrica. Estima-se que 20% dos usuários de AINEs sofre da lesão gástrica, decorrente da inibição da COX-1, responsável pela produção de PG (Yamagata & Hiraishi, 2007).

Os AINEs produzem danos no estômago por mecanismos locais (tópicos) e sistêmicos. As ações tópicas envolvem diversos mecanismos, mas principalmente a natureza ácida de alguns AINEs, pode diretamente lesar as células epiteliais. Além disso, estes fármacos são capazes de reduzir a secreção de muco e bicarbonato, alterando a eficácia do gradiente de pH em proteger o epitélio, e também diminuir a capacidade do fator de crescimento epidermal (EGF) em promover o reparo epitelial. As ações sistêmicas mais importantes dos AINEs incluem a capacidade de suprimir a síntese de PGs, o que deixa a mucosa mais susceptível aos efeitos lesivos de agentes luminais como ácido, pepsina e até mesmo os AINEs (Wallace, 2008). Os leucotrienos LTB_4 também contribuem para a injúria da mucosa gástrica por AINEs, pela promoção de quimiotaxia de neutrófilos e leucócitos, estimulando a liberação de ERO e, indiretamente a formação de outros mediadores inflamatórios, como o TNF-α (Wallace, 2001)

O controle positivo deste modelo, o lansoprazol, é uma droga benzimidazólica substituída, capaz de diminuir a secreção ácida, inibindo irreversivelmente a bomba de prótons ao se transformar em sulfonamida nos canalículos da célula parietal do estômago, além de erradicar a *H. pylori* através da inibição da respiração da bactéria com consequente inibibção da síntese de ATP. Quando administrado diariamente em baixa dose, mostra-se

efetivo em reduzir a incidência de úlceras em usuários crônicos de AINEs (Katzung, 2007; Nagata et al., 2001; Sugano et al., 2012).

No presente trabalho os controles positivos e o EHMe (dose de 250mg/Kg) foram capazes de proteger a mucosa gástrica dos agentes lesivos etanol e indometacina. Considerando que o etanol causa lipoperoxidação lipídica, e que o EHMe diminui a síntese de PGs e não diminui a síntese e/ou liberação de LTB_4, mas continua protegendo a mucosa no modelo de indometacina, os resultados sugerem que a atividade gastroprotetora pode ser proveniente de outros efeitos exercidos pelos flavonóides (apigenina) e triterpenos (α e β-amirina) presentes no extrato. Estes metabólitos secundários são conhecidos por suas propriedades gastroprotetores, incluindo efeitos antissecretório, citoprotetor, antioxidante e supressor de citocinas inflamatórias (TNF-α) (Navarrete et al, 2002; Mota et al., 2009; Melo et al., 2011).

8. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos até o presente momento indicam que o EHMe é bastante promissor para a utilização terapêutica na dor, inflamação e distúrbios gastrointestinais, e estes efeitos farmacológicos são em grande parte devido a ação sinérgica de seus metabólitos secundários. Os mecanismos periféricos relacionados com o efeito antinociceptivo em modelos de nocicepção química aguda envolvem as vias opióide, nitrérgica, glutamatérgica, receptores TRPA-1 e ASICs. Na inflamação o EHMe inibe os edemas possivelmente por interação com receptores TRPA-1 e/ou como antioxidante no modelo do xilol, e através da diminuição da síntese de PGE_2 no modelo do AA. Interessantemente, mesmo apresentando atividade anti-inflamatória, o EHMe, através de mecanismos ainda não elucidados, tem efeito gastroprotetor. Este resultado associado ao efeito redutor da motilidade intestinal comprova o uso popular desta espécie. Além disso, constatou-se ausência de toxicidade em parâmetros macroscópicos, sugerindo segurança e eficácia em sua aplicação farmacológica. Apesar de serem necessários mais estudos, neste contexto, o uso do extrato hidroalcoólico das entrecascas de *Machaerium hirtum* se mostra promissor como potencial medicamento fitoterápico.

9. REFERÊNCIAS

AANONSEN, L. M; WILCOX, G.L Nociceptive action of excitatory amino acids in the mouse: effects of spinally administered opioids, phencyclidine and *sigma* agonists, **J. Pharmacol. Exp. Ther**., v.1, p.9–19, 1987.

AANONSEN, L. M; WILCOX, G.L. Excitatory amino acid receptors and nociceptive neurotransmission in rat spinal cord, **Pain**, v. 41, p. 309–321, 1990.

AKIKO, T. et al. Inhibition of both COX-1 and COX-2 is required for development of gastric damage in response to nonsteroidal antiinflammatory drugs. **J. Physiol**., v. 95, p. 21–27, 2001.

ALBERNAZ, L. C. et al. Investigation of plant extracts in traditional medicine of the Brazilian Cerrado against protozoans and yeasts. **J. Ethnopharmacol.**, v. 131, n. 1, p. 116-121, 2010.

AL-FAYEZ M. et al. Diferential modulation of cyclooxygenase-mediated prostaglandin production by the putative cancer chemopreventive Flavonoids tricin, apigenin and quercetin. **Cancer Chemother Pharmacol**., v.58, p.816–825, 2006.

ALMEIDA, T. F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Res**., v. 1000, p. 40-56, 2004.

ALMEIDA, R.N. **Psicofarmacologia - Fundamentos Práticos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

AL MESHAL, I. A. et al. **Fitoterapia**, v.53, p. 79, 1982.

ANDRADE, E.L. et al. Pronociceptive response elicited by TRPA1 receptor activation in mice. **Neurosci.**, v. 152, p. 511–520, 2008.

ANVISA,2008. Disponível em<http://www.saude.al.gov.br/sites/default/files/rdc_79.08.pdf>. Acesso em: 13 jun. 2013.

ANVISA, 2010. Disponível em: < http://portal.anvisa.gov.br. 2010>. Acesso em: 20 jun. 2013.

BAGGIO, C.H. et al. Gastroprotective effects of a crude extract of *Baccharis illinita* DC in rats. **Pharm. Res**., V. 47, p 93-8, 2003.

BAGGIO, C. H. et al. Antinociception of β-d-glucan from< i> Pleurotus pulmonarius</i> is possibly related to protein kinase C inhibition.**Int. J. Biol. Macromol.**, v. 50, n. 3, p. 872-877, 2012.

BALABAN, C. D; ZHOU, J; LI, H. S. Type 1 vanilloid receptor expression by mammalian inner ear ganglion cells. **Hearing research**, v.175, n.1, p.165-170, 2003.

BALSINDE J.; BALBOA M.A.;DENNIS E.A. Functional coupling between secretory phospholipase A2 and cyclooxygenase-2 and its regulation by cytosolic group IV phospholipase A2. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v.95, p. 7951-7956, 1998.

BANDELL, M. et al. Noxious cold ion channel TRPA1 is activated by pungent compounds and bradykinin. **Neuron**., v. 41, p.849–857, 2004.

BANDYOPADHYAY, D.; Biswas, K.; Bhattacharyya, M.; Reiter, R.J.; Banerjee, R.K. Gastric toxicity and mucosal ulceration induced by oxygen-derived reactive species, protection by melatonin**. Curr. Mol. Med**. v. 1, p.501-513, 2001.

BARNES, P. J.; KARIN, M. Nuclear factor-κB—a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. **N. Engl. J. Med.**, v. 336, n. 15, p. 1066-1071, 1997.

BASBAUM, A.I; JESSELL, T.M. The perception of pain. **Princ. neural sci.**, 4ª edição, Nova York: McGraw-Hill, p. 472–491, 1999.

BASBAUM, A.I; JESSELL, T. The perception of pain. **Princ. Neurosci.**, p.472–491, 2000.

BASBAUM, A.I. et al. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267-84, 2009.

BASHARI, E. et al. Two PKC consensus sites on human acid-sensing ion channel 1b differentially regulate its function. **Am. J. Cell Physiol.,** v.296, n.2, p. C372-C384, 2009.

BAUTISTA, D.M. et al. TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. **Cell,** v.124, p. 1269–1282, 2006.

BAUTISTA, D. M. et al. The menthol receptor TRPM8 is the principal detector of environmental cold. **Nature**, v.448, p.204-208, 2007.

BATTAGLIA, G.; RUSTIONI. A.; Coexistence of glutamate and substance P in dorsal root ganglion cells of the rat and monkey. **J. Comp. Neurol**., v.277, p. 302-312, 1988.

BECKER, G.; BLUM, H.E. Novel opioid antagonists for opioid-induced bowel dysfunction and postoperative ileus. **Lancet**, V. 373, p. 1198-206, 2009.

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**., v. 924, p. 219-228, 2002.

BELAGIHALLY M. et al. Alterations of matrix metalloproteinases, gastric mucin and prostaglandin E_2 levels by pectic polysaccharide of swallow root (*Decalepis hamiltonii*) during ulcer healing. **Biochimie**., v. 92, n.2 , p.194–203, 2010.

BENTO C. C. et al. Allantoin isolated of Machaerium hirtum (Fabaceae). In: Brazilian Conference in Natural Products, 3, 2011, Ouro Preto-MG, **Resumos.** 2011.

BERIA, J.U. et al. Epidemiologia do consumo de medicamentos em crianças no centro urbano da região sul do Brasil. **Rev. Saúde Pública***,* v.27,n.2, p.95-104, 1993.

BESERRA, A.M.S.S. Gastroprotective and Ulcer-Healing Mechanisms of Ellagic Acid in Experimental Rat. **J. Agri. Food Chem.,** v. 59, p. 6957-65, 2011.

BESSON, J. M. The neurobiology of Pain. **Lancet**, v. 353, p. 1610-15, 1999.

BIESKI, I. G. C. et al. Ethnopharmacology of medicinal plants of the Pantanal region (Mato Grosso, Brazil). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 2012.

BOURINET, E. et al. Silencing of the Cav3.2 T-type calcium channel gene in sensory neurons demonstrates its major role in nociception. **EMBO J**., v. 24, p. 315–324, 2005.

BOMBARDIER, C. An evidence-based evaluation of the gastrointestinal safety of coxibs. **Am. j. cardiol.**, v.89(6A), 3D, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde - Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos: Textos Básicos de Saúde, Brasília, 2006, 60p.

BRASIL. Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA): Diretrizes da Prática de Eutanásia do CONCEA, Brasília, 2013, 54p.

BRENNER, A. V. et al. Season of birth and risk of brain tumours in adults. **Neurol.** v. 63, p. 276-281, 2004.

BRENOL, J. C. T.; XAVIER, R. M.; MARASCA, J. Antiinflamatórios não hormonais convencionais. **Ver. Bras. Med**., p. 57, 2000.

BRITO, A.R.M.S. **Manual De Ensaios Toxicológicos In Vivo**. Ed. Unicamp, Campinas (Brazil), p.122, 1994.

BRITO, A.R.M.S; ANTONIO, M.A. Oral anti-inflammatory and ulcerogenic activities of a hydrialcoholic extract and partitioned fractions of *Turnera ulmifolia* (Turneraceae). **J. of Ethnopharmacol..** v. 61, 215-28, 1998.

BRZOZOWSKI, P.C. et al. Role of prostaglandins in gastroprotection and gastric adaptation. **J. Physiol. Pharmacol**., v. 56, p. 33-55, 2005.

CALAM, J.; BARON, J. H. Pathophysiology of duodenal and gastric ulcer and gastric cancer. **Brit. Med. J**., v.323, p.980-983, 2001.

CALIXTO, J.B.. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents)**. Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.33, n.2, p. 179-189, 2000.

CALIXTO, J. B. et al. Inflammatory pain: kinins and antagonists. **Curr. Opin. Anesthesiol**., v. 14 p. 519-526, 2001.

CALIXTO, J. B.. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Cienc. Cult**. , v.55, n.3, p. 37-39, 2003.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: A personal view**. J. Ethnopharmacol.**, v.100, n.1, p.131-134, 2005.

CALIXTO, J. B; SIQUEIRA JUNIOR, J. M. Desenvolvimento de medicamentos no Brasil: desafios. **Gazeta Médica da Bahia**, v.78, n.1, 2008.

CARLSON, R.P. et al. Modulation of mouse ear oedema by cyclooxygenase and lipoxygenase inhibitors and other pharmacologic agents**. Agents Actions**, v.17, p. 197-206, p. 1985.

CARR, D.B.; GOUDAS, L. C. Acute pain. **Lancet,** v. 353 , p. 2051-2058, 1999.

CARTER, R.B. Differentiating analgesic and non-analgesic drug activities on rat hot plate: effect of behavioral endpoint. **Pain**, v.47,p**.**211–220, 1991.

CARVALHO, W.A.; LEMÔNICA, L. Mecanismos celulares e moleculares da dor inflamatória. Modulação periférica e avanços terapêuticos**. Rev. Bras. Anestesiol,** v.48, p.137-58, 1998

CATERINA, M.J. Impaired nociception and pain sensation in mice lacking the capsaicin receptor**. Science,** v.288, p.306–313, 2000.

CHANG, J. et al. Correlation between mouse skin inflammation induced by arachidonic acid and eicosanoid synthesis. **J. Inflamm**., v. 10, p. 205-214, 1986.

CHÁVEZ-PIÑA, A. E. Carbenoxolone gastroprotective mechanism: participation of nitric oxide/$_c$GMP/K_{ATP} pathway in ethanol-induced gastric injury in the rat. **Fundam. Clin. Pharmacol.**, v.25, p. 717–722, 2011.

CHEN, L. et al. Prostanoids and inflammatory pain. **Prostaglandins Other Lipid Mediators**, 2012.

CODERRE, T. J; YASHPAl, K. Intracellular Messengers Contributing to Persistent Nociception and Hyperalgesia Induced by $_{L}$-Glutamate and Substance P in the Rat Formalin Pain Model. **Eur. J. Neurosci.,** v.6, p.1328–1334, 1994.

COGGESHALL, R. E.; CARLTON, S. M. Receptor localization in the mammalian dorsal horn and primary afferent neurons. **Brain Res. Rev**., v.1, n. 24, p. 28-66, 1997.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonóides: potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Rev. Virt. Quim**., v.1, p. 241-256, 2009.

CROZIER A, JAGANATH I B, CLIFFORD M N. Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. **Nat. Prod. Rep**., v. 26, p.1001-1043, 2009.

CRUMMEY, A. et al. Inhibition of arachidonic acid-induced ear oedema as a model for assessing topical antiinflammatoty compounds. **Agents Actions**, v. 20, p. 69-76, 1987.

CUNHA, T. et al. A cascate of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A**., v. 102, n. 5, p. 1755-1760, 2005.

CUNHA, T. M. et al. Morphine peripheral analgesia depends on activation of the PI3Kγ/AKT/nNOS/NO/KATP signaling pathway. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, v. 107, n. 9, p. 4442-4447, 2010.

CUZZOCREA, S. et al. Rosiglitazone, a ligand of the peroxisome proliferator-activated receptor-g, reduces acute inflammation. **Eur. J. Pharmacol**., v. 483, n. 1, p. 79- 93, 2004.

DEMÉTRIO, G. S. et al. Prevalence of self-medication for pain relief in a city of southern Brazil. **ACM Arq. Catarin. Med**; v.41, n.3,2012.

DE QUEIROZ, A.C. et al. The antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Piptadenia stipulacea* Benth. (Fabaceae). **J. Ethnopharmacol.,** v.128, p. 377-83, 2010.

DI ROSA, M; SORRENTINO, L. The mechanism of the inflammatory effect of carrageenin. **Eur. J. Pharm.,** v.4, p.340-342,1968.

DI ROSA, M., GIROUD, J. P., WILLOUGHB Y, D. A.: Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **J.Pathol.,**. v.104, p. 15 - 28,1971.

DI STASI, L.C. **Plantas medicinais: Arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: UNESP, 1996. 230p.

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas Medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica.** 2ª. ed. São Paulo: Unesp, 2002. 604 p.

DUBUISSON, D.; DENNIS, S. G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain**, v. 4, p. 161-174, 1978.

DUFFY, Colm. Introduction. In: **Heteroaromatic Lipoxin A4 Analogues**. Springer Berlin Heidelberg, 2012. p. 1-9.

DUNHAM, N. W; MYIA, T. S. A note an simple apparatus for detection neurological deficit in rats and mice. **J. Am. Pharm. Assoc**., v. 46, p. 208-9, 1957.

EDDY, E. T.; LEIMBACH, C. V. Synthetic analgesic. II. Dithienylbutenyl and dithienylbutyl amines**. J. Pharmacol. Exp. Ther**., v. 107, p. 385-393, 1953.

EPPLER, A. R. et al. Assessment of skin absorption and irritation potential of arachidonic acid and glyceryl arachidonate using in vitro diffusion cell techniques. **Food Chem. Toxicol**., v. 45, p. 2109-2117, 2007.

FERNANDEZ, M.A. et al. New insights into the mechanism of action of the anti-inflammatory triterpene lupeol. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 53, p.1533–1539, 2001.

FERREIRA, J; SANTOS, A.R.S; CALIXTO, J.B. The role of systemic, spinal and supraspinal L-arginine-nitric oxide-cGMP pathway in thermal hyperalgesia caused by intrathecal injection of glutamate in mice. **Neuropharmacol.,** v.38, p.835–842, 1999.

FERREIRA, K.A. et al. Validation of brief pain inventory to Brazilian patients with pain. **Support Care Cancer,** . v.19, p.505–511, 2011.

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

FITZGERALD, G.A. Coxibs and Cardiovascular Disease. **N. Engl. J. Med**., v.35, n.1, p.1709-1711, 2004.

FREIRE, M.A.M. et al. Pain modulation by nitric oxide in the spinal Cord.**Front. Neurosc.,** v. 3, p. 175–181, 2009.

FRANCO, M.F; MORLEY, J. Use of l-labelled albumin for the detection and measurement of the delayed-hypersensitivity reactions in the mouse. **J Immunol Meth**. v.11, p.7-14, 1976.

FREELAND, H. S. et al. Leukotriene B4 generation by human PMNs is not inhibited by glucocorticoids in vivo or in vitro. **J. Allergy Clin. Immunol**., v.79, p.157, 1987.

FROEHLICH, J.C. Opiod peptides. **Alcohol health & Research world,** v. 21,p. 132-136, 1997.

FU, J. et al. The induction and suppression of prostaglandin HZ synthase (cyclooxygenase) in human monocytes. **J. Biol. Chrm**. v.265. p.16737- 16740, 1990.

FÜRST, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. **Brain Res. Bull**., v. 48, n. 2, p. 129-41, 1999.

GARCIA L. J. et al. Pharmacological Analysis Of Local The Acute Inflammatory Process Induced In The Rat´S Paw By Local Injection Of Carrageem And By Heating. **Br. J. Pharm.,** v. 48, p. 88-96, 1993.

GARCIA LEME, J. et al. Pharmacological analysis of the acute inflammatory process induce in rat´s paw by local injection of carrageenan and by heating. **Br. J. Pharmac**., v.48, p.88-96,1973.

GASBARRI, A. et al. Comparative effects of lesions to the ponto-cerebellar and olivo-cerebellar pathways on motor and spatial learning in the rat. **Neurosci.,** v. 116, n. 4, p. 1131-40, 2003.

GERRITSEN, M.E; CARLEY, W.W; RANGES, G.E. et al. Flavonoids inhibit cytokine-induced endothelial cell adhesion protein gene expression. **Am. J. Pathol.,** v.147, p.278 – 292, 1995.

GEPPETTI, P; HOLZER, P. Neurogenic Inflammation**. Boca Raton: CRC Press**, Florida, p. 153-67, 1996.

GILROY, D. W. et al. A novel role for phospholipase A2 isoforms in the checkpoint control of acute inflammation. **Faseb. J**., v. 18, p. 489-498, 2004.

GOEL, K. SAIRAM. Anti-ulcer drugs from indigenous sources with emphasis on *Musa sapientum*, *Tamra bhasma*,*Asparagus racemosus* and *Zingiber officinale*. **Ind. J. Pharmacol.**, v. 34, p. 100‑110, 2002.

GOODMAN & GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica**, 11ª ed, Nova York : McGraw-Hill, 2007.

GOSSLAU, A. et al. The importance of natural product characterization in studies of their anti-inflammatory activity. **Mol. Nutr. Food Res**., v.55, p. 74–82. 2011.

GRADOLATTO, A. et al. Pharmacokinetics and metabolism of apigenin in female and male rats after a single oral administration. **Drug Metab. Dispos.**, v. 33, n. 1, p. 49-54, 2005.

GREENWOOD-VAN MEERVELD, B. et al. Preclinical studies of opioids and opioid antagonists on gastrointestinal function. **Neurogastroenterol. Motil.,** v. 16 p. 46–53, 2004.

GROSSER, T; FRIES, S;FITZGERALD, G.A. Biological basis for the cardiovascular consequences of Cox 2 inhibition: therapeutic challenges and opportunities. **J. Clin .Invest**., v.116, p.4–15, 2006.

GUERRERO, A.T et al. The role of PAF/PAFR signaling in zymosan-induced articular inflammatory hyperalgesia. **Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol**., .38, p.51–59, 2013.

GUIDOBONO, F. et al. Protection by amylin of gastric erosions induced by indomethacin or ethanol in rats. **Br. J. Pharmacol**., v. 120, p. 581-86, 1997.

GUIEU, R. et al. Adenosine and neuropathic pain. **Pain**., v. 68, p. 271-274, 1996.

GUNN, A. et al. The Influence of Non-Nociceptive Factors on Hot-Plate Latency in Rats. **J. Pain,** v. 12, p.222‑227, 2011.

GUYTON, A. C; HALL, J. E. **Tratado de Fisiologia Médica**. 12ª. ed. Rio de Janeiro : Elsevier, 2011.

HANSEN, D.; HARAGUCHI, M.; ALONSO, A. Pharmaceutical properties of'sucupira'(Pterodon spp.). **Braz. J. Pharm. Sci.**, v. 46, n. 4, p. 607-616, 2010.

HARBONE, J. B.; BOULTER, D.; TURNER, B. L. **Chemotaxonomy of the Leguminosae**. London: Academic Press, 1971.

HEINRICHER, M. M. et al. Descending control of nociception: Specificity, recruitment and plasticity. **Brain Res. Rev**., v. 60, p. 214-225, 2009.

HENDERSON, W. R. The role of leukotrienes in inflammation, **Anal. Int. Med.,** v**.**121, p. 684-697, 1994.

HENRIQUES, M.G.M.O. et al. Mouse Paw Edema. A new model for inflammation? **Braz. J. Med. Bio. Res**. v. 20, p.243-249,1987.

HIRATA, F et al. A phospholipase A, inhibitory protein in rabbit neutrophils induced by glucocorticoids. **Proc. Narl Acad. Sci**,, v. 77, n. 5, p. 2533-2536, 1980.

HOHMANN, A. G. et al. An endocannabinoid mechanism for stress-induced analgesia. **Nature,** v. 435, p. 1108–1112, 2005.

HONG, S. L; LEVINE, L. Inhibition of arachidonic acid release from cells as thc biochemical action of anti-inflammatory corticostcroids**, Proc. Not1 Acad. Sci. USA***,* v.*73,* p.730- 1734, 1976.

HOWD, R.A., ADAMOVICS, A., PALEKAR, A. Naloxone and intestinal motility. **Cell. Mol. Life Sci.,** vol. 3, p 1310-1311, 1978.

HUANG, M.T. et al. Inhibitory effects of black tea theaflavin derivatives on 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced inflammation and arachidonic acid metabolism in mouse ears. **Mol. nutri. food res.**, v. 50, n. 2, p. 115-122, 2006.

HUANG, C.W. et al. Nociceptors of dorsal root ganglion express proton-sensing G-protein-coupled receptors, **Mol. Cell. Neurosci**., v.36, p.195–210, 2007.

HUMES, J. L.; OPAS, E. E.; BONNEY, R. J. **Arachidonic acid metabolities in mouse ear oedema. Advances in inflammations research.** Nova York: Raven Press, p. 57-65, 1986.

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

HUNSKAAR, S. & HOLE, K.; The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, V. 30, n. 1, p. 103-4, 1987.

IGNOATO, M. C. et al. Chemical constituents of *Machaerium hirtum* Vell.(Fabaceae) leaves and branches and its anti-inflammatory activity evaluation. **Nat. prod. res.**, n. ahead-of-print, p. 1-6, 2012.

JACOBS, R.S. et al. Some pharmacological observations on marine natural products. **Tetrahedron**., v.41, p. 981–984, 1985.

JIN, J.H. et al. Anti-inflammatory and anti-arthritic activity of total flavonoids of the roots of *Sophora flavescens.* **J. Ethnopharmacol.,** v. 127, p. 589-95, 2010.

JONES, R. Nonsteroidal anti-inflammatory drug prescribing: past, present, and future. **Am. J. Med.**, v.110, p. 4S–7S, 2001.

JULIUS, D.; BASBAUM A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, p. 203-210, 2001.

JUST, M.J. et al.Anti-inflammatory activity of unusual lupine saponins from *Bupleurum fruticenses*. **Plant. Med.,** 64, 404-07, 1998.

KAMM, M. A. Why the enteric nervous system is important to clinicans. **Gut**., v. 47, 2000.

KANADASWAMI, C. et al. The antitumor activities of flavonoids. **In vivo**, v. 19, n. 5, p. 895-909, 2005.

KANUM, M.A. Why the enteric nervous system is important to clinicans**. Gut**, V. 47, Suppl4: iv8-iv10, 2000.

KATZUNG, B.G. **Farmacologia básica e clínica**, 10ª ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

KAWABATA, A. Prostaglandin E2 and pain-an update. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 34, n. 8, p. 1170-1173, 2011.

KIRSCHSTEIN, T. Inhibition of rapid heat responses in nociceptive primary sensory neurons of rats by vanilloid receptor antagonists. **J. Neurophysiol***,* v.82, p.2853–2860, 1999.

KITTO, K. F.; HALEY, J. E.; WILCOX, G. L. Involviment of nitric oxide in spinally mediated hyperalgesia in the mouse. **Neurosci. Lett**., v. 148, p. 1-5, 1992.

KLAASSEN, C. D.; WATKINS, J. B. **Toxicologia: a ciência básica dos tóxicos de Casarett e Doull**. 2001.

KOBAYASHI, K.. et al. Distinct expression of TRPM8, TRPA1, and TRPV1 mRNAs in rat primary afferent neurons with aδ/c-fibers and colocalization with trk receptors. **J. Comp. Neurol.**, v.493, p. 596–606, 2005.

KONTUREK, S.J. et al. From nerves and hormones to bacteria in the stomach; Nobel prize for achievements in gastrology during last century. **J. Physiol. Pharmacol.**, v.56, p.07–530, 2005a.

KONTUREK, S.J; KONTUREK, P.C; BRZOZOWSKI, T. Prostaglandins and ulcer healing. **J. Physiol. Pharmacol,** v.56, n. 5, p. 5–31, 2005b.

KUMAR, V; ABBAS, AK; FAUSTO, N. **Robbins e Cotran: Patologia: Bases Patológicas das Doenças**. 7 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005.

KUMMER, C. L.; COELHO, T. C. R. B. Antiinflamatórios não esteróides inibidores da ciclooxigenase-2 (COX-2): aspectos atuais. **Rev. Bras. Anestesiol**., v.52, n.4, p. 498-512, 2002.

LA CASA, I. et al. Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced Gastric lesions. **J. Ethnopharmacol.**, v.71, p. 45–53, 2000.

LABUDA, C.J.; KOBLISH, M.; TUTHILL, P.; DOLLE.; R.E.; LITLLE, P.J. Antinociceptive activity of the selective iNOS inhibitor AR-C102222 in rodent models of inflammatory, neuropathic and post-operative pain. **Eur. J. of Pain,** V. 10, p. 505-12, 2006.

LAINE, L. Approaches to Nonsteroidal Anti-inflammatory Drug Use in the High-Risk Patient. **Gastroenter**. v. 120, p. 594–606, 2001.

LAGES, A. S. et al. Inibidores seletivos de prostaglandina endoperóxido sintase-2 (PGHS-2): nova estratégia para o tratamento da inflamação. **Quím. Nova**, v.21, n.6 , p. 761-771, 1998.

LEITH, J. L. et al. Cyclooxygenase-1-derived prostaglandins in the periaqueductal gray differentially control C- versus A-fiber-evoked spinal nociception. **J. Neurosci**., v. 27, p. 11296–11305, 2007.

LE BARS, D.; GORAZIU, M.; CADDEN, S.W. Animal models of anti-nociception. **Pharmacol. Review.** v. 53, p. 597-652, 2001.

LEVY, L. Carregenan paw edema in the mouse. **Life Sci**., v.8, p.601-606, 1969.

LEVY, B. D. et al. Lipid mediator class switching during acute inflammation: signals in resolution. **Nat. Immunol**., v. 2, p. 612-619, 2001.

LEWIS, R. A; AUSTEN, K. F; SOBERMAN, R. J. Leukotrienes and other products of the 5-lipoxygenase pathway,. **N. Engl. J.Med**, v. 323, p.645-655. 1990.

LEWIS, G. P. et al. Legumes of the world**. Royal Botanic Gardens**, Kew, p. 577,2005.

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

LIMA, M. R. et al. The antibiotic activity of some Brazilian medicinal plants. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 3, p. 300-306, 2006.

LIN, S. et al. *In vivo* efect of casticin on acute inflammation. **J. Chinese Integr. Med.,** v.*5*p.573-576, 2007.

LIU, H. et al. Evidence for presynaptic N-methyl-D-aspartate autoreceptores in the spinal cord dorsal horn. **Natl. Acad. Sci. U S A**, v. 91, p. 8383-8387, 1994.

LIU, H.; MANTYH, P. W.; BASBAUM, A. I. NMDA-receptor regulation of substance P release form Primary afferent nociceptors. **Nature**, v. 386, p. 721-724, 1997.

LONGHI-BALBINOT, D.T et al.. Further analyses of mechanisms underlying the antinociceptive effect of the triterpene 3β, 6β, 16β-trihydroxylup-20(29)-ene in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 653, n.1–3, 25, p. 32–40, 2011.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa : Instituto Plantarum, 1998.

LUCIO, E. M. R. A. et al. Avaliação toxicológica aguda e screening hipocrático da epilsopilosina, alcalóide secundário de *Pilocharpus microphyllus* Stapf. **Rev. Bras. Farmacog**., v. 9/10, p. 23-25, 2000.

LUIZ, A. P. Antinociceptive action of ethanolic extract obtained from roots of Humirianthera ampla Miers. **J. ethnopharmacol.**, v.114, n.3,p. 355-363, 2007.

LUO, J. C. et al. Dexamethasone delays ulcer healing by inhibition of angiogenesis in rat stomachs. **Eur. J. Pharmacol**,v. 485, p.275–281, 2004.

MA, X. et al. Apigenin, a plant-derived flavone, activates transient receptor potential vanilloid 4 cation channel. **Brit. j. pharmacol.**, v. 166, n. 1, p. 349-358, 2012.

MALONE MH, ROBICHAUD RC. A Hippocratic screen for pure or crude drug materials. **Lloydia** 25, p.320-332, 1962.

MANTHEY, J. A. et al. Biological properties of citrus flavonoids pertaining to cancer and inflammation. **Current Medicinal Chemistry**, v.8, p. 135-153, 2001.

MAO, J. Opioid-induced abnormal pain sensitivity:implications in clinical opioid therapy. **Pain**. v.100, p.213–217, 2002.

MARCON, R. et al. Evidence of TRPV1 receptor and PKC signaling pathway in the antinociceptive effect of amyrin octanoate**. Brain Res**., v.1295, p.76-88, 2009.

MAROON, J.C.; BOST, J.W.; MAROON, A. Natural anti-inflammatory agents for pain relief. **Surg. neurol. int.**, v. 1, 2010.

MASFERRER, J. L. et al. Selective Regulation of Cellular Cyclooxygenase by Dexamethasone and Endotoxin in Mice. **J. Clin. Inves**t., v.86, p.1375-1379, 1990

MÄNTYSELKÄ, P. et al. Pain as a reason to visit the doctor: a study in Finnish primary health care. **Pain**, v.89, n. 2–3, p. 175–180, 2001.

McCLESKEY, E. W.; GOLD, M. S. Ion channels of nociception. **Annu. Rev. Physiol.**, v. 61, p. 835-56, 1999.

McDONALD, P.P. et al. Autocrine enhancement of leukotriene synthesis by endogenous leukotriene B4 and platelet-activating factor in human neutrophils. **Br. J. Pharmacol**., v.111, p. 852-860, 1994.

McDONALD, D. C; CARLSON, K.; IZRAEL, D. Geographic Variation in Opioid Prescribing in the U.S. **J. Pain**, v.13, n.10, p.988–996, 2012.

McGETTIGAN, P; HENRY, D. Use of Non-Steroidal Anti-Inflammatory Drugs That Elevate Cardiovascular Risk: An Examination of Sales and Essential Medicines Lists in Low-, Middle-, and High- Income Countries. **PLOS Medicine**, v.10, n. 2, 2013.

McNAMARA, C. R. et al. TRPA1 mediates formalin-induced pain. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, v.104, n.33, p. 13525-13530, 2007.

MEDEIROS, A.C.S.; ZANON, A.; **Bol. Pesq. Fl.**, *v.40***,** p.57, 2000.

MEDEIROS, R .et al Mechanisms underlying the inhibitory actions of the pentacyclic triterpene alpha-amyrin in the mouse skin inflammation induced by phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. **Eur J Pharmacol**., v.559, p.227-35, 2007.

MEDZHITOV, R.; Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 428-35, 2008.

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

MELO, C. M. Anti-inflammatory effect of α, β-amyrin, a triterpene from Protium heptaphyllum, on cerulein-induced acute pancreatitis in mice. **Inflam. Res.**, v.60, n.7, p.673-681, 2011.

MENAHAN LA, SOBOCINSKI KA. Comparison of carbohydrate and lipid metabolism in mice and rats during fasting. C**omp. Biochem. Physio.l B**., v. 74, n. 4), p.859-64, 1983.

MEOTTI, F.C.; COELHO, I. S.; SANTOS, A.R.S. The nociception induced by glutamate in mice is potentiated by protons released into the solution. **J. Pain**, v. 11, n. 6, p. 570-578, 2010.

MEYER, R.A; RINGKAMP, M.; CAMPBELL, J.N; RAJA, S.N. Peripheral mechanisms of cutaneous nociception. **Wall and Melzack's Textbook of Pain**. Philadelphia, Ed. Elsevier, pp. 3–34, 2008.

MILIC, M. et al. The role of α1 and α5 subunit-containing GABAA receptors in motor impairment induced by benzodiazepines in rat. **Behav. Pharmacol.**, v.23, p. 191–197, 2012.

MILLAN, M.J. The induction of pain: an integrative review. **Prog. Neurobiol**. v.57, p.1 – 164, 1999.

MINCIS, M. et al.. Etanol e o trato gastrointestinal. **Arq. Gastroenterol.**, v. 32, p.131-9, 1995.

MOILANEN, L. J. et al. TRPA1 Contributes to the Acute Inflammatory Response and Mediates Carrageenan-Induced Paw Edema in the Mouse**. Sci. Rep**., v.2, p. 380-403, 2012.

MONTEIRO, Elaine Cristina Almeida et al. Os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs). **Temas de Reumatologia Clínica, São Paulo**, v. 9, n. 2, p. 53-63, 2008.

MORUCCI, F. et al. Antinociceptive activity of aqueous extract and isolated compounds of *Lithrea molleoides***. J. Ethnopharmacol.,** v. 142, p. 401–406, 2012.

MORTAZ E. et al. Dual effects of acetylsalicylic acid on mast cell degranulation, expression of cyclooxygenase-2 and release of pro-inflammatory cytokines. **Biochem. Pharmacol**. v.69, p. 1049–1057, 2005.

MOTA, K.S et al. Flavonoids with gastroprotective activity. **Molecules**, v. 14, p. 979–1012, 2009.

MURAKAMI, M; HIRANO, T. The molecular mechanisms of chronic inflammation development. **Front. immunol.**, v.3, 2012.

MUSTAFA, R.A. et al. Total Phenolic Compounds, Flavonoids, and Radical Scavenging Activity of 21 Selected Tropical Plants. **J. Food Sci.**, v.75, p.C28–C35, 2010.

MIYAMOTO, T. et al. TRPV1 and TRPA1 mediate peripheral nitric oxide-induced nociception in mice. **PLoS One**, v. 4, n. 10, p. e7596, 2009.

NAGATA, K; SONE, N.; TAMURA, T. Inhibitory activities of lansoprazole against respiration in Helicobacter pylori. **Antimicrob Ag Chemother**, v. 45, n. 5, p. 1522-1527, 2001.

NAGY, I; RANG, H. Noxious heat activates all capsaicin-sensitive and also a sub-population of capsaicin-insensitive dorsal root ganglion neurons. **Neuroscience**, v. 88, p. 995–997, 1999.

NAGY, L.; NAGATA, M.; SZABO, S. Protein and non-protein sulfhydryls and disulfides in gastric mucosa and liver after gastrotoxic chemicals and sucralfate: possible new targets of pharmacologic agents. **World J. Gastroenterol**, v.13, p.2053–2060, 2007.

NAVARRETE, A; JOSÉ TREJO-MIRANDA, J.L; REYES-TREJO, L. Principles of root bark of *Hippocratea excelsa* (Hippocrataceae) with gastroprotective activity. **J. Ethnopharmacol**, v.79, n. 3, p. 383–388, 2002.

NEUGEBAUER, V. et al. Forebrain pain mechanisms. **Brain Res.,** v. 60, p. 226-242, 2009.

NIJVELDT, R. J. et al. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **Amer. j. clin. Nutri.**, v. 74, n. 4, p. 418-425, 2001.

NORONHA, V. **Aspectos do consumo de medicamentos em uma maternidade de médio porte**. Belo Horizonte (MG): Universidade Federal de Minas Gerais; 1999.

OKE, S.L; TRACEY, K.J. The Inflammatory Reflex and the Role of Complementary and Alternative Medical Therapies. **Ann. N.Y. Acad. Sci**. v. 1172, p.172–180, 2009.

OLIVEIRA F.A. et al. Pentacyclic triterpenoids, alpha, beta-amyrins, suppress the scratching behavior in a mouse model of pruritus. **Pharmacol. Biochem. Behav**., v.8, p.719–25, 2004a.

OLIVEIRA, F.A. et al. Gastroprotective effect of the mixture of alpha- and beta-amyrin from Protium heptaphyllum: role of capsaicin sensitive primary afferent neurons. **Planta Medica**, v.70, p.780–782, 2004b.

OTUKI, M.F. et al.Topical antiinflammatory effects of the ether extract from Protium kleinii and alpha-amyrin pentacyclic triterpene. **Eur. J. Pharmacol**., v.507, p.253–259, 2005b.

OTUKI, M.F. et al. Antinociceptive properties of mixture of alpha-amyrin and beta-amyrin triterpenes: evidence for participation of protein kinase C and protein kinase A pathways. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.313, p. 310–318, 2005a.

PAN, J.S.et al. Oxidative stress disturbs energy metabolism of mitochondria in ethanol-induced gastric mucosa injury. **World J. Gastroenterol.**, v.14, p. 5857–5867, 2008.

PAN, R. et al. Central mechanisms of menthol-induced analgesia**. J. Pharmacol. Exp. Ther**., v.343, n.3, p.661-72, 2012.

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

PATWARDHAN, B; VAIDYA, A.D. Natural products drug discovery: accelerating the clinical candidate development using reverse pharmacology approaches. **Indian. J. Exp. Biol**., v.48, n.3, p.220-7, 2010

PAUL, S; SAHA, D. Evaluation of Antimotility Effect of Alpinia conchigera Griff on Charcoal Induced Gastrointestinal Motility in Mice. **Asian J. Pharm. Res**, v.2, n.2, p. 71-74, 2012.

POSADAS, I. et al. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. **Br. J. Pharmacol.,** v. 142, p.331–338, 2004.

RAGHAVAN, S.; HARVEY, A. D.; HUMBLE, S. R. New opioid side effects and implications for long-term therapy. **Trends Anesth. Crit. Care**, v. 1, n. 1, p. 18-21, 2011.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; J.M. RITTER.; FLOWER, R. **Farmacologia**, 6ª ed, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

REDDY, P. MK.; DKHAR, S. A.; SUBRAMANIAN, R. Effect of insulin on small intestinal transit in normal mice is independent of blood glucose level. **BMC pharmacol.**, v. 6, n. 1, p. 4, 2006.

RICCIOTTI, E; FITZGERALD, G.A. Prostaglandins and Inflammation. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**., v.31,p.986-1000, 2011.

RICHARDSON, J.D; VASKO, M.R. Cellular mechanisms of neurogenic inflammation. **J. Pharmacol. Exper. Ther.**, v. 302, n. 3, p. 839-845, 2002.

RIDDICK, CA. et al.. Dexamethasone increases expression of 5-lipoxygenase and its activating protein in human monocytes and THP-1 cells. **Eur. J. Biochem.,** v.246, n.1, p.112-8, 1997.

RHIND, S. G. et al. Indomethacin modulates circulating cytokine responses to strenuous exercise in humans. **Cytokine**, v.19, p.153-158, 2002.

ROBERT, A.; NEZAMIS, 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. **Gastroenter**. v.77, p.433-443,1979.

ROCHA, A.P.C, KRAYCHETE, D.C, LEMONICA, L et al, Dor: Aspectos atuais de sensibilzação periférica e central. **Rev. Bras. Anestesiol**. v.571, p.94-105, 2007.

RODRIGUES, M. R. A. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory potential of extract and isolated compounds from the leaves of *Salvia officinalis* in mice. **J. Ethnopharmacol.**, v.139, n.2, p.519-526, 2012.

ROSLAND, J.H.; HUNSKAAR, S.; HOLE, K. Diazepam attenuates morphine antinociception test-dependently im mice. **J. Pharmacol. Toxicol**. v. 66, p. 382-386, 1990a.

ROSLAND, J. H. et al. The formalin test in mice: effect of formalin concentration. **Pain**. v. 42, p. 235-242, 1990b .

ROSTOM, A. et al. Prevention of NSAID-related upper gastrointestinal toxicity: a meta-analysis of traditional NSAIDs with gastroprotection and cox-2 inhibitors. **Drug Healthcare Patient Safety**. v.1, p.47–71, 2009.

ROTELLI, A. E. et al. Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation. **Pharmacol. Res.**, v. 48, n. 6, p. 601-606, 2003.

SAKURADA T. et al. The capsaicin test in mice for evaluating tachykinin antagonists in the spinal cord. **Neuropharm,** v. 31, p.1279–85, 1992.

SAKURADA, T. et al Involvement of nitric oxide in spinally mediated capsaicin- and glutamate-induced behavioural responses in the mouse. Neurochem. v. 29, p. 271– 278, 1996.

SAKURADA, T. et al. Differential effects of intraplantar capsazepine and ruthenium red on capsaicin-induced desensitization in mice. **Pharmacol. Biochem. Beha**.,v. 75, p.115-121, 2003.

SAMUELSSON, B; MORGENSTERN, R; JAKOBSSON, PJ. MEMBRANE Prostaglandin e synthase-1: a novel therapeutic target. P**harmacol Rev.,** v. 59, p.207–224, 2007.

SANDOR, K; HELYES, Z; ELEKES, K; SZOLCSÁNYI, J. Involvement of capsaicin-sensitive afferents and the transient receptor potencial vanilloid 1 receptor in xylene-induced nocifensive behaviour and inflammation in the mouse. **Neurosc. Letters**, v. 405, p. 204-207, 2009.

SANNOMIYA, M. et al. Análise cromatografica por HPLC-DAD das folhas e cascas de machaerium hirtum (Fabaceae). 2011.

SANTOS, A.R.S.; MIGUEL, O.G.; YUNES, R.A. Antinociceptive properties of the new alkaloid, cis-8, 10-di-N-propyllobelidiol hydrochloride dihydrate isolated from *Siphocampylus verticillatus*: evidence for the mechanism of action. **J. Pharmacol. Exp. Ther**., v. 289, p. 417–26, 1999.

SANTOS, A.R.S.; GADOTTI, V.M.; OLIVEIRA, G.L. Mechanisms involved in the antinociception caused by agmatine in mice. **Neuropharm**., v. 48, p. 1021- 34, 2005.

SANTOS, H. C. O. et al. Efeito analgésico do piroxicam para tratamento de dor aguda induzida; Analgesic effect of piroxicam for treatment of induced acute pain. **Rev. Soc. Bras. Clín. Méd**, v. 9, n. 2, 2011.

SARAIVA, J.F.K. COX-2 Risco Cardiovascular: efeito molécula ou classe dependente? **Phaoenix Comunicação Integrada**, p.1-5, 2007.

SCHAIBLE, H. G; RICHTER, F. Pathophysiology of pain. Langenbecks .**Arch. Surg.,** v. 389, n. 4, p. 237-43, 2004**.**

SCHWAB, J. M. et al. COX-3 the enzyme and the concept: steps towards highly specialized pathways and precision therapeutics?. **Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids**, v. 69, n. 5, p. 339-343, 2003.

SCHÄFERS, M.; SORKIN, L. Effect of cytokines on neuronal excitability. **Neurosci. Lett.**, v. 437, n. 3, p. 188-193, 2008.
SEBALDT, R.J. Inhibition of eicosanoid biosynthesis by glucocorticoids in humans. **Proc. Natl. Acad. Sci. U S A**, v.87, n.18, p.6974–6978, 1990.

SHAHEEN, N.J et al..The burden of gastrointestinal and liver diseases. **Am. J. Gastroenterol**, v. 101, p. 2128–2138, 2006.

SHERWOOD, E.R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best. Pract. Res. Clin. Anaesthesiol**., v. 18, n. 3, p. 385-405, 2004.

SHERRINGTON C.S.; The integrative action of the nervous system. **Scribner**, Nova York, 1906.

SHIBATA, M. et al. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. **Pain,** v. 38, p. 347–352, 1989.

SHU, Y.Z. Recent natural products based drug development:A pharmaceutical industry perspective. **J. Nat. Prod.**, v.61, p.1053-1071, 1998.

SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ª. ed. Porto Alegre/Florianópolis :Universidade UFRGS / Editora da UFSC, 2010.

SMITH, W. L.; DEWITT, D. L.; GARAVITO, R. M. Cyclooxygenases: Structural, Cellular, and Molecular Biology. **Annu. Rev. of Biochem**., v. 69, p. 145-182, 2000.

SORKIN, L. S. NMDA evokes an L-NAME sensitive spinal release of glutamate and citrulline. **Neuroreport**, v. 4, n. 5, p. 479-482, 1993.

SOSA, S. et al. Screening of the topical anti-inflammatory activity of some Central American plants. **J. Ethnopharmacol.**, v. 81, n. 2, p. 211-215, 2002.

SPECTOR, A. A. et al. Epoxyeicosatrienoic acids (EETs): metabolism and biochemical function. **Prog. Lipid. res.**, v. 43, n. 1, p. 55, 2004.
STANKOVA, J. et al. Modulation of Leukotriene B4 Receptor-1. **J. Immunol**., v.168, p.3570-3576, 2002.

STEIN, C; CLARK, J.D; OH, U.; VASKO, M.R; WILCOX, G.L; OVERLAND, A.C; VANDERAH, T.W.; SPENCER, R.H. Peripheral mechanisms of pain and analgesia. **Brain Res. Review.** v. 60, p. 90-113, 2009

STORY, G.M. et al. ANKTM1, a TRPlike channel expressed in nociceptive neurons, is activated by cold temperatures**. Cell**, v.112, p.819–829, 2003..

STUCKY, C; GOLD, M. S.; ZHANG, X. Mechanisms of pain. **Proc. Natl. Acad. Sci .U S A**, v. 98, n. 21, p. 11845-6, 2001.

SUGANO, K.. et al. Lansoprazole for secondary prevention of gastric or duodenal ulcers associated with long-term non-steroidal anti-inflammatory drug (NSAID) therapy: results of a prospective, multicenter, double-blind, randomized, double-dummy, active controlled trial. **J. Gastroenterol**, v.47, n.5, p.540-552, 2012.

SUN, R.Q. et al. Calcitonin gene-related peptide receptor activation produces PKA- and PKC-dependent mechanical hyperalgesia and central sensitization. **J. Neurophysiol**., v.92, p. 2859–2866, 2004.

SWINGLE, K.F; REITER, M.J; SCHWARTZMILLER, D.H. Comparison of croton oil and cantharidin induced inflammations of the mouse ear and their modification by topically applied drugs., **Arch. Int. Pharmacodyn.**, V. 254, p. 168-76, 1981.

PIETROVSKI, E.F. et al.Anticociceptive properties of the ethanolic extract and of the triterpene 3beta,6beta,16betatrihidroxilup-20(29)-ene obtained from the flowers of Combretum leprosum in mice. **Pharmacol. Biochem. Beha.**, v.83, p.90–9, 2006.

POTT, A; POTT, V. J. **Features and conservation of the Brazilian Pantanal wetland:** ***Wetlands Ecology and Management*** , n.12, p. 547–552, 2004.

TAIWO, Y. O.; LEVINE, J. D. Further confirmation of the role of adenyl-cyclase and of cAMP dependent protein kinase in primary afferent hyperalgesia. **Neurosci**., v. 44, p.131-135, 1991.

TAK, P. P. et al. NF-κB: a key role in inflammatory diseases. **J. Clin. Invest.**, v. 107, n. 1, p. 7-11, 2001.

TAKEUCHI, K.; YAG,I K.; KITAMURA. M; KUBOMI, M. Stimulation of duodenal bicarbonate secretion by carbenoxolone in rats: a comparative study with prostaglandina E2. **Gen. Pharmacol**., v.30, p.739–744, 1998.

TANGERINA, M.M.P.; SANNOMIYA, M.; VILEGAS, W. Análise dos Constituintes de *Machaerium hirtum* (Fabaceae) por FIA-ESI-IT-MSn. In: Congresso Brasileiro de Espectrometria de Massas, 4, 2011, Campinas-SP, **Resumos...**2011.

TARNAWSKI, A.S. Cellular and molecular mechanisms of gastrointestinal ulcer healing. **Dig. Dis. Sci.,** v. 50, p 24-33, 2005.

TEIXEIRA, M. J, O. **Anatomia e Fisiologia das vias nociceptivas da dor. Dor epidemiologia, fisiopatologia, avaliação, síndromes dolorosas e tratamento**. Ed Moreira Jr. 1 ed. 2001.

THIRUGNANASAMBANTHAM, P. et al. Analgesic activity of certain flavones derivatives. A structure activity study. **J. Ethnopharmacol.**, v.28, p.207–14, 1990.

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

TODD, A. J.; SPIKE, R. C. The localization of classical transmitters and neuropeptides within neurons in laminae I-III of the mammalian spinal dorsal horn. **Prog. Neurobiol**., v. 41, n. 5, p. 609-45, 1993.

TOMINAGA, M. Nociception and TRP channels. **Handb. Exp. Pharmacol.**, n. 179, p. 489-505, 2007.

TREVISANI, M. et al. 4-Hydroxynonenal, anendogenous aldehyde, causes pain and neurogenic inflammation through activation of the irritant receptor TRPA1.**Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.A**., v.104, p.13519–13524, 2007.

TSAGARELI, M. G. et al. Behavioral Testing of Thermo-Sensitive Transient Receptor Potential (TRP) Channel Agonists Cinnamaldehyde and Menthol on Touch, Temperature and Pain Sensations . **Bull. Georg. Natl. Acad. Sci**., v. 4, n. 3, 2010.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO – Departamento de Comunicação Institucional. **Laboratórios apostam na pesquisa de fitoterápicos. Disponível em: <**http://dgi.unifesp.br/sites/comunicacao/index.php?c=Noticia&m=ler&cod=4696e1fe> – Acesso em 13 jun. 2013.

VANEGAS, H; SCHAIBLE, H-G. Prostaglandins and cycloxygenases in the spinal cord**. Prog. Neurobiol**., v. 64, p.327–363, 2001.

VENKATACHALAM K, MONTELL C. TRP channels. **Annu. Rev. Biochem**., v.76, p.387-417, 2007.

WALLACE, J. L. Pathogenesis of NSAID-induced gastroduodenal mucosal injury. **Best Pract & Res. Clin. Gastroenterol.,** v. 15, p. 691-703, 2001.

WALLACE, J.L. Prostaglandins, NSAIDs, and Gastric Mucosal Protection: Why Doesn't the Stomach Digest Itself? **Physiol. Rev**., v. 88, p 1547–65, 2008.

WILLOUGHBY, D. A.; MOORE, A.R.; COLVILLE-NASH, P.R. COX-1, COX-2, and COX-3 and the future treatment of chronic inflammatory disease. **The Lancet**, v. 355, n. 9204, p. 646-648, 2000.

WINTER, A. C; RISLEY, E.A; NUSS, G.W. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. **Proc. Soc. Exp. Bio. Med**., v.111, p.544-547,1962.

XIAN, Y.F. et al. Effect of Rhizoma Polygonati on 12-O-tetradecanoylphorbol-acetate-induced ear edema in mice. **J. Ethnopharmacol.,** 2012.

YAMAGATA M, HIRAISHI H. Prevalence and incidence of NSAID-induced gastrointestinal ulcers and bleeding**. Nihon Rinsho**. v.10, p.1749-53, 2007.

YOUNG, J. M. et al.12-0- tetradecanoylphorbol acetate- and arachidonic acid-induced ear edema. **J. Invest. Dermatol**., v. 80, n. 1, p. 48-52, 1983.

YOUNG, J. M. et al. The mouse ear inflammatory response to topical arachidonic acid. **J. Invest. Dermatol**., v. 82, p. 367- 371, 1984.

YUAN, Gaofeng et al. Natural products and anti-inflammatory activity. **Asia Pac. J. Clin. Nutr**, v. 15, n. 2, p. 143, 2006.

YUNES, R.A**.** The use of natural products as sources of new analgesic drugs. **Atta-ur-Rahman (Ed.) Studies in Natural Products Chemistry,** v. 30, 2005**.**

ZANINIR J.C et al. Action of compounds from *Mandevilla velutina* on croton oil-induced ear oedema in mice. A comparative study with steroidal and nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Phytother. Res**., v.6, p1-5, 1992.

ZAPATA-COLINDRES, J. C. et al. The association of Helicobacter pylori infection and nonsteroidal anti- inflammatory drugs in peptic ulcer disease. **Can. J. Gastroenterol**., v. 20, p.277–280, 2006

ZEILHOFER, H.U, BRUNE, K. Analgesic strategies beyond the inhibition of cyclooxygenases. **Trends. Pharmacol. Sci.**. v. 9, p.467-74, 2006.

ZIYAN, Li et al. Evaluation of the anti-inflammatory activity of luteolin in experimental animal models. **Plan. Med.**, v. 73, n. 03, p. 221-226, 2007

ZWENGER, S.; BASU, C. Plant terpenoids: applications and future potentials. **Biotechnol. Mol. Biol. Rev.**, v. 3, n. 1, p. 1-7, 2008.

10. ANEXOS

Anexo 1 – Protocolo do Comitê de Ética em Experimentação Animal (nº 367-CEUA)

unesp UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA "JÚLIO DE MESQUITA FILHO" Campus de Botucatu

Certificado

Certificamos que o Protocolo nº **367-CEUA**, sobre "Avaliação do efeito anti-nociceptivo e anti-inflamatório do extrato hidroalcoólico de folhas e entrecascas de Machaerium hirtum (Vell.) Stellfeld", sob a responsabilidade de **Clélia Akiko Hiruma-Lima**, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e foi aprovado pela ***COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS*** (CEUA), em reunião extraordinária de **12/12/2011**.

Botucatu, 12 de dezembro de 2011.

Profª Drª Patrícia Fernanda Felipe Pinheiro
Presidente - CEUA

Anexo 2 - Protocolo experimental das avaliações do teste "Screening" hipocrático

Os parâmetros a serem observados de acordo com a tabela de Brito (1994) e segundo explicações de alguns padrões comportamentais descritos por Malone e Robichaud (1962), são os seguintes:

Frêmito vocal:	Emissão de ruídos frequentes
Irritabilidade:	Reação ao indivíduo ao lado ou ao manuseá-lo
Resposta ao toque:	Direcionar algo em direção ao animal e esperar ele desviar
Aperto de cauda:	Apertar a ponta da cauda e puxá-lo
Contorção:	Animal faz movimento sinuoso
Trem posterior:	Pata posterior abaixada
Endireitamento:	5, pode ser posicionado em único lado; 6, pode ser posicionado em qualquer dos lados igualmente bem; 7, pode ser posicionado de costas tão bem como qualquer lado; 8, não pode ser despertado, estando de costas, com um beliscão no dedo da pata traseira.
Tônus corporal:	Puxar a pele pra ver se ela retorna ao normal
Força de agarrar:	Fazê-lo segurar na grade e puxá-lo pela cauda
Ataxia:	1, detecção de perda de coordenação; 2, dificuldade de andar reto mas prosseguir alinhado; 3 não conseguir andar reto, com curso errante; 4, não conseguir qualquer curso
Reflexo auricular:	Mexer a orelha com a pinça
Reflexo corneal:	Levar em direção ao olho a pinça para ver se eles tentam fechá-los.
Tremores:	Verificar se eles tremem, comparando com o normal.
Convulsões:	São medidas subjetivamente de 1 a 4 de acordo com a severidade e duração
Estimulações:	Movimentos repentinos
Straub:	Cauda levantada como uma bandeira
Hipnose:	Dormir agrupados

Anestesia:	1- resposta lenta quando uma agulha é pressionada no pé; 2- sem reação à agulha firme pressionada; 3- sem reação com a penetração da agulha
Lacrimação:	Comparar com a normal
Ptose:	1- notável fechamento do olho; 2- metade fechado; 3- quase completamente fechado; 4- fechado completamente
Micção:	Considerar subjetivamente a freqüência e quantidade
Defecação:	Verificar alteração na consistência das fezes
Piloereção:	A gradação é analisada subjetivamente através da ereção e do aspecto do pelo
Hipotermia:	Tocar o animal e verificar se a temperatura é baixa em relação ao controle
Respiração:	Comparar com o normal
Cianose:	Observar a alteração da cor de orelhas, patas e da mucosa oral.
Número de mortos:	Anotar a cada verificação dos comportamentos

Anexo 3 - Teste Hipocrático – Toxicidade de drogas por Análise Comportamental Parâmetros analisados em camundongos machos e fêmeas tratados oralmente com dose única de veículo e EHMe 5000 mg/Kg

Sintomas	Normal	Tempo para as análises comportamentais (minutos)				
		30`	60`	120`	240`	360`
Aparência geral	4	4	4	4	4	4
Frênito vocal	0	0	0	0	0	0
Irritabilidade	0	0	0	0	0	0
Reposta ao toque	4	4	4	4	4	4
Aperto da cauda	4	4	4	4	4	4
Contorção	0	0	0	0	0	0
Trem posterior	0	0	0	0	0	0
Endireitamento	4	4	4	4	4	4
Tônus muscular	4	4	4	4	4	4
Força de agarrar	4	4	4	4	4	4
Ataxia	0	0	0	0	0	0
Reflexo auricular	4	4	4	4	4	4
Reflexo corneal	4	4	4	4	4	4
Tremores	0	0	0	0	0	0
Convulsões	0	0	0	0	0	0
Estimulações	4	4	4	4	4	4
Straub	0	0	0	0	0	0
Hipnose	0	0	0	0	0	0
Anestesia	0	0	0	0	0	0
Lacrimação	0	0	0	0	0	0
Ptose	0	0	0	0	0	0
Micção	4	4	4	4	4	4

Piloereção	0	0	0	0	0	0
Defecação	4	4	4	4	4	4
Hipotermia	0	0	0	0	0	0
Respiracão	4	4	4	4	4	4
Cianose	0	0	0	0	0	0
Morte		0	0	0	0	0