



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



ROSANNA TARKANY BASTING

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-
INFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA DO
EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *Eugenia
punicifolia* (Kunth) DC**



Botucatu – SP

2012

ROSANNA TARKANY BASTING

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-
INFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA DO
EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *Eugenia
punicifolia* (Kunth) DC**



Monografia apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de bacharel no curso de Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Clélia Akiko Hiruma Lima

Coorientadora: Prof^ª. Catarine Massucato Nishijima

Botucatu – SP

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DA INFORMAÇÃO

DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Basting, Rosanna Tarkany.

Avaliação da atividade anti-inflamatória e antinociceptiva do extrato hidroalcoólico de *Eugenia punicifolia* (Kunth) DC / Rosanna Tarkany Basting. – Botucatu : [s.n.], 2012

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Clélia Akiko Hiruma Lima

Capes: 21006008

1. Dor – Tratamento. 2. Resposta imune. 3. Agentes antiinflamatórios. 4. Myrtaceae – Uso terapêutico. 5. Plantas medicinais – Uso terapêutico.

Palavras-chave: Anti-inflamatório; Antinocicepção; *Eugenia punicifolia*; Myrtaceae.

Auxílio Financeiro: FAPESP – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo.
Processo número: 2011/20145-8



“...É melhor tentar e falhar,
que preocupar-se em ver a vida passar;
É melhor tentar ainda que em vão,
que sentar-se fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar,
que em dias tristes em casa me esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco,
que em conformidade viver...”

Martin Luther King

AGRADECIMENTOS

Agradeço à minha família pelo apoio incondicional em todos os instantes de minha vida, tanto nos momentos bons como nos ruins, hoje sou resultado da confiança e da força de cada um de vocês. Aos meus pais, Elisabeta e Roberto, pelo suporte e incentivo, e por tudo o que me ensinaram e continuam me ensinando até hoje. Grande parte do que sou é reflexo de vocês. Aos meus irmãos, Roberto e Roberta, pelo companheirismo, amizade, carinho e em especial à Roberta, por desde pequena me despertar o interesse pela pesquisa. Um dia quero ser pelo menos metade do que você é. Aos meus sobrinhos, Vinícius e Gustavo, por representarem uma das maiores fontes de alegria da minha vida.

À Profª Drª Clélia Akiko Hiruma Lima e à Profª Drª Lúcia Rocha pela confiança, atenção, orientações, ensinamentos e por abrirem as portas do laboratório para a realização e concretização deste trabalho, e por contribuírem para o meu crescimento profissional, muito obrigada.

À minha coorientadora Cat, grande parte da minha experiência e conhecimento no laboratório foi adquirida com os seus ensinamentos. Obrigada pela amizade, paciência e ajuda em todos os momentos, te desejo muito sucesso.

A todos do laboratório pelas ajudas nos experimentos, especialmente ao Fernando pelo companheirismo e amizade.

Agradecimento especial à Vânia, Juliana, Flávia e Tamires pela amizade e companheirismo dentro e fora do laboratório e pelo incentivo nos momentos difíceis e de escolha na minha carreira. Muito obrigada pela grande amizade, vocês se tornaram muito especiais e me ajudaram quando eu mais precisava de apoio. Obrigada pela descontração, pelas ajudas, risadas, e principalmente por tornar meus momentos no laboratório mais leves e felizes. Desejo muito sucesso a todas vocês, porque vocês merecem demais. Esse trabalho também é de vocês.

Às minhas grandes amigas Thaís (Anônima) e Maria Angélica (Boing). Vocês me mostraram o verdadeiro significado da amizade, pois em vocês encontrei verdadeiras irmãs. Obrigada pela paciência, pelo sorriso, pelo abraço, pela mão que sempre se estendia quando eu precisava. Esta caminhada não seria a mesma sem vocês.

Ao Prof. Dr. Stefan Laufer e todos os alunos de seu laboratório da Universidade de Tübingen - Alemanha, pela maravilhosa e única oportunidade de conhecer e realizar os ensaios *in vitro* deste trabalho. Obrigada pelo grande crescimento profissional e pessoal, nunca me esquecerei deste estágio.

A todos da Biologia XLV, obrigada por esses quatro anos de convivência, de risadas, estudos, festas, discussões, brigas. Acho que nunca existirá uma sala à nossa altura.

Aos funcionários do departamento de Fisiologia, em especial ao Dr. Hélio Kushima, pelo seu conhecimento, ajuda e pelos momentos de descontração.

A FAPESP pelo auxílio financeiro.

E a Ele, por sempre me iluminar e dar forças para seguir no caminho certo,

Muito Obrigada a todos!

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Eugenia punicifolia</i>	34
Figura 2. Evolução do peso corporal (g) de camundongos (machos) tratados oralmente com única dose do extrato hidroalcoólico de <i>Eugenia punicifolia</i> (EHEP) (5000 mg/kg) no modelo de toxicidade aguda	47
Figura 3. Evolução do peso corporal (g) de camundongos (fêmeas) tratados oralmente com única dose do extrato hidroalcoólico de <i>Eugenia punicifolia</i> (EHEP) (5000 mg/kg) no modelo de toxicidade aguda	47
Figura 4. Efeito do tratamento agudo com o extrato hidroalcoólico de <i>Eugenia punicifolia</i> (EHEP) (5000 mg/kg) sobre os órgãos de camundongos (g) no modelo de toxicidade aguda.....	48
Figura 5. Efeito do tratamento agudo com o extrato hidroalcoólico de <i>Eugenia punicifolia</i> (EHEP) sobre os órgãos reprodutivos de camundongos (g) no modelo de toxicidade aguda.....	48
Figura 6. Avaliação do número de quedas dos camundongos tratados oralmente com extrato hidroalcoólico de <i>Eugenia punicifolia</i> (EHEP) (250 mg/kg) no modelo de Rota Rod	49
Figura 7. Avaliação da atividade antinociceptiva do extrato hidroalcoólico de <i>Eugenia punicifolia</i> (EHEP) no modelo de formalina na fase neurogênica	50
Figura 8. Avaliação da atividade antinociceptiva do extrato hidroalcoólico de <i>Eugenia punicifolia</i> (EHEP) no modelo de formalina na fase inflamatória	50
Figura 9. Avaliação da participação da via L-arginina-óxido nítrico na atividade antinociceptiva do extrato hidroalcoólico de <i>Eugenia punicifolia</i> (EHEP) (250 mg/kg) no modelo de formalina na fase neurogênica	51
Figura 10. Avaliação da participação da via L-arginina-óxido nítrico na atividade antinociceptiva do extrato hidroalcoólico de <i>Eugenia punicifolia</i> (EHEP) (250 mg/kg) no modelo de formalina na fase inflamatória	51
Figura 11. Avaliação da participação do receptor opióide na atividade antinociceptiva do extrato hidroalcoólico de <i>Eugenia punicifolia</i> (EHEP) (250 mg/kg) no modelo de formalina na fase neurogênica	52
Figura 12. Avaliação da participação do receptor opióide na atividade antinociceptiva do extrato hidroalcoólico de <i>Eugenia punicifolia</i> (EHEP) (250 mg/kg) no modelo de formalina na fase inflamatória	53

Figura 13. Avaliação da participação do sistema glutamatérgico na atividade antinociceptiva do extrato hidroalcoólico de <i>Eugenia punicifolia</i> (EHEP) (250 mg/kg) no modelo de dor induzida pelo glutamato	53
Figura 14. Avaliação do efeito anti-edematogênico do extrato hidroalcoólico de <i>Eugenia punicifolia</i> (EHEP) (125, 250 e 500 mg/kg) no modelo de edema de orelha induzido pelo xilol.....	54
Figura 15. Avaliação do efeito anti-edematogênico do extrato hidroalcoólico de <i>Eugenia punicifolia</i> (EHEP) (250 mg/kg) no modelo de edema de pata induzido pela carragenina.....	55
Figura 16. Avaliação da atividade do extrato hidroalcoólico de folhas de <i>Eugenia punicifolia</i> (EHEP 30, 10 e 3 mg/ml e suas respectivas diluições) no ensaio de p38 α MAPK	56
Figura 17. Avaliação da atividade inibitória do extrato hidroalcoólico de folhas de <i>Eugenia punicifolia</i> (EHEP 30 e 10 mg/ml e suas respectivas diluições) no ensaio do TNF- α . Doador 1.....	57
Figura 18. Avaliação da atividade inibitória do extrato hidroalcoólico de folhas de <i>Eugenia punicifolia</i> (EHEP 30 e 10 mg/ml e suas respectivas diluições) no ensaio do TNF- α . Doador 2.....	58
Figura 19. Atividade antiulcerogênica do extrato hidroalcoólico de <i>Eugenia punicifolia</i> (EHEP) (125, 250 e 500 mg/kg) no modelo de indução de úlcera gástrica por etanol	59
Figura 20. Atividade antiulcerogênica do extrato hidroalcoólico de <i>Eugenia punicifolia</i> (EHEP) (125, 250 e 500 mg/kg) no modelo de indução de úlcera gástrica por indometacina.....	60
Figura 21. Efeito do extrato hidroalcoólico de <i>Eugenia punicifolia</i> (EHEP) (125 mg/kg e 250 mg/kg) sobre a motilidade intestinal de camundongos com a utilização de carvão ativado.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

μl – microlitro

μm - micrometro

μM - micromolar

μmol – micromol

AINEs – Anti-inflamatórios não Esteroidais

AMPA – ácido-α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico

ATP – adenosina trifosfato

Ca²⁺ - cálcio ²⁺

cm – centímetro

COX-1 – Ciclooxigenase 1

COX-2 – Ciclooxigenase 2

EHEP – Extrato hidroalcoólico de folhas de *Eugenia punicifolia*

ERK – Sinal de regulação extracelular de proteína quinase

g – grama

h – hora

i.p. – intraperitoneal

IL – 1 – interleucina 1

IL - 1β – interleucina 1β

IL – 6 – interleucina 6

iNOS – óxido nítrico sintase induzida

kg – kilograma

L-name – L-NG-Nitroarginina metil ester

MAPK – proteína quinase ativada por mitógeno

m/s – metro por segundo

mg – miligrama

ml- mililitro

NFκB – Fator de transcrição nuclear kappa B

NMDA – N-metil-D-aspartato

n° - número

NO – óxido nítrico

°C – graus Celsius

PAG – substância periarquedutal cinzenta

PAF – fator ativador de plaquetas

PG – prostaglandina

rpm – rotação por minuto

RVM – medula rostral ventromedial

s – segundo

s.c. – sub cutâneo

SP – substância P

TNF-α - fator de necrose tumoral

v.o. – via oral

RESUMO:

A inflamação é uma resposta imune complexa relacionada ao dano tecidual e/ou celular causada por estímulos químicos, físicos, imunológicos ou microbianos. O processo inflamatório envolve uma complexa cascata de eventos bioquímicos e celulares, que inclui sensibilização e ativação de receptores, lise e reparo tecidual. Em geral, as lesões teciduais desencadeiam uma reação inflamatória local recrutando leucócitos, que liberam mediadores inflamatórios. Essas substâncias são capazes de sensibilizar nociceptores. Após a transmissão sináptica e modulação do sinal nociceptivo pelos neurônios sensoriais, esses sinais são percebidos como “dor”. A dor é uma experiência que envolve múltiplos fatores. A via supraespinal do controle da dor se origina em muitas regiões cerebrais, tais como substância periarquedutal cinzenta (PAG), núcleos medianos da rafe e medula rostral ventromedial (RVM) e possuem papel crítico na determinação da dor aguda e crônica. Os medicamentos Anti-inflamatórios Não Esteroidais (AINEs) são utilizados no controle da inflamação, os quais inibem os mediadores inflamatórios, mas podem provocar efeitos adversos como úlceras gástricas e danos cardiovasculares. Uma alternativa para o tratamento da dor e inflamação é a utilização de espécies vegetais. O gênero *Eugenia* pertence à família Myrtaceae e é uma das famílias botânicas de maior expressão nos ecossistemas brasileiros. Sob o ponto de vista farmacológico, estudos realizados com extratos brutos de espécies congêneres demonstraram a presença de propriedade anti-inflamatória, analgésica, antifúngica, hipotensiva, antidiabética e antioxidante de algumas das espécies. Como classe fitoquímica de importância na terapêutica, os flavonóides tem representado um importante grupo com relevante ação anti-inflamatória e gastroprotetora, e estão presentes de forma expressiva na composição química do gênero *Eugenia*. O objetivo geral do projeto é avaliar a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do extrato hidroalcoólico de folhas de *Eugenia punicifolia* (EHEP). Nesta trabalho foram realizados os testes de toxicidade aguda, avaliação

da performance motora, avaliação da atividade antinociceptiva através do teste da formalina, avaliação do envolvimento da via L-arginina-óxido nítrico, do sistema opioidérgico e glutamatérgico na antinocicepção, avaliação da inibição da p38 α MAPK e do TNF- α em ensaios *in vitro*, avaliação da atividade anti-edematogênica pelos modelos de edema de orelha induzido pelo xilol e edema de pata induzido pela carragenina, avaliação da atividade antiulcerogênica e determinação da motilidade intestinal. Os experimentos *in vivo* foram realizados com camundongos ou ratos, conforme metodologia adotada e aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal da Instituição (nº 369). Os resultados obtidos não demonstraram sinais de toxicidade do EHEP no ensaio de toxicidade aguda com a administração oral de uma dose de 5000 mg/kg. O EHEP apresentou atividade antinociceptiva na dor neurogênica nas doses de 125, 250 e 500 mg/kg com inibição de 25, 35 e 20 %; e na dor inflamatória em 41, 63 e 36% respectivamente em comparação com o grupo controle tratado com o veículo ($p < 0.05$). Com o intuito de investigar os mecanismos de ação verificou-se por intermédio do modelo de formalina a participação da via do óxido nítrico e do sistema glutamatérgico na antinocicepção do EHEP, e a não participação do sistema opioidérgico na atividade antinociceptiva do EHEP. No ensaio da p38 α MAPK, o EHEP apresentou inibição da atividade de fosforilação da p38 α MAPK em cerca de 90%, atuando sobre esta via e no ensaio do TNF- α , o EHEP apresentou baixa inibição na liberação do TNF- α , não atuando exclusivamente por esta via. Na avaliação da atividade anti-edematogênica do EHEP a dose de 250 mg/kg inibiu o edema de orelha induzido pelo xilol em 64%; no modelo de edema induzido pela carragenina, o EHEP inibiu o edema em 50% na primeira hora de avaliação. Na avaliação do EHEP sobre o trato gastrointestinal, verificou-se pelo modelo de indução de úlcera gástrica por etanol absoluto, uma inibição das lesões da mucosa gástrica do extrato hidroalcoólico de folhas de *Eugenia punicifolia* nas doses de 125, 250 e 500 mg/kg em 88,4%, 97,6% e 99,8% respectivamente em comparação com o grupo controle tratado com

veículo ($p < 0.05$), assim como ocorreu uma inibição de 52,9%, 72,3% e 53% nas doses de 125, 250 e 500 mg/kg respectivamente no modelo de indução de úlcera gástrica por indometacina. O extrato nas doses de 125 e 250 mg/kg não provocou alteração no trânsito intestinal dos animais em comparação com o grupo controle tratado com veículo ($p < 0.05$). Os resultados obtidos demonstram uma ausência de efeito tóxico agudo e uma promissora atividade antinociceptiva e/ou anti-inflamatória do extrato hidroalcoólico de folhas de *Eugenia punicifolia* associado com uma efetiva ação gastroprotetora do extrato. Palavras chave: Dor; inflamação; anti-inflamatório; antinocicepção; *Eugenia punicifolia*; Myrtaceae.

ABSTRACT

Inflammation is an immune complex-related tissue damage and / or cell caused by chemical, physical, immunological or microbial. The inflammatory process involves a complex cascade of biochemical and cellular events, including awareness and receptor activation, lysis and tissue repair. In general, tissue damage trigger a local inflammatory response by recruiting leukocytes, which release inflammatory mediators. These substances are able to sensitize nociceptors. After synaptic transmission and signal modulation by nociceptive sensory neurons, these signals are perceived as "pain." Pain is an experience that involves multiple factors. The route of the supraspinal pain control originates in many brain regions, such as substance periarqueductal gray (PAG), median raphe nucleus and rostral ventromedial medulla (RVM) and have a critical role in determining the chronic and acute pain. Anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are used to control inflammation, which inhibit the inflammatory mediators, but can cause side effects such as stomach ulcers and cardiovascular damage. An alternative for the treatment of pain and inflammation is the use of plant species. The genus *Eugenia* belongs to the family Myrtaceae, one of the largest botanical families of expression in the Brazilian ecosystems. From the pharmacological point of view, studies of similar species crude extracts showed the presence of anti-inflammatory, analgesic, antifungal, hypotensive, antidiabetic and antioxidant activity of some species. As a class of importance in therapeutic phytochemical, the flavonoids has represented an important group with significant anti-inflammatory and gastroprotective, and are present in a significant way in the chemical composition of genus *Eugenia*. The project's overall objective is to evaluate the antinociceptive and anti-inflammatory activities from hydroalcoholic extract of leaves of *Eugenia punicifolia* (EHEP). In this work were performed acute toxicity tests, evaluation of motor performance, evaluation of antinociceptive activity through the formalin test, evaluation of the involvement of L-arginine-nitric oxide, the glutamatergic and opioid system

in antinociception, assessment of inhibition of p38 α MAPK and TNF- α in vitro tests, activity by anti-edematogenic models of ear edema induced by xylene and paw edema induced by carrageenan, antiulcer activity evaluation and determination of intestinal motility. The experiments *in vivo* were performed with mice or rats, according to the methodology adopted and approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation Institution (No. 369). The results showed no signs of toxicity in the acute toxicity test by oral administration of EHEP in a dose of 5000 mg / kg. The EHEP presented antinociceptive activity in neurogenic pain at doses of 125, 250 and 500 mg / kg with inhibition of 25, 35 and 20%, and inflammatory pain in 41, 63 and 36% respectively in comparison with the control group treated with the vehicle (p <0.05). In order to investigate the mechanisms of action was verified through the formalin model the involvement of nitric oxide and the glutamatergic system in the antinociception EHEP, and non-participation of the opioid system in the antinociceptive of EHEP. In the assay of p38 α MAPK, the EHEP showed inhibition of phosphorylation of p38 α MAPK by about 90%, and acting on this pathway, in the assay of TNF- α , the EHEP showed low inhibition in the release of TNF- α , acting not only by this route. In the evaluation of anti-edematogenic activity of EHEP the dose of 250 mg / kg inhibited ear edema induced by xylene in 64%; the model of edema induced by carrageenan, the EHEP inhibited the edema by 50% within the first hour evaluation. In evaluating of the gastrointestinal tract, it was found by the model of gastric ulcer induced by absolute ethanol, an inhibition of gastric mucosal lesions from hydroalcoholic extract of leaves of *Eugenia punicifolia* at doses of 125, 250 and 500 mg/kg in 88.4%, 97.6% and 99.8% respectively compared to control group treated with vehicle (p <0.05), and an inhibition of 52.9%, 72.3% and 53% at doses 125, 250 and 500 mg / kg respectively in the model of gastric ulcer induced by indomethacin. The extract doses of 125 and 250 mg / kg did not cause changes in bowel habits of the animals compared to the vehicle treated control group (p <0.05). The results show an absence of acute

toxic effect and a promising antinociceptive and / or anti-inflammatory of extract of leaves of *Eugenia punicifolia* associated with effective gastroprotective action of the extract.

Keywords: Pain; inflammation; anti-inflammatory; antinociceptive; *Eugenia punicifolia*; Myrtaceae.

SUMÁRIO

1.1. Inflamação e dor	21
1.2. Proteína quinase e p38 α MAPK	27
1.3. Terapêutica atual	28
1.4. Plantas medicinais	30
1.5. Planta utilizada	32
2. Objetivos	35
2.1. Objetivo geral	35
2.2. Objetivos específicos	35
3. Materias e Métodos	36
3.1. Material vegetal	36
3.2. Preparação dos extratos	36
3.3. Animais	36
4. Atividade farmacológica geral	37
4.1. Toxicidade aguda e “screening” hipocrático	37
4.2. Avaliação da performance motora “Rota Rod”	37
4.3. Teste da formalina	38
4.4. Avaliação da participação da via L-arginina-óxido nítrico na antinocicepção	39
4.5. Avaliação da participação de receptor opióide na antinocicepção	39
4.6. Avaliação do sistema glutamatérgico na antinocicepção	39
4.7. Edema de orelha induzido pelo xilol	40
4.8. Indução de edema de pata pela carragenina	40
4.9. Ensaio da p38 α MAPK	41

4.10. Ensaio do TNF α	42
4.11. Avaliação da atividade antiulcerogênica no modelo de indução de úlcera gástrica por etanol	45
4.12. Avaliação da atividade antiulcerogênica no modelo de úlcera gástrica induzida por indometacina	45
4.13. Determinação da motilidade intestinal	45
5. Análise estatística	46
6. Resultados	46
6.1. Toxicidade aguda e “screening” hipocrático	46
6.2. Avaliação da performance motora “Rota Rod”	48
6.3. Teste da formalina	49
6.4. Avaliação da participação da via L-arginina-óxido nítrico na antinocicepção	50
6.5. Avaliação da participação de receptor opióide na antinocicepção	52
6.6. Avaliação do sistema glutamatérgico na antinocicepção	53
6.7. Edema de orelha induzido pelo xilol	54
6.8. Indução de edema de pata pela carragenina	54
6.9. Ensaio da p38 α MAPK	55
6.10. Ensaio do TNF- α	57
6.11. Avaliação da atividade antiulcerogênica no modelo de indução de úlcera gástrica por etanol	58
6.12. Avaliação da atividade antiulcerogênica no modelo de úlcera gástrica induzida por indometacina	59
6.13. Avaliação da motilidade intestinal	60
7. Discussão	61

8. Conclusão	78
9. Referências bibliográficas	79
10. Anexos	97

1. INTRODUÇÃO

1.1. INFLAMAÇÃO E DOR

A inflamação é uma resposta imune complexa relacionada ao dano tecidual e/ou celular causada por estímulos químicos, físicos, imunológicos ou microbianos (Hume & Fairlie, 2005; Serhan & Savill, 2005). 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, ocorrendo exacerbação do processo, 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).

O processo inflamatório envolve uma complexa cascata de eventos bioquímicos e celulares, que inclui extravasamento de plasma, ativação enzimática, migração celular, sensibilização e ativação de receptores, lise e reparo tecidual (Carvalho & Lemônica, 1998). Em geral, as lesões teciduais desencadeiam uma reação inflamatória local, iniciadas e reguladas por mediadores inflamatórios: aminas (histamina e serotonina de mastócitos), proteases plasmáticas [sistema complemento, cininas (bradicinina e calidina) e proteínas fibrinolíticas e de coagulação], mediadores lipídicos [prostaglandinas, leucotrienos e fator ativador de plaquetas (PAF)], citocinas (de linfócitos ativados e macrófagos – interleucinas e fator de necrose tumoral), NO, entre outros (Cotran *et al.*, 1996; Rosenberg *et al.*, 1999; Roberts II & Morrow, 2003).

A dor aparece devido aos efeitos diretos de mediadores resultantes tanto do dano inicial quanto da resposta inflamatória em si, como pela compressão dos nervos sensoriais ocasionada pelo edema local. Uma resposta inflamatória aguda bem sucedida resulta na eliminação do agente infeccioso seguida pela fase de resolução e reparo, a qual é mediada

principalmente por macrófagos residentes e recrutados. Se a inflamação aguda falha em eliminar o patógeno, o processo inflamatório persiste e adquire novas características. O infiltrado de neutrófilos é substituído por macrófagos, e no caso de infecção por linfócitos T. Se o efeito combinado dessas células ainda continua insuficiente, um estado inflamatório crônico se segue, envolvendo a formação de granulomas (Medzhitov, 2008).

Esses mediadores são capazes de estimular e sensibilizar nociceptores, definido por Sherrington em 1906, como terminações livres de neurônios aferentes primários (Taiwo & Levine, 1991; Guieu *et al.*, 1996; Calixto, 2000; Calixto *et al.*, 2001, Basbaum *et al.*, 2009). Os nociceptores podem ser ativados por diversos estímulos dolorosos, classificados como mecânicos, térmicos e químicos. Os mediadores inflamatórios promovem de forma sinérgica uma alteração no mecanismo de transdução periférica desses estímulos, aumentando a sensibilidade de transdução de receptores de elevado limiar, com conseqüente redução no limiar de percepção do estímulo doloroso, exagerada resposta a estímulos nociceptivos supra limiares e dor espontânea (Bonica *et al.*, 1990; Meyer *et al.*, 1994).

Precisamente, a dor é um resultado subjetivo da nocicepção, a qual é definida como processos neurais de codificação e processamento do estímulo nocivo (Schaible & Richter, 2004; Loeser & Treede, 2008). Descrevendo melhor, a nocicepção é o processo pelo qual estímulos térmicos, mecânicos ou químicos nocivos são detectados por uma subpopulação de fibras nervosas periféricas, chamadas nociceptores (Basbaum *et al.*, 2009). Os nociceptores são extremamente heterogêneos, diferindo quanto aos tipos de neurotransmissores que contêm, os receptores e canais iônicos que expressam, na velocidade de condução, nas suas propriedades de resposta ao estímulo nocivo e sua capacidade de serem sensibilizados durante a inflamação, lesão e doença (Stucky *et al.*, 2001). Há dois tipos de transmissão do estímulo nociceptivo, de acordo com as características da fibra aferente envolvida na transmissão nervosa. Estas são classificadas de acordo com seu diâmetro, sua estrutura e presença de

mielina. A fibra do tipo C é amielinizada e seu diâmetro varia entre 0,4 a 1,2 μm , e são capazes de propagar o impulso nervoso de maneira mais lenta. As terminações desse tipo de fibra são receptores termossensíveis ao calor e ao frio e também são sensibilizados por substâncias como acetilcolina, serotonina e histamina, bem como a capsaicina (Stein *et al.*, 2009). Os sinais dolorosos pontuais-rápidos são desencadeados por estímulos mecânicos ou térmicos e transmitidos através dos nervos periféricos para a medula espinhal via fibras A mielinizadas na velocidade entre 6 e 30 m/s. Existem duas principais subclasses de nociceptores A δ ; ambas respondem a estímulos mecânicos intensos, mas podem ser diferenciadas pela sua responsividade diferenciada ao calor intenso (tipo I são ativadas a aproximadamente 53 °C; e tipo II ativadas a aproximadamente 43 °C) (Basbaum et al., 2009). Em geral, a dor rápida é desencadeada por tipos de estímulos mecânicos e térmicos, enquanto a dor crônica pode ser desencadeada pelos três tipos de estímulo (Guyton & Hall, 2006; Guyton & Hall, 2011).

Após a transmissão sináptica e modulação do sinal nociceptivo pelos neurônios sensoriais, esses sinais são finalmente percebidos como “dor” em um contexto que envolve fatores cognitivos e ambientais (Woolf & Salter, 2000). A dor é uma qualidade sensorial complexa e indefinida, difícil de ser descrita ou interpretada, pois é uma experiência envolvendo múltiplos fatores que não inclui apenas a nocicepção, mas implica também em componentes cognitivos, afetivos e emocionais (Neugebauer *et al.*, 2009).

A primeira sinapse da via da dor ocorre no corno dorsal espinal, sendo a chave da regulação da transmissão da nocicepção (Heinricher *et al.*, 2009). A sensibilização no corno espinal é o maior fator na indução e na manutenção da nocicepção na segunda fase do teste da formalina. Essa sensibilização resulta da liberação pré-sináptica de mediadores tais como glutamato e substância P. Receptores de glutamato (N-metil D-aspartato ou NMDA, ácido- α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico ou AMPA, cainato e substância P agem

sinergicamente para promover aumento da excitabilidade neuronal, sensibilização central e caracterizam um processo periférico conhecido como inflamação neurogênica (Geppetti & Holzer, 1996). As mudanças fisiológicas que acompanham a inflamação aguda local incluem algumas características principais e envolve uma sequência de eventos, como a vasodilatação, aumento do fluxo sanguíneo local e da permeabilidade vascular, infiltração de leucócitos, prejuízo tecidual por atividade de proteases e espécies reativas de oxigênio, necrose e apoptose, além da liberação de inúmeros mediadores pró-inflamatórios (Huerre & Gounon, 1996; Vivier & Malissen, 2005). Podem ainda estimular a síntese de óxido nítrico (NO) pelo endotélio vascular, causando vasodilatação e extravasamento de plasma para os tecidos (edema), degranulação de mastócitos, aumento da liberação de enzimas lisossômicas e de prostaglandinas (Rang *et al.*, 1994; Aley *et al.*, 1998; Sung *et al.*, 2004; Sherwood & Toliver-Kinsky, 2004).

A via supraespinal do controle da dor se origina em muitas regiões cerebrais, tais como substância periarquedutal cinzenta (PAG), núcleos medianos da rafe e medula rostral ventromedial (RVM) e possuem papel crítico na determinação da dor crônica e aguda (Heinricher & Ingram, 2008; Heinricher *et al.*, 2009). O sistema PAG-RVM, importante no comportamento e nos aspectos terapêuticos da dor, é alvo de alguns agentes analgésicos como anti-depressivos, agentes opióides, inibidores de ciclooxigenase e canabinóides (Hohmann *et al.*, 2005; Leith *et al.*, 2007).

A estimulação dos nociceptores gera potenciais de ação que são conduzidos pelas fibras dos neurônios sensoriais primários aos neurônios de segunda ordem no corno dorsal da medula espinhal, ascendendo para o córtex (Cheng & Ji, 2008). Assim como todos os neurônios sensoriais primários do sistema somatosensorial, os nociceptores possuem seus corpos celulares no gânglio da raiz dorsal ou trigeminal e um axônio que se bifurca em um ramo periférico (para inervar o tecido alvo periférico) e um ramo central (o qual entra no SNC

para fazer sinapse com neurônios nociceptivos de segunda ordem) (Woolf & Ma, 2007). Os axônios dos neurônios de segunda ordem constituem os feixes aferentes que transmitem os impulsos nociceptivos a estruturas do tronco cerebral e diencefalo incluindo o tálamo, substância cinzenta periaquedutal, hipotálamo, entre outros (Almeida *et al.*, 2004). O funcionamento adequado do sistema nociceptivo é essencial para proteger o organismo de danos teciduais. Entretanto em condições patológicas, este sistema se torna sensibilizado e a dor transforma-se em doença (Zeilhofer, 2005).

Os nociceptores não sinalizam somente a dor aguda, mas também contribuem em condições dolorosas persistentes de cunho patológico. Embora a dor aguda possua um papel protetor como um sistema de alerta, a dor crônica como a dor neuropática, é produzida pela disfunção ou lesão do sistema nervoso periférico ou central e pode persistir por dias, meses ou anos após a lesão nervosa (Zimmermann, 2001; Somers & Clemente, 2009). A dor neuropática é caracterizada por sintomas de hipersensibilidade dolorosa, representados pela alodínia mecânica (respostas dolorosas a estímulos táteis normalmente inócuos) e hiperalgesia mecânica e térmica (responsividade aumentada a estímulos previamente nocivos) (Ji & Strichartz, 2004). Isto é resultado de duas diferentes condições: aumento da responsividade dos neurônios da medula espinhal (sensibilização central) ou diminuição do limiar de ativação dos nociceptores (sensibilização periférica) (Julius & Basbaum, 2001).

Atualmente, não se pode considerar somente a atividade neuronal na indução e manutenção de dores crônicas e neuropáticas. Desta forma, a ativação glial na medula espinhal parece ser um mecanismo envolvido em neuropatias de diferentes etiologias (Milligan & Watkins, 2009). Tem sido demonstrado recentemente que astrócitos e microglias desempenham importantes papéis na transmissão da dor, podendo modular a função sináptica e a excitabilidade neural por diferentes mecanismos (Halassa *et al.*, 2007; Pocock & Kettenmann, 2007).

Os astrócitos são as células gliais mais abundantes no sistema nervoso central. Seu contato próximo com os neurônios permite a ativação astrocitária por diversos neurotransmissores, além disso, os astrócitos expressam vários receptores de membrana funcionais (Porter & McCarthy, 1997). Dentre estes, pode-se destacar os receptores glutamatérgicos ionotrópicos NMDA e não-NMDA, bem como receptores purinérgicos e receptores da substância P. Na ativação astrocitária, o sinal extracelular promove a ativação das vias de sinalização intracelular ERK/MAPK-1 (proteína quinase ativada por mitógeno 1) e JNK/MAPK-8 (c-Jun-N-terminal quinase). Este processo leva a síntese de mediadores pró inflamatórios, como IL-1, TNF- α , PGE2 e NO (Milligan & Watkins, 2009).

Durante condições neuropáticas, a ativação de células gliais promove a liberação dos mesmos sinais neuroexcitatórios que são liberados em condições imunológicas. De fato, os eventos fisiológicos que envolvem o início e a manutenção da dor neuropática em modelos animais envolvem sinais neuroexcitatórios que incluem o TNF- α , IL-1 e IL-6 (Watkins *et al.*, 2001; Marchand *et al.*, 2005). Além disso, todos os sinais neuroexcitatórios ou neuromodulatórios que as células gliais liberam (como SP, aminoácidos excitatórios, NO e ATP) ou aqueles nos quais as células gliais expressam receptores, desempenham papel fundamental em estados de dor neuropática (McMahon *et al.*, 2005). Um dos eventos que ocorrem seguindo a lesão em nervo periférico é o aumento do Ca²⁺ intracelular, levando a subsequente ativação das vias de p38, MAPK e ERK na microglia. A ativação destas vias promove a ativação de vários fatores de transcrição, como o NF- κ B e secreção de TNF- α , IL-1, IL-6 e PGE2, e o fator neurotrófico derivado do cérebro. Uma possibilidade pela qual as citocinas pró-inflamatórias liberadas contribuem para a dor é por atuar em seus receptores que são expressos em neurônios em regiões responsivas a dor na medula espinhal. Por exemplo, TNF α e IL-1 são liberados por astrócitos e aumentam a excitabilidade neuronal e a força sináptica por aumentar a condutividade dos receptores glutamatérgicos AMPA e NMDA, bem

como, por aumentar o número destes receptores na membrana dos neurônios (Stellwagen & Malenka, 2006).

1.2. PROTEÍNA QUINASE E P38 α MAPK

As proteínas quinases (PKs) constituem uma família de enzimas que, através da fosforilação de proteínas substrato, regulam a atividade, localização e a função das mesmas (Manning, 2002). A fosforilação dessas proteínas é responsável pela regulação celular, assim como a transdução de sinais na célula. Devido as suas funções de extrema importância, as PKs têm sido alvos de estudos para o desenvolvimento de novos fármacos que modulem suas funções (Schreiber *et al.*, 2009).

As proteínas quinases eucarióticas (ePKs) podem ser divididas em duas subfamílias de acordo com os resíduos que fosforilam: as serina/treonina quinases e as tirosina quinases (Scapin, 2002). A fosforilação é realizada através da remoção de um grupo fosfato de uma molécula de ATP (adenosina trifosfato) e posterior ligação covalente deste grupo a um dos três aminoácidos, que possuem um grupo hidroxila livre. Este processo, o qual pode ser revertido pela defosforilação catalisada por fosfatases, resulta em mudanças conformacionais na proteína substrato podendo ativar ou inibir sua função. Em humanos, a desregulação das tirosina-quinases está relacionada ao desenvolvimento de várias doenças incluindo câncer e diabetes, além de uma grande variedade de doenças congênitas (Robinson *et al.*, 2000).

As MAPKs (proteínas quinase ativadas por mitógenos) são integrantes da subfamília serina e treonina quinases e são ativadas por uma grande variedade de tensões ambientais, tais como choque osmótico, raios ultra-violeta, luz, choque térmico, desgaste mecânico, lipopolissacarídeos e citocinas inflamatórias, incluindo o fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucinas-1 β .

A p38 α MAPK, uma isoforma das MAPKs, tem sido relacionada com a inflamação e apoptose. A isoforma p38 α é a melhor caracterizada e talvez a mais fisiologicamente relevante quinase envolvida em respostas inflamatórias. Além disso, a p38 α MAPK fosforila diversos fatores de transcrição, alguns deles responsáveis pela expressão transcricional de genes que codificam citocinas inflamatórias, tais como IL-1 β e TNF α (Westra & Limburg, 2006; Laufer & Koch, 2008). Estudos mostraram que os inibidores da p38 α MAPK podem diminuir a produção de citocinas e outras substâncias relacionadas com a inflamação como a Ciclooxigenase (COX)-2 e a óxido nítrico sintase em diferentes estudos de inflamação realizados *in vivo* e *in vitro*. Vários p38 α MAPK inibidores têm sido mostrados para bloquear a produção de IL-1 e TNF e outras citocinas (Pearson *et al.*, 2001; Schett *et al.*, 2008). Portanto, a inibição de p38 α MAPK é considerada uma nova alternativa para o tratamento de doenças inflamatórias, e estudos devem ser realizados para avaliar possíveis inibidores eficientes desta proteína.

1.3. TERAPÊUTICA ATUAL

Atualmente, os medicamentos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) são amplamente utilizados e estima-se que todos os dias mais de 30 milhões de pessoas consomem esse tipo de medicamento ao redor do mundo (Steinmeyer, 2000). Nos Estados Unidos, cerca de 3 milhões de americanos utilizam AINEs, e há mais de 100 milhões de suas prescrições anualmente (Laine, 2001; Schlansky & Hwang, 2009).

Os AINEs possuem variada estrutura química e apresentam atividade analgésica, antipirética e anti-inflamatória (Teixeira, 2001). O seu mecanismo de ação deve-se à inibição da atividade das enzimas Ciclooxigenase-1 (COX-1) e Ciclooxigenase-2 (COX-2) (Amann & Peskar, 2002). O uso indiscriminado de AINEs pode levar a efeitos adversos sérios, como o surgimento de úlceras gástricas, que ocorrem pela inibição da síntese de COX-1 (Yuan *et al.*,

2006). A COX-1 quando inibida, produz hipermotilidade gástrica, e por isso avalia-se o trânsito intestinal, provocando alterações microvasculares, bem como a indução de infiltração leucocitária. Esses últimos efeitos resultam em danos à mucosa gástrica (Akiko *et al.*, 2001), sendo esse o principal fator limitante do uso dos AINEs (Laine, 2003). É estimado que nos Estados Unidos, o encargo anual para tratamentos diretos e indiretos de úlceras pépticas é de 3,4 bilhões de dólares (Sandler *et al.*, 2002).

As úlceras pépticas são lesões na mucosa gástrica e duodenal provocadas por um desequilíbrio entre os fatores protetores (secreção de muco gastroduodenal, produção de bicarbonato, fluxo sanguíneo adequado) e lesivos (excesso de pepsina ou ácido clorídrico) da mucosa gástrica e duodenal (Shichijo *et al.*, 2003). Estas lesões podem ser agravadas pelo consumo de bebidas alcoólicas, tabagismo, estresse, uso de AINEs, fatores dietéticos, representados pelo consumo excessivo de café, refrigerantes e condimentos, presença da bactéria *Helicobacter pylori*, motilidade gastroduodenal, presença excessiva de ácidos e pepsina (Eastwood, 1997). Estudos realizados por Leong (2009) demonstram que a doença ulcerosa péptica, afeta igualmente tanto populações de países ocidentais como orientais, porém a magnitude do problema é regional e tem se agravado muito com o uso indiscriminado e cada vez mais freqüente dos AINEs para diferentes finalidades.

Além dos distúrbios gastrointestinais, os inibidores seletivos da COX-2, atuam no sistema cardiovascular e acarretam o desequilíbrio da homeostase em favor da trombogênese e da vasoconstrição, resultando em danos ao sistema cardiovascular e infartos do miocárdio (Vonkeman, 2006). Ainda em relação a seus efeitos adversos, o uso de AINEs pelos indivíduos do sexo feminino aumenta significativamente a ocorrência da síndrome do folículo luteinizado não roto, que contribui para a ocorrência da infertilidade (Micu *et al.*, 2011). Também tem se observado que os AINEs são responsáveis pela segunda causa mais comum de reações de hipersensibilidade induzida por drogas (Gomes & Demoly, 2005).

A condução clínica da dor é um aspecto essencial na medicina moderna e para a qualidade de vida, no entanto as terapias atuais são freqüentemente insuficientes devido a severos efeitos indesejados ou eficácia limitada. Por essa razão, a descoberta de novas terapias para o tratamento da dor torna-se necessária (Bourinet *et al.*, 2005).

1.4. PLANTAS MEDICINAIS

A utilização de espécies vegetais com fins de tratamento, cura de doenças e alívio de sintomas remetem ao início da civilização. Desde o início da cultura humana, as plantas são utilizadas pelo homem com vários objetivos para sua sobrevivência, inclusive fins medicinais. O papiro de Ebers, espécie de farmacopéia faraônica escrita em torno de 1550 a.C., já se referia aos medicamentos de origem vegetal e mencionava cerca de 700 remédios (Gurgel *et al.*, 2005).

O uso de plantas medicinais é freqüente em muitas comunidades onde a população utiliza as plantas de forma empírica para combater os sintomas da doença, utilizando-se de chás e infusões. A união do conhecimento popular e a investigação científica é denominada etnofarmacologia, definida por Rivier & Bruhn em 1979, como sendo uma “área multidisciplinar de pesquisa baseada na observação, descrição e investigação experimental de drogas indígenas e sua atividade biológica”.

O Brasil mostra-se como um país com uma das maiores biodiversidades do mundo pela presença de diferentes biomas, como o cerrado, o pantanal e a região amazônica. A enorme biodiversidade vegetal é capaz de gerar fitoterápicos, fitofármacos e protótipos de novas drogas com importância econômica (Calixto, 2000; Newman & Cragg, 2007).

Estudos mostraram que dentre 1010 drogas descobertas, 275 (cerca de 30%) são derivadas de produtos naturais e 13 % dessas drogas apresentam potencial anti-inflamatório (Calixto, 2000). Dados da Associação Brasileira de Fitoterapia (Abfit) revelam que o mercado de

fitoterápicos cresce cerca de 10% ao ano e hoje representa 8% da venda nacional de medicamentos e 15% do mercado internacional. Em 2008, o mercado era de US\$ 550 milhões no País, e a expectativa da indústria é de que esse valor dobre até 2011, chegando a US\$ 1 bilhão.

Desde 2007, o sistema público de saúde do Brasil oferece medicamentos derivados de plantas, como a “espineira santa” (*Maytenus ilicifolia*) para o tratamento de gastrite, úlcera, câncer de pele e outras doenças; e do “guaco” (*Mikania guaco*), como um expectorante. Em 2010 outras seis plantas começaram a ser distribuídas: a alcachofra (*Cynara cardunculus*) para o tratamento da dor abdominal associada com problemas do fígado e da bile; a “aroeira” (*Schinus terebinthifolius*) para tratar infecções ginecológicas, a “cáscara sagrada” (*Rhamnus purshiana*) indicada para constipação; a “garra do diabo” (*Harpagophytum procumbens*) com atividade anti-inflamatória para dor nas costas e osteoartrite; a “isoflavona da soja” (*Fabaceae/Leguminosae*) como coadjuvante no tratamento dos sintomas da menopausa e a “unha de gato” (*Uncaria tomentosa*) com propriedades anti-inflamatórias (oral e tópica) para artrite reumatoide, osteoartrite, câncer e também como fortificante do sistema imunológico. A Agência Nacional e Vigilância Sanitária (ANVISA) é responsável por aprovar e realizar a subsequente comercialização e produção dos medicamentos no Brasil. Em 2010, a ANVISA apresentou uma lista com mais de 60 plantas medicinais com ação terapêutica reconhecida cientificamente (ANVISA, 2010).

No nosso país muitas plantas são utilizadas na forma de extratos brutos, infusões ou emplastos para tratar infecções recorrentes, diversas doenças inflamatórias, particularmente inflamações na pele e cicatrização de feridas, doenças ulcerativas, entre outras. As preparações de plantas medicinais tradicionais são comumente usadas, mas a eficácia real e os princípios ativos relevantes são usualmente desconhecidos. No entanto, eles são medicamentos e, como tal, possuem efeitos colaterais se não utilizados corretamente. Por isso,

é de suma importância determinar se o uso de uma planta que é utilizada como medicamento é suportado por reais efeitos farmacológicos ou é apenas baseado em crença popular. Conseqüentemente, há uma necessidade de estudos experimentais para demonstrar as propriedades farmacológicas e para identificar os compostos ativos. A elucidação de compostos bioativos de extratos de plantas e seus mecanismos de ação é um grande desafio para o desenvolvimento de novos medicamentos derivados de fontes naturais. A farmacopéia brasileira descreve 48 plantas medicinais em detalhes com apoio em base científica. Mais de 100 plantas já estão comercialmente disponíveis como produtos farmacêuticos (Lista de Planta Sindusfarma) (Goettert, 2010). Com o intuito de aprimorar o conhecimento sobre os efeitos farmacológicos e também os efeitos colaterais, é importante realizar experimentos fitoquímicos, biológicos e farmacológicos. Portanto o estudo de novas drogas derivadas de plantas medicinais são um ponto de partida para novas drogas sintéticas e para otimização de geração de compostos com potencial terapêutico.

1.5. PLANTA UTILIZADA:

O gênero *Eugenia* pertence à família Myrtaceae, uma das famílias botânicas de maior expressão nos ecossistemas brasileiros, tanto em número de espécies como em número de indivíduos. No Cerrado, das 6.062 espécies citadas por Mendonça *et al.* (1998), 214 pertencem à família Myrtaceae, distribuídas em 15 gêneros, o equivalente a 3,5% da flora deste bioma.

Estudo fitoquímico realizado com espécies de *Eugenia* revelou a presença de flavonóides, taninos, terpenóides e óleos essenciais (Oliveira *et al.*, 2006). Os flavonóides são compostos da família dos polifenóis, abundantes no reino vegetal. Em relação as suas propriedades, pode-se citar a atividade antioxidante, além de atuarem na inibição da enzima lipoxigenase -5, conversora do ácido araquidônico em leucotrienos, que são mediadores de asma, alergias e

inflamação, bem como a inibição da via da COX (Simões, 1984; Landolfi *et al.*, 1984). Há relatos da ação anti-inflamatória dos flavonóides tais como a quercetina e a apigenina que causam inibição de COX-2 e de óxido nítrico sintase (Mutoh *et al.*, 2000; Raso *et al.*, 2001). Quercetina e luteolina inibem a ativação do sistema complemento, diminuindo a adesão de células inflamatórias ao endotélio, e por conseqüência, redução da resposta inflamatória (Friesenecker *et al.*, 1995). Além do potencial anti-inflamatório dos flavonóides, esses flavonóides também apresentam comprovada atividade gastroprotetora (Sannomiya *et al.*, 2005).

Sob o ponto de vista farmacológico, estudos realizados com extratos brutos desse gênero, comprovaram as atividades anti-inflamatória, analgésica, antifúngica, antipirética, hipotensiva, antidiabética e antioxidante (Oliveira *et al.*, 2006). *Eugenia uniflora*, uma espécie brasileira conhecida como pitangueira, é utilizada pela população para tratamento de distúrbios inflamatórios como reumatismo e febre, dores de estômago e como hipoglicemiantes em diabéticos. O extrato hidroalcoólico das folhas da pitangueira apresentou efeito anti-oxidante, anti-diarréico, hipoglicemiante e bactericida, este último observado no óleo essencial dessa espécie (Amorim *et al.*, 2009).

Eugenia puniceifolia (Kunth) DC, conhecida como pedra-ume caá, é um arbusto que se encontra amplamente distribuído no cerrado e na região amazônica, onde popularmente é usado em infusões para tratamento de distúrbios hiperglicêmicos, como a diabetes mellitus (Leite, 2011) e usa-se a infusão alcoólica para o tratamento de ferimentos, doenças infecciosas (Oliveira *et al.*, 2005). Além disso, o extrato de *Eugenia puniceifolia* é empregado para tratar distúrbios estomacais e diarréia (Brito *et al.*, 2007; Bopp *et al.*, 2009).



Figura 1. *Eugenia puniceifolia* www.flickr.com/photos/38938362@N05

Pesquisas mostraram que a espécie *Eugenia puniceifolia* possui atividade antioxidante (Gonzaga *et al.*, 2007), efeitos benéficos em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina (Brunetti *et al.*, 2006), influência nos efeitos dos neurotransmissores nicotínicos colinérgicos na placa motora, aumentando a neurotransmissão mediada por receptores nicotínicos para acetilcolina (Grangeiro *et al.*, 2006), redução na produção de mediadores inflamatórios TNF α (fator de necrose tumoral), NF κ B e interleucina 1 β , apoptose e contribuição para a regeneração muscular no distúrbio muscular de Duchenne em ratos (Leite *et al.*, 2010) e o extrato de *Eugenia puniceifolia* aumenta a liberação excitatória de catecolaminas de células cromafins da adrenal bovina quando estimuladas com acetilcolina e potássio, e poderia ser utilizado como um modelo para sintetizar novos derivados com potencial terapêutica como protótipo em pacientes com doença de Alzheimer (Pascual *et al.*, 2012).

Portanto, em vista dos dados farmacológicos de espécies congêneres de *Eugenia* como anti-inflamatório, do potencial farmacológico dos flavonóides como importante classe

fitoquímica com ações anti-inflamatórias, é proposto neste projeto à avaliação da ação antinociceptiva e anti-inflamatória do extrato hidroalcoólico de folhas da *Eugenia punicifolia* (EHEP) e os possíveis mecanismos envolvidos nas ações farmacológicas detectadas.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL:

O objetivo geral desse trabalho é avaliar o efeito anti-inflamatório e antinociceptivo do extrato hidroalcoólico de folhas de *Eugenia punicifolia* (EHEP).

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Avaliar a toxicidade aguda do EHEP em camundongos e a performance motora dos camundongos tratados com EHEP no aparelho “Rota Rod”;
- Avaliar o efeito antinociceptivo *in vivo* do EHEP utilizando o modelo de indução de nocicepção pela injeção intraplantar de formalina em camundongos;
- Identificar os possíveis mecanismos de ação antinociceptiva do EHEP por meio da investigação do efeito do extrato sobre as vias do óxido nítrico, do sistema glutamatérgico e sistema opioidérgico;
- Avaliar o efeito inibitório sobre a p38 α MAPK;
- Avaliar o efeito inibitório sobre a TNF- α ;
- Determinar o potencial efeito anti-edematogênico do EHEP no modelo de inflamação aguda induzida pelo xilol e no modelo de edema de pata induzido pela carragenina;
- Avaliar a atividade antiulcerogênica do EHEP no modelo de indução de úlcera gástrica por etanol e indometacina e
- Determinar a motilidade intestinal do EHEP.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. MATERIAL VEGETAL

As amostras foram coletadas e identificadas no Instituto Florestal e Estações Experimentais Floresta Estadual de Assis, pelo Dr. Antônio C. G. Melo. O espécime da *Eugenia punicifolia* foi depositado no Acervo do Herbário D. Bento Pickel (Instituto Florestal) – número 43.522.

3.2. PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS

O extrato foi preparado a partir de 10 g do material vegetal onde foram adicionados 100 mL de solvente (Etanol: água 70:30). Esta solução foi mantida em maceração dinâmica por um período de 2 horas. Em seguida, a solução foi filtrada e o resíduo reextraído por mais duas vezes, seguindo o mesmo processo. Posteriormente a solução foi seca em estufas a no máximo 40 °C. O rendimento do extrato hidroalcoólico das folhas obtido foi de 51%. No total foram coletadas 7 kg de folhas de *Eugenia punicifolia*.

3.3. ANIMAIS

Foram utilizados camundongos Swiss albinos machos e fêmeas (25-40g) e ratos machos Wistar (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 ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) e ciclo claro-escuro de 12 horas controlado. Os animais foram alimentados com ração Purina® 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 369 – Anexo 1).

4. ATIVIDADE FARMACOLÓGICA GERAL

4.1. Toxicidade aguda e “screening” hipocrático (Brito, 1994):

Foram utilizados camundongos machos e fêmeas Swiss, divididos em grupos (n=8-10): um grupo tratado com o veículo (salina) e os demais tratados com uma dose aguda de 5000 mg/kg do extrato hidroalcolico de *Eugenia punicifolia* DC. Os tratamentos foram realizados oralmente e os parâmetros comportamentais, descritos por Brito (1994) – Anexo 2, foram observados aos 30, 60, 120, 240 e 360 min. após a administração do extrato, bem como o número de mortes. O peso corporal dos animais foi avaliado diariamente por 14 dias após o início dos experimentos. No décimo quinto dia, os animais foram mortos 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. Alterações estatisticamente significativa dos parâmetros adotados entre os animais tratados com o EHEP e tratados com o veículo foram indicativos de efeito tóxico agudo do extrato vegetal.

4.2. Avaliação da performance motora “Rota Rod” (Dunham & Myia, 1957 com modificações):

Para avaliar o efeito do EHEP na performance motora dos camundongos machos utilizou-se o aparelho “rota Rod”. O aparelho contém uma barra de ferro giratória com velocidade regulável em rotações por minuto (6 rpm), separada em 04 compartimentos permitindo a avaliação simultânea de vários animais. Camundongos Swiss machos (n=8) foram separados em diferentes grupos: veículo (salina 10 ml/kg) e EHEP (250 mg/kg) que receberam os diferentes tratamentos oralmente administrados 60 minutos antes da avaliação da performance locomotora. O grupo utilizado como controle recebeu o tratamento com diazepam (2,0 mg/kg,

i.p.) 30 minutos antes da avaliação. Foi analisado o número de quedas de cada animal durante os 3 minutos de observação.

4.3. Teste da formalina (Hunskaar & Hole, 1985 com modificações):

O modelo mais específico de dor aguda é caracterizado pelo teste de formalina. Este teste 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 minutos. É uma fase indicativa de dor neurogênica (mecanismo central), que sofre ação principalmente de drogas narcóticas (opioides) e é decorrente da estimulação direta dos nociceptores. 2) Fase tardia: inicia-se entre 15-30 min após administração de formalina e permanece até cerca de 60 min. Esta fase é indicativa de dor inflamatória, e sofre ação de drogas periféricas (AINEs) e narcóticas (Hunskaar & Hole, 1985). Na segunda fase do teste da formalina vários mediadores químicos são liberados pelas células lesadas como a histamina, bradicinina, serotonina e prostaglandinas. Todos esses mediadores contribuem para o processo inflamatório, estimulam nociceptores e induzem a dor, portanto, drogas capazes de reduzir essa resposta inflamatória, demonstram atividade nessa segunda fase (Esfahani, 2011).

Este experimento foi baseado nas descrições de Hunskaar & Hole (1985), com algumas modificações. Foi utilizada uma câmara de observação, que consiste em um funil com 20 cm de diâmetro. Foram utilizados camundongos machos (n=10-12), onde cada animal foi previamente colocado no funil câmara por 30 minutos antes da injeção intraplantar de formalina para permitir aclimatação com o novo ambiente. Os camundongos foram pré-tratados oralmente com veículo (salina) e com o EHEP nas doses de 125, 250 e 500 mg/kg (curva dose-resposta). Após uma hora, foi administrada 20 µL de solução de formalina 2,7 % em tampão fosfato que foi injetada intraplantarmente na pata traseira direita. Logo após a injeção de formalina, os animais foram observados na câmara até 30 minutos. O tempo (em segundos) que o camundongo lambeu suas patas foi registrado e considerado como indicativo

de dor. A menor dose efetiva do EHEP foi utilizada para caracterização dos mecanismos de ação.

4.4. Avaliação da participação da via L-arginina-óxido nítrico na antinocicepção (Santos *et al.*, 1999 e Santos *et al.*, 2005 com modificações):

Para a avaliação do papel do óxido nítrico na antinocicepção do EHEP, camundongos machos (n=10-12) foram pré-tratados com L-arginina (substrato da síntese de NO) 500 mg/kg (i.p) 30 minutos antes dos tratamentos orais. Como controle da reversão da antinocicepção do EHEP, foi administrado l-name (inibidor da síntese de NO) 65 mg/kg (i.p) 30 minutos após a injeção de l-arginina e os animais foram submetidos ao teste da formalina como descrito anteriormente.

4.5. Avaliação da participação de receptor opióide na antinocicepção (Santos *et al.*, 1999 e Santos *et al.*, 2005 com modificações):

Para a avaliação da participação de receptores opióides na atividade antinociceptiva do extrato hidroalcoólico de *Eugenia punicifolia*, os camundongos machos (n=10) foram pré-tratados com naloxona (antagonista de receptor opióide) 1 mg/kg (i.p) 30 minutos antes aos tratamentos orais do teste da formalina como descrito anteriormente. Morfina 2,5 mg/kg (s.c) foi utilizada para o controle da reversão da antinocicepção.

4.6. Avaliação do sistema glutamatérgico na antinocicepção (Beirith *et al.*, 2002):

Para avaliação do papel do sistema glutamatérgico na atividade antinociceptiva do extrato hidroalcoólico de *Eugenia punicifolia*, foi administrado injeção intraplantar de 20 µl de 30 µmol de glutamato. Os camundongos machos (n=10) tratados via oral com veículo (salina 10 ml/kg) ou extrato (250 mg/kg) foram observados por 15 minutos seguidos. O tempo em segundos que o animal lambeu a pata foi considerado como indicativo de dor.

4.7. Edema de orelha induzido pelo xilol (Swingle *et al.*, 1981 com modificações):

Xilol possui ação pró-inflamatória aguda de origem predominantemente neurogênica mediada pelos neurônios sensíveis a capsaicina. Há evidências do envolvimento da substância P e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) na ativação das fibras sensoriais pelo xilol. Nesse modelo experimental, substância P provoca extravasamento de plasma (e consequentemente edema) através da ativação de receptores NK1 (neurocininas) nas células do endotélio vascular, enquanto que CGRP potencializa o efeito da substância P através da indução de vasodilatação (Geppetti *et al.*, 1996).

Para a indução do edema de orelha, 40 µl de xilol foram aplicados topicamente na orelha esquerda dos camundongos machos (n=10) (20 µl na face anterior da orelha, 20 µl na face posterior). A orelha direita foi utilizada como controle. Os animais, 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 com a substância teste de interesse e o controle negativo (salina). As doses de 125, 250 e 500 mg/kg do extrato hidroalcoólico da *Eugenia punicifolia* foram testadas através de administração via oral. Após uma hora de indução do edema, os camundongos foram mortos e uma secção circular (8 mm de diâmetro) de suas orelhas esquerdas e direitas foram retiradas com o auxílio de um *puncher* (perfurador). Logo em seguida as orelhas foram pesadas. O edema é expresso através da diferença de massa (em miligramas) entre a orelha esquerda e a orelha direita.

4.8. Indução de edema de pata pela carragenina (Winter *et al.*, 1962, Levy, 1969):

O modelo de edema de pata induzido pela carragenina é altamente sensível as drogas anti-inflamatórias não esteroidais e tem sido uma ferramenta aceitável para avaliação de novas drogas anti-inflamatórias (Just *et al.*, 1998). Este modelo possui duas fases: a fase inicial (1-2 horas) é mediada por histamina, serotonina e aumento da síntese de prostaglandina, enquanto

que a fase tardia (3-4 horas) é sustentada pela liberação de prostaglandina no tecido, sendo que essa fase é inibida pelas drogas anti-inflamatórias tais como piroxicam (Brito & Antonio, 1998).

Para verificar a possível atividade anti-edematogênica do extrato de *Eugenia punicifolia* foi utilizado o método de indução de edema de pata com carragenina em ratos Wistar (Winter *et al.*, 1962; Levy, 1969). Os animais em jejum de quatro horas (n=7) foram divididos em grupos: controle positivo (salina 10 ml/kg), controle negativo (Piroxicam 30 mg/kg) e extrato de *Eugenia punicifolia* (250 mg/kg). Os tratamentos foram administrados por via oral 1 hora antes da indução do edema através da injeção subcutânea de 100 µl/pata de carragenina (1%) na região subplantar da pata posterior direita e 100 µl/pata de salina estéril na pata esquerda. Após uma hora da indução do edema, fez-se a medição de ambas as patas durante 4 horas, a cada uma hora de intervalo, utilizando o pletismômetro Insight. O resultado é expressado pela diferença de volume (ml) deslocado entre as patas medidas.

4.9. Ensaio da p38 α MAPK (Goettert *et al.*, 2010):

Para a avaliação da atividade do EHEP sobre a proteína quinase ativada por mitógeno p38 α , o seguinte ensaio foi realizado:

1. Placa de microtitulação com 96 poços foi revestida com 50 µL/poço de substrato ATF-2 e incubada overnight a 4°C.
2. Após o período de incubação, os locais de ligações livres restantes na placa foram bloqueados com “Blocking Buffer” (solução bloqueadora) por 30 minutos. Após o tempo de ação, a placa foi lavada 3 vezes com água destilada.
3. As amostras analisadas foram diluídas em uma solução de p38 α quinase (KB – p38 α – 12 ng/poço) (concentrações de 10µM a 0.01µM), e preparadas em gelo. Cada composto do controle positivo, solução de NSB (non specific binding – sítio de ligação não

específico) – controle negativo e os compostos testados foram transferidos em triplicata para placa (50 µL/poço) e incubada durante 60 minutos a 37 ° C.

4. Após o período de incubação, utilizou-se “Blocking Buffer” (solução bloqueadora) por 15 minutos. Após o tempo de ação, a placa foi lavada 3 vezes com água destilada.
5. Adicionou-se 50 µl de anticorpo peroxidase ATF-2-Thr^{69/71}(1:5000) em cada poço e incubou-se por 60 minutos a 37°C.
6. Após o período de incubação a placa foi lavada 3 vezes com água destilada e foram adicionados 50 µl de solução TMB em cada poço. A placa foi colocada no escuro por aproximadamente 5-10 minutos para o efeito de coloração.
7. Após o tempo de ação atingido, adicionou-se em cada poço 25 µl de 2N H₂SO₄. A detecção da reação foi lida em espectrofotômetro a 450 nm.
8. A inibição foi calculada de acordo com a seguinte equação: Inibição (%) = 100 – (OD amostra / OD estimulação) × 100, onde OD corresponde à densidade óptica no espectrofotômetro.

4.10. Ensaio do TNF- α (Goettert *et al.*, 2010):

Para a avaliação da atuação do EHEP sobre a liberação do TNF- α foram utilizadas duas amostras de sangue humano fresco solubilizados potássio-EDTA de dois diferentes doadores, provenientes do Centro de doação de sangue da Universidade de Tübingen – Alemanha.

4.10.1. Estimulação da liberação do TNF- α

1. Soluções estoques de todas as amostras foram preparadas com Cremophor®EL/EtOH (10 mM) e diluições de séries de 10⁻³ a 10⁻⁶ foram realizadas. Para as primeiras duas diluições, solução de gentamicina foi adicionada. Todas as diluições foram feitas com 1% de Cremophor®EL/EtOH. As amostras diluídas foram transferidas

para uma placa de microtitulação (300 µl/poço) em seus respectivos poços. A solução de Cremophor®EL/EtOH a 1% foi utilizada como valores de referências basais e de estimulação.

2. 16 ml de sangue fresco humano de dois diferentes voluntários foram pipetados em soro bovino fetal (16 ml) cada. A mistura foi armazenada a 37° C com agitação branda.

3. 400 µl do sangue diluído foram transferidos para uma placa de poço profundo (quantidade transferida para cada poço - uma placa foi utilizada para cada doador). Com uma pipeta eletrônica de 8 canais, 50 µl das amostras diluídas (100 µM a 0,1 µM) foram transferidas para cada placa. A placa foi pré-incubada por 15 minutos em câmara de CO₂ e com concentração de 5% de CO₂.

4. Posteriormente 50µl de solução de DPBS- gentamicina foram pipetadas em cada poço para analisar o valor basal e 50 µl de solução LPS (1 µg/ml) nos poços restantes, resultando em uma concentração final de 10 µM a 0,01 µM.

5. Após 150 minutos de incubação a 37°C e 5% de CO₂, foram adicionados 500 µl de solução 1% de BSA/PBS resfriadas no gelo, e posteriormente cada placa foi reservada no gelo por 10 minutos.

6. As placas foram centrifugadas (1000 rpm, 4°C, 15 minutos) e 2 x 160 µl do sobrenatante foram transferidos para tubos Eppendorf.

7. As amostras foram congeladas a -80°C para posterior quantificação pelo método ELISA.

4.10.2. Determinação da inibição da liberação da citocinina TNF-α pelo método ELISA

1. Placa de microtitulação de 96 poços foi revestida com 100 µl/poço de solução de anticorpo de captura (anticorpo de rato anti TNF-α humano) e incubada overnight em temperatura ambiente e no escuro.

2. A placa foi lavada três vezes com “washing buffer” e 300 µl de 1% de BSA/PBS foram adicionados em cada poço, seguidos de 60 minutos de incubação em temperatura ambiente.

3. As amostras foram diluídas 1:1,5 com diluente de TNF- α e uma série de padrões (1000 pg/ml a 0 pg/ml) foram produzidos. As placas foram lavadas com “washing buffer” e o líquido restante na placa foi removido tocando cuidadosamente a placa.

4. 100 µl das amostras e das séries padrões foram pipetadas em seus correspondentes poços, e a placa foi incubada por 120 minutos a temperatura ambiente e no escuro. Os poços para o branco continuaram vazios.

5. Após lavagem das placas, 100 µL de solução de anticorpo secundário (cabra anti-humano TNF- α) foram adicionados em cada poço, exceto para o branco.

6. Após outra incubação de 120 minutos e três passos de lavagem, 100 µl de solução de enzima reativa (HRP) foram adicionados nos respectivos poços (exceto o branco) e incubados por mais 20 minutos em temperatura ambiente e no escuro.

7. Após um último passo de lavagem 100 µl de solução de substrato TMB foram adicionados aos poços e a placa foi incubada por 20 minutos a temperatura ambiente e no escuro.

8. A reação foi paralizada com 50 µl de 2N de ácido sulfúrico e a densidade óptica foi mensurada fotometricamente a 450 nm com um leitor de microplaca.

9. A porcentagem de inibição foi calculada de acordo com a seguinte equação: Inibição (%) = $100 - (C_{\text{amostra}} - C_{\text{Basal}} / C_{\text{estimulação}} - C_{\text{basal}}) \times 100$, onde C é o valor da absorbância.

C amostra: concentração da citocinina nos poços com as substâncias testes e LPS; C basal: concentração da citocinina nos poços sem as substâncias testes e LPS; C estimulação: concentração das citocinins nos poços com LPS.

4.11. Avaliação da atividade antiulcerogênica no modelo de indução de úlcera gástrica por etanol (Robert *et al.*, 1979 com modificações):

Ratos Wistar machos foram divididos em grupos (n=7) e tratados, após 12 horas de jejum, com EHEP nas 3 doses (125, 250 e 500 mg/kg), 100 mg/kg de carbenoloxona (controle positivo) ou veículo (controle negativo – salina 10 ml/kg) uma hora antes da indução das lesões gástricas pela administração, também por via oral, de 1 ml de etanol absoluto. Após 1 hora da indução, os animais foram mortos e os estômagos retirados para contagem e classificação das lesões. Para a quantificação das lesões gástricas os estômagos foram colocados em placas de vidro, as quais foram escaneadas para realização da quantificação, através do aplicativo Avsoft Bioview® (mm²).

4.12. Avaliação da atividade antiulcerogênica no modelo de úlcera gástrica induzida por indometacina (Guidono *et al.*, 1997):

Ratos Wistar foram separados em grupos (n=7), privados de comida por 12h, com água *ad libitum*. Após 30 minutos decorridos da administração (via oral) de salina 10 ml/kg, lansoprazol 30 mg/kg, e o EHEP nas doses de 125, 250 e 500 mg/kg, indometacina 50 mg/kg - solubilizada em Carbonato de Sódio 0,5%, pH 7,4, foi administrada (via oral) para todos os 35 animais. Após 6 horas da administração do agente lesivo (indometacina), todos os animais foram mortos e os estômagos retirados, abertos pela maior curvatura e a área de lesão (mm²) determinada pelo programa Avsoft Bioview® (mm²).

4.13. Determinação da motilidade intestinal (Stickney & Northup, 1959 com modificações):

Camundongos Swiss machos (n=10), em jejum de 6 horas foram divididos em grupos que receberam seus respectivos tratamentos orais: veículo (salina 10 ml/kg - controle negativo),

morfina 2,5 mg/kg (s.c controle positivo) e EHEP nas doses de 125 mg/kg e 250 mg/kg. Após trinta minutos, todos os animais receberam carvão ativado 10% v.o. em volume de 10 ml/kg. Meia hora após a administração do carvão, todos os animais foram mortos. O passo seguinte foi a remoção de todo intestino delgado juntamente com o estômago, para a realização da medição do comprimento total do intestino e a distância percorrida pelo carvão ativado, para a obtenção da relação distância percorrida e comprimento total do intestino. Os dados obtidos dessa relação foram corrigidos em arco seno para posterior análise estatística.

5. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos na forma de média \pm erro padrão da média (e.p.m) 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, ou teste de Student (t) para comparar dois grupos. A análise estatística dos resultados considerou como nível de significância mínima de $p < 0,05$.

6. RESULTADOS

6.1. Toxicidade Aguda e *Screening* hipocrático

A administração oral do extrato hidroalcoólico de *Eugenia punicifolia* na dose de 5000 mg/kg não provocou alterações nos parâmetros comportamentais das fêmeas e machos analisados quando comparados aos parâmetros obtidos pelo grupo tratado com o veículo (Anexo 4). O monitoramento diário dos pesos corporais dos animais durante 14 dias não indicou variação em relação ao grupo controle negativo (Figuras 2 e 3).

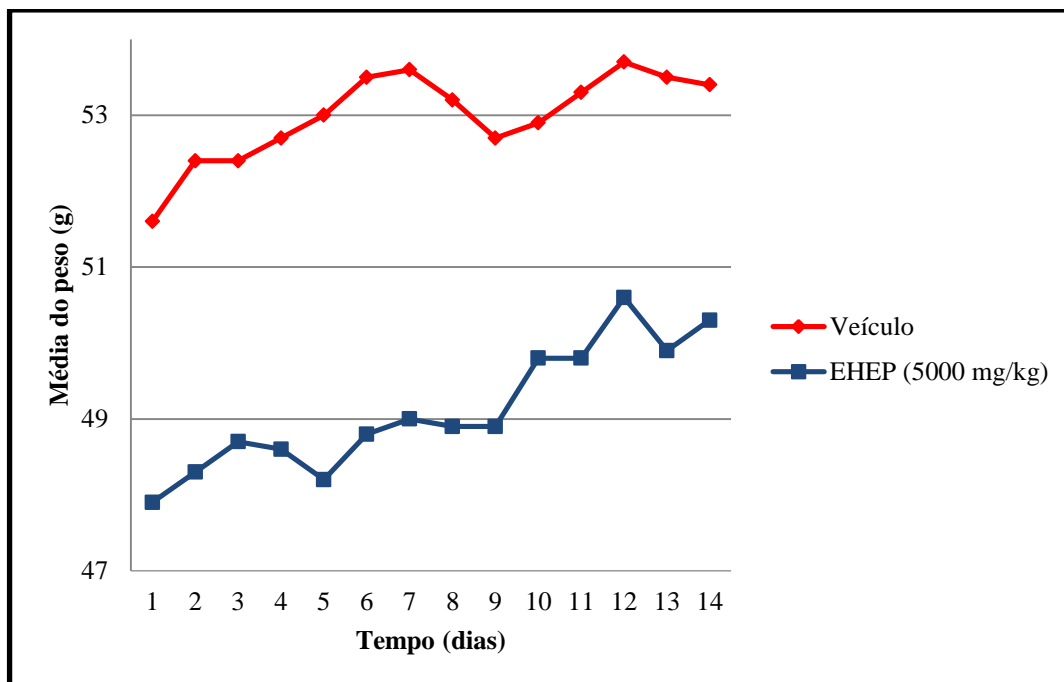


Figura 2. Evolução do peso corporal (g) de camundongos (machos) tratados oralmente com única dose do extrato hidroalcoólico de *Eugenia punicifolia* (EHEP) (5000 mg/kg) no modelo de toxicidade aguda. Média do peso (g) dos animais monitorados durante 14 dias. Os pontos representam as médias de peso dos grupos para cada dia de observação. Teste t “Student”.

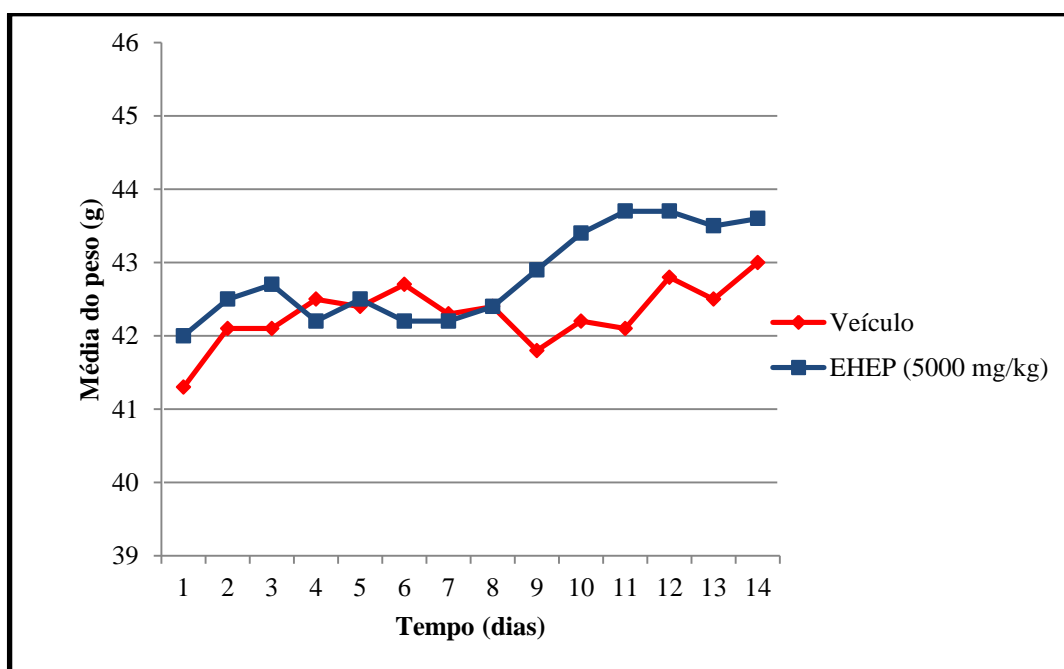


Figura 3. Evolução do peso corporal (g) de camundongos (fêmeas) tratados oralmente com única dose do extrato hidroalcoólico de *Eugenia punicifolia* (EHEP) (5000 mg/kg) no modelo de toxicidade aguda. Média do peso (g) dos animais monitorados durante 14 dias. Os pontos representam as médias de peso dos 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, verificou-se ausência de diferença significativa ($p > 0.05$) entre os grupos tratados com o extrato e tratados com o veículo (Figura 4), tanto para fêmeas quanto para machos. Na Figura 5 estão representadas as médias dos pesos dos órgãos reprodutores e observou-se que também não ocorreram diferenças estatísticas entre os grupos tratados com o extrato e veículo.

Tratamentos	N	Morte	Coração	Baço	Pulmão	Fígado	Rins
Veículo	10	0	4,00 ± 0,08	3,40 ± 0,11	4,40 ± 0,14	13,23 ± 0,15	6,58 ± 0,49
♂ EHEP (5000 mg/kg)	10	0	4,05 ± 0,13	3,11 ± 0,09	4,87 ± 0,21	12,34 ± 0,18	6,30 ± 0,56
Veículo	10	0	3,69 ± 0,06	3,51 ± 0,20	4,80 ± 0,08	12,46 ± 0,19	5,60 ± 0,11
♀ EHEP (5000 mg/kg)	8	0	3,94 ± 0,06	3,11 ± 0,13	4,19 ± 0,05	12,42 ± 0,16	5,37 ± 0,05

Figura 4. Efeito do tratamento agudo com o extrato hidroalcoólico de *Eugenia punicifolia* (EHEP) (5000 mg/kg) sobre os órgãos de camundongos (g) no modelo de toxicidade aguda. Para machos: $F_{(1;18)} = 2,45$ para peso do Coração, $F_{(1;18)} = 1,45$ para peso do Baço, $F_{(1;18)} = 2,03$ para peso do Pulmão, $F_{(1;18)} = 2,91$ para peso do Fígado e $F_{(1;18)} = 1,50$ para peso do Rins. Para Fêmeas: $F_{(1;16)} = 1,34$ para peso do Coração, $F_{(1;16)} = 2,83$ para peso do Baço, $F_{(1;16)} = 2,67$ para peso do Pulmão, $F_{(1;16)} = 1,64$ para peso do Fígado e $F_{(1;16)} = 6,13$ para peso do Rins. Os dados são expressos pela média ± erro padrão da média. Teste t “Student”.

Tratamentos	Útero	Ovários#
Veículo	2,37 ± 0,27	1,07 ± 0,06
EHEP (5000 mg/kg)	2,19 ± 0,37	1,24 ± 0,05

Figura 5. Efeito do tratamento agudo com o extrato hidroalcoólico de *Eugenia punicifolia* (EHEP) sobre os órgãos reprodutivos de camundongos (g) no modelo de toxicidade aguda. $F_{(1;16)} = 1,52$ para peso do Útero, $F_{(1;16)} = 1,71$ para peso do Ovários. Os dados são expressos pela média ± erro padrão da média. # Os valores reais foram multiplicados por 100 para que fosse viável a realização da conversão dos dados em arcoseno e posterior análise estatística. Teste t “Student”.

6.2. Avaliação da performance motora “Rota Rod”

No modelo experimental para a avaliação da atividade motora, o EHEP (250 mg/kg) não demonstrou alterações no número de quedas dos animais ($2,12 \pm 0,61$) durante o período

avaliado. O grupo controle positivo, tratado com diazepam (2 mg/kg, i.p.), apresentou um expressivo aumento no número de quedas dos animais ($7,62 \pm 1,79$), como mostra a figura 6.

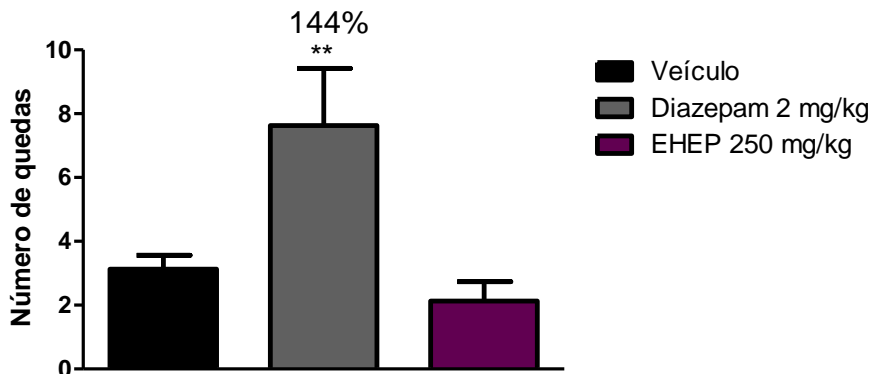


Figura 6. Avaliação do número de quedas dos camundongos tratados oralmente com extrato hidroalcoólico de *Eugenia punicifolia* (EHEP) (250 mg/kg) no modelo de Rota Rod. Os dados são expressos pela média \pm erro padrão pela média (n=8). ANOVA $F_{(2,21)} = 6,81$. Teste de Dunnett $**p < 0,01$. Os valores (%) correspondem ao aumento da média em relação ao grupo controle (veículo - salina).

6.3. Teste da formalina

Neste modelo verificou-se que o extrato hidroalcoólico de *Eugenia punicifolia* administrado oralmente nas doses de 125, 250 e 500 mg/kg, possui significativo efeito antinociceptivo em ambas as fases (neurogênica e inflamatória) do teste da formalina, como mostram as figuras 7 e 8. Este resultado foi determinante para a caracterização da menor dose efetiva (250 mg/kg).

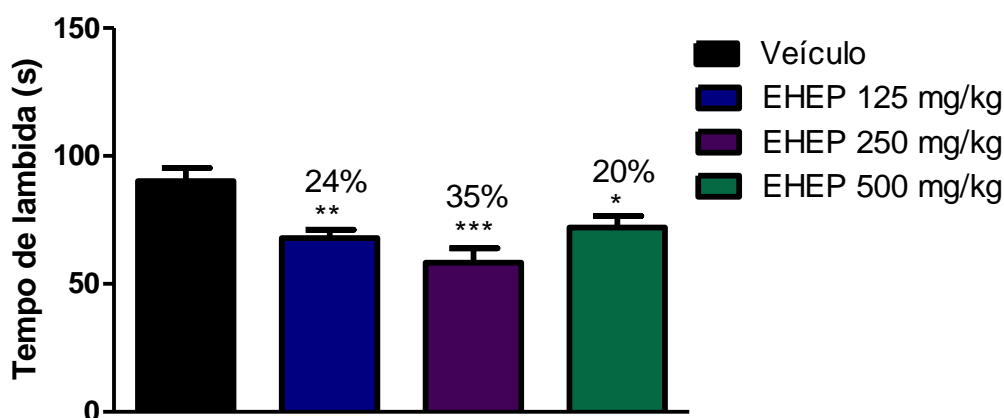


Figura 7. Avaliação da atividade antinociceptiva do extrato hidroalcoólico de *Eugenia punicifolia* (EHEP) no modelo de formalina na fase neurogênica. Os dados são expressos pela média ± erro padrão da média (n=10-12). ANOVA F_(3;34) = 8,29 para fase neurogênica. Teste de Dunnett *p<0,05; **p<0,01 e ***p<0,001. Os valores (%) correspondem á redução da média em relação ao grupo controle (veículo - salina).

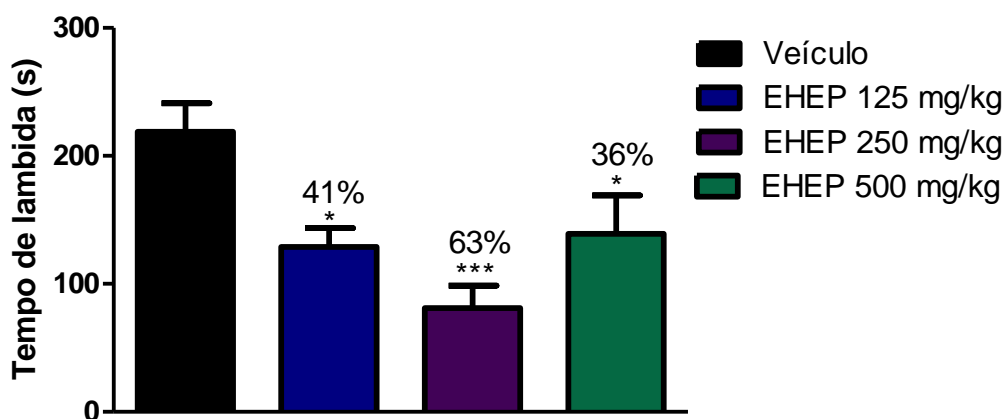


Figura 8. Avaliação da atividade antinociceptiva do extrato hidroalcoólico de *Eugenia punicifolia* (EHEP) no modelo de formalina na fase inflamatória. Os dados são expressos pela média ± erro padrão da média (n=10-12). ANOVA F_(3;33) = 6,61 para fase inflamatória. Teste de Dunnett *p<0,05 e ***p<0,001. Os valores (%) correspondem á redução da média em relação ao grupo controle (veículo- salina).

6.4. Avaliação da participação da via L-arginina-óxido nítrico na antinocicepção

Para investigar o possível papel do óxido nítrico (NO) no mecanismo de ação antinociceptiva desse extrato, foi utilizado a L-arginina (um substrato para síntese de NO) a fim de verificar possível efeito de reversão do extrato através dessa droga. Para isso, os animais foram pré-tratados com L-arginina (500 mg/kg, i.p.) 30 minutos antes da administração oral do extrato de *Eugenia punicifolia*. O L-name (inibidor da NO sintase) foi utilizado como controle da antinocicepção.

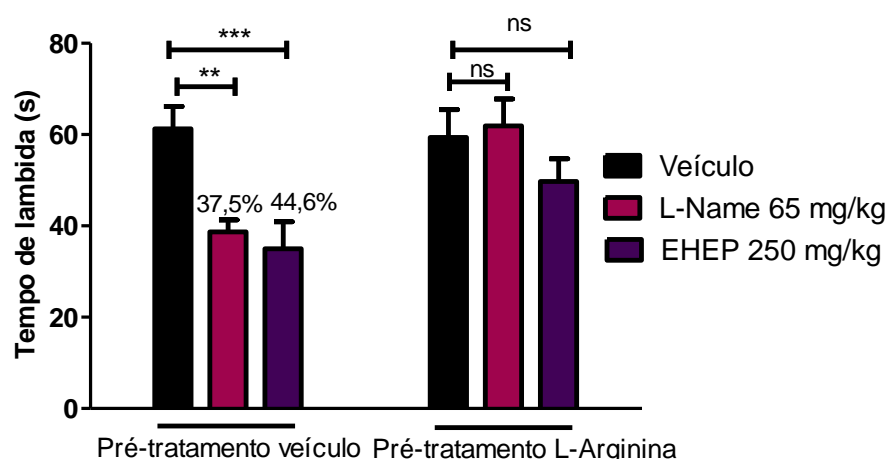


Figura 9. Avaliação da participação da via L-arginina-óxido nítrico na atividade antinociceptiva do extrato hidroalcoólico de *Eugenia punicifolia* (EHEP) (250 mg/kg) no modelo de formalina na fase neurogênica. Tratamentos: salina 10 ml/kg, L-name 65 mg/kg *i.p.*, *E. punicifolia* 250 mg/kg *v.o.* Pré-tratamento: salina 10 ml/kg *v.o.* ANOVA $F_{(3;38)} = 7,76$. Pré-tratamento: l-arginina 500 mg/kg *i.p.* ANOVA $F_{(3;28)} = 1,50$. Teste Dunnett ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; ns = não significativo. As barras representam os valores de média em segundos \pm erro padrão da média. As porcentagens indicam a ação antinociceptiva em relação aos seus respectivos controles. (n= 10-12).

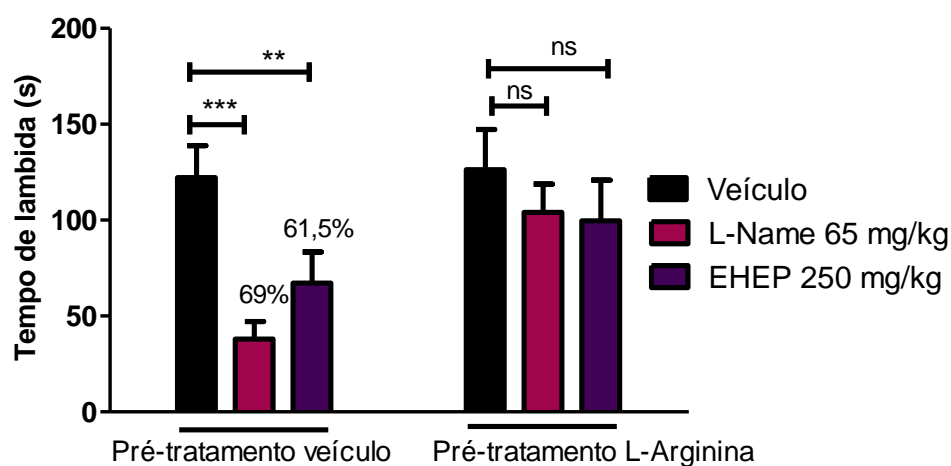


Figura 10. Avaliação da participação da via L-arginina-óxido nítrico na atividade antinociceptiva do extrato hidroalcoólico de *Eugenia punicifolia* (EHEP) (250 mg/kg) no modelo de formalina na fase inflamatória. Tratamentos: salina 10 ml/kg, L-name 65 mg/kg *i.p.*, *E. punicifolia* 250 mg/kg *v.o.* Pré-tratamento: salina 10 ml/kg *v.o.* ANOVA $F_{(3;37)} = 7,06$ Pré-tratamento: l-arginina 500 mg/kg *i.p.* ANOVA $F_{(3;28)} = 0,30$. Teste Dunnett ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; ns = não significativo. As barras representam os valores de média em segundos \pm erro padrão da média. As porcentagens indicam a ação antinociceptiva em relação aos seus respectivos controles. (n= 10-12).

Como mostram as figuras 9 e 10, houve significativa reversão do efeito antinociceptivo do extrato através do pré-tratamento com L-arginina quando comparado ao pré-tratamento com o veículo, em ambas as fases do teste da formalina.

6.5. Avaliação da participação de receptor opióide na antinociceção

Para investigar o possível papel do sistema opioidérgico no mecanismo de ação antinociceptiva do extrato, foi utilizado a naloxona (antagonista não seletivo de receptor opióide) com o intuito de verificar possível efeito de reversão do extrato através dessa droga. Para isso, os animais foram pré-tratados com naloxona (1 mg/kg, i.p.) 30 minutos antes da administração oral do extrato de *Eugenia punicifolia*. Morfina foi utilizada como controle da antinociceção. Como mostram as figuras 11 e 12, a naloxona reverteu completamente o efeito antinociceptivo causado pela morfina em ambas as fases (2,5 mg/kg, s.c.). No entanto, a naloxona não reverteu à ação antinociceptiva causada pelo EHEP em ambas as fases do teste da formalina (250 mg/kg, v.o.).

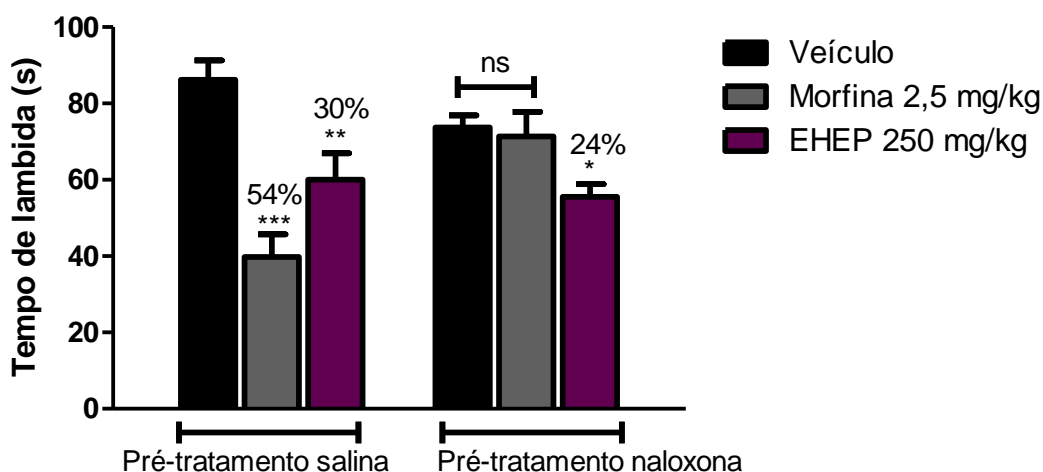


Figura 11. Avaliação da participação do receptor opióide na atividade antinociceptiva do extrato hidroalcoólico de *Eugenia punicifolia* (EHEP) (250 mg/kg) no modelo de formalina na fase neurogênica. Tratamentos: salina 10 ml/kg, naloxona 1 mg/kg i.p., *E. punicifolia* 250 mg/kg v.o. Pré-tratamento: salina 10 ml/kg v.o. ANOVA $F_{(2;22)} = 16,95$. Pré-tratamento: naloxona 1 mg/kg i.p. ANOVA $F_{(2;24)} = 3,59$. Teste Dunnett * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; ns = não significativo. As barras representam os valores de média em segundos \pm erro padrão da média. As porcentagens indicam a ação antinociceptiva em relação aos seus respectivos controles. (n= 10-12).

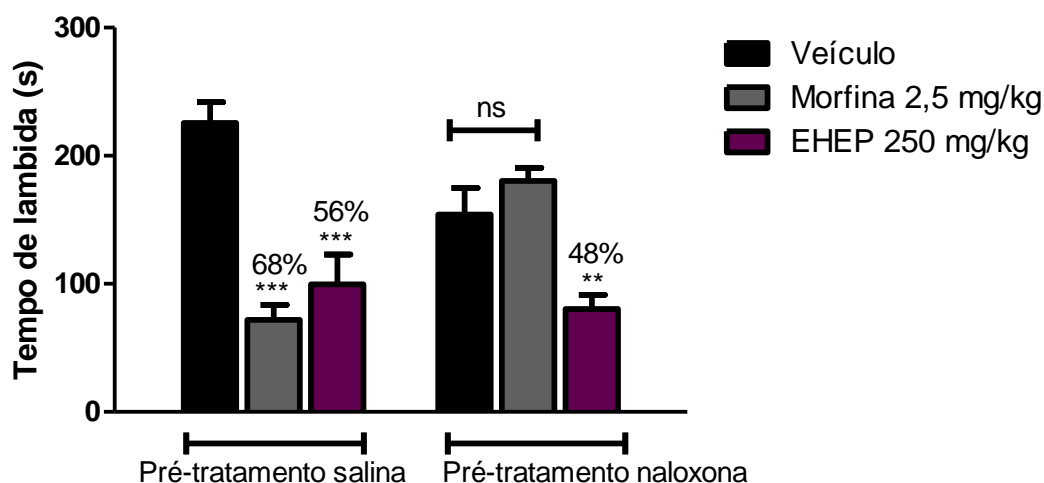


Figura 12. Avaliação da participação do receptor opióide na atividade antinociceptiva do extrato hidroalcoólico de *Eugenia punicifolia* (EHEP) (250 mg/kg) no modelo de formalina na fase inflamatória. Tratamentos: salina 10 ml/kg, naloxona 1 mg/kg *i.p.*, *E. punicifolia* 250 mg/kg *v.o.* Pré-tratamento: salina 10 ml/kg *v.o.* ANOVA $F_{(2;21)} = 24,28$. Pré-tratamento: naloxona 1 mg/kg *i.p.* ANOVA $F_{(2;20)} = 11,19$. Teste Dunnett ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$; ns = não significativo. As barras representam os valores de média em segundos \pm erro padrão da média. As porcentagens indicam a ação antinociceptiva em relação aos seus respectivos controles. (n= 10-12).

6.6. Avaliação do sistema glutamatérgico na antinociceção

Através da indução da nociceção pela administração do glutamato, foi possível observar que a administração da dose de 250 mg/kg de EHEP inibiu em 35% ($79,71 \pm 7,14$ s) a nociceção quando comparado ao grupo tratado com o veículo (salina 10ml/kg, *v.o.*), como mostra a figura 13.

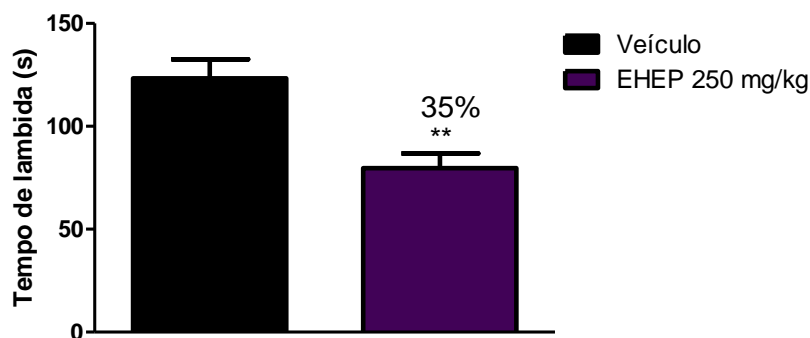


Figura 13. Avaliação da participação do sistema glutamatérgico na atividade antinociceptiva do extrato hidroalcoólico de *Eugenia punicifolia* (EHEP) (250 mg/kg) no modelo de dor induzida pelo glutamato. Os dados são expressos pela média \pm erro padrão da média (n=10). Teste t “Student” *** $p < 0,01$. Os valores (%) correspondem á redução da média em relação ao grupo controle (veículo- salina).

6.7. Edema de orelha induzido pelo xilol

No modelo do edema de orelha induzido pela aplicação tópica de xilol, o EHEP mostrou significativa redução do edema apenas na dose de 250 mg/kg, inibindo em 64% ($3,61 \pm 0,94$ mg) quando comparado ao grupo tratado com o veículo (salina). O controle positivo, dexametasona (5 mg/kg, i.p.), apresentou inibição do edema em 67% ($3,21 \pm 0,68$), como mostra a figura 14.

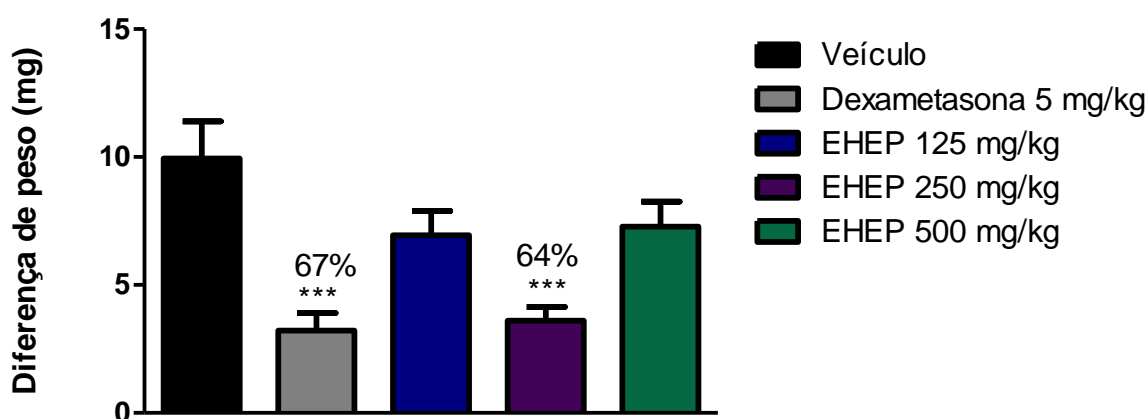


Figura 14. Avaliação do efeito anti-edematogênico do extrato hidroalcoólico de *Eugenia punicifolia* (EHEP) (125, 250 e 500 mg/kg) no modelo de edema de orelha induzido pelo xilol. Os dados são expressos pela média \pm erro padrão da média (n=10). ANOVA $F_{(4;37)} = 7,69$. Teste Dunnett *** $p < 0,001$. Os valores (%) correspondem à redução da média em relação ao grupo controle (veículo- salina).

6.8. Indução de edema de pata pela carragenina

No modelo de edema de pata induzido pela carragenina, o EHEP na dose de 250 mg/kg mostrou significativa inibição do edema apenas na primeira hora de avaliação do modelo experimental, inibindo em 50% ($0,20 \pm 0,04$ ml) o edema quando comparado ao grupo veículo (salina) ($0,40 \pm 0,04$ ml). O grupo controle positivo (piroxicam, 30 mg/kg, v.o.) mostrou inibição em todas as 4 horas avaliadas, inibindo respectivamente em 55% ($0,18 \pm 0,04$ ml), 69% ($0,26 \pm 0,09$ ml), 57% ($0,48 \pm 0,07$ ml) e 63% ($0,37 \pm 0,07$ ml) quando comparado ao grupo veículo (salina), como mostra a figura 15.

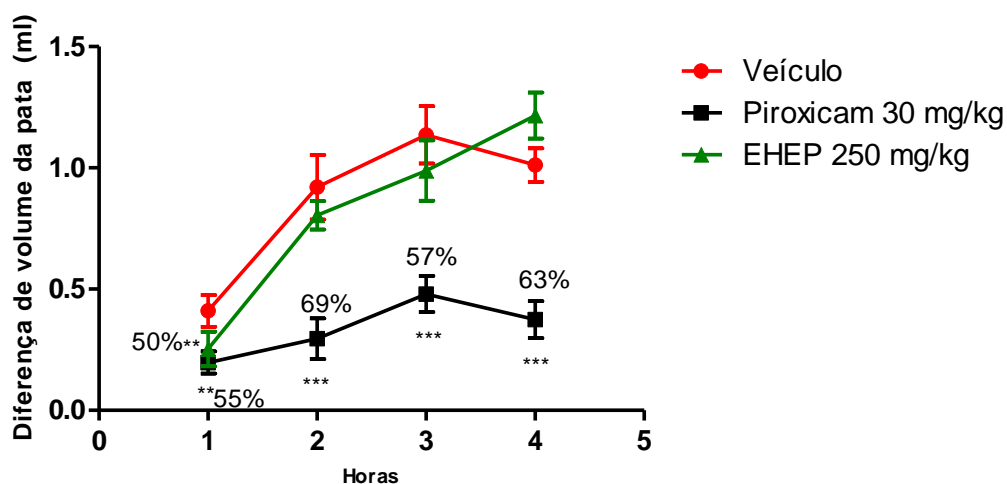


Figura 15. Avaliação do efeito anti-edematogênico do extrato hidroalcoólico de *Eugenia punicifolia* (EHEP) (250 mg/kg) no modelo de edema de pata induzido pela carragenina. Os dados são expressos pela média \pm erro padrão da média (n=7). ANOVA de 2 vias seguido de teste de Bonferroni. **p<0.01;***p<0.001 vs controle negativo (veículo-salina).

6.9. Ensaio da p38 α MAPK

No ensaio da p38 α MAPK o extrato hidroalcoólico de folhas de *Eugenia punicifolia* foi utilizado nas doses de 30, 10 e 3 mg/ml. No primeiro passo, foi realizada uma primeira diluição utilizando-se 3 μ l da solução estoque (extrato ou inibidores) em 297 μ l de solução quinase. Posteriormente, desta nova solução, foram retirados 30 μ l e diluídos novamente em 270 μ l de solução quinase. Essas diluições foram realizadas quatro vezes, diluídas na proporção 1:10. Deste modo, foi possível testar diferentes concentrações na inibição da atividade da p38 α , na escala de diluição de 1:1000 ao comparamos a solução inicial com a última solução testada. Para o controle positivo foi utilizado o inibidor SB 203580 (4-(4-Fluorofenil)-2-(4-metilsulfonilfenil) -5-(4-piridil)-1H-imidazol). O resultado do ensaio é mostrado na figura 16.

Amostras	Concentração	Inibição (%) ± S.E.M (%)
Controle positivo (SB 203580)	10 µM	96,15 ± 1,65
Controle positivo (SB 203580)	1 µM	88,86 ± 2,00
Controle positivo (SB 203580)	0,1 µM	63,84 ± 1,29
Controle positivo (SB 203580)	0,01 µM	12,0 ± 3,51
EHEP 30 mg/ml	3x10 ⁻⁴ mg/ml	103,37 ± 1,20
EHEP 30 mg/ml	3x10 ⁻⁵ mg/ml	91,37 ± 0,35
EHEP 30 mg/ml	3x10 ⁻⁶ mg/ml	17,72 ± 1,56
EHEP 30 mg/ml	3x10 ⁻⁷ mg/ml	7,45 ± 1,53
EHEP 10 mg/ml	1x10 ⁻⁴ mg/ml	97,88 ± 0,23
EHEP 10 mg/ml	1x10 ⁻⁵ mg/ml	51,37 ± 2,83
EHEP 10 mg/ml	1x10 ⁻⁶ mg/ml	18,50 ± 0,67
EHEP 10 mg/ml	1x10 ⁻⁷ mg/ml	7,84 ± 1,90
EHEP 3 mg/ml	3x10 ⁻⁶ mg/ml	90,50 ± 0,75
EHEP 3 mg/ml	3x10 ⁻⁷ mg/ml	33,80 ± 4,57
EHEP 3 mg/ml	3x10 ⁻⁸ mg/ml	20,39 ± 2,92
EHEP 3 mg/ml	3x10 ⁻⁹ mg/ml	23,13 ± 4,05

Figura 16. Avaliação da atividade do extrato hidroalcoólico de folhas de *Eugenia punicifolia* (EHEP 30, 10 e 3 mg/ml e suas respectivas diluições) no ensaio de p38α MAPK. Os dados são expressos pela média ± erro padrão da média.

A figura mostra que o extrato inibiu significativamente, em todas as doses testadas, a fosforilação da p38α MAPK. As amostras com maiores concentrações demonstraram maior atividade na inibição, em torno de 90%, assim como as concentrações do controle positivo. Esse resultado demonstra que o EHEP possui participação efetiva na via da p38α MAPK.

6.10. Ensaio do TNF- α

A potência dos inibidores p38 α MAPK em ensaios livres de células é importante para determinar a inibição da liberação de citocinas pró- inflamatórias, como por exemplo, o TNF- α , a partir de células do sistema imunológico. Sob condições fisiologicamente relevantes, como em todo o sangue, muitos inibidores desta via MAPK perdem a sua eficácia, e por isto este ensaio escolhido avaliar a atuação do EHEP sobre a liberação do TNF- α em sangue humano. Neste ensaio foram utilizadas as doses de 30 e 10 mg/ml do extrato hidroalcoólico de folhas de *Eugenia punicifolia*, e respectivas diluições na ordem de 1:1000. Para o controle positivo foi utilizado o inibidor SB 203580 (4-(4-Fluorofenil)-2-(4-metilsulfinilfenil) -5-(4-piridil)-1H-imidazol). O ensaio foi realizado com sangue de dois diferentes doadores, e é expresso nas figuras 17 e 18.

Amostras	Concentração	Inibição (%) \pm S.E.M. (%)
SB 203580 I	10 μ M	100 \pm 0
SB 203580 I	1 μ M	79,38 \pm 13,05
SB 203580 I	0,1 μ M	28,56 \pm 3,56
SB 203580 I	0,01 μ M	21,99 \pm 1,42
SB 203580 II	10 μ M	100 \pm 0
SB 203580 II	1 μ M	86,94 \pm 7,19
SB 203580 II	0,1 μ M	22,49 \pm 6,22
SB 203580 II	0,01 μ M	- 17,91 \pm 8,54
EHEP 30 mg/ml	3x10 ⁻⁴ mg/ml	21,93 \pm 8,55
EHEP 30 mg/ml	3x10 ⁻⁵ mg/ml	11,35 \pm 2,13
EHEP 30 mg/ml	3x10 ⁻⁶ mg/ml	-29,32 \pm 4,85
EHEP 30 mg/ml	3x10 ⁻⁷ mg/ml	-81,55 \pm 7,19
EHEP 10 mg/ml	1x10 ⁻⁴ mg/ml	50,93 \pm 2,13
EHEP 10 mg/ml	1x10 ⁻⁵ mg/ml	11,48 \pm 0,77
EHEP 10 mg/ml	1x10 ⁻⁶ mg/ml	-2,52 \pm 0,77
EHEP 10 mg/ml	1x10 ⁻⁷ mg/ml	-43,76 \pm 2,72

Figura 17. Avaliação da atividade inibitória do extrato hidroalcoólico de folhas de *Eugenia punicifolia* (EHEP 30 e 10 mg/ml e suas respectivas diluições) no ensaio do TNF- α . Doador 1. Os dados são expressos pela média \pm erro padrão da média.

Amostras	Concentração	Inibição (%) ± S.E.M. (%)
SB 203580 I	10 µM	80,98 ± 0,88
SB 203580 I	1 µM	52,12 ± 8,17
SB 203580 I	0,1 µM	29,73 ± 0,75
SB 203580 I	0,01 µM	-8,83 ± 0,25
SB 203580 II	10 µM	82,27 ± 1,32
SB 203580 II	1 µM	31,83 ± 7,76
SB 203580 II	0,1 µM	11,25 ± 8,71
SB 203580 II	0,01 µM	9,19 ± 11,61
EHEP 30 mg/ml	3x10 ⁻⁴ mg/ml	14,33 ± 2,84
EHEP 30 mg/ml	3x10 ⁻⁵ mg/ml	-11,65 ± 1,07
EHEP 30 mg/ml	3x10 ⁻⁶ mg/ml	-24,01 ± 7,82
EHEP 30 mg/ml	3x10 ⁻⁷ mg/ml	-12,41 ± 4,29
EHEP 10 mg/ml	1x10 ⁻⁴ mg/ml	36,02 ± 3,21
EHEP 10 mg/ml	1x10 ⁻⁵ mg/ml	21,69 ± 2,02
EHEP 10 mg/ml	1x10 ⁻⁶ mg/ml	14,33 ± 1,32
EHEP 10 mg/ml	1x10 ⁻⁷ mg/ml	-4,73 ± 2,90

Figura 18. Avaliação da atividade inibitória do extrato hidroalcoólico de folhas de *Eugenia punicifolia* (EHEP 30 e 10mg/ml e suas respectivas diluições) no ensaio do TNF- α . Doador 2. Os dados são expressos pela média \pm erro padrão da média.

As figuras 17 e 18 mostram que o EHEP atua nesta via, mas não exclusivamente, pois este teste não é específico, devido a várias enzimas existentes no sangue. A inibição não apresentou alta significância devido à baixa concentração do extrato, pois neste ensaio não é possível usar uma concentração maior, devido à sensibilidade do ensaio, podendo ocorrer precipitação da solução do extrato, e também a coloração da solução interferir na leitura do espectrofotômetro. Os valores expressos negativos correspondem a uma inibição maior que o valor basal, o que pode ser explicado por a resposta ter extrapolado a curva resposta do ensaio.

6.11. Avaliação da atividade antiulcerogênica no modelo de indução de úlcera gástrica por etanol

Neste modelo verificou-se que o extrato hidroalcoólico de *Eugenia punicifolia* (EHEP) nas doses de 125, 250 e 500 mg/kg inibiram as lesões gástricas dos animais frente às lesões

gástricas induzidas por um agente lesivo em 88,4; 97,6 e 99,8% respectivamente, como mostra a figura 19.

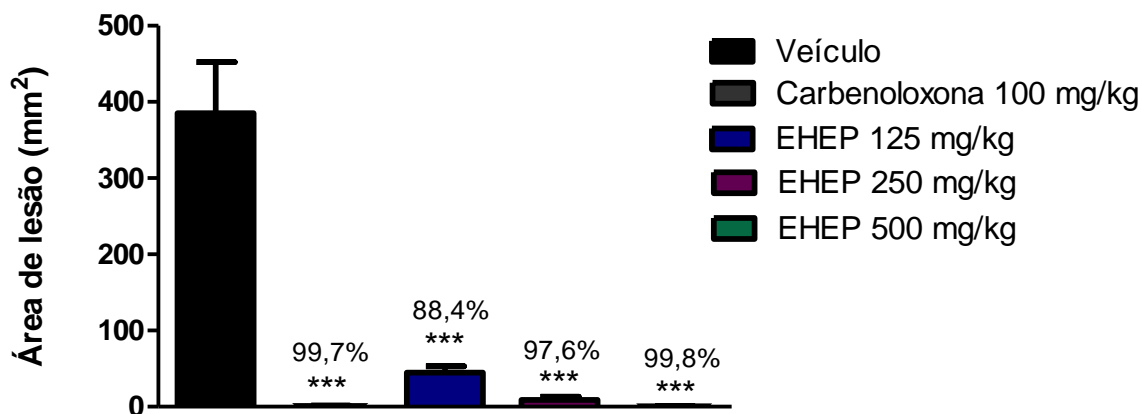


Figura 19. Atividade antiulcerogênica do extrato hidroalcoólico de *Eugenia punicifolia* (EHEP) (125, 250 e 500 mg/kg) no modelo de indução de úlcera gástrica por etanol. Os dados são expressos pela média \pm erro padrão da média (n=7). ANOVA $F_{(4;20)} = 30,19$. Teste de Dunnett *** $p < 0,001$. Os valores (%) correspondem à redução da média em relação ao grupo controle (veículo - salina).

6.12. Avaliação da atividade antiulcerogênica no modelo de úlcera gástrica induzida por indometacina

O resultado deste modelo demonstra que o EHEP nas doses de 125, 250 e 500 mg/kg inibiu significativamente a úlcera induzida por indometacina em 52,9; 72,3 e 53% como mostrado na figura 20.

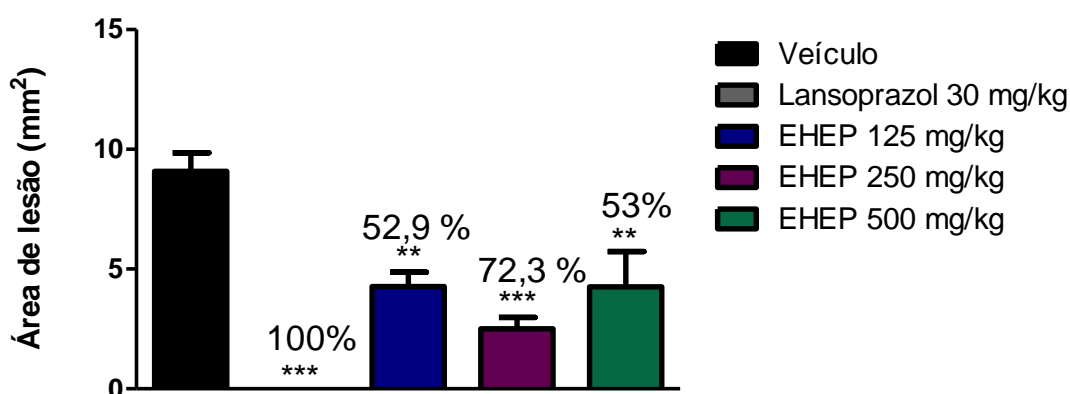


Figura 20. Atividade antiulcerogênica do extrato hidroalcoólico de *Eugenia punicifolia* (EHEP) (125, 250 e 500 mg/kg) no modelo de indução de úlcera gástrica por indometacina. Os dados são expressos pela média \pm erro padrão da média (n=7). ANOVA $F_{(4;20)} = 16,25$. Teste de Dunnett ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$. Os valores (%) correspondem à redução da média em relação ao grupo controle (veículo - salina).

6.13. Avaliação da motilidade intestinal

A administração oral do EHEP nas doses de 125 e 250 mg/kg não alteraram a motilidade intestinal quando comparado com o grupo controle tratado com o veículo. Somente os animais tratados com morfina reduziram de modo significativo o trânsito intestinal, como mostra a figura 21.

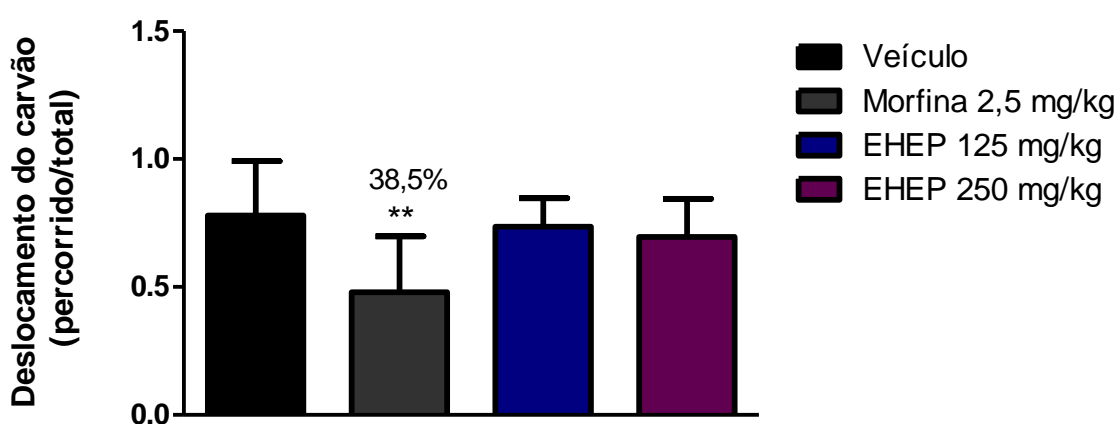


Figura 21. Efeito do extrato hidroalcoólico de *Eugenia punicifolia* (EHEP) (125 mg/kg e 250 mg/kg) sobre a motilidade intestinal de camundongos com a utilização de carvão ativado. Os dados são expressos pela média \pm erro padrão da média (n=10). ANOVA $F_{(3;34)} = 5,36$. Teste de Dunnett ** $p < 0,01$. Os valores (%) correspondem à redução da média em relação ao grupo controle (veículo - salina).

7. DISCUSSÃO

A dor está freqüentemente associada a muitas doenças. Apesar dos principais avanços no conhecimento dos mecanismos moleculares envolvidos na dor e investimento considerável na pesquisa farmacêutica e desenvolvimento nessa área, ainda existem poucas classes de drogas analgésicas, principalmente para o controle da dor crônica (Woodcock *et al.*, 2007) e as terapias atuais são usualmente insuficientes por possuírem efeitos colaterais severos e efetividade limitada (Bourinet *et al.*, 2005). Atualmente, a Organização Mundial da Saúde tem incentivado investimentos públicos em plantas medicinais, e assim a fitoterapia vem sendo mais aceita entre profissionais da saúde. No Brasil, cada vez mais a fitoterapia está se difundindo entre a população, estigmatizado pela “consciência ecológica”, que faz com que os consumidores tenham preferência por produtos de origem natural (Silveira *et al.*, 2008). Muitas substâncias de origem vegetal, pertencentes às mais diversas classes químicas, possuem comprovada atividade anti-inflamatória, como exemplo podemos citar o fitoterápico anti-inflamatório Acheflan, produto oriundo de pesquisa brasileira que resultou em um produto que inibe citocinas inflamatórias e é indicado para uso local no alívio de dores associadas à inflamação dos músculos e tendões (Coutinho, 2009; ANVISA 2011). Por essas razões, a busca por novas moléculas que sejam eficazes e com efeitos adversos menores é contínua e necessária.

Neste trabalho, o objetivo foi avaliar a atividade antinociceptiva e/ou anti-inflamatória do extrato hidroalcoólico de folhas de *Eugenia punicifolia* (EHEP). Com os modelos experimentais *in vivo* realizados foi possível verificar a toxicidade aguda, a performance motora, a atividade antinociceptiva e/ou anti-inflamatória, avaliar a atividade gastroprotetora e a ação na motilidade intestinal do EHEP e também elucidar os possíveis mecanismos de ação envolvidos nestas atividades farmacológicas.

No modelo de toxicidade aguda foram caracterizados os possíveis efeitos tóxicos da administração da dose de 5000 mg/kg do EHEP. É uma avaliação importante no início da pesquisa para fornecer subsídios sobre o modo de ação tóxico da substância testada e determinante para a continuidade da pesquisa de produtos naturais (Brito, 1994).

O tratamento dos animais com o extrato não evidenciou efeitos tóxicos pela ausência de sinais clínicos relevantes no *screening* hipocrático, bem como ausência de morte durante o período de observação. O *screening* hipocrático é um ensaio bastante útil e comumente usado na triagem preliminar de plantas para detectar atividades farmacológicas e toxicológicas (Lucio *et al.*, 2000). Também não foram registradas alterações do peso corporal durante os 14 dias de observação, assim como não houve alteração dos pesos dos órgãos vitais dos animais. O acompanhamento do peso corpóreo do animal é um importante indicador para a avaliação da toxicidade de uma substância (Jahn & Günzel, 1997). Outro parâmetro analisado neste experimento foi o peso relativo de alguns órgãos, obtidos pela razão entre o peso do órgão e o peso corpóreo total do animal e posteriormente transformado em arcosseno para adequação estatística. Após a realização do teste estatístico, o grupo tratado com o EHEP não apresentou nenhuma alteração quando comparado com o grupo controle (salina), válido tanto para os animais machos e fêmeas. Apesar da ausência de sinal de toxicidade, conforme mostrado nas figuras 2, 3, 4 e 5, recomenda-se realizar novos testes de toxicidade crônica com doses repetidas para descartar completamente o efeito tóxico do extrato.

Para elucidar se o EHEP causaria possíveis alterações no comportamento motor, devido à possibilidade de algumas drogas serem capazes de induzir alterações motoras ou efeitos inespecíficos foi realizada a avaliação da performance motora através do teste com o equipamento “*Rota Rod*”. Modificações no desempenho motor que o animal possa vir a sofrer, é proveniente de uma ação miorelaxante ou sedativa, podendo induzir a um grande

número de erros em estudos sobre drogas que atuam na nocicepção central e periférica (Millan, 2002).

O *Rota rod* é um dispositivo que mede a atividade forçada, através da avaliação do equilíbrio e da coordenação dos animais, parâmetros esses, indicativos de transtornos neurológicos, (Rosland *et al.*, 1990) no caso efeito neurotóxico de plantas. Este modelo experimental avalia a coordenação motora, que está associada com cerebelo e fatores cognitivos (Gasbarri *et al.*, 2003). O diazepam, um benzodiazepínico, utilizado neste experimento como controle positivo no teste de avaliação motora, apresenta diversos efeitos farmacológicos como a potencialização da atividade dos neurotransmissores inibitórios do SNC, como opióides endógenos, que atuam na abertura dos canais de cloro induzindo a hiperpolarização das membranas celulares que resulta na inibição da propagação do impulso nervoso (Skarda *et al.*, 1997).

Os resultados obtidos nesse modelo experimental mostraram que o EHEP administrado oralmente na dose de 250 mg/kg (figura 6) não foi capaz de alterar o desempenho motor dos animais, descartando um possível falso positivo no teste da formalina, por exemplo, pois drogas sedativas, sem ação analgésica, podem inibir o comportamento da dor dos animais neste teste. Portanto, após a caracterização da segurança do uso do extrato em animais iniciou-se os testes para caracterizar as ações farmacológicas.

O teste da formalina é uma ferramenta útil não só para avaliar o potencial de uma substância analgésica ou anti-inflamatória, mas também para elucidar o mecanismo de ação (Hunskar & Hole, 1985). É também um dos modelos mais utilizados em ensaios de dor e que mais se assemelha a dor clínica (Tjolsen *et al.*, 1992).

Este teste possui uma resposta distinta (bifásica) de resposta de dor: 1) Fase inicial ou neurogênica: a dor é resultado do efeito irritante direto sobre os nociceptores ativando as fibras aferentes primárias, acarretando na liberação de neuropeptídios como SP e CGRP em

terminais periféricos e centrais (Tjolsen *et al.*, 1992). Esta fase dura 5 minutos após a injeção de formalina. Nesta fase a resposta nociceptiva pode ser inibida pela administração de agonistas opióides como a morfina (Hunskaar *et al.*, 1985; Hunskaar & Hole, 1987).

Na intérfase, a nocicepção é inibida fisiologicamente pelas fibras descendentes (Hunskaar *et al.*, 1985). A entrada de estímulos nociceptivos no SNC ativa as vias descendentes inibitórias analgésicas e, pelo comportamento dos animais, pode ser observada uma interfase entre cinco a quinze minutos após a aplicação de formalina, período no qual praticamente não é observada resposta nociceptiva (Millan, 2002).

E finalmente, a segunda fase, chamada de inflamatória, é caracterizada pela sensibilização periférica através de mediadores inflamatórios modulados pela medula espinhal e inicia-se após 15 minutos da indução da dor pela formalina e permanece durante os 45 minutos subsequentes (Le Bars *et al.*, 2001; Sayyah *et al.*, 2004). Substância P e bradicinina estão relacionadas com a fase neurogênica, enquanto serotonina, histamina, bradicinina, óxido nítrico e prostaglandinas estão envolvidos na fase inflamatória (García *et al.*, 2004). Vários trabalhos têm demonstrado que a injeção de formalina libera diferentes mediadores, como PGE₂, NO, glutamato, cininas, entre outros peptídeos, sendo que recentemente foi relatado que a formalina também ativa canais TRPA1 (Mcnamara *et al.*, 2007). Respostas positivas, através da redução do tempo de lambida da pata, indicam participação de mediadores periféricos como histamina, serotonina, bradicinina e substância P. Uma redução da resposta à dor pode ocorrer também pela atuação através da liberação de glutamato e também da substância P na medula. Todos esses mediadores contribuem para o processo inflamatório, estimulam nociceptores e induzem a dor, portanto, drogas capazes de reduzir essa resposta inflamatória, demonstram atividade nessa segunda fase (Esfahani, 2011).

Os resultados deste trabalho apontaram um efeito antinociceptivo do extrato em ambas as fases do teste da formalina. As doses de 125, 250, 500 mg/kg do extrato hidroalcoólico de

folhas de *Eugenia punicifolia* (EHEP) diminuíram o efeito nociceptivo causado pela injeção intraplantar de formalina (figuras 7 e 8), porém a dose de 250 mg/kg mostrou maior proteção significativa predominantemente na 2ª fase do teste de formalina, reduzindo o tempo de lambida da pata do animal em 63% quando comparada com as doses de 125 e 500 mg/kg e, portanto foi escolhida para avaliar os mecanismos de ação do EHEP.

O óxido nítrico (NO) tem um importante papel no desenvolvimento e manutenção da dor (Jin *et al.*, 2010; LaBuda *et al.*, 2006). O NO é uma molécula gasosa altamente reativa que passa facilmente através das membranas celulares. A ativação do receptor NMDA no neurônio pós-sináptico induz a produção de NO que é difundido rapidamente no neurônio pré-sináptico para modular sua atividade (Levy & Zochodne, 2004). Essa molécula pode ser liberada após uma estimulação direta das fibras aferentes primárias, auxiliando a sensibilização de nociceptores e aumentando a excitabilidade das fibras nervosas (Aley *et al.*, 1998). O NO provoca hiperalgesia e está envolvido na sensibilização central, fortalecendo a ação de prostaglandinas em diversos modelos de dor (Zhuo, 2007). O óxido nítrico também está intimamente relacionado com a vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e a transmissão de estímulos dolorosos e possui papel importante no processamento da informação nociceptiva (Meller & Gebhart, 1993, Caruso *et al.*, 2005). NO parece ser um intermediário na neurotransmissão medular (Tassorelli *et al.*, 2006), pois estudo mostrou que após a injeção de formalina existe um aumento da liberação de nitrito com uma pausa transiente entre as duas fases (Okuda *et al.*, 2001). Há também varias evidências que sugerem que a inibição da NO sintase atenua a dor inflamatória (Boettger *et al.*, 2007; De Alba *et al.*, 2006) e evidências experimentais indicam que o oxido nítrico, juntamente com outros mediadores inflamatórios, participam da segunda fase do teste da formalina (Da Matta *et al.*, 2011; Garcia *et al.*, 2004; Tjolsen *et al.*, 1992).

Em vista do papel do óxido nítrico no processo nociceptivo, o envolvimento do NO na ação antinociceptiva do extrato foi investigado através do pré-tratamento de L-arginina, que causa a reversão do efeito antinociceptivo no teste de formalina (Kitto *et al.*, 1992). Os resultados mostraram que houve reversão significativa do efeito antinociceptivo de *E. puniceifolia* pela L-arginina (figuras 9 e 10). Sendo assim, o efeito antinociceptivo do EHEP pode estar relacionado com a inibição da liberação ou síntese de óxido nítrico *in vivo*. A inibição da liberação/síntese é um dado importante para a ação antinociceptiva do EHEP, pois possivelmente contribui para o efeito antinociceptivo da planta frente aos modelos de nocicepção induzida pela formalina e glutamato.

Para investigarmos outros possíveis mecanismos de ação do EHEP na atividade antinociceptiva, foi avaliada a participação do sistema opioidérgico. Para a avaliação, os animais foram pré-tratados com veículo (salina) ou naloxona (antagonista não específico de receptor opióide) e morfina, analgésico opióide cujo efeito pode ser revertido com o pré-tratamento com naloxona. Portanto, a naloxona é utilizada para bloquear os receptores opióides e verificar se a substância teste perde seu efeito antinociceptivo observado anteriormente (Santos *et al.*, 1999; Santos *et al.*, 2005). O sistema opióide é um mecanismo endógeno do organismo para conter a dor e a inflamação. Na periferia, tais efeitos são produzidos pela interação entre peptídeos opióides derivados dos leucócitos e os receptores opióides existentes na terminação dos neurônios aferentes primários, graças as citocinas anti-inflamatórias e/ou endocanabinóides (Stein *et al.*, 2003). Este cenário é importante para o estudo dos mecanismos da dor inflamatória (Stein *et al.*, 2009).

Os receptores opióides são coexpressos com neuropeptídeos sensoriais tais como substância P e CGRP (calcitonin-related peptide) (Mousa *et al.*, 2007), e são transportados do gânglio da raiz dorsal para os terminais periféricos nervosos (Mousa *et al.*, 2001). Esse transporte é estimulado por citocinas e por fator de crescimento de nervos

produzidos no tecido inflamado (Mousa *et al.*, 2007), o que resulta num aumento da densidade de receptores opióides nos terminais nervosos dos tecidos inflamados. Agonistas opióides podem atenuar a inflamação induzida pelo aumento da excitabilidade dos neurônios aferentes e a liberação de neuropeptídeos pró-inflamatórios (substância P e CGRP) em tecidos lesados. Todos esses eventos conduzem aos efeitos anti-nociceptivo e anti-inflamatório (Stein *et al.*, 2009).

Com a realização do modelo experimental para avaliação da participação do sistema opioidérgico foi possível observar que os animais tratados com o EHEP e pré-tratados com naloxona não tiveram seu efeito antinociceptivo revertido, confirmando que o sistema opióide não parece participar da antinocicepção provocada pelo extrato hidroalcoólico de folhas de *Eugenia punicifolia*, de acordo com as figuras 11 e 12.

Para fornecer mais evidências sobre a participação do sistema glutamatérgico na antinocicepção causada pelo EHEP, foi investigado o efeito do EHEP na nocicepção causada pela injeção intraplantar de glutamato como agente álgico, como um possível mecanismo de ação. O glutamato é um aminoácido excitatório, encontrado em concentrações de μM na medula espinhal, e é originado de fibras aferentes primárias mielinizadas e não mielinizadas, em adição aos interneurônios intrínsecos (Battaglia & Rustioni, 1988). Sabe-se que o glutamato é o principal neurotransmissor excitatório envolvido na transmissão de sinais nociceptivos. Além disso, tem sido demonstrado que a injeção intraplantar de glutamato libera aminoácidos excitatórios, como PGE_2 , NO, cininas, prótons, glutamato e substância P no corno dorsal (Millan, 1999; Beirith *et al.*, 2002; Sakurada *et al.*, 1996). O glutamato está envolvido na transmissão da informação nociceptiva da periferia até regiões supraespinhais (Beirith *et al.*, 2002). Existem 2 famílias de receptores glutamatérgicos, os ionotrópicos e os metabotrópicos. Os receptores ionotrópicos os quais pertencem os canais iônicos são permeáveis aos cátions e são subdivididos em três grupos: N-metil-D-aspartato (NMDA),

cainato e ácido DL- α -amino-3-hidróxi-5-metil-4-isoxazole-propiónico (AMPA) (Ozawa *et al.*, 1998). Os receptores metabotrópicos são acoplados a proteína G e agem através da liberação de segundos mensageiros até mesmo por alteração da atividade de canais iônicos e pela interação das subunidades intracelulares da proteína G (Meldrum, 2000). Uma ação excitatória direta do glutamato nas fibras aferentes primárias se dá pela ativação dos receptores NMDA que causa a liberação de SP e de 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. O NO pode também interferir nas ações periféricas mediadas pelas mesmas fibras. A produção de NO é grandemente dependente da ativação de receptor NMDA e a produção ou liberação de NO é importante para a antinocicepção de vários compostos (Sakurada *et al.*, 1996; Beirith *et al.*, 2002; Ji & Strchartz, 2004; Caruso *et al.*, 2005).

Os resultados encontrados demonstram que os animais tratados com EHEP tiveram uma inibição de 35% da nocicepção causada pela injeção intraplantar de glutamato (figura 13), quando comparado ao grupo tratado com veículo (salina), sugerindo a participação do sistema glutamatérgico na propriedade antinociceptiva do extrato. Em adição, a supressão da nocicepção causada pelo EHEP diante da injeção intraplantar de glutamato pode estar associada com a interação do sistema glutamatérgico ou inibição da produção do óxido nítrico (Ferreira *et al.*, 1999).

Para caracterizar a atividade do EHEP sobre o processo anti-edematogênico, foi avaliado o modelo de edema de orelha induzido por xilol, um agente flogístico que causa irritação na orelha de camundongos, pela promoção de acúmulo de fluídos, característico da resposta inflamatória aguda (Okoli *et al.*, 2007). Os animais tratados com EHEP apresentaram significativa redução do edema de orelha apenas na dose de 250 mg/kg (redução de 64%) (figura 14). O mecanismo bioquímico da inflamação provocado pelo xilol desencadeia mecanismos celulares envolvidos na regulação da liberação de substâncias pró-inflamatórias

originárias de neurônios sensoriais. Esta inflamação é iniciada pela ação de mediadores como acetilcolina, histamina, serotonina, bradicinina, prostaglandinas, que provoca a liberação direta dos neuropeptídeos, pela excitação dos neurônios, com ativação dos seus receptores. O xilol induz a liberação de substâncias bioativas dos terminais periféricos de neurônios sensoriais que agem sobre células alvos periféricas, como os mastócitos, produzindo inflamação neurogênica caracterizada por calor, rubor, edema e hipersensibilidade (Richardson & Vasko, 2002; Li *et al.*, 2011).

O modelo de edema de pata induzido pela carragenina é altamente sensível às drogas anti-inflamatórias não-esteroidais e tem sido uma ferramenta aceitável para avaliação de novas drogas, como os produtos naturais. Para a indução do edema de pata é utilizada a carragenina, sendo este um agente lesivo que estimula o desencadeamento dos fenômenos de transformações nos tecidos. Trata-se de um extrato solúvel em água derivada da carragena, musgo irlandês, uma alga marinha encontrada nas costas do Atlântico da Europa e na América do Norte, muito utilizada para induzir a reação inflamatória aguda em animais experimentais (Garcia *et al.*, 1993). A carragenina induz a migração de células inflamatórias para o local da injeção que, juntamente com células residentes, produzem mediadores importantes para o desenvolvimento da inflamação (Cuzzocrea *et al.*, 2002). Dessa forma, as drogas que inibem a migração celular, a alteração fenotípica dessas células ou a liberação de mediadores inflamatórios podem inibir o edema e a alodínia mecânica induzidos pela carragenina.

A injeção da carragenina na pata de animais experimentais induz a produção local de citocinas inflamatórias, incluindo TNF- α , IL-1 e IL-6 (Cunha *et al.*, 2000, Wang *et al.*, 2004), entre outras. De forma complementar, a inibição da atividade dessas citocinas, por meio do uso de anticorpos ou de antagonistas dos seus receptores inibe a sensibilização induzida pela carragenina (Cunha *et al.*, 2000). Há evidências de que as citocinas inflamatórias, além de

induzirem a mudança fenotípica dos nociceptores, contribuem para o desenvolvimento de alterações vasculares que conduzem ao edema (Hrubey *et al.*, 1991).

Vários estudos demonstraram que citocinas inflamatórias, produzidas por células residentes ou células que migraram para o sítio inflamatório, contribuem para o desenvolvimento da sensibilização dos nociceptores e desenvolvimento de alodínia térmica ou mecânica após a injeção da carragenina e também para a resposta nociceptiva induzida pelo formaldeído (Hrubey *et al.*, 1991).

Esse modelo é bifásico: a fase inicial (1-2 horas) é mediada por histamina, serotonina e aumento da síntese de prostaglandina, enquanto que na fase tardia (3-4 horas) é sustentada pela liberação de prostaglandinas, ciclooxigenases, e esta fase é inibida pelas drogas anti-inflamatórias tais como piroxicam (Perianayagam *et al.*, 2006; Just *et al.*, 1998). A sequência de eventos do edema de pata é bem delineada. A ação dos mediadores iniciais no edema, histamina e serotonina, é sucedida pelo aumento da permeabilidade vascular, e esta é mantida pela liberação das cininas plasmáticas; em uma terceira fase ocorre a liberação de prostaglandinas que estão associadas com a presença de leucócitos no sítio da inflamação (Moncada *et al.*, 1973, Williams & Morley, 1973).

No presente estudo, o EHEP administrado oralmente na dose de 250 mg/kg mostrou significativo efeito inibitório sobre o edema de pata em ratos induzido por carragenina (figura 15), somente na primeira hora após a indução do edema, reduzindo em 50% o edema em relação ao grupo controle negativo tratado com veículo (salina). Neste aspecto, está classicamente demonstrado por Winter *et al.*, (1962) que, durante o desenvolvimento da resposta edematogênica neste teste, na primeira hora da formação do edema estão envolvidos os mediadores derivados de aminas biológicas histamina e serotonina, na segunda hora há a liberação de bradicinina e calidina e, na fase final do edema, após 3 horas de indução, ocorre a participação de eicosanóides como as prostaglandinas (Osadeb & Okoye, 2003). O resultado

obtido nos sugere que a inibição do edema pelo EHEP pode estar relacionada com a inibição dos mediadores inflamatórios na primeira fase, agindo na liberação de histamina e serotonina decorrentes da primeira hora de avaliação.

Proteínas quinases são uma das classes mais importantes para descoberta de novas drogas. Esta proteína possui um importante papel fisiológico e patológico por modular funções celulares, como tumorigênicas e inflamatórias, e é o principal alvo de descobertas de novas drogas do século XXI. Inibidores de proteínas quinases terapêuticos estão em desenvolvimento clínico para doenças como artrite reumática, diabetes e doenças cardiovasculares. (Zuccotto *et al.*, 2010). É esperado que o screening para inibidores de proteínas quinases se torne cada vez mais importante no futuro, e um pré-requisito essencial para o desenvolvimento de novas drogas e validação de novos compostos terapêuticos por ser um teste válido, rápido e de fácil manuseio (Laufer *et al.*, 2008).

Para avaliar o possível efeito do EHEP sobre a inibição de proteínas quinases, foi realizado o ensaio da p38 α MAPK, pois esta proteína está relacionada com a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como o TNF- α e a IL-1, regulando a inibição ou liberação destas. O resultado obtido demonstra uma inibição de cerca de 90% na via da p38 α MAPK, quando testada a concentração de 30 mg/ml do EHEP, inibindo significativamente esta via. Além de testar a potência de possíveis inibidores de p38 α MAPK em ensaios livres de células, é importante determinar a inibição da liberação de citocinas pró-inflamatórias, como por exemplo, TNF- α . Sobre condições fisiológicas relevantes, como no sangue humano, potentes inibidores perdem sua eficácia. O ensaio da inibição da liberação do TNF- α foi realizado com sangue humano de dois diferentes voluntários. Este teste é importante como uma ferramenta de avaliação para descoberta de possíveis drogas inibidores da liberação do TNF- α por ser um ensaio com rápida performance e avaliação direta sobre condições fisiológicas. Este ensaio constitui em duas fases, onde primeiramente as amostras de sangue humano fresco foram preparadas para

induzir a liberação da citocinas, como o TNF- α , principalmente pela via das MAPKs. (Brook *et al.*, 2000; Kunz *et al.*, 2009). Na segunda fase do ensaio, foi realizado um teste de ELISA para testar o índice do TNF- α , e a possível inibição das amostras testadas. O resultado obtido demonstra que o EHEP não inibe significativamente a via do TNF- α , tendo uma inibição de cerca de 30%. Esta perda de inibição do EHEP nesta via pode ser explicado, pois o teste em sangue humano difere dos ensaios realizados *in vitro*, onde há fatores adicionais, como a solubilidade, os sítios de ligações das proteínas plasmáticas, a permeabilidade celular e a concentração de ATP que possuem um importante papel. A albumina presente no plasma é uma das proteínas majoritárias de transporte no sangue e possuem a habilidade de se ligar a pequenas moléculas como drogas e aminoácidos, alcançando o tecido alvo. Flavonóides presentes em extratos de plantas também se ligam a albumina para modular a sua biodisponibilidade (Xiao *et al.*, 2010). Os fatores citados previamente podem ter interferido na potência do EHEP, e provavelmente são os responsáveis pela fraca inibição.

Em vista da indicação popular do uso do extrato de *Eugenia punicifolia* para distúrbios estomacais e diarreia, e também para avaliar o efeito colateral de vários AINEs na indução de úlceras gástricas, foi avaliada a atividade antiulcerogênica através do modelo de indução de úlcera gástrica por etanol e determinada a ação do EHEP na motilidade intestinal. A úlcera gástrica surge de um desequilíbrio entre fatores protetores da mucosa como, a barreira de muco e bicarbonato, óxido nítrico (NO), fluxo sanguíneo, prostaglandinas, entre outros, e fatores agressores, por exemplo, secreção de ácido, pepsina e radicais livres. 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 consumo de álcool, o tabagismo, dieta inadequada, os AINEs e a presença, no local, da bactéria *Helicobacter pylori* (Beserra, 2011). Para combater esse ataque, a mucosa possui mecanismos de defesa interativa que protegem o tecido de danos e eventuais ulcerações (Whittle, 2003).

O álcool possui um papel muito importante nas doenças do trato gastrointestinal. A lesão da mucosa gástrica ocorre devido a uma diminuição de função da barreira de muco, a principal proteção contra o ácido gástrico. Altas concentrações de etanol levam a um aumento da permeabilidade epitelial, como consequência de mudanças da diferença de potencial celular que é causado pela re-difusão de íons H⁺ através da mucosa lesada, e danos da mucosa principalmente devido aos distúrbios vasculares e diminuição do fluxo sanguíneo local (Siegmund *et al.*, 2003).

A administração tópica do etanol absoluto, utilizada no modelo de indução de úlcera gástrica, causa edema no tecido, hemorragia subepitelial, esfoliação celular e infiltração de células inflamatórias que podem contribuir para indução dos danos na mucosa e geração de espécies reativas de oxigênio (Kountouras *et al.*, 2001). O etanol afeta a barreira de muco encontrada na parede gástrica, com isso, torna 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). O etanol também induz estresse oxidativo, danos ao DNA e redução dos grupamentos sulfídricos não proteicos (GSH) das células que são fatores importantes na proteção da mucosa gástrica (Repetto & Llesuy, 2002).

Os resultados obtidos neste trabalho demonstram uma intensa ação protetora da mucosa gástrica do EHEP nas 3 doses utilizadas (125, 250 e 500 mg/kg), com uma inibição de 88,4; 97,6 e 99,8%, respectivamente, das lesões gástricas induzidas por um agente lesivo, no caso o etanol absoluto, quando comparado com o veículo (grupo controle negativo). Em adição, a espécie além de possuir ações antinociceptiva e anti-inflamatória, ao contrário dos AINEs, não possui o efeito colateral das alterações decorrentes no trato gastrointestinal, atuando também como gastroprotetor.

Considerando que os efeitos antinociceptivos do extrato hidroalcoólico de folhas de *Eugenia punicifolia* possam ser decorrentes de sua ação sobre as ciclooxigenases, o presente trabalho teve também como objetivo avaliar o possível efeito ulcerogênico deste extrato, utilizando o modelo experimental de indução de úlcera gástrica por AINEs, descrito por Guidono *et al.*, 1997.

Para caracterizar de modo mais preciso o mecanismo de ação do EHEP foi realizada uma curva dose resposta (125, 250 e 500 mg/kg) no modelo de úlcera gástrica induzida por um AINE, no caso, a indometacina. Os AINEs são reconhecidamente indutores de úlcera, e diversos mecanismos estão envolvidos nesse processo. Sua ação pode ser local, principalmente aqueles que possuem um caráter ácido, que danificam as células epiteliais, bem como uma ação sistêmica. Esses fármacos são capazes de reduzir a secreção de muco e bicarbonato, e assim alterar o pH da mucosa gástrica. Estas alterações tornam a barreira mucosa mais susceptível a danos, bem como destroem a camada de fosfolipídios que a recobre, facilitando a ação do suco gástrico na mucosa. Contudo, o efeito sistêmico mais importante, é a capacidade dos AINEs de inibir a síntese de prostaglandinas, que são responsáveis pela modulação de vários componentes envolvidos na defesa da mucosa. Estudos correlacionaram de forma direta a capacidade de diversos AINEs em suprimir a síntese dessas substâncias bem como de sua habilidade em causar danos gástricos. Outro efeito dessa classe medicamentosa é a diminuição do fluxo sanguíneo, que é consequência da supressão da atividade da COX-1. Esta redução do fluxo sanguíneo na mucosa por si só não causa danos. Entretanto, somado a outros fatores que tornam a mucosa sensível, pode inclusive, prejudicar a reestruturação da mucosa após uma injúria (Wallace, 2008).

Além de todas essas ações já citadas, os anti-inflamatórios não-esteroidais causam a aderência de neutrófilos ao endotélio vascular, esse processo é mediado, principalmente via leucotrieno B₄. Essas células induzem dano celular por liberar uma série de enzimas

proteolíticas e de espécies reativas de oxigênio. Estas respostas da ação dos AINEs também caracteriza o envolvimento de estresse oxidativo, no surgimento das lesões gástricas. O efeito inibitório dos anti-inflamatórios não-esteroidais sobre a agregação plaquetária também é importante para o aparecimento de lesões gástricas, e é resultante da inibição da COX-1. Ocorre como consequência deste evento uma diminuição na liberação de tromboxano A₂, que produz como efeito final a ocorrência de hemorragias (Wallace, 2008). E, por fim, outro componente desse processo de lesão gástrica mediado pelos AINEs é o aumento da secreção ácida. Foi demonstrado em estudos que o tratamento concomitante de um AINE com um inibidor de bomba protônica (agente anti secretor) reduz para cerca de 5% a incidência de ulceração, comparado com pacientes que receberam placebo associado a um AINE ou a um inibidor seletivo de COX-2, onde esse índice foi de 20%. Portanto, o processo de agressão à mucosa gástrica que leva a úlcera causada pelos AINEs é multifatorial, e várias vias complexas e interligadas estão envolvidas. Contudo a via da COX se destaca em todo o processo, sendo muitas vezes o fator chave desencadeante de outras ações (Scheiman *et al.*, 2006).

A indometacina é uma droga anti-inflamatória não-esteroidal, um derivado indólico, amplamente utilizada na clínica para diversos tipos de doenças inflamatórias, como osteoartrite e gota. Experimentalmente se tornou um fármaco de primeira escolha para indução de lesão gástrica, devido ao seu maior potencial ulcerogênico, mediante outros fármacos da classe, e esse efeito se deve a sua capacidade de inibição tanto da enzima COX-1 como da COX-2. Classicamente se atribui os distúrbios gastrointestinais adversos desse medicamento, a sua capacidade de inibição da COX-1. Porém, diversos estudos demonstram que, na realidade, ambas isoformas estão envolvidas no processo de citoproteção. A enzima COX é responsável por catalisar a primeira etapa da reação de síntese do ácido araquidônico em seus metabólitos: prostaglandina, tromboxano A₂, leucotrienos e prostaciclina, em

condições fisiológicas a síntese de prostaglandina é mediada pela COX constitutiva (COX-1). Porém em processos inflamatórios, a outra isoforma (COX-2) é rapidamente induzida, e se torna responsável por esse processo, assim a inibição conjunta dessas enzimas leva a formação de lesão na mucosa gástrica (Suleyman *et al.*, 2010). Os resultados obtidos demonstram que o EHEP nas três doses testadas inibiram significativamente as lesões ulcerosas causadas pela indometacina, demonstrando que a via de ação do extrato não é exclusivamente dependente da via das Ciclooxygenases.

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 opioidérgico, bem como o colinérgico, adrenérgico e serotoninérgico. Várias drogas afetam o trânsito gastrointestinal pela ação de agonistas ou antagonistas no receptor celular específico (Kanum, 2000). A morfina exerce sua ação atuando no SNC e sistema nervoso entérico, sendo esse último um conjunto de neurônios do trato gastrointestinal que controla as células musculares lisas responsáveis pela motilidade gastrintestinal (Goyal & Hirano, 1996). Esse opióide atua nos três principais tipos de receptores μ , κ e δ . O receptor μ possui dois subtipos μ_1 e μ_2 . O μ_1 predomina no sistema nervoso central e é responsável pela analgesia, enquanto o μ_2 está presente na medula espinhal e também no tubo digestivo sendo responsável pela depressão respiratória e disfunção intestinal. Através da ativação do receptor μ_2 os opióides induzem os seus efeitos no sistema gastrointestinal como a inibição da atividade nervosa entérica e inibição da atividade motora propulsiva (Person & Wexner, 2006; Becker & Blum, 2009).

Na determinação da motilidade intestinal sob ação do extrato não foi observada alteração da motilidade intestinal após a administração do EHEP nas doses de 125 e 250 mg/kg, não atuando como um antidiarréico, pois não causa alterações no trânsito intestinal. Portanto, a inibição das lesões gástricas corrobora com a utilização da espécie na medicina popular para o

tratamento de doenças estomacais, e evidenciam que os efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório não são capazes de promover distúrbios do trato gastrointestinal como gastrite ou úlceras. Adicionalmente, este resultado valida a não participação da via opioidérgica como mecanismo antinociceptivo, como demonstrado nos resultados obtidos pelo teste da formalina.

Os compostos fitoquímicos responsáveis pela ação antinociceptiva e anti-inflamatória de *Eugenia punicifolia* ainda são desconhecidos, pois a caracterização fitoquímica da espécie será realizada *a posteriori*, mas estudos com espécies congêneres demonstram a presença de flavonóides e taninos (Oliveira *et al.*, 2006), que tem demonstrado atividade antinociceptiva e anti-inflamatória em experimentação *in vivo* e *in vitro* (Birt, 2006; de Queiroz *et al.*, 2010; Filho *et al.*, 2008; Middleton *et al.*, 2000; Souza *et al.*, 2007). Verificou-se também que os flavonóides são capazes de diminuir a produção de NO e a expressão da enzima iNOS (Cazarolli *et al.*, 2008; Santangelo *et al.*, 2007) e agem como potencial inibidores da ciclooxigenase, lipoxigenase e óxido nítrico sintetase (Rao *et al.*, 2005; Middleton *et al.*, 2000).

A ausência de efeitos ulcerogênicos do extrato de EHEP sugere, uma vez mais, que estas ações possam ser decorrentes de flavonóides presentes neste extrato. A proposta de que os efeitos biológicos evidenciados no presente trabalho possam ser decorrentes das ações de flavonóides encontra apoio em diversos estudos que demonstraram que os efeitos anti-inflamatórios destes compostos não estão relacionados a alterações gastrointestinais podendo alguns deles, ao contrário, atuarem como protetores da parede gástrica (Borreli & Izzo, 2000; Janbaz *et al.*, 2002; Coelho *et al.*, 2003). Certamente um extrato que associe os efeitos antinociceptivo, anti-inflamatório e gastroprotetor pode ser considerado um extrato relevante no tratamento de doenças crônicas.

8. CONCLUSÃO

Neste trabalho foram avaliadas a toxicidade aguda, a atividade da performance motora, a atividade antinociceptiva, os possíveis mecanismos de ação do EHEP, a atividade anti-edematogênica, a inibição sobre a p38 α MAPK e TNF- α , além da atividade antiulcerogênica e determinação da motilidade intestinal.

Os resultados demonstram uma ausência de toxicidade com a administração de uma dose de 5000 mg/kg *v.o.* e ausência de alteração na avaliação da performance motora quando administrado o EHEP na dose de 250 mg/kg e avaliado pelo “Rota rod”. O extrato foi eficaz na reversão do efeito nociceptivo nas duas fases do teste da formalina, na dor neurogênica e inflamatória. Foi possível verificar que a dose de 250 mg/kg apresenta maior inibição da nocicepção quando comparada com as doses de 125 e 500 mg/kg. Foi verificado também que sua ação antinociceptiva está relacionada com a via do óxido nítrico e do glutamato. No ensaio de p38 α MAPK, o extrato inibiu significativamente a fosforilação da proteína, indicando uma atuação sobre esta via. No ensaio de TNF- α , o EHEP apresentou uma pequena inibição, não sendo tendo atuação exclusiva nesta via. No modelo de úlcera gástrica induzida por etanol foi verificada uma intensa proteção da mucosa gástrica, com redução das lesões gástricas, nas 3 doses administradas do EHEP, assim como foi observado redução nas lesões de úlceras gástrica no modelo de úlcera gástrica induzida por indometacina. Na determinação da motilidade intestinal, o EHEP não demonstrou alteração do trânsito intestinal.

Coletivamente, os resultados obtidos no presente estudo demonstram que o extrato hidroalcoólico de folhas de *Eugenia punicifolia* apresentou um importante efeito antinociceptivo, anti-inflamatório e antiulcerogênico.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKIKO, T.; ARAKI, H.; KOMOIKE, Y.; HASE, S.; TAKEUCHI, K. Inhibition of both COX-1 and COX-2 is required for development of gastric damage in response to nonsteroidal antiinflammatory drugs. **J. of Phys.** V. 95, p. 21–7, 2001.
- ALEY, K.O.; MCCARTER, G.; LEVINE, J.D. Nitric oxid signaling in pain and nociceptor sensitization in the rat. **J. of Neuroscience**, V. 18, p. 7008-14, 1998.
- ALMEIDA, T.F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Res.**, V. 1000, p. 40-56, 2004.
- AMANN, R. & PESKAR, B.A. Anti-inflammatory effects of aspirin and sodium salicylate. **Eur. J. Pharmacol.** V. 447, p. 1-9, 2002.
- AMORIM, A.C.L.; LIMA, C.K.F.; HOVELL, A.M.C.; MIRANDA, A.L.P.; REZENDE, C.M. Antinociceptove and hypotermic evaluation of the leaf essential oil and isolated terpenoids from *Eugenia uniflora* L. (Brazilian Pitanga). **Phytomedicine**, V. 16, p. 923-28, 2009.
- ANVISA, bula do aceflan aprovada em agosto de 2011. Disponível em <http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/BM/BM%5B34341-1-0%5D.PDF> e http://www.ache.com.br/Downloads/LeafletText/4/BU_ACHEFLAN_CREME_AGO2011.pdf.
- ANVISA. <http://portal.anvisa.gov.br>. 2010.
- BASBAUM, A.I.; BAUTISTA, D.M.; SCHERRER, G.; JULIUS, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, V. 139, n. 2, p. 267-84, 2009.
- 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. 302-12, 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.
- 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.

- BIRT, D.F. Phytochemicals and cancer prevention: from epidemiology to mechanism of action. **J. of the American Dietetic Association**, V. 106, p. 20-21, 2006.
- BOETTGER, M.K.; UCEYLER, N.; ZELENKA, M.; SCHMITT, A.; REIF, A.; CHEN, Y.; SOMMER, C. Differences in inflammatory pain in nNOS-, iNOS- and eNOS-deficient mice. **Eur. J. of Pain**, V. 11, p. 810-18, 2007.
- BONICA, J.J.; YAKSH, T.; LIEBESKIND, J.C. Biochemistry and modulation of nociception and pain. in: Bonica, JJ - **The Management of Pain**, 2nd Ed, V. 1, Malvern, Lea & Febiger; p. 95-121, 1990.
- BOPP, A.; DE BONA, K.S.; BELLE, L.P.; MORESCO, R.N.; MORETTO, M.B. *Syzygium cumini* inhibits adenosine deaminase activity and reduces glucose levels in hyperglycemic patients. **Fundam Clin Pharm.**, V. 23, p. 501-7, 2009.
- BORRELLI, F. & IZZO, A.A. The plant kingdom as a source of anti-ulcer remedies. **Phytotherapy Res.**, V. 14, p. 581-91, 2000.
- BOURINET, E.; ALLOUI, A.; MONTEIL, A.; BARRERE, C.; COUETTE, B. Silencing of the Cav3.2 T-type calcium channel gene in sensory neurons demonstrates its major role in nociception. **Embo J.** V.24, p.315-24, 2005.
- BRITO, A.R.M.S. & ANTONIO, M.A. Oral anti-inflammatory and ulcerogenic activities of a hydroalcoholic extract and partitioned fractions of *Turnera ulmifolia* (Turneraceae). **J. of Ethnopharm.** V. 61, 215-28, 1998.
- BRITO, A.R.M.S. **Manual De Ensaio Toxicológicos In Vivo**. Ed. Unicamp, Campinas (Brazil), p.122, 1994.
- BRITO, F.A.; LIMA, L.A.; RAMOS, M.F.; NAKAMURA, M.J.; CAVALHER-MACHADO, S.C.; SIANI, A.C.; HENRIQUES, M.G.M.O.; SAMPAIO, A.L.F. Pharmacological study of anti-allergic activity of *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, V. 40, p.105-15, 2007.
- BRUNETTI, I.L.; VENDRAMINI, R.C.; JANUÁRIO, A.H.; FRANÇA, S.C.; PEPATO, M.T. Effects of toxicity of *Eugenia punicifolia* extracts in streptozotocin-diabetic rats. **Pharm Biol.** V. 44, p.35-43, 2006.

- BROOK, M.; SULLY, G.; CLARK, A. R.; SAKLATVALA, J. Regulation of tumor necrosis factor α mRNA stability by the mitogen-activated protein kinase p38 signalling cascade. **FEBS Lett.** V. 483, p. 57-61, 2000.
- BRZOZOWSKI, T.; KONTUREK, P.C.; DROZDOWICZ, D.; PADJO, R. Role of prostaglandins in gastroprotection and gastric adaptation. **J. Physiol. Pharmacol.**, V. 56, p. 33-55, 2005.
- CALIXTO, J.B. Efficacy, safety quality control, marketing and regulatory guide lines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Bras. J. Med. Biol. Res.**, V. 33, p. 179-89, 2000.
- CALIXTO, J.B.; CABRINI, D.A.; FERREIRA, J.; CAMPOS, M.M. Inflammatory pain: kinins and antagonists. **Curr. Opin. Anesthesiol.** V.14, p. 519-26, 2001.
- CARUSO, C.; DURAND, D.; WATANOBE, H.; LASAGA, M. NMDA and group I metabotropic glutamate receptors activation modulates substance P release from the arcuate nucleus and median eminence. **Neurosc. Lett.**, V. 393, p. 60-4, 2005.
- CARUSO, C.; DURAND, D.; WATANOBE, H.; LASAGA, M. NMDA and group I metabotropic glutamate receptor activation modulates substance P release from the arcuate nucleus and median eminence. **Neurosci. Lett.**, V. 393, p. 60-94, 2005.
- CARVALHO, W.A. & LEMÔNICA, L. Mecanismos celulares e moleculares da dor inflamatória. Modulação periférica e avanços terapêuticos. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, V.48, p.137-58, 1998.
- CAZAROLLI, L. H.; ZANATT, L.; ALBERTON, E. H.; FIGUEIREDO, M. S. R. B. *Mini-Rev. Med. Chem.*, V. 8, p.1429, 2008.
- CHENG, J. K.; JI, R. R. Intracellular signaling in primary sensory neurons and persistent pain. **Neurochem Res.**, v. 33, n. 10, p. 1970-8, 2008.
- COELHO, R. G.; DI STASI, L. C.; VILEGAS, W. Chemical constituents from the infusion of *Zollernia ilicifolia* comparison with *Maytemus* species. **Zeitschrift für Naturforschung**, V. 58, p. 47-52, 2003.
- COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. Doenças da imunidade. In: SCHOEN, F. J. (Ed.). **Robbins patologia estrutural e funcional**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

- COUTINHO, M.A.S.; MUZITANO, M.F.; COSTA, S.S. Flavonóides: potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Rev. Virt. Quim.**, V.1, p. 241-56, 2009.
- CUNHA, J.M.; CUNHA, F.Q.; POOLE, S.; FERREIRA, S.H. Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-1 receptor antagonist. **Br. J. of Pharmacol.**, V. 130, n. 6, p. 1418-24, 2000.
- CUZZOCREA, S.; PISANO, B.; DUGO, L.; IANARO, A.; MAFFIA, P.; PATEL, N.S.A.; Di PAOLA, R.; IALENTI, A.; GENOVESE, T.; CHATTERJEE, P.K.; Di ROSA, M.; CAPUTI, A.P.; THIEMERMANN, C. Rosiglitazone, a ligand of the peroxisome proliferator-activated receptor-g, reduces acute inflammation. **Eur. J. Pharmacol.**, V. 483, n. 1, p. 79- 93, 2004.
- DA MATTA, C.B.; DE SOUZA, E.T.; DE QUEIROZ, A.C.; DE LIRA, D.P.; DE ARAÚJO, M.V.; CAVALCANTE-SILVA, L.H.; DE MIRANDA, G.E.; DE ARAÚJO-JUNIOR, J.X.; BARBOSA-FILHO, J.M.; DE OLIVEIRA SANTOS, B.V.; ALEXANDRE-MOREIRA, M.S. Antinociceptive and anti-inflammatory activity from algae of the genus *Caulerpa*. **Marine Drugs**, V. 9, p. 307-18, 2011.
- DE ALBA, J.; CLAYTON, N.M.; COLLINS, S.D.; COLTHUP, P.; CHESSELL, I.; KNOWLES, R.G. GW274150, a novel and highly selective inhibitor of the inducible isoform of nitric oxide synthase (iNOS), shows analgesic effects in rat models of inflammatory and neuropathic pain. **Pain**, V. 120, p. 170-81, 2006.
- DE QUEIROZ, A.C.; DE LIRA, D.P.; DIAS, T.D.E.L.; DE SOUZA, E.T.; DA MATTA, C.B.; DE AQUINO, A.B.; SILVA, L.H.; DA SILVA, D.J.; MELLA, E.A.; AGRA MDE, F.; FILHO, J.M.; DE ARAUJO-JUNIOR, J.X.; SANTOS, B.V.; ALEXANDRE-MOREIRA, M.S. The antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Piptadenia stipulacea* Benth. (Fabaceae). **J. of Ethnopharm.**, V.128, p. 377-83, 2010.
- 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.
- EASTWOOD, G.L. Is smoking still important in the pathogenesis of peptic ulcer disease? **J. Clin Gastroenterology.**, V.25, s.1, p 1-7, 1997.
- ESFAHANI, H.M. Anti-inflammatory and antinociceptive effect of the ethanolic extract of *Alkanna frigida* and *Alkanna orientalis*. **J. Nat. Med.**, 2011.

- FERREIRA, J.; SANTOS, A.R.S.; CALIXTO, J.N. The role of systemic, spinal and supraspinal l-arginine-nitric oxide-cGMP pathway in thermal hyperalgesia caused by intrathecal injection of glutamate in mice. **Neuropharm.**, 38, p. 835-42, 1999.
- FILHO, A.W.; FILHO, V.C.; OLINGER, L.; DE SOUZA, M.M. Quercetin: further investigation of its antinociceptive properties and mechanism of action. **Archives of Pharmacal Research**, V.31, p. 713-21, 2008.
- FREITAS, F.F.B.P.; LEITE, J.R.S.A.; MIURA, L.M.C.V.; OLIVEIRA, R.C.M.; PEREIRA, S.S.; PIAULINO, C.A.; SOARES, P.M.G.; FERNANDES, H.B.; OLIBEIRA, F.A. Gastroprotective activity of *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. in animal models. **J. of Ethnopharm.**, V. 137, p.700-8, 2011.
- FRIESENECKER, B.; TSAI, A.G.; INTAGLIETTA, M. Cellular basis of inflammation, edema and the activity of Daflon 500 mg. **Int. J. Microcirc. Clin.** V. 15, p. 17-21, 1995.
- GARCIA L. J.; HARMAMURA L.; LEITE M.P.; ROCHA E SILVA M. Pharmacological Analysis Of Local The Acute Inflammatory Process Induced In The Rat'S Paw By Local Injection Of Carrageem And By Heating. **British J. Pharm.**, V. 48, p. 88-96, 1993.
- GARCIA, M.D.; FERNANDEZ, M.A.; ALVAREZ, A.; SAENZ, M.T. Antinociceptive and anti-inflammatory effect of the aqueous extract from leaves of *Pimenta racemosa var.ozua* (*Myrtaceae*). **J. of Etnopharm.**, V. 91, p. 63-73, 2004.
- GASBARRI, A.; POMPILI, A.; PACITTI, C. 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.
- GEPPETTI, P. & HOLZER, P. Neurogenic Inflammation. **Boca Raton: CRC Press, Florida**, p. 153-67, 1996.
- GILROY, D.W.; NEWSON, J.; SAWMYNADEN, P.; WILLOUGHBY, D.A.; CROXTALL, J.D. A novel role for phospholipase A2 isoforms in the checkpoint control of acute inflammation. **FASEB J.** V. 18, p. 489-98, 2004.
- GOETTERT, M. Development and optimization of *in vitro* Kinase Assays to screen extracts and isolated compounds from natural sources. **Dissertation**, Universitat Tübingen, 2010.

- GOMES, E.R. & DEMOLY, P. Epidemiology of hypersensitivity drug reactions. **Curr Opin Allergy Clin Immunol.** V. 5, p. 309-16, 2005.
- GONZAGA, D.T.G.; SOUZA, R.B.; BRAGA, T.L.; ROCHA DA, D.; ARAUJO, K.G.L.; FERREIRA, V.F.; SANTOS, W.C. Atividade antioxidante do extrato hexânico de *Eugenia punicifolia* (pedra-ume caá). **30ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química.** UFF. 2007.
- GOYAL, R.K. & HIRANO, I. The enteric nervous system. **New England J. Med.**, V. 334, n. 17, p. 1106-15, 1996.
- GRANJEIRO, M.S.; CALHEIROS-LIMA, A.P.; MARTINS, M.F.; ARRUDA, L.F.; GARCEZ-DO-CAMPO, L.; SANTOS, W.C. Pharmacological effects of *Eugenia punicifolia* (*Myrtaceae*) in cholinergic nicotinic neurotransmission. **Journal of Ethnopharmacology**, V. 108(1), p. 26-30, 2006.
- GUIDOBONO, F.; et al. Protection by amylin of gastric erosions induced by indomethacin or ethanol in rats. **Br. J. Pharmacology**, 120: 581-6, 1997.
- GUIEU, R.; PERAGUT, J.C.; ROUSSEL, P.; HASSANI, H.; SAMPIERI, F.; BECHIS, G.; GOLA, R.; ROCHAT, H. Adenosine and neuropathic pain. **Pain**, V. 68, p. 271-74, 1996.
- GURGEL, L.A.; SIDRIM, J.J.C.; MARTINS, D.T.; CECHINEL-FILHO, V.; RAO, V.S. In vitro antifungal activity of dragon's blood from *Croton urucurana* against dermatophytes. **J. of Ethnopharm.**, V. 97, p. 409-12, 2005.
- GUYTON, A.C. & HALL, J.E. **Tratado de fisiologia médica.** 11 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p.598-600, 2006.
- GUYTON, A.C. & HALL, J.E. **Tratado de fisiologia médica.** 12 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p.617-18, 2011.
- HALASSA, M. M.; FELLIN, T.; HAYDON, P. G. The tripartite synapse: roles for gliotransmission in health and disease. **Trends Mol Med**, v. 13, n. 2, p. 54-63, 2007.
- HEINRICHER, M.M. & INGRAM, S.L. The brainstem and nociceptive modulation. **Pain**, V. 5, p. 593-626, 2008.
- HEINRICHER, M.M.; TAVARES, I.; LEITH, J.L.; LUMB, B.M. Descending control of nociception: Specificity, recruitment and plasticity (Review). **Brain Res.**, V. 60, p. 214-25, 2009.

- HOHMANN, A.G.; SUPLITA, R.L.; BOLTON, N.M.; NEELY, M.H.; FEGLEY, D.; MANGIERI, R.; KREY, J.F.; WALKER, J.M.; HOLMES, P.V.; CRYSTAL, J.D.; DURANTI, A.; TONTINI, A.; MOR, M.; TARZIA, G.; PIOMELLI, D. An endocannabinoid mechanism for stress-induced analgesia. **Nature**, V.435, p.1108–12, 2005.
- HRUBEY, P.S.; HARVEY, A.K.; BENDELE, A.M.; CHANDRASEKHAR, S. Effects of anti-arthritic drugs on IL-1 induced inflammation in rats. **Agents Actions**, V. 34, n. 1-2, p. 56-59, 1991.
- HUERRE, M. R.; GOUNON, P. Inflammation: patterns and new concepts. **Res Immunol**, V. 147, n. 7, p. 417-34, 1996.
- HUME, D.A. & FAIRLIE, D.P. Therapeutic targets in inflammatory disease. **Curr Med Chem.**, V. 12, n. 25, p. 2925-29, 2005.
- 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.
- 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.
- JAHN, A.L. & GÜNZEL, P.K.H. The value of spermatology in male reproductive toxicology: do spermatologic examinations in fertility studies provide new and additional information relevant for safety assessment? **Reprod Toxicol**, V.11, p. 171-78, 1997.
- JANBAZ, K. H.; SAEED, S. A.; GILANI, H. Protective effect of rutin on paracetamol and CC14-induced hepatotoxicity in rodents. **Fitoterapia**, V. 73, p. 557-63, 2002.
- JJ, R. R. & SUTER, M. R. p38 MAPK, microglial signaling, and neuropathic pain. **Mol Pain**, v. 3, p. 33, 2007.
- JJ, R.R. & STRICHARTZ, G. Cell signalling and the genesis of neuropathic pain. **Science**, V. 252, p. 1–19, 2004.
- JIN, J.H.; KIM, J.S.; KANG, S.S.; SON, K.H.; CHANG, H.W.; KIM, H.P. Anti-inflammatory and anti-arthritic activity of total flavonoids of the roots of *Sophora flavescens*. **J. of Ethnopharm.**, V. 127, p. 589-95, 2010.
- JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, n. 6852, p. 203-10, 2001.

- JUST, M.J.; RECIO, M.C.; GINER, R.M.; CUELLAR, M.J.; MANEZ, S.L. Anti-inflammatory activity of unusual lupine saponins from *Bupleurum fruticenses*. **Planta Medica** 64, 404-07, 1998.
- KANUM, M.A. Why the enteric nervous system is important to clinicians. **Gut**, V. 47, Suppl4: iv8-iv10, 2000.
- KHANNA, D.; SETHI, G.; AHN, K.S.; PANDEY, M.K.; KUNNUMAKKARA, A.B.; SUNG, B., AGGARWAL, A.; AGGARWAL, B.B. Natural products as a gold mine for arthritis treatment. **Current Opinion in Pharm.**, V. 7, p. 344-51, 2007.
- KITTO, K.F.; HALEY, J.E.; WILCOX, G.L. Involvement of nitric oxide in spinally mediated hyperalgesia in the mouse. **Neurosci. Lett.**, V. 148, p. 1-5, 1992.
- KOUNTOURAS, J.; MYLOPOULOS, N.; BOURA, P.; BESSAS, C.; CHATZPOULOS, D.; VENIZELOS, J.; ZAVOS, C. Relationship between *Helicobacter Pylori* infection and glaucoma. **Ophthalmol.**, V. 108, p. 599-604, 2001.
- KUNZ, M.; IBRAHIM, S. M. Cytokines and cytokine profiles in human autoimmune diseases and animal models of autoimmunity. **Mediators Inflammation**, 2009.
- LABUDA, C.J.; KOBLISH, M.; TUTHILL, P.; DOLLE, R.E.; LITTLE, P.J. Antinociceptive activity of the selective iNOS inhibitor AR-C102222 in rodent models of inflammatory, neuropathic and post-operative pain. **E. J. of Pain**, V. 10, p. 505-12, 2006.
- LAINE, L. Approaches to Nonsteroidal Anti-inflammatory Drug Use in the High-Risk Patient. **Gastroenterology**, V. 120, p. 594-606, 2001.
- LAINE, L. Gastrointestinal effects of NSAIDs and Coxibs. Perspectives in Pain Management: The role of coxibs. **J. of Pain and Symp. Manag.**, V. 25, p. 32-40, 2003.
- LANDOLFI, R.; MOWER, R.L.; STEINER, M. Modification of platelet function and arachidonic acid metabolism by bioflavonoids. **Biochem Pharmacol.** V. 33, p.1525-30, 1984.
- LAUFER, S.; KOCH, P. Towards the improvement of the synthesis of novel 4(5)-aryl-5(4)-heteroaryl-2-thio-substituted imidazoles and their p38 MAP kinase inhibitory activity. **Org. Biomol. Chem.**, V. 6, p. 437-9, 2008.
- LE BARS, D.; GORAZIU, M.; CADDEN, S.W. Animal models of anti-nociception. **Pharmacol. Review**, V. 53, p. 597-652, 2001.

- LEITE, P.E.; DE ALMEIDA, K.B.; LAGROTA-CANDIDO, J.; TRINDADE, P.; DA SILVA, R.F.; RIBEIRO, M.G.; LIMA-ARAUJO, K.G.; SANTOS, W.C.; QUIRICO-SANTOS, T. Anti-inflammatory activity of *Eugenia punicifolia* extract on muscular lesion of mdx dystrophic mice. **J Cell Biochem.**, V. 111, p. 1652-60, 2010.
- LEITE, P.E.C. Ativação seletiva da subunidade $\alpha 7$ do receptor nicotínico de acetilcolina e a utilização do extrato de *Eugenia punicifolia* como estratégias antiinflamatórias na lesão muscular do camundongo *mdx* com distrofia muscular de Duchenne. Tese – Doutorado em Neuroimunologia – Universidade Federal Fluminense – Niterói: [s.n.], 2011.
- LEITH, J.L.; WILSON, A.W.; DONALDSON, L.F.; LUMB, B.M. Cyclooxygenase-1-derived prostaglandins in the periaqueductal gray differentially control C- versus A-fiber-evoked spinal nociception. **J. Neurosci.**, V. 27, p. 11296–305, 2007.
- LEONG, R.W. Differences in peptic ulcer between the East and the West. **Gastroenterol. Clin. North Am.**, V.38, p.363-79, 2009.
- LEVY, D. & ZOCHODNE, D.W. No pain: potential roles of nitric oxide in neuropathic pain. **Pain Practice.**, V. 4, p. 11-18, 2004.
- LEVY, L. Carrageenan paw oedema in the mouse. **Life Scienc.** V. 8, p. 601-6, 1969.
- LI, Y.; *et al.* Anti-inflammatory activity of patchouli alcohol isolated from Pogostemonis Herba in animals models. **Fitoterapia**, 82: 1295-1301, 2011.
- LIU, D. Z.; LIANG, H. J.; CHEN, C. H.; SU, C. H.; LEE, T. H.; HUANG, C. T.; HOU, W. C.; LIN, S. Y.; ZHONG, W. B.; LIN, P. J.; HUNG, L. F.; LIANG, Y. C. Comparative anti-inflammatory characterization of wild fruiting body, liquid-state fermentation, and solid-state culture of *Taiwanofungus camphoratus* in microglia and the mechanism of its action. **J. of Ethnopharm.**, V. 113, n. 1, p. 45-53, 2007.
- LIU, L.; ZHU, W.; ZHANG, Z. S.; YANG, T.; GRANT, A.; OXFORD, G.; SIMON, S. A. Nicotine inhibits voltage-dependent sodium channels and sensitizes vanilloid receptors. **J Neurophysiol**, v. 91, n. 4, p. 1482-91, 2004.
- LOESER, J. D.; TREEDE, R. D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, V. 137, n. 3, p. 473-7, 2008.

- LUCIO, E.M.R.A.; ROSALEN, P.L.; SHARAPIN, N.; SOUZA BRITO, A.R.M. Avaliação toxicológica aguda e screening hipocrático da epilsopilosina, alcalóide secundário de *Pilocarpus microphyllus* Stapf. **Rev. Bras. Farmacogn.**, V. 9/10, p. 23-5, 2000.
- MANNING,G. Evolution of protein kinase signaling from yeast to man. **Trends In Biochemical Sciences**, San Francisco, V. 27, n. 10, p.514-520, 2002.
- MARCHAND, F.; PERRETTI, M.; MCMAHON, S. B. Role of the immune system in chronic pain. **Nat Rev Neurosci**, v. 6, n. 7, p. 521-32, 2005.
- MCMAHON, S. B.; CAFFERTY, W. B.; MARCHAND, F. Immune and glial cell factors as pain mediators and modulators. **Exp Neurol**, v. 192, n. 2, p. 444-62, 2005.
- MCNAMARA, C. R.; MANDEL-BREHM, J.; BAUTISTA, D. M.; SIEMENS, J.; DERANIAN, K. L.; ZHAO, M.; HAYWARD, N. J.; CHONG, J. A.; JULIUS, D.; MORAN, M. M.; FANGER, C. M. TRPA1 mediates formalin-induced pain. **Proc Natl Acad Sci U S A**, V. 104, n. 33, p. 13525-30, 2007.
- MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, V. 454, n. 7203, p. 428-35, 2008.
- MELDRUM, B. S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: review of physiology and pathology. **J Nutr**, v. 130, n. 4S Suppl, p. 1007S-15S, 2000.
- MELLER, S.T.; GEBHART, G.F. Nitric oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord. **Pain**, V. 52, p.127-136, 1993.
- MENDONÇA, R.C.; FELFILI, J. M.; WALTER, B. M. T.; SILVA JÚNIOR, M. C. da; REZENDE, A. V.; FILGUEIRAS, T. S.; NOGUEIRA, P. E. Flora vascular do Cerrado. In: SANO, S.M. e ALMEIDA, S.P. (eds.). **Cerrado: ambiente e flora**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998.
- MEYER, R.A.; CAMPBELL, F.N.; RAJA, S.N. Peripheral neural mechanisms of nociception. em: Wall, P.D.; Melzack, R. - **Textbook of Pain**, 3rd Ed, Edinburgh, Churchill Livingstone; p.13-44, 1994.
- MICU, M.C.; MICU, R.; OSTENSEN, M. Luteinized unruptured follicle syndrome increased by inactive disease and selective cyclooxygenase 2 inhibitors in women with inflammatory arthropathies. **Arthritis Care Res**, V. 63(9), p. 1334-8, 2011.

- MIDDLETON JR, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T.C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacological Reviews**, V. 52, p. 673-751, 2000.
- MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T.C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease and cancer. **Pharmacological Reviews**, V.52, p.673-751, 2000.
- MILLAN, M. J. Descending control of pain. **Progr. Neurobiol.**, V. 66, p. 355–474, 2002.
- MILLIGAN, E. D.; WATKINS, L. R. Pathological and protective roles of glia in chronic pain. **Nat Rev Neurosci**, v. 10, n. 1, p. 23-36, 2009.
- MILLIGAN, E. D.; WATKINS, L. R. Pathological and protective roles of glia in chronic pain. **Nat Rev Neurosci**, v. 10, n. 1, p. 23-36, 2009.
- MINCIS, M.; CHEBLI, J.M.F.; KHOURI, S.T.; MINCIS, R. Etanol e o trato gastrointestinal. **Arq Gastroenterol.**, V. 32, p.131-9, 1995.
- MONCADA, S.; FERREIRA, S.H.; VANE, J.R. Prostaglandins Aspirin-like drugs and the oedema of inflammation. **Nature**, V.246 (23), p. 215-18, 1973.
- MOUSA, S.A., CHEPPUDIRA, B.P., SHAQURA, M., FISCHER, O., HOFMANN, J., HELLWEG, R., SCHAFER, M. Nerve growth factor governs the enhanced ability of opioids to suppress inflammatory pain. **Brain** V.130, p.502–13, 2007.
- MOUSA, S.A., ZHANG, Q., SITTE, N., JI, R., STEIN, C. Beta-Endorphin-containing memory-cells and mu-opioid receptors undergo transport to peripheral inflamed tissue. **J. Neuroimmunol.** V.115 (1–2), p.71–8, 2001.
- MUTOH, M.; TAKAHASHI, M.; FUKUDA, K.; KOMATSU, H.; ENYA, T.; MATSUSHIMA-HIBIYA, Y.; MUTOH, H.; SUGIMURA, T.; WAKABAYASHI, K. Suppression by flavonoids of cyclooxygenase-2 promoter-dependent transcriptional activity in colon cancer cells: structure-activity relationship. **J. Cancer Res.** V. 91, p. 686-91, 2000.
- NEUGEBAUER, V.; GALHARDO, V.; MAIONE, S.; MACKEY, S.C. Forebrain pain mechanisms. **Brain Res.** V. 60, p. 226-42, 2009.

- NEWMAN, D.J. & CRAGG, G.M. Natural products as sources of New Drugs over the 25 years. **J.Nat Prod.** V.70, p. 461-77, 2007.
- OKOLI, C.O.; AKAH, P.A.; NWAFOR, S.V. Anti-inflammatory activity of hexane leaf extract of *Aspilia Africana* C.D Adams. **J. of Ethnopharm.**, V.109, p.219-5, 2007.
- OKUDA, K.; SAKURADA, C.; TAKAHASHI, M.; YAMADA, T.; SAKURADA, T. Characterization of nociceptive responses and spinal releases of nitric oxide metabolites and glutamate evoked by different concentrations of formalin in rats. **Pain**, V. 92, p.107–115, 2001.
- OLIVEIRA, A.M.; HUMBERTO, M.M.S.; DA SILVA, J.M.; ROCHA, R.F.A.; SANT'ANA, A.E.G. Estudo fitoquímico e avaliação das atividades moluscicida e larvicida dos extratos da casca do caule e folha de *Eugenia malaccensis* L. (Myrtaceae). **Rev. Bras. Farmacogn.**, V.16(0), 2006.
- OLIVEIRA, R.N. de; DIAS, I.J.M.; CAMARA, C.A.G.. Estudo comparativo do óleo essencial de *Eugenia puniceifolia* (HBK) DC de diferentes localidades de Pernambuco. **Rev. Bras. Farmacogn.**, V. 15, n. 1, p. 39-43, 2005.
- OSADEB, P.O. & OKOYE, F.B.C. Anti-inflammatory effects of crude methanolic extract and fractions of *Alchornea cordifolia* leaves. **J. of Ethnopharm.**, V. 89, p. 19 – 24, 2003.
- OZAWA, S.; KAMIYA, H.; TSUZUKI, K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. **Prog Neurobiol**, v. 54, n. 5, p. 581-618, 1998.
- PASCUAL, R.; LOS RIOS, I.C.C.; ROSA, J.M.; CORREA-LEITE, P.E.; LIMA-ARAÚJO, K.G.; FERREIRA, V.F.; ROCHA, D.R.; GONZAGA, D.T.G.; GARCIA, A.G.; SANTOS, W.C.; GANDIA, L. Augmentation of catecholamine release elicited by an *Eugenia puniceifolia* extract in chromaffin cells. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, V. 22(1), p. 1-12, 2012.
- PEARSON, G.; ROBINSON, F.; GIBSON, T.B.; XU, B.E.; KARANDIKAR, M.; BERMAN, K.; COBB, M.H. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: Regulation and physiological functions. **Endocr. Rev.**, V.22, p.153-83, 2001.
- PERIANAYAGAM, J.B., SHARMA, S.A., PILLAI, K.K., 2006. Anti-inflammatory activity of *Trichodesma indicum* root extracts in experimental animals. **J. of Ethnopharm.**, V.104, p. 410–14, 2006.
- PERSON, B. & WEXNER, S.D. The management of postoperative ileus. **Curr. Probl. Surg.**, V. 43, p. 6-65, 2006.

- POCOCK, J. M.; KETTENMANN, H. Neurotransmitter receptors on microglia. **Trends Neurosci**, v. 30, n. 10, p. 527-35, 2007.
- PORTER, J. T.; MCCARTHY, K. D. Astrocytic neurotransmitter receptors in situ and in vivo. **Prog Neurobiol**, v. 51, n. 4, p. 439-55, 1997.
- RANG, H.P.; BEVAN, S.; DRAY, A. Nociceptive peripheral neurons: cellular properties, em: Wall, P.D.; Melzack, R. **Textbook of Pain**, 3rd Ed, Edinburgh, Churchill Livingstone; p.57-78, 1994.
- RAO, Y.K.; FANG, S.H.; TZENG, Y.M. Anti-inflammatory activities of flavonoids isolated from *Caesalpinia pulcherrima*. **J. of Ethnopharm.**, V.100, p. 249-53, 2005.
- RASO, G.M.; MELI, R.; DI CARLO, G.; PACILIO, M.; DI CARL, R. Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774A.1. **Life Sci.**, V. 68, p. 921–31, 2001.
- REPETTO, M.G. & LIESUY, S.F. Antioxidant properties of natural compounds used in popular medicine for gastric ulcers. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, V. 35, p.523-34, 2002.
- RICHARDSON, J.D. & VASKO, M.R. Cellular mechanisms of neurogenic inflammation. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, V.302, p.839-45, 2002.
- RIVIER, L. & BRUHN, J.G. Editorial. **J. of Ethnopharm.**, 1:1, 1979.
- ROBERT, A.; NEZAMIS, J.E.; LANCASTER, C.; HAUCHAR, A.J. Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCl, NaOH, hypertonic NaCl and thermal injury. **Gastroenterology**, V.77, p.433-43, 1979.
- ROBERTS II, L. J.; MORROW, J. D. Analgésico-antipiréticos, agentes anti-inflamatórios e fármacos utilizados no tratamento da gota. In: HARDMAN, J. G.; LIMBIRD, L. E. (Ed.). **Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica**. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2003.
- ROBINSON, D.R.; WU, Yi-mi; LIN, S.F. The protein tyrosine kinase family of the human genome. **Nat. Oncogene**, V. 19, p.548-57, 2000.
- ROSENBERG, H. F.; GALLIN, J. I. Inflammation. In: PAUL, W. E. (Ed.). **Fundamental immunology**. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1999.

- ROSLAND, J.H.; HUNSKAAR, S.; HOLE, K. Diazepam attenuates morphine antinociception test-dependently in mice. **J. Pharmacol. Toxicol.**, V. 66, p. 382-386, 1990.
- SAKURADA, T.; SAKURADA, C.; WAKO, K. Involvement of nitric oxide in spinally mediated capsaicin- and glutamate-induced behavioural responses in the mouse. **Neurochem.** V. 29, p. 271–8, 1996.
- SANDLER, R.S.; EVERHART, J.E.; DONOWITZ, M. The burden of selected digestive diseases in the United States. **Gastroenterology**, V.122, p.1500–11, 2002.
- SANNOMIYA, M.; ONSECA, V. B.; DA SILVA, M. A.; ROCHA, L. R.; DOS SANTOS, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. Flavonoids and antiulcerogenic activity from *Byrsonima crassa* leaves extracts. **J. of Ethnopharm.**, V.97 (1), p.1-6, 2005.
- SANTANGELO, C.; VARI, R.; SCAZZOCCHIO, B.; di BENEDETTO, R.; FILESI, C.; MASELLA, R. Polyphenols, intracellular signalling and inflammation (Review). **Ann Ist Super Sanità**, V. 43, p. 394-405, 2007.
- 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, 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.
- SAYYAH, M.; HADIDI, N.; KAMALINEJAD, M. Analgesic and anti-inflammatory activity of *Lactuca sativa* seed extract in rats. **J. of Ethnopharm.**, V. 92, p. 325-29, 2004.
- SCAPIN, G. Structural biology in drug design: selective protein kinase inhibitors. **Drug Discov Today**, V. 7, p. 601-11, 2002.
- SCHAIBLE, H. G.; RICHTER, F. Pathophysiology of pain. **Langenbecks Arch Surg**, v. 389, n. 4, p. 237-43, 2004.
- SCHEIMAN, J.M.; *et al.* Prevention of ulcers by esomeprazol in at-risk patients using non-selective NSAIDs and COX-2-inhibitors. **Am. J. Gastroenterol.** 101: 701-10, 2006.

- SCHEIMAN, J.M.; YEOMANS, N.D.; TALLEY, N.J.; VAKIL, N.; CHAN, F.K.; TULASSAY, Z. Prevention of ulcers by esomeprazole in at-risk patients using non-selective NSAIDs and COX-2-inhibitors. **Am. J. Gastroenterol.** V.101, p.701-10, 2006.
- SCHETT, G.; ZWERINA, J.; FIRESTEIN, G. The p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in rheumatoid arthritis. **Ann. Rheum. Dis.**, V.67, p. 909-16, 2008.
- SCHLANSKY, B. & HWANG, J.H. Prevention of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastropathy. **Journal of Gastroenterology**, V. 52, p. 44–52, 2009.
- SCHREIBER, M.; RES, I.; MATTER, A. Protein Kinases as antibacterial targets. **Current Opinion in Cell Biologym**, V.21, p. 325-30, 2009.
- SERHAN, C.N. & SAVILL, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. **Nat. Immunol.**, V. 6, p. 1191-97, 2005.
- SHERRINGTON, C.S. Integrative action of the central nervous system. **Scribner's Sons**, New York, p. 114, 1906.
- SHERWOOD, E.R. & TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best Pract. Res. Clin. Anaesthesiol.**, V.18, n.3, p. 385-405, 2004.
- SHICHIJO, K.; IHARA, M.; MATSUU, M. Overexpression of heat shock protein 70 in stomach of stress-induced gastric ulcer-resistant rats. **Dig Dis Sci.**, V. 48, p. 340–48, 2003.
- SIEGMUND, S. Animal models in gastrointestinal alcohol research-a short appraisal of the different models and their results. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, V. 17, n. 4, p. 519-42, 2003.
- SILVEIRA, P.F.; BANDEIRA, M.A.M.; ARRAIS, S.D. Farmacovigilância e reações adversas as plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Bras. J. Pharmacol.**, V. 18, n. 4, p. 618-26, 2008.
- SIMÕES, C.M.O. Investigação químico-farmacológica de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC., Compositae. Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1984.
- SKARDA, R.T.; MUIR, W.W.; HUBBELL, J.A.E. Anestesia local en bovinos, ovejas, cabras y cerdos Cap. 5 In: "**Manual de Anestesia Veterinaria**" – 2ª ed. Mosby / Doyma Libros , S.A. Madrid, España. p. 53-77, 1997.

- SOMERS, D. L. & CLEMENTE, F. R. Contralateral high or a combination of high and low-frequency transcutaneous electrical nerve stimulation reduces mechanical allodynia and alters dorsal horn neurotransmitter content in neuropathic rats. **J. Pain**, v. 10, n. 2, p. 221-9, 2009.
- SOUZA, S.M.; AQUINO, L.C.; MILACH JR. A.C.; BANDEIRA, M.A.; NOBRE, M.E.; VIANA, G.S. Antiinflammatory and antiulcer properties of tannins from *Myracrodruon urundeuva Allemao* (Anacardiaceae) in rodents. **Phytotherapy Res.**, V. 21, p. 220-25, 2007.
- 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.
- STEIN, C.; SCHAFFER, M.; MACHELSKA, H. Attacking pain at its source: new perspectives on opioids. **Nat. Med.**, V. 9, p. 1003-8, 2003.
- STEINMEYER, J. Pharmacology basis for the therapy of pain and inflammation with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Arthritis Res.**, V. 2, p. 379-85, 2000.
- STELLWAGEN, D.; MALENKA, R. C. Synaptic scaling mediated by glial TNF α . **Nature**, V. 440, n. 7087, p. 1054-9, 2006.
- STICKNEY, J.C. & NORTHUP, D.W. Effect of gastric emptying upon propulsive motility of small intestine of rat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, V.101, p.582-583, 1959.
- STUCKY, C. L.; GOLD, M. S.; ZHANG, X. Mechanisms of pain. **Proc Natl Acad Sci U S A**, V. 98, n. 21, p. 11845-6, 2001.
- SULEYMAN, H.; ALBAYRAK, A.; BILICI, M.; CADIRCI, E.; HALICI, Z. Different mechanisms in formation and prevention of indomethacin-induced gastric ulcers. **Inflamm.**, V.33(4), p. 224-34, 2010.
- SUNG, C.S.; WEN, Z.H.; CHANG, W.K.; HO, S.T.; TSAI, S.K.; CHANG, Y.C. Intrathecal Interleukin-1 β administration induces thermal hyperalgesia by activating inducible nitric oxide synthase expression in the rat spinal cord. **Brain Research**, V. 1015, p. 145-53, 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.

- TAIWO, Y.O. & LEVINE, J.D.; Further confirmation of the role of adenylyl-cyclase and of cAMP dependent protein kinase in primary afferent hyperalgesia. **Neuroscience**, V. 44, p.131-35, 1991
- TASSORELLI, C.; GRECO, R.; WANG, D.; SANDRINI, G.; NAPPI, G. Prostaglandins, glutamate and nitric oxide synthase mediate nitroglycerin-induced hyperalgesia in the formalin test. **E. J. of Pharmacol.**, V. 534, p.103-7, 2006.
- 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.
- TJOLSEN, A.; BERGE, O.G.; HUNSKAAR, S.; ROSLAND, J.H.; HOLE, K. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, V. 51, p.5-17, 1992.
- VIVIER, E. & MALISSEN, B. Innate and adaptive immunity: specificities and signaling hierarchies revisited. **Nat Immunol**, v. 6, n. 1, p. 17-21, 2005.
- VONKEMAN, H.E.; BROUWERS, J.R.B.J.; VAN DE LAAR, M.A.F.J. Understanding the NSAID related risk of vascular events. **Boletim Medical J.**, V. 332, p. 895-98, 2006.
- XIAO, J.; CAO, H.; WANG, Y.; YAMAMOTO, K.; WEI, X. Structure-affinity relationship of flavones on binding to serum albumins: Effect of hydroxyl groups on ring A. **Mol. Nutr. Food Res.** V. 54, p. 253-60, 2010.
- WALLACE, J. L. Pathogenesis of NSAID-induced gastroduodenal mucosal injury. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, V. 15, p. 691-703, 2001.
- WALLACE, J.L. Prostaglandins, NSAIDs, and Gastric Mucosal Protection: Why Doesn't the Stomach Digest Itself? **Physiol. Rev.** 88: 1547-65, 2008.
- WANG, Z.Q.; PORRECA, F.; CUZZOCREA, S.; GALEN, K.; LIGHTFOOT, R.; MASINI, E.; MUSCOLI, C.; MOLLACE, V.; NDENGELE, M.; ISCHIROPOULOS, H.; SALVEMINI, D. A newly identified role for superoxide in inflammatory pain. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, V. 309, n. 3, p. 869-78, 2004.
- WATKINS, L. R.; MILLIGAN, E. D.; MAIER, S. F. Glial activation: a driving force for pathological pain. **Trends Neurosci**, v. 24, n. 8, p. 450-5, 2001.
- WESTRA, J. & LIMBURG, P.C. P 38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) in rheumatoid arthritis. Mini-Rev. **Med. Chem.** V. 6, p. 867-74, 2006.

- WHITTLE, B.J. Gastrointestinal effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. **Fudam. Clin.**, V. 17, p. 301-13, 2003.
- WILLIAMS, T.J. & MORLEY, J. Prostaglandins as potentiators of increased vascular permeability in inflammation. **Nature**, V. 246, p. 215-217, 1973.
- WINTER, C.A.; RISLEY, E.A.; NUSS, G.W. Carrageenan-induced oedema in the hind paw of rat as an assay for anti-inflammatory activity. **ProcSoc. Exp. Biol. Ther.** V. 111, p. 544-7, 1962.
- WOODCOCK, J.; WITTER, J.; DIONNE, R. A. Stimulating the development of mechanism-based, individualized pain therapies. **Nat Rev Drug Discov**, V. 6, n. 9, p. 703-10, 2007.
- WOOLF, C. J.; MA, Q. Nociceptors--noxious stimulus detectors. **Neuron**, v. 55, n. 3, p. 353-64, 2007.
- WOOLF, C.J. & SALTER, M.W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. **Scienc.**, V. 288, p. 1765-69, 2000.
- YUAN, Y.; PADOL, I.T.; HUNT, R.H. Peptic ulcer disease today. **Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.**, V. 3, p. 80-9, 2006.
- ZEILHOFER, H. U. Synaptic modulation in pain pathways. **Rev Physiol Biochem Pharmacol**, v. 154, p. 73-100, 2005.
- ZHUO, M. Neuronal mechanism for neuropathic pain. **Mol. Pain**, V. 3, n. 14, p. 3-14, 2007.
- ZIMMERMANN, M. Pathobiology of neuropathic pain. **E. J. of Pharmacol.**, V. 429, n. 1-3, p. 23-37, 2001.
- ZUCCOTTO, F.; ARDINI, E.; CASALE, E.; ANGIOLINI, M. Through the "Gatekeeper Door": Exploiting the Active Kinase Conformation. **J. Med. Chem.** V.53, p. 2681-94, 2010.

10. Anexo 1 – Protocolo do Comitê de Ética em Experimentação Animal (nº 369)



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



Certificado

Certificamos que o Protocolo nº 369-CEUA, sobre “AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTI-NOCICEPTIVA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *Eugenia punicifolia* (Kunth) DC”, 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.

Prof. Dr.ª Patrícia Fernanda Felipe Pinheiro
Presidente - CEUA

Instituto de Biociências - Diretoria Técnica Acadêmica
Dutra de Rêgo Junior s/n. CEP 13648-970 Botucatu SP Brasil
Tel. 44 3841 6043/6044 fax 44 3845 5744 e-mail: unesp@unesp.br

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:

<i>Frêmito vocal:</i>	Emissão de ruídos frequentes
<i>Irritabilidade:</i>	Reação ao indivíduo ao lado ou ao manuseá-lo
<i>Resposta ao toque:</i>	Direcionar algo em direção ao animal e esperar ele desviar
<i>Aperto de cauda:</i>	Apertar a ponta da cauda e puxá-lo
<i>Contorção:</i>	Animal faz movimento sinuoso
<i>Trem posterior:</i>	Pata posterior abaixada
<i>Endireitamento:</i>	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.
<i>Tônus corporal:</i>	Puxar a pele pra ver se ela retorna ao normal
<i>Força de agarrar:</i>	Fazê-lo segurar na grade e puxá-lo pela cauda
<i>Ataxia:</i>	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
<i>Reflexo auricular:</i>	Mexer a orelha com a pinça
<i>Reflexo corneal:</i>	Levar em direção ao olho a pinça para ver se eles tentam fechá-los.
<i>Tremores:</i>	Verificar se eles tremem, comparando com o normal.
<i>Convulsões:</i>	São medidas subjetivamente de 1 a 4 de acordo com a severidade e duração

<i>Estimulações:</i>	Movimentos repentinos
<i>Straub:</i>	Cauda levantada como uma bandeira
<i>Hipnose:</i>	Dormir agrupados
<i>Anestesia:</i>	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
<i>Lacrimação:</i>	Comparar com a normal
<i>Ptose:</i>	1- notável fechamento do olho; 2- metade fechado; 3- quase completamente fechado; 4- fechado completamente
<i>Micção:</i>	Considerar subjetivamente a frequência e quantidade
<i>Defecação:</i>	Verificar alteração na consistência das fezes
<i>Piloereção:</i>	A gradação é analisada subjetivamente através da ereção e do aspecto do pelo
<i>Hipotermia:</i>	Tocar o animal e verificar se a temperatura é baixa em relação ao controle
<i>Respiração:</i>	Comparar com o normal
<i>Cianose:</i>	Observar a alteração da cor de orelhas, patas e da mucosa oral.
<i>Número de mortos:</i>	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 EHEP 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
Respiração	4	4	4	4	4	4
Cianose	0	0	0	0	0	0
Morte		0	0	0	0	0

Códigos: Testes com anotação normal “0”, a intensidade do efeito varia na escala de 1 a 4

Teste com anotação normal “4”, a intensidade do efeito poderá variar de 0 a 3 quando ocorrer diminuição, 4 quando igual ao controle e de 5 a 8 quando ocorrer aumento.