

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO
DE *MYRCIA BELLA* CAMBESS NA DOR AGUDA E NA
INFLAMAÇÃO EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE
ROEDORES



VÂNIA VASTI ALFIERI NUNES

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia Geral e Aplicada, Área de concentração *Biomoléculas: estrutura e função*

Profa. Dra. Clélia Akiko Hiruma Lima

**BOTUCATU – SP
2012**



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



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA

"Julio de Mesquita Filho"

INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU

AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO HIDROALCÓOLICO
DE *MYRCIA BELLA* CAMBESS NA DOR AGUDA E NA
INFLAMAÇÃO EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE
ROEDORES



VÂNIA VASTI ALFIERI NUNES

ORIENTADORA: PROFA. DRA. CLÉLIA AKIKO HIRUMA LIMA

CO-ORIENTADORA: PROFA. DRA. CATARINA DOS SANTOS

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências,
Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título
de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Biologia
Geral e Aplicada, Área de concentração *Biomoléculas:
estrutura e função*

Profa. Dra. Clélia Akiko Hiruma Lima

**BOTUCATU – SP
2012**

Auxílio Financeiro:

Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
(CNPq)



Dedico este trabalho a Deus, que me capacitou e me sustentou para sua realização.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à minha família que sempre me apoiou nos momentos difíceis e compartilhou minhas alegrias. Aos meus pais, **Nancy e Benoni**, que são exemplos de ética e profissionalismo e que sempre me incentivaram nessa busca ao conhecimento e ao crescimento profissional, sempre com muito amor e carinho. Aos meus irmãos, **Sarah e Davison**, pelo apoio, amor, carinho e compreensão. Agradeço a Deus pela família que tenho.

Agradeço ao meu noivo, **Rodrigo**, pela paciência, compreensão, companheirismo e amor, acreditando nesse trabalho e na minha capacitação. Obrigada por entender minha falta de atenção e minha ausência que ocorreram inúmeras vezes. Você é o melhor presente que Deus colocou na minha vida.

À **Profa. Dra. Clélia Akiko Hiruma-Lima** pela sua orientação e ensinamentos e pela oportunidade de realização desse trabalho. À **Profa. Dra. Lúcia Rocha** pelas suas dicas didáticas e ajudas sempre que precisei.

À **Profa. Dra. Catarina dos Santos** por sempre acreditar em mim e me acolher de braços abertos. Se eu cheguei até aqui foi em grande parte pelo seu exemplo de profissionalismo e ética.

Ao **Dr. Antônio C. G. Melo** do Instituto Florestal de Assis que possibilitou a identificação e coleta da planta estudada.

À equipe do laboratório **Thiago, Raquel, Patrícia, Marília, Ellen, Fernando, Tamires, Larissa, Celi** pelas inúmeras ajudas. À **Katharinne** e a **Laísa** que foram muito mais que colegas de Congressos e sim pessoas que pude compartilhar vários momentos no decorrer dessa jornada, obrigada pela amizade. À **Flávia**, por me fazer rir quando eu achava que isso seria impossível e por sua alegria contagiante, obrigada por seu apoio e por sua amizade, e por muitas vezes também me ajudar na realização deste trabalho.

Agradeço em especial “as meninas da dor” que, sem elas, não seria possível a realização desse trabalho. **Catarine, Rosanna e Juliana**, vocês sabem que este trabalho também é de vocês. **Cat**, a sua experiência e amizade me incentivaram muitas vezes em minha vida pessoal e profissional. **Ro**, é a melhor IC, sua amizade e carinho foram um presente em um momento em que eu mais precisava. A **Ju** entrou na minha vida mais tarde, mas pude perceber a profissional que ela é sempre pronta a ajudar, bem como a amiga que se tornou e que estava do sempre ao meu lado. Meninas vocês fizeram meu sonho de realização desse trabalho possível. Muito obrigada.

Aos amigos **Thaís, Cíntia Dayanne, Jeunes, Marcel e Alessandra** que tornaram minha vida em Botucatu mais feliz, obrigada pelos incentivos e risadas.

À **Marci e Jéssica**, minhas mocinhas, que sempre estavam comigo me apoiando e me aconselhando. Elas me abraçaram nos dias de choro e também sorriram comigo nos momentos de alegria. Obrigada pelos momentos compartilhados e por ser minha família daqui de Botucatu.

Aos funcionários do Departamento de Fisiologia, principalmente ao **Dr. Hélio Kushima** por sua ajuda e conhecimento. Ao **Seu Júnior e Janete** pelos cuidados com os animais e com o departamento, pela amizade e pelos momentos de descontração.

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

Ao **CNPQ** pelo seu apoio financeiro.

Muito obrigada!

"A mente que se abre a uma nova ideia nunca mais volta ao seu tamanho original."

(Albert Einstein)

PRÓLOGO

O projeto de mestrado possibilitou a formação Biologia Geral e Aplicada, com os estudos direcionados para a caracterização de atividade farmacológica de produtos naturais, sendo o objeto alvo dos estudos a dor e a inflamação. Durante a execução do projeto de mestrado, várias outras atividades foram realizadas, no intuito de enriquecer a formação profissional do aluno.

Trabalhos apresentados na forma de painel em eventos científicos

➔ “Hydroalcoholic extracts of *Eugenia puniceifolia* (KUNTH) DC’ and *Myrcia bella* CAMBESS’ Leaves: Analgesic effect and antidiarrheal in mice” Nunes, V. V. A.; Nishijima, C. M.; Santos, R. C.; Rocha, L. R. M.; Santos, C.; Hiruma-Lima, C. A. 8th International Congress of Pharmaceuticals Sciences, 21-24 Agosto de 2011, Ribeirão Preto-SP.

➔ "Atividade antimicrobiana dos extratos hidroalcoólicos de *Eugenia sp.* e *Myrcia sp.*” Costa, M. F.; Maeda, M. Y.; Nunes, V. V. A.; Daniel, E. F.; Duarte, R. M. T.; Duarte, M. C. T.; Santos, C. 34ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 26 maio de 2011, Florianópolis.

Participação em eventos científicos

➔ 8th International Congress of Pharmaceutical Sciences (CIFARP), 21-24 de agosto de 2011, Ribeirão Preto-SP.

➔ 7th Biota Symposium, 7th Biota Program Assessment Meeting e 4th Bioprospecta Program Assessment Meeting, 3-10 de julho de 2011, São Carlos-SP.

➔ 4º Simpósio de Imunologia: Imunobiologia de Tumores, 20-22 de maio de 2011, Botucatu-SP.

➔ X Workshop da Pós-graduação do Instituto de Biociências de Botucatu-UNESP, 12-14 de maio de 2011, Botucatu-SP.

Cursos realizados

➔ Busca profissional de patentes: Técnicas, estratégias e aplicações práticas Foco no Questel Orbit realizado pela Axonal Consultoria Tecnológica, A Agência Unesp de Inovação – AUIM e a Coordenadoria Geral de Bibliotecas da Unesp - GGB, 27 de outubro de 2011, Botucatu-SP.

➔ Phytopharmatec – Workshop on Phytopharmaceutical Technology, pré-evento do 8th International Congress of Pharmaceutical Sciences (CIFARP), 21-24 de agosto de 2011, Ribeirão Preto-SP.

➔ Curso sobre diseño experimental y tamaño de la muestra em trabajos con animales de laboratorio, 25-29 de julho de 2011, Buenos Aires- Argentina.

➔ Mini-curso: Inflamação, dor e novas terapêuticas. Modelos experimentais, durante o X Workshop da Pós-graduação do Instituto de Biociências de Botucatu-UNESP, 12-14 de maio de 2011, Botucatu-SP.

Disciplinas cursadas

- Estresse e Imunidade (5 créditos)
- Tópicos Especiais em Biologia Molecular Estrutural: Métodos Teóricos e Práticos de Cristalização de Proteínas (3 créditos)
- Tópicos Especiais em Biologia Geral e Aplicada (2 créditos)
- Interação entre a Pós-graduação e o Ensino Básico de Ciências e Biologia (6 créditos)

Extensão universitária

- ➔ Monitor do curso “Reprodução de A a Z” do programa de extensão universitária “Difundindo e Popularizando a Ciência na Unesp: Interação entre Pós-Graduação e Ensino Básico” realizado em Botucatu-SP de 23 a 28 de janeiro de 2012

- ➔ Expositora das atividades do Projeto de Extensão Universitária “Reprodução de A a Z” do programa de extensão universitária “Difundindo e Popularizando a Ciência na Unesp: Interação entre Pós-Graduação e Ensino Básico” durante o evento “Venha conhecer o IB” realizado em Botucatu-SP 30 de agosto de 2011.

- ➔ Monitor do curso “Reprodução de A a Z” do programa de extensão universitária “Difundindo e Popularizando a Ciência na Unesp: Interação entre Pós-Graduação e Ensino Básico” realizado em Botucatu-SP de 24 a 29 de janeiro de 2011.

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AA	– ácido araquidônico
AAS	– ácido acetilsalicílico
AINES	– anti-inflamatório não esteroidal
AMPA	– ácido- α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico
ATP	– trifosfato de adenosina
CGRP	– peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
Cm	– centímetros
COX	– ciclooxigenase
EHMb	– extrato hidroalcoólico de <i>Myrcia bella</i>
G	– grama
GABA	– ácido gama aminobutírico
IL-1 β	– interleucina – 1 β
IL-6	– interleucina – 6
IL-8	– interleucina – 8
i.p.	– intraperitoneal
iNOS	– óxido nítrico sintase induzida
kg	– quilograma
l-name	– L-NG-Nitroarginina metil ester
mg	– miligrama
min	– minutos
mL	– mililitro
NMDA	– N-metil-D-aspartato
NO	– óxido nítrico
NOS	– óxido nítrico sintetase
PAG	– substância cinzenta periaquidutal

PGE ₂	– prostaglandina E ₂
PGI ₂	– prostaglandina I ₂
pH	– potencial de hidrogênio iônico
RVM	– medula rostral ventromedial
rpm	– rotação por minuto
s	– segundos
s.c.	– subcutâneo
SNC	– sistema nervoso central
SNP	– sistema nervoso periférico
SP	– substância P
TNF- α	– fator de necrose tumoral α
TRP	– receptor potencial transitório
TRPA1	– receptor potencial transitório relacionado à proteína anquirina 1
TRPV	– receptor potencial transitório vanilóide
TRPV1	– receptor potencial transitório vanilóide 1
v.o.	– via oral
μ l	– microlitro
μ mol	– micromol
μ M	– micromolar
°C	– graus Celsius
5-HT	– serotonina

RESUMO

A dor é uma experiência que envolve múltiplos fatores. A via supraespalhal do controle da dor se origina em muitas regiões cerebrais, tais como substância periaquedutal cinzenta (PAG), núcleos medianos da rafe e medula rostral ventromedial (RVM) e possuem papel crítico na determinação da dor aguda e crônica. A dor pode ser desencadeada devido a uma lesão tecidual que inicia uma reação inflamatória. A inflamação é uma resposta imune complexa que pode ser 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 através do recrutamento de leucócitos, que liberam mediadores inflamatórios. Os medicamentos Anti-inflamatórios Não-Esteroidais (AINEs) são utilizados no tratamento da dor e inflamação, os quais inibem os mediadores inflamatórios, mas podem também provocar efeitos adversos como as úlceras gástricas e causar danos cardiovasculares. Uma alternativa para o tratamento da dor e inflamação é a utilização de espécies vegetais. O gênero *Myrcia* pertence à família Myrtaceae, família botânica que apresenta grande expressão nos ecossistemas brasileiros. Como classe fitoquímica de importância terapêutica, os flavonóides tem representado um importante grupo com relevante ação anti-inflamatória e gastroprotetora, e estão presentes de forma expressiva na composição química de espécies do gênero *Myrcia*. O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do extrato hidroalcoólico de folhas de *Myrcia bella* (EHMb). Neste trabalho foram avaliados os efeitos do extrato nos testes de toxicidade aguda, de avaliação da atividade antinociceptiva através de modelos de nocicepção por agentes químicos e térmicos (contorção abdominal induzida pelo ácido acético, formalina, placa quente) e avaliação do envolvimento do sistema opióide, serotoninérgico, glutamatérgico e da via do l-arginina óxido nítrico na antinocicepção do EHMb. Realizou-se também a avaliação da performance motora e determinação da motilidade intestinal de camundongos tratados com EHMb. Os resultados obtidos demonstraram baixa toxicidade do EHMb no ensaio de toxicidade aguda com a administração da dose de 5000 mg/Kg. A administração oral do EHMb apresentou atividade antinociceptiva nas doses de 125 e 250 mg/Kg com inibição de 32,57 e 55,79% respectivamente no modelo de dor induzida pelo ácido acético. No teste de formalina a dose de 250 mg/Kg apresentou uma inibição de 32,3% na dor inflamatória. Entretanto, no teste da placa quente o EHMb não apresentou atividade antinociceptiva na dose de 250 mg/kg. Com o intuito de investigar os mecanismos de ação envolvidos na antinocicepção, verificou-se por intermédio do modelo de formalina que o sistema opióide, serotoninérgico e a via l-arginina óxido nítrico participam efetivamente do mecanismo antinociceptivo do EHMb, bem como o sistema glutamatérgico. O EHMb não apresentou alteração na avaliação da performance motora na dose de 250 mg/Kg indicando portanto a ausência de um efeito inespecífico do extrato. Para avaliação do EHMb sobre a motilidade intestinal, verificou-se uma diminuição de 23,8% do trânsito intestinal nos camundongos tratados com o extrato na dose de 250 mg/kg. Na avaliação da atividade anti-inflamatória do EHMb pela indução do edema de orelha por xilol as doses de 125 e 250 mg/Kg inibiram em 51,89% e 42,04% respectivamente, porém não foi efetivo quando a inflamação ocorreu por AA. A partir dos resultados apresentados neste projeto é possível afirmar que o EHMb possui uma efetiva ação antinociceptiva. Essa antinocicepção do EHMb ocorre por atuação do sistema opioidérgico, serotoninérgico, glutamatérgico e nitrérgico. O EHMb também possui uma importante atuação na inflamação que não é via metabólitos do AA.

Palavras chave: Anti-inflamatório; Antinocicepção; Dor; Inflamação; *Myrcia bella*

ABSTRACT

Pain is an experience that involves a lot of factors. The supraspinal pathway of pain control originates in several brain regions, such as periaqueductal gray matter (PAG), median raphe nucleus and the rostral ventromedial medulla (RVM), and it has a critical role in acute and chronic pain's. The pain can be unleashed due to a tissue injury which initiates an inflammatory reaction is an immune complex response which may be caused by chemical, physical, microbiological or immunological stimulus. The inflammatory process involves a complex biochemical cascade and cellular events, including receptor's awareness and receptor's activation, lysis and tissue repair. In general, the tissue injury unleashes a local inflammatory response by leukocytes recruiting, which ones can release inflammatory mediators. The non-steroidal anti-inflammatory drugs (AINEs) are used in the treatment of pain and inflammation, which inhibit the inflammatory mediators, but also may cause adverse effects such as gastric ulcers and cardiovascular damage. An alternative for the treatment of pain and inflammation's treatment is use of plant species. The specie *Myrcia* is a genus belongs to the Myrtaceae botanical family, very expressive in the Brazilian ecosystems. Flavonoids, as a phytochemical class of great therapeutic importance, it has been represented an essential group with significant anti-inflammatory and gastroprotective effects, and they are present in an important way in species of *Myrcia*'s the chemical composition. The essential purpose of this work was to evaluate the antinociceptive and anti-inflammatory activities in *Myrcia bella* leaves' extract (EHMb). This study evaluated the effects of the extract in the acute toxicity tests, evaluation of antinociceptive activity through models of nociception by chemical and thermal stimulus (writhing induced by acetic acid, formalin, hot plate) and evaluation of the involvement of the opioid system, serotonergic, glutamatergic and L-arginine nitric oxide pathway in antinociception produced by EHMb. It was also conducted the motor performance evaluation and intestinal motility's determination of mice treated with EHMb. The results have showed low toxicity of EHMb in the acute toxicity test with 5000 mg/Kg. The oral administration of EHMb has presented antinociceptive activity of 125 and 250 mg/kg doses, showing 32.57% and 55.79% of inhibited in pain model induced by acetic acid. In the formalin test at a 250 mg/kg dose it has inhibited 32.3% of the inflammatory pain. However, the hot plate test the EHMb was has not presented antinociceptive activity active at a dose of 250 mg/kg dose. In order to investigate the mechanisms involved in antinociception produces by EHMb, it was investigated the mechanisms involved in the antinociception produced by the EHMb found used the participation of formalin test that as opioid, serotonergic, L-arginine nitric oxide pathway and glutamatergic systems. The EHMb has presented no changes in evaluation of motor performance evaluation at a 250 mg/Kg. To evaluate the EHMb on intestinal motility, there was observed 23.8% reduction of the intestinal tract in mice treated with at the 250 mg/kg dose . In the EHMb's activity anti-inflammatory evaluation by the ear edema induced by xylene, it has inhibited 51.89% and 42.04% (125 and 250 mg/kg doses, respectively), but it was not effective when inflammation occurred by AA. From the results presented in this project it is possible to say that EHMb has an effective antinociceptive action. This EHMb's antinociception is due to the opioid, serotonergic, glutamatergic and and L-arginine nitric oxide pathway system's actuations. The EHMb also has an important performance in inflammation, that is not through AA metabolites.

Keywords: Anti-inflammatory, Antinociceptive, Pain, Inflammation, *Myrcia bella*

SUMÁRIO

1. Introdução	17
1.1. Dor	17
1.2. Inflamação	19
2. Justificativa	21
2.1. Terapêutica atual para dor aguda e inflamação	21
2.2. Plantas na terapêutica da dor aguda e inflamação	23
3. Objetivos	26
3.1. Objetivo geral	26
3.2. Objetivos específicos	26
4. Materias e métodos	26
4.1. Material vegetal	26
4.1.1. Preparação dos extratos	26
4.2. Animais experimentais	27
4.2.1. Toxicidade aguda e “screening” hipocrático	27
4.2.2. Contorção abdominal induzida pelo ácido acético	27
4.2.3. Avaliação da performance motora “Rota Rod”	28
4.2.4. Teste de formalina	28
4.2.5. Placa quente ou “Hot Plate”	29
4.2.6. Avaliação da participação sistema opioidérgico na antinocicepção	29
4.2.7. Avaliação da participação dos receptores opióides na antinocicepção	30
4.2.8. Determinação da motilidade intestinal	30
4.2.9. Avaliação da participação do sistema serotonérgico na antinocicepção	30
4.2.10. Avaliação da participação da via l-arginina NO na antinocicepção	31
4.2.11. Avaliação do sistema glutamatérgico na antinocicepção	31
4.2.12. Edema de orelha induzido por xilol	31
4.2.13. Edema de orelha induzido por ácido araquidônico	32
5. Análise estatística	32
6. Resultados	32
6.1. Processo de extração	32

6.2. Toxicidade aguda e “screening” hipocrático	33
6.3. Contorção abdominal induzida pelo ácido acético	35
6.4 Avaliação da performance motora “Rota Rod”	36
6.5. Teste de formalina	37
6.6. Placa quente ou “Hot Plate”	38
6.7. Avaliação da participação sistema opioidérgico na antinocicepção	40
6.8. Avaliação da participação dos receptores opióides na antinocicepção	41
6.9. Avaliação da motilidade intestinal	42
6.10. Avaliação da participação do sistema serotonérgico na antinocicepção	43
6.11. Avaliação da participação da via L-arginina NO na antinocicepção	44
6.12. Avaliação da participação do sistema glutamatérgico na antinocicepção	45
6.13. Modelo de edema de orelha induzido pelo xilol	46
6.14. Modelo de edema de orelha induzido pelo ácido araquidônico	47
7. Discussão	48
8. Conclusão	61
9. Referências Bibliográficas	62
10. Anexos	72
10.1 Anexo 1	76
10.2. Anexo 2	77
10.3. Anexo 3	79

INTRODUÇÃO

1.1. Dor

A dor é uma qualidade sensorial complexa e indefinida, difícil de ser descrita ou interpretada, pois é uma experiência envolvendo múltiplos fatores. Além da nocicepção, neste processo também existe a participação de componentes cognitivos, afetivos e emocionais (Neugebauer *et al.*, 2009). A nocicepção é definida como a percepção de um estímulo nocivo traduzido em impulso nervoso (Almeida *et al.*, 2004). O termo nocicepção e antinocicepção são adotados para os animais e sua avaliação é realizada de forma indireta através dos componentes fisiológicos da dor (Jones, 1992; Tjolsen e Hole, 1997).

Na homeostasia, a dor desempenha um papel fundamental ao sinalizar que algo está errado no organismo (Willis Jr., 1997) A propagação da dor é iniciada através da ativação de nociceptores distribuídos pela pele, vísceras, articulações, músculos, tendões e vasos sanguíneos (Julius e Basbaum, 2001; Guyton e Hall, 2011). Os nociceptores são terminações livres de neurônios aferentes primários que podem ser ativados por estímulos nocivos mecânicos, térmicos ou químicos e estão distribuídos por todos os tecidos do organismo, com exceção do tecido nervoso (Meyer *et al.*, 1994; Millan, 1999; Julius e Basbaum, 2001). Os corpos celulares dos nociceptores estão localizados dentro dos gânglios das raízes dorsais e conduzem as informações de nocicepção ao SNC (Russo e Brose, 1998; Besson, 1999; Millan, 1999).

Os nociceptores são divididos em 3 subtipos: os mecanoreceptores que respondem à pressão; os mecanotérmicos que respondem à pressão e também ao calor; os polimodais que respondem não apenas à pressão e ao calor, mas também aos estímulos químicos (Natalini, 2000; Willis Jr., 2007). Os nociceptores são ligados ao SNC por fibras nervosas A δ e por fibras C. A condução dos impulsos nociceptivos são realizados pelas fibras aferentes primárias do tipo A δ , que são caracterizadas como fibras mielinizadas, de pequeno calibre que e promovem a condução rápida do estímulo doloroso. As fibras do tipo C são fibras desmielinizadas e possuem baixa velocidade de condução e, conduzem o estímulo doloroso mais difuso e prolongado (Machado, 2000; Natalini, 2000).

As fibras sensoriais primárias ou neurônios sensoriais primários realizam sinapse no corno dorsal da medula espinhal com neurônios de segunda ordem (Hill, 2001). Esses neurônios cruzam a medula espinhal para ascender ao trato espinotalâmico ocorrendo assim uma projeção dos seus corpos celulares ao tálamo (Russo e Brose, 1998).

O trato espinotalâmico, localizado na substância branca ventral, é a via mais importante de transmissão do estímulo doloroso e da ativação dos neurônios nociceptivos de segunda ordem tendo como resultado a resposta reflexa espinhal e também a ativação dos tratos ascendentes, os quais transmitem a informação nociceptiva para as estruturas supra-espinhais, completando assim, a via nociceptiva (Guyton e Hall, 2011).

No tálamo, os neurônios de terceira ordem são ativados através da transmissão da informação do estímulo doloroso ao córtex somatossensorial no qual ocorre a percepção da dor (Vanderah, 2007). O córtex, que é uma região final da projeção da dor, assim como o tálamo, são responsáveis pela discriminação do tipo de sensação dolorosa (Guyton e Hall, 2011).

A via supraespinhal (ou via descendente), responsável pelo controle da nociceção, é originada em várias regiões cerebrais tais como a substância cinzenta periaquedutal (PAG), os núcleos medianos da rafe e a medula rostral ventromedial (RVM). A via supraespinhal possui um importante papel na determinação tanto da dor crônica como na aguda (Heinricher e Ingram, 2008; Heinricher *et al.*, 2009). O sistema PAG-RVM é região alvo de alguns medicamentos como os inibidores das ciclooxigenases (COX), sendo importante no comportamento e nos aspectos terapêuticos da dor (Hohmann *et al.*, 2005; Leith *et al.*, 2007).

A modulação da dor ocorre por alterações no Sistema Nervoso em resposta aos estímulos nocivos e permitem que estímulos nocivos recebidos no corno dorsal da medula espinhal possam ser inibidos seletivamente, ocorrendo assim uma modificação da transmissão do sinal nocivo para centros superiores. O sistema de modulação endógeno da dor consiste de interneurônios bem definidos, localizados dentro das camadas superficiais da medula espinhal e do trato neuronal descendentes, que podem inibir a transmissão do sinal de dor (Yaksh, 2006).

Os neurotransmissores são fundamentais na sensibilização do corno dorsal, e são liberados por terminações axônicas de neurônios nas junções sinápticas e atuam localmente para controlar a ação das células nervosas, apresentando tanto função excitatória ou inibitória da dor (Guyton e Hall, 2011). Os neurotransmissores, glutamato e a substância P (SP), atuam sobre seus respectivos receptores e atuam sinergicamente para promover a excitabilidade neuronal no corno dorsal, através de mecanismos que envolvem o aumento da expressão de óxido nítrico (NO) (Sakurada *et al.*, 1996).

O glutamato é um aminoácido excitatório liberado juntamente com neuropeptídeos dos terminais de aferentes primários. O glutamato funciona como neurotransmissor e gera

potenciais excitatórios pós-sinápticos rápidos que são responsáveis pela ativação de neurônios pós-sinápticos espinotalâmico. Os neuropeptídeos, como a SP, são capazes de prolongar a ação do glutamato (Kandel *et al.*, 2000).

A substância P (um peptídeo da família das taquicinininas) é importante para a nocicepção ou sensibilização da dor. A SP está envolvida na transmissão nociceptivas de aferentes da fibra C, podendo mediar às sinapses entre as fibras aferentes primárias e o neurônio do corno dorsal da medula. A SP é neuromoduladora da excitabilidade pós-sináptica e está relacionada com os potenciais pós-sinápticos lentos que apresentam longa duração e pequena intensidade (Dickeson, 1995; Bromm, 1998; Li e Zhuo, 2001).

Os opióides endógenos também têm papel na nocicepção e modulam fisiologicamente a sensação dolorosa e a resposta frente à dor, sendo conhecidos também como endorfinas, encefalinas e dinorfinas e liberados em situações de estresse associados à dor. Os opióides endógenos atuam em receptores próprios, reduzem a liberação de neurotransmissores envolvidos na resposta da dor, e conseqüentemente, inibem a percepção da sensação dolorosa (Berne e Levy, 1996; Van Loon e Appel, 2000; Chevlen, 2003; Guyton e Hall, 2011).

A serotonina (5-HT) pode exercer ações antinociceptiva e também nociceptiva. Na periferia, a 5-HT é liberada por mastócitos e plaquetas, e é considerada um mediador inflamatório. No SNC, 5-HT está associada, tanto com o processamento quanto com a modulação da dor. Quando a 5-HT é liberada no corno dorsal da medula espinhal, por estimulação da PAG, ocorre a inibição do corno dorsal pela excitação de interneurônios inibitórios (Sawinok e Reid, 1996; Millan 1999; Sommer, 2004).

1.2. Inflamação

A inflamação é uma resposta imune complexa relacionada ao dano tecidual e/ou celular causada por estímulos químico, físico, imunológico ou microbiano (Hume e Fairlie, 2005; Serhan e Savil, 2005). A inflamação foi caracterizada clinicamente 30 anos a.C. por um médico romano, Aulus Cornélius Celsus, através de quatro sinais cardinais: calor, rubor, edema e a dor. Posteriormente Cláudio Galeno acrescentou o quinto sinal que é a perda da função do membro afetado. O objetivo da inflamação é restaurar a homeostasia levando à resolução ou finalização do processo inflamatório. Porém, quando esta resposta não é modulada, ocorre exacerbação do processo inflamatório podendo tornar-se crônico e conduzir à perda de função (Gilroy *et al.*, 2004).

Em geral, as lesões teciduais desencadeiam uma reação inflamatória local através do recrutamento de leucócitos que liberam mediadores inflamatórios locais tais como: cininas (bradicinina e calidina), citocinas (interleucinas e fator de necrose tumoral), aminas (serotonina e histamina) e prostanóides (prostaglandinas, prostaciclina e leucotrienos). Esses mediadores são capazes de estimular e sensibilizar os nociceptores provocando a dor (Taiwo e Levine, 1991; Guieu *et al.*, 1996; Millan, 1997; Millan, 1999; Calixto, 2000a; Calixto *et al.*, 2001).

Após o estímulo inflamatório local, as alterações vasculares iniciam-se imediatamente e desenvolvem-se durante as primeiras horas. Essas alterações consistem em vasodilatação, aumento de fluxo sanguíneo local, aumento de permeabilidade vascular e exsudação de plasma (Lima *et al.*, 2007).

Uma característica importante da inflamação aguda é a vasodilatação produzida por diversos mediadores tais como: histamina, PGE₂, IL-1 β , NO dentre outros. Inicialmente a vasodilatação é mediada por NO e prostaglandinas vasodilatadoras (PGE₂ e PGI₂). A infiltração de leucócitos nos tecidos é um dos principais eventos da inflamação e da dor, pois produz liberação de NO pela enzima óxido nítrico sintase do tipo induzida (iNOS). A iNOS é ativada por estímulos imunológicos levando à produção de NO, em grande quantidade. O NO contribui para a vasodilatação no processo de inflamação aguda (Shen *et al.*, 1995; Vallance e Chan, 2001; Pokharel *et al.*, 2006; Chiu *et al.*, 2011).

Outra característica da inflamação aguda é o exsudato líquido ou edema que é causado devido ação de histamina, bradicinina, acetilcolina, PGE₂, TNF- α , IL-1 β leucotrienos B₄, SP, componentes do sistema complemento e fator de ativação plaquetária (Denzlinger *et al.*, 1985; Teixeira, 2001; Arya e Kumar, 2005). Cada um destes componentes presentes no exsudato tem relevância no processo inflamatório e cada um deles será discutido a seguir.

A histamina apresenta um importante papel na resposta inflamatória como a vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular. A 5-HT está presente nas plaquetas e mastócitos e promove o aumento da permeabilidade vascular bem como a vasoconstrição (Goadsby *et al.*, 2002; Criado *et al.*, 2010).

A SP é um neurotransmissor encontrado no SNC e no trato gastrointestinal, atua como potente vasodilatador e aumenta a permeabilidade vascular na resposta inflamatória. A bradicinina é gerada logo após a lesão tecidual e contribui no processo inflamatório pelo aumento da permeabilidade vascular, extravasamento plasmático, migração celular para o foco inflamatório (Calixto *et al.*, 2000b; O'Connor *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2011).

A IL-1 β modula a excitabilidade neuronal via receptores TRPV-1, canal de sódio, ácido gama-aminobutírico (GABA) e receptor de glutamato (NMDA), além de facilitar a transmissão da dor (Brenner *et al.*, 2004; Schafers e Sorkin, 2008).

O TNF- α interage em uma cascata de citocinas e pode induzir dor diretamente ou através da estimulação da síntese de IL-1 β , IL-6 e IL-8 (Cunha *et al.*, 2005). Este é um dos principais mediadores envolvidos no desenvolvimento da dor articular (Ieda *et al.*, 2001).

O ácido araquidônico tem papel fundamental na inflamação, pois serve de substrato para ação de diferentes enzimas que geram eicosanóides distintos, como prostaglandinas (PGE₂) e leucotrienos. O ácido araquidônico sofre ação da ciclooxigenase (COX) que se apresenta em duas principais isoformas: COX-1, a isoforma constitutiva, responsável pela produção de prostaglandinas (PGs) que controlam os processos fisiológicos normais, e COX-2, isoforma induzida, tem a sua expressão ativada nos processos inflamatórios (Balsinde *et al.*, 1998; Lages *et al.*, 1998; Smith *et al.*, 2000; Kummer e Coelho, 2002).

Dentre as prostaglandinas produzidas no processo inflamatório, a PGE₂ é essencial para o controle do fluxo sanguíneo e dilatação dos vasos. Trata-se de um prostanóide com inúmeras funções no organismo, entre elas, o mecanismo de proteção gástrica (Levy *et al.*, 2001; Wallace, 2008).

Uma resposta inflamatória aguda resulta da eliminação do agente nocivo, seguida pela fase de resolução e reparo, se a inflamação aguda falha na eliminação do patógeno, ou na regeneração do tecido lesado, o processo inflamatório persiste e levando a um estado inflamatório crônico que envolve a formação de granuloma, necrose e fibrose, que resultarão em um maior dano e possível perda de função tecidual (Medzhitov, 2008).

2. JUSTIFICATIVA

2.1 Terapêutica atual para dor aguda e inflamação:

A dor é a maior causa de afastamento do trabalho e também está presente em mais de 70% dos pacientes que procuram consultórios médicos no Brasil. Portanto, o estudo da dor é cada vez mais relevante e o seu tratamento é essencial na medicina moderna para melhoria da qualidade de vida da população (Bruno, 2001; Bourinet *et al.*, 2005; Rocha *et al.*, 2007).

Os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) são medicamentos amplamente utilizados para o tratamento da dor e inflamação 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 são realizadas mais de 100 milhões de prescrições deste medicamento anualmente (Laine, 2001; Schlansky e Hwang, 2009).

Os AINES têm uma estrutura química variada e possuem atividades analgésica, antipirética e anti-inflamatória (Teixeira, 2001). O seu mecanismo de ação deve-se à inibição da atividade de COX-1 e COX-2 que impede a conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas (Amann e Peskar, 2002). Entretanto, estudos têm demonstrado que alguns AINES podem atuar por vias independentes da COX. Rhind *et al.* (2002), observaram que a indometacina inibiu a produção de citocinas, e alguns AINES são capazes de inibir a atuação dos mastócitos e bloquear a atuação do NF- κ B (Mortaz *et al.*, 2005).

O uso indiscriminado dos AINES pode levar a diversos efeitos colaterais, 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, provocando alterações microvasculares, e também induzir à infiltração leucocitária. Esses últimos efeitos resultam em dano à mucosa gástrica (Akiko *et al.*, 2001). As PGs aumentam a secreção de íons bicarbonato que são responsáveis pela redução da acidez estomacal e também geram o espessamento da camada de muco no estômago. Quando esses fatores protetores são rompidos, por inibição da COX-1, ocorrem ulcerações podendo ocorrer perfuração da parede gástrica (Silverstein *et al.*, 1995).

Portanto, o principal fator limitante do uso dos AINES é a toxicidade no trato gastrointestinal (Laine, 2003). Devido à hemorragia decorrente da terapia com AINES, são estimadas mais de 2000 mortes por ano e um gasto de 128 milhões de Euros com medicamentos com ação gastroprotetora na Alemanha (Steinmeyer, 2000).

Na década de 90, na tentativa de minimizar os efeitos adversos dos AINES surgiram os inibidores seletivos da COX-2 (Coxibs) utilizados, inicialmente, para o tratamento de artrites reumatóides e inflamações crônicas (Vonkerman e Van de Laar, 2010). Os Coxibs surgiram como nova opção terapêutica para o tratamento da inflamação. Contudo, esses medicamentos atuam no sistema cardiovascular onde existe um equilíbrio da ação da COX-1 e COX-2 e os Coxibs acoplam-se, irreversivelmente, à COX-2 inibindo a síntese de prostaciclina antitrombóticas. Como consequência os inibidores seletivos da COX-2 acarretam o

desequilíbrio da homeostase em favor da trombogênese e da vasoconstrição, resultando em danos ao sistema cardiovascular e infartos do miocárdio (Vonkerman, 2006). Notou-se também que em pacientes com histórico prévio de úlcera gástrica, o uso desta classe de medicamento pode não ocorrer a cicatrização da lesão. A COX-2 desempenha papel importante na regulação dos mecanismos de defesa da mucosa gástrica, a sua presença é fundamental no processo de cicatrização (Motilva *et al.*, 2005). Em 2004, devido a um grande número de pacientes com problemas cardiovasculares decorrente do uso do rofecoxib (Vioxx®), este medicamento foi retirado do mercado brasileiro e as bulas dos inibidores seletivos da COX-2 que ainda permanecem como opção terapêutica, devem relatar aos pacientes sobre os seus riscos cardiovasculares (Botting, 2006).

Recentemente, no Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) aumentou o controle da venda dos AINEs seletivos para COX-2, incluindo na lista de substâncias sob controle especial (Lista C1 da Portaria 344/98) - Resolução RDC nº. 79, de 04 de novembro de 2008. Os anti-inflamatórios desta classe só podem ser vendidos com retenção da receita médica pelo estabelecimento farmacêutico (Anvisa, 2008). Em consequência de todos os aspectos citados, os coxibs deixaram de ser uma alternativa segura aumentando assim a falta de opções terapêuticas para o tratamento da dor (Veldhuyzen, 1997; Steinmeyer, 2000; Laine, 2003).

2.2. Plantas na terapêutica da dor e inflamação.

As plantas são uma importante fonte de produtos naturais biologicamente ativos e são consideradas um caminho promissor para a descoberta de novas substâncias. Pressões evolutivas induziram com que as mesmas gerassem compostos de valor adaptativo, os metabólitos secundários. Sabe-se que muitas destas substâncias estão diretamente envolvidas em mecanismos que permitem à adequação da planta ao seu meio (Simões *et al.*, 2004).

Estudos mostraram que dentre 1010 drogas descobertas, 275 (cerca de 30%) são derivadas de produtos naturais e 13 dessas drogas apresentam potencial anti-inflamatório. A enorme biodiversidade vegetal é capaz de gerar fitoterápicos, fitofármacos e protótipos de novas drogas com elevada importância econômica e terapêutica (Calixto, 2000; Newman e Cragg, 2007). O mercado europeu e as grandes multinacionais apresentam interesse crescente na comercialização de fármacos produzidos por plantas, considerando os elevados valores investidos nesse setor (US\$ 7 bilhões em 1997) na qual 50% desse valor é referente somente ao mercado da Alemanha (Calixto, 2000).

Diversos produtos de origem vegetal apresentaram potencial farmacológico no tratamento de inflamações, dentre eles destacam-se terpenos, quinonas, catequinas, alcalóides e flavonóides (Khanna *et al.*, 2007).

Os flavonóides são compostos da família dos polifenóis abundantes no reino vegetal e estão presentes em vários alimentos. Em relação as suas propriedades biológicas, pode-se citar a atividade antioxidante, relacionada com a prevenção da peroxidação lipídica da membrana celular. Os flavonóides também atuam na inibição da enzima lipoxigenase - 5, conversora do ácido araquidônico em leucotrienos, que são mediadores de asma, alergias e inflamação, bem, como causam 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 NO (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 consequência, reduzem a resposta inflamatória (Friesenecker *et al.*, 1995).

Adicionalmente, estudos têm mostrado que flavonóides exercem um efeito inibitório na exsudação de proteínas e na migração de leucócitos para o sítio inflamatório, bem como sua ação na liberação de ácido araquidônico dos fosfolipídeos, presentes nas membranas celulares, por ação da fosfolipase A2. Estudos demonstram que a quercetina inibe a fosfolipase A2 de leucócitos, de coelhos e humanos (Landolfi *et al.*, 1984; Harbone, 1994).

Além do potencial anti-inflamatório, os flavonóides também apresentam atividade gastroprotetora. O extrato metanólico das folhas de *Byrsonima crassa* Niedenzu cujo perfil fitoquímico detectou a presença abundante de flavonóides derivados da quercetina, possui efeito gastroprotetor no modelo experimental de úlcera induzida pela associação de ácido clorídrico e etanol (Sannomiya *et al.*, 2005).

O perfil químico da família Myrtaceae é caracterizado pela presença de taninos, flavonóides, monoterpenos, sesquiterpenos, triterpenóides, entre outros (Cruz e Kaplan, 2004). A subfamília Myrtoideae, que inclui o gênero *Eugenia* apresenta flavonóides e óleos voláteis na sua composição química e o gênero *Myrcia* apresenta espécies com flavonóides em sua composição química. *Myrcia uniflora*, *Myrcia multiflora*, *Myrcia guianensis*, *Myrcia salicifolia*, *Myrcia speciosa*, *Myrcia sphaerocarpa*, *Myrcia guianense* revelaram a existência de propriedades biológicas de várias substâncias isoladas e também nos extratos brutos e infusões. A *Myrcia mutiflora* possui atividade anti-diabética, com efeito inibitório sobre

aldose redutase e α -glucosidase (Yoshikawa *et al.*, 1998; Costa *et al.*, 2000; Matsuda *et al.*, 2001; Matsuda *et al.*, 2002a; Matsuda *et al.*, 2002b; Cruz *et al.*, 2004; Limberger *et al.*, 2004; Souza, 2008). Porém, apesar da composição fitoquímica promissora nos estudos farmacológicos, não existem estudos que assegurem um potencial efeito analgésico e/ou anti-inflamatório de espécies deste gênero.

Estudos prévios *in vivo* realizados em nosso laboratório demonstraram que a administração oral de 250 mg/Kg do extrato hidroalcoólico de *Myrcia bella* (figura 1) diminuiu em 49% a nocicepção de camundongos na fase inflamatória no teste da formalina. Com base nestes resultados iniciais, estudos mais aprofundados foram realizados neste trabalho com o extrato hidroalcoólico de *Myrcia bella* como nova alternativa terapêutica para tratamento da dor e da inflamação.



Figura 1. *Myrcia bella* <http://www.flickr.com/photos/38938362@N05/4257332183/>

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade anti-nociceptiva e anti-inflamatória do extrato hidroalcoólico das folhas de *Myrcia bella* em modelos experimentais *in vivo*.

2.1 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade analgésica e/ou anti-inflamatória do extrato hidroalcoólico de *Myrcia bella* utilizando o modelo de nocicepção com agentes químicos e térmicos em camundongos.
- Avaliar o efeito do extrato hidroalcoólico de *Myrcia bella* sobre a performance motora de camundongos no modelo de Rota Rod e sobre a motilidade intestinal.
- Determinar o potencial efeito anti-edematogênico do extrato no modelo de inflamação aguda induzida pelo xilol e induzida pelo ácido araquidônico (AA).
- Identificar possíveis mecanismos de ação analgésica do extrato hidroalcoólico de *Myrcia bella* através da investigação do seu efeito sobre vias do óxido nítrico, do sistema serotoninérgico, do sistema opioidérgico e do sistema glutamatérgico.

4. MATERIAIS E MÉTODOS:

4.1. Material Vegetal

As amostras foram coletadas e identificadas no Instituto Florestal e Estações Experimentais Floresta Estadual de Assis pelo Dr. Antônio C. G. Melo no período de dezembro de 2009. O espécime da *Myrcia bella* foi depositado no Herbário da Unicamp: UEC 157583. As folhas da planta foram coletadas em dezembro de 2009 e passaram pelo processo de trituração e secagem a 40°C.

4.1.1. Preparação dos extratos

A partir de 10 g do material vegetal 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 temperatura máxima de 40 °C e seu rendimento foi de 44%,. A caracterização fitoquímica do extrato hidroalcoólico está sendo

realizada pela Profa. Dr.a Anne Lígia Dokkedal Bosqueiro da Faculdade de Ciências da Unesp de Bauru – SP.

4.2. Animais experimentais

Foram utilizados camundongos Swiss albinos machos e fêmeas (25-35g) provenientes do Biotério Central de Botucatu e camundongos Swiss machos provenientes da Anilab, Paulínia-SP. Os animais foram aclimatados às condições do Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia da Unesp de Botucatu por pelo menos sete dias antes da manipulação experimental, sob temperatura ($23 \pm 2^\circ\text{C}$) e ciclo controlado claro-escuro de 12 horas. Os animais foram alimentados com ração Purina® e água *ad libitum*. Todos os experimentos obedeceram ao protocolo experimental que foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal, do Instituto de Biociências da UNESP – Botucatu (Protocolo número 368 – Anexo 1).

4.2.1. 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 hidroalcoólico de *Myrcia bella* 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 EHMB, bem como o número de mortes no grupo. 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, 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 significativas dos parâmetros adotados entre os animais tratados com o EHMB e tratados com o veículo foram indicativos de efeito tóxico agudo do extrato vegetal.

4.2.2. Contorção abdominal induzida pelo ácido acético (Koster *et al.*, 1959 com modificações).

Para a determinação de um possível efeito analgésico/anti-inflamatório do EHMB foi realizado o modelo de contorção abdominal induzida pelo ácido acético (0,8%) 10 ml/kg i.p. Este modelo consiste de uma resposta indicativa de dor da contorção abdominal dos animais

seguidas de extensões dos membros posteriores que são observados durante 15 minutos. O período de observação se dá de 5-20 minutos após a injeção do agente álgico. O tratamento dos camundongos machos (n=10) em jejum de 6 horas foi realizado oralmente pela administração de salina (10mL/kg) e EHMB nas doses de 125 mg/kg, 250 mg/kg ou ácido acetilsalicílico (AAS) na dose de 300 mg/kg que foi utilizado como controle positivo do modelo experimental.

4.2.3. Avaliação da performance motora “Rota Rod” (Dunham e Myia, 1957 com modificações).

Para avaliar o efeito do EHMB na performance motora dos camundongos machos (n=9) utilizou-se o aparelho de 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 10mL/kg) e EHMB (250 mg/kg) que receberam os diferentes tratamento oralmente administrados 60 minutos antes da avaliação da performance locomotora. Um outro grupo de animais recebeu o tratamento com diazepam (2,0 mg/kg), administrado via i.p. 30 minutos antes da avaliação. que foi utilizado como controle positivo. Foi analisado o número de quedas de cada animal durante os 3 minutos de observação.

4.2.4. Teste da formalina (Hunskaar e Hole, 1985 com modificações).

O modelo mais específico de dor aguda é caracterizado pelo teste de formalina. Este modelo possui fases distintas (bifásica) em resposta a dor: 1) Fase inicial: inicia-se logo após a administração de formalina e desaparece após aproximadamente 5 min. É uma fase indicativa de dor neurogênica (mecanismo central), que sofre ação principalmente de drogas narcóticas (opióides). 2) Fase tardia: inicia-se entre 15-30 min após administração de formalina e permanece até cerca de 60 min. Esta fase é indicativa de dor inflamatória, e sofre ação de AINEs e drogas narcóticas. Foi utilizada uma câmara de observação, que consiste em um funil com 20 cm de diâmetro. Cada camundongo macho (n= 10-12) 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 (10 mL/kg v.o.), e com o EHMB 125, 250 e 500 mg/kg. Após uma hora, foi então

administrada 20 µL de solução de formalina 2,7 % em salina que foi injetada intraplantarmente na pata traseira direita. Logo após a injeção de formalina, os animais foram observados na câmara durante 30 minutos. O tempo (em segundos) que o camundongo lambeu suas patas foi registrado e considerado como indicativo de dor. A menor dose efetiva neste modelo experimental do EHMB foi utilizada para caracterização dos mecanismos de ação.

4.2.5. Placa quente ou “Hot Plate” (Eddy e Leimbach, 1953 com modificações).

Esse modelo foi utilizado para avaliar o efeito do EHMB sobre a dor neurogênica. Para isso, a placa foi aquecida e mantida a temperatura constante de 50 °C. Os camundongos foram selecionados 24 horas antes da realização experimental e colocados em um cilindro de vidro de 24 cm de diâmetro em uma superfície quente e o tempo (segundos) em que o animal iniciasse a resposta de lambe, chacoalhar, retirar a pata ou pular foi registrado como tempo de latência. Foi determinado o tempo limite de 30 segundos sobre a placa quente para evitar maiores danos teciduais decorrente de possíveis queimaduras. Os animais camundongos machos (n=10-12) receberam o tratamento oral de veículo (salina 10 mL/kg) ou EHMB (250 mg/kg) 60 minutos antes da realização do teste. A morfina (5 mg/kg) foi utilizada como controle positivo neste modelo experimental e foi administrada pela via subcutânea 15 minutos antes da realização do teste da placa quente.

4.2.6. Avaliação da participação do sistema opioide na antinociceção (Santos *et al.*, 1999 e Santos *et al.*, 2005 com modificações).

Para avaliar a participação do sistema opioide na atividade antinociceptiva do EHMB, os camundongos machos (n=10-12) foram pré-tratados com 1 mg/kg de naloxona (antagonista de receptores opióides) 30 minutos antes dos tratamentos orais. Os animais receberam o tratamento oral com o veículo (salina 10 mL/kg) ou EHMB (250 mg/kg) 60 minutos antes da realização do teste e a morfina, utilizada como controle positivo, foi administrada s.c. (2,5 mg/kg) 20 minutos antes da injeção de formalina. Os animais foram observados na segunda fase do teste de formalina devido à ação nociceptiva observada anteriormente apenas nessa fase do modelo experimental.

4.2.7. Avaliação da participação dos receptores opióides na antinocicepção (Longhi-Balbinot *et al.*, 2011 com modificações).

Para avaliar a participação dos receptores opióides na atividade antinociceptiva do EHMB os camundongos machos (n=10-12) foram pré-tratados com (salina 10 mL/kg) de veículo i.p., (1 mg/kg) de CTOP (antagonista seletivo do receptor opióide μ) s.c., (1 mg/kg) de nor-binaltorfimina (antagonista seletivo do receptor opióide κ) i.p. ou (3 mg/kg) de naltrindole (antagonista seletivo do receptor opióide δ) s.c.. Após 20 minutos, os animais receberam oralmente veículo (salina 10 mL/kg), EHMB (250 mg/kg) ou morfina (2,5 mg/kg) s.c. A injeção de formalina foi realizada após 60 minutos de administração de salina ou de EHMB e 20 minutos depois da administração da morfina. A observação do tempo de lambida do animal foi realizada apenas na segunda fase do teste de formalina (15-30 minutos após a injeção) devido à ação nociceptiva ter sido observada apenas nessa fase do modelo experimental.

4.2.8. Determinação da motilidade intestinal (Baggio *et al.*, 2003).

Camundongos Swiss machos (n=8), em jejum de 6h foram divididos em grupos, que receberam seus respectivos tratamentos de veículo - salina 10 mL/kg (v.o.), morfina 2,5 mg/kg (s.c.) ou EHMB 250 mg/kg (v.o.). Após 30 minutos, todos os animais receberam carvão ativado a 10% (v.o.) em volume de 10 mL/kg. Após 30 minutos da administração do carvão, todos os animais foram mortos. Após a morte dos animais foi removido o intestino delgado juntamente com o estômago, para a realização da medição do comprimento total do intestino e a distância percorrida pelo carvão ativado, para ser analisado a obtenção da relação distância percorrida pelo carvão e o comprimento total do intestino. Os dados obtidos dessa relação (%) foram convertidos em arco seno para posterior análise estatística.

4.2.9. Avaliação da participação do sistema serotoninérgico na antinocicepção (Santos *et al.*, 1999 e Santos *et al.*, 2005 com modificações).

Para avaliar o envolvimento do sistema serotoninérgico na atividade antinociceptiva do EHMB os camundongos machos (n=10-12) foram pré-tratados com 0,1 mg/kg de WAY100635 (antagonista 5 HT_{1A}) i.p, 1 mg/kg de ketanserina (antagonista 5 HT₂) i.p , 0,5 mg/kg de ondansetron (antagonista 5 HT₃) i.p ou 10 mL/kg de veículo (salina) 30 minutos antes dos tratamentos orais dos animais. No tratamento foi realizado a administração de veículo (salina 10 mL/kg) ou EHMB (250 mg/kg). A injeção de formalina foi realizada após

60 minutos de administração do tratamento. A observação do tempo de lambida do animal foi realizada apenas na segunda fase do teste de formalina (15-30 minutos após a injeção) devido à ação nociceptiva ter sido observada apenas nessa fase do modelo experimental.

4.2.10. Avaliação da participação do 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 extrato, camundongos machos (n=10-12) foram pré-tratados com 500 mg/kg de l-arginina (substrato da síntese de NO) i.p ou 10 mL/kg de veículo (salina) i.p. 30 minutos antes dos tratamentos orais. Os animais foram tratados oralmente 60 minutos antes da injeção de formalina, com 10mg/kg veículo (salina) ou 250mg/kg de EHMB. Como controle da reversão da anti-nocicepção foi administrado 65 mg/kg de l-name (inibidor da síntese de NO) i.p. 30 minutos após a injeção de l-arginina e os animais foram submetidos ao teste da formalina e observados durante a fase inflamatória.

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

Com o intuito de avaliar o papel do sistema glutamatérgico na atividade antinociceptiva do EHMB foi realizado uma injeção intraplantar de 20 µl a 30 µmol de glutamato. Os animais camundongos machos (n=10-12) foram tratados pela via oral com veículo (salina 10 mL/kg) ou EHMB (250 mg/kg) 60 minutos antes da injeção de glutamato e foram observados por 15 minutos. O tempo em segundos que o animal lambeu a pata foi considerado como indicativo de dor.

4.2.12. Edema de orelha induzido por xilol (Swingle *et al.*, 1981 com modificações).

Para avaliar o efeito anti-edematogênico do EHMB foi utilizado o modelo experimental de indução de edema com o uso tópico do xilol. Para indução desse edema de orelha, 40 µl de xilol foram aplicados topicamente na orelha esquerda dos camundongos (20 µl na face anterior da orelha, 20 µl na face posterior). A orelha direita foi utilizada como controle. Os camundongos machos (n=10) foram submetidos ao jejum por 2 horas e posteriormente, foram tratados 2 horas antes da indução do edema de orelha com 5 mg/kg, (i.p) de dexametasona e 60 minutos antes da indução do edema tratados oralmente com o veículo (salina 10 mL/kg) ou EHMB nas doses de 125 ou 250 mg/kg. Após uma hora da 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 e o edema foi expresso através da diferença de massa (em miligramas) entre a orelha esquerda e a orelha direita.

4.2.13. Edema de orelha induzido por ácido araquidônico (AA) (Young *et al.*, 1984 e Crummey *et al.*, 1987 com modificações).

Para avaliar a participação do AA na ação anti-edematogênica do EHMB, foi utilizado o modelo experimental de indução de edema com o uso tópico do AA. Para indução desse edema de orelha, 20 µl de AA diluído em acetona na concentração de 2mg/20µl, foram aplicados topicamente na orelha esquerda dos camundongos (10 µl na face anterior da orelha, 10 µl na face posterior). A orelha direita foi utilizada como controle. Os camundongos machos (n=10-12), submetidos ao jejum por 2 horas, foram tratados 2 horas antes da indução do edema com 5 mg/kg, (i.p) de dexametasona e uma hora antes da indução do edema tratados com oralmente com o veículo (salina) ou 125 mg/kg de EHMB. Após uma hora da 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 e o edema foi expresso através da diferença de massa (em miligramas) entre a orelha esquerda e a orelha direita.

5. Análise Estatística

Os resultados foram expressos na forma de média ± erro padrão da média dos parâmetros obtidos. Os valores médios obtidos foram submetidos à análise de variância de uma via (ANOVA), seguida do teste de Dunnett para comparação entre três grupos ou mais, 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

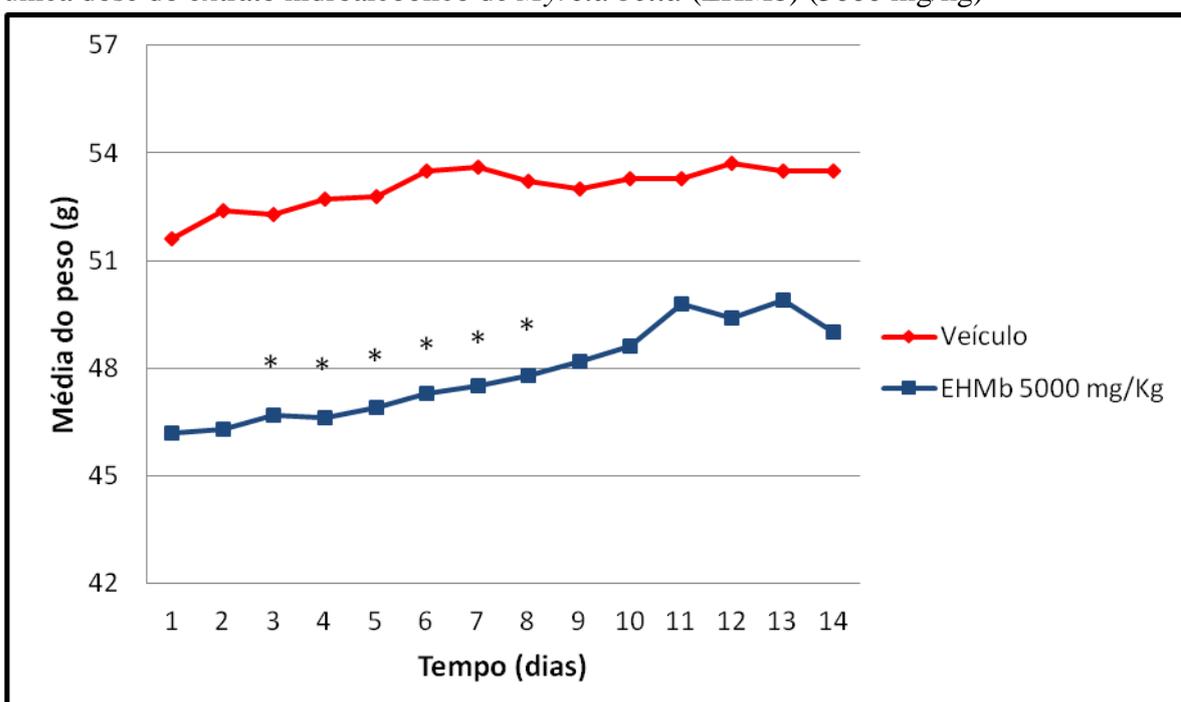
6.1. Processo de extração

O rendimento final da extração das folhas de *Myrcia bella* pelo método de maceração dinâmica durante 2 horas utilizando como solvente (Etanol: água 70:30) foi de 44%.

6.2. Toxicidade aguda e “screening” hipocrático

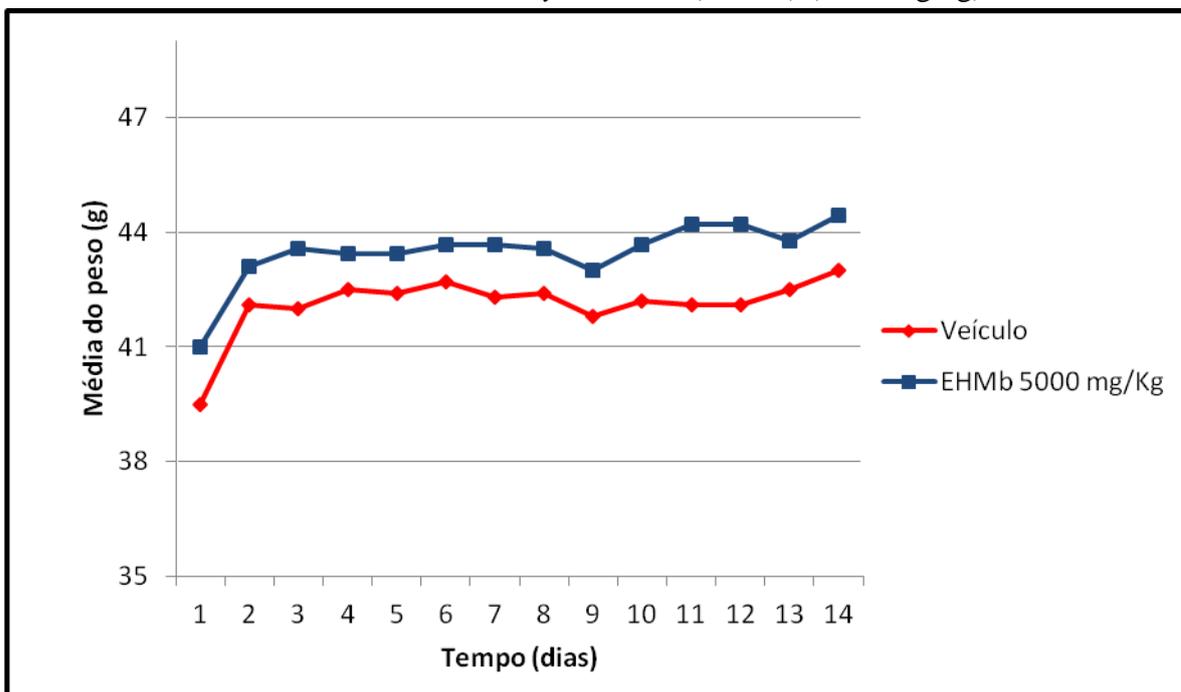
Os camundongos, machos e fêmeas, receberam a dose de 5000 mg/kg de EHMB e não foram detectadas alterações nos parâmetros comportamentais analisados (Anexo 3) e não ocorreu nenhuma morte nos grupos tratados com o extrato. A evolução do peso corporal dos animais foi acompanhada diariamente durante 14 dias após o tratamento. O grupo de camundongos machos tratados com veículo, quando comparados com os animais que receberam EHMB na dose de 5000 mg/kg, apresentaram alterações na evolução dos pesos corporais do 3º ao 8º dia de observação. Porém após o 8º dia o peso corporal desse grupo foi normalizado como observado na figura 2. A evolução do peso das fêmeas tratadas com o EHMB durante os 14 dias não apresentou nenhuma alteração quando comparado ao grupo tratado com o veículo (figura 3).

Figura 2. Evolução do peso corporal (g) de camundongos (machos) tratados oralmente com única dose do extrato hidroalcoólico de *Myrcia bella* (EHMB) (5000 mg/kg)



Média do peso (g) dos animais monitorados durante 14 dias. Os pontos representam as médias de peso dos grupos para cada dia de observação. Teste t “Student” * $p < 0,05$ vs grupo controle tratado com veículo.

Figura 3. Evolução do peso corporal (g) de camundongos (fêmeas) tratados oralmente com única dose do extrato hidroalcoólico de *Myrcia bella* (EHMb) (5000 mg/kg)



Média do peso (g) dos animais monitorados durante 14 dias. Os pontos representam as médias de peso dos grupos para cada dia de observação. Teste t “Student”.

Outro parâmetro analisado nesse modelo experimental foi o peso relativo dos órgãos, (coração, baço, pulmões, fígado e rins), obtidos pela razão entre o peso do órgão e peso total do animal transformado em arcoseno para adequação estatística. Para as fêmeas também foram analisados os pesos dos ovários e útero. Após a realização do teste estatístico, no qual se comparou o grupo tratado com o EHMb e o veículo, verificou-se que não existe diferença significativa entre os grupos de machos. Para as fêmeas (figura 4) foi observada uma redução significativa no peso dos pulmões (veículo $4,80 \pm 0,08$ e tratados com EHMb $4,49 \pm 0,10$). No entanto, quando foram analisado os pesos dos órgãos reprodutores das fêmeas, como mostrado na figura 5, não ocorreu nenhuma alteração significativa entre os grupos.

Figura 4. Efeito do tratamento agudo com o extrato hidroalcoólico de *Myrcia bella* (EHMb) (5000 mg/kg) sobre os órgãos de camundongos (g).

Tratamentos	N	Morte	Coração	Baço	Pulmão	Fígado	Rins
Veículo - Salina	10	0	4,00 ± 0,09	3,40 ± 0,12	4,40 ± 0,14	13,23 ± 0,26	6,58 ± 0,15
♂ EHMb (5000 mg/kg)	10	0	4,03 ± 0,07	3,55 ± 0,15	4,87 ± 0,21	12,97 ± 0,27	6,31 ± 0,07
Veículo - Salina	10	0	3,69 ± 0,07	3,52 ± 0,21	4,80 ± 0,08	12,46 ± 0,19	5,60 ± 0,12
♀ EHMb (5000 mg/kg)	8	0	3,76 ± 0,10	3,22 ± 0,12	4,49 ± 0,10*	11,87 ± 0,21	5,41 ± 0,12

Os dados são expressos pela média ± erro padrão da média. Teste t “Student”.

Figura 5. Efeito do tratamento agudo com o extrato hidroalcoólico de *Myrcia bella* (EHMb) sobre os órgãos reprodutivos de camundongos (g)

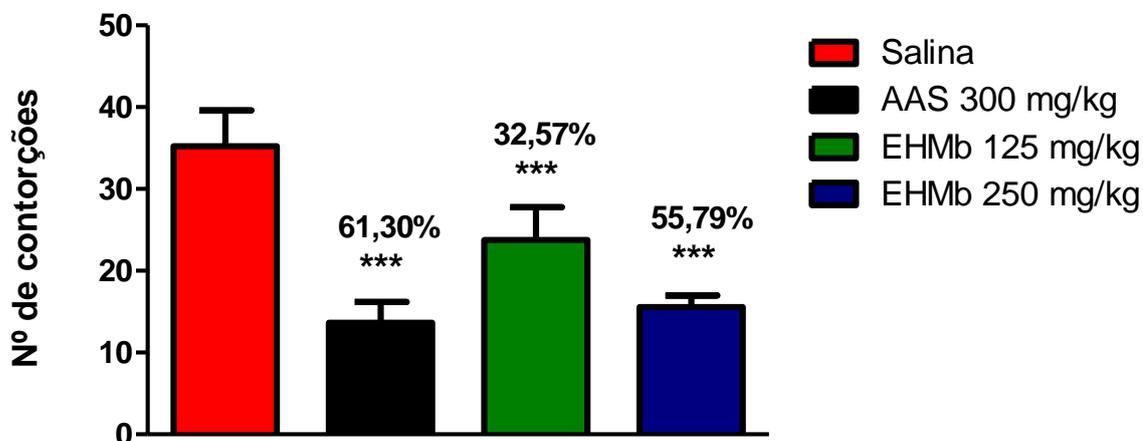
Tratamentos	Útero	Ovários#
Salina	2,39 ± 0,27	1,08 ± 0,06
EHMb (5000 mg/kg)	2,70 ± 0,33	1,13 ± 0,21

Os valores reais foram multiplicados por 100 para que fosse viável a realização da conversão dos dados em arco seno e posterior análise estatística. Os dados são expressos pela média ± erro padrão da média. Teste t “Student”.

6.3. Contorção abdominal induzida pelo ácido acético.

No modelo experimental de dor induzida pelo ácido acético, o grupo controle previamente tratado com solução salina, obteve 35 ± 4,4 contorções durante os 15 minutos de avaliação experimental. O tratamento dos animais com EHMb nas doses de 125 e 250 mg/kg, promoveu reduções expressivas no número de contorções abdominais em 32,57% (24 ± 4,0) e 55,79% (16 ± 1,4), respectivamente. O ácido acetilsalicílico (AAS), utilizado como controle positivo, apresentou uma redução do número de contorções abdominais em 61,3% (14 ± 2,6). Os resultados podem ser observados na figura abaixo.

Figura 6. Número de contorções abdominais, induzida pelo ácido acético i.p. (0,8%), de camundongos machos tratados oralmente com as dose de 125 mg/Kg e 250 mg/Kg do extrato hidroalcoólico de *Myrcia bella* (EHMb).

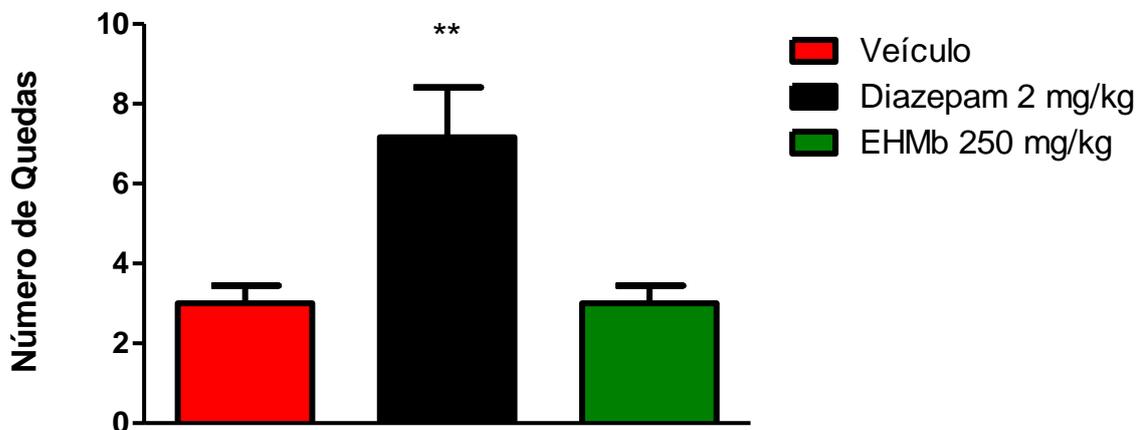


Os dados são expressos pela média \pm erro padrão da média (n=10). ANOVA seguida de Teste de Dunnett ***p<0,001. Os valores (%) correspondem á redução da média em relação ao grupo controle (veículo - salina).

6.4. Atividade de performace motora ‘‘Rota-rod’’.

No modelo experimental para avaliação da performace motora, o grupo controle, previamente tratado com solução salina obteve $3 \pm 0,44$ número de quedas durante os 3 minutos de avaliação experimental. O tratamento com EHMb na doses de 250 mg/Kg, não demonstrou alterarações no número de quedas dos animais ($3 \pm 0,44$) durante o período avaliado. O diazepam utilizado como controle positivo, apresentou um aumento expressivo do número de quedas dos animais em ($7,17 \pm 1,25$) como podemos observar na figura 7.

Figura 7. Número de quedas de camundongos machos tratados oralmente com as dose do extrato hidroalcoólico de *Myrcia bella* (EHMb) na dose de 250 mg/Kg no modelo de Rota rod.

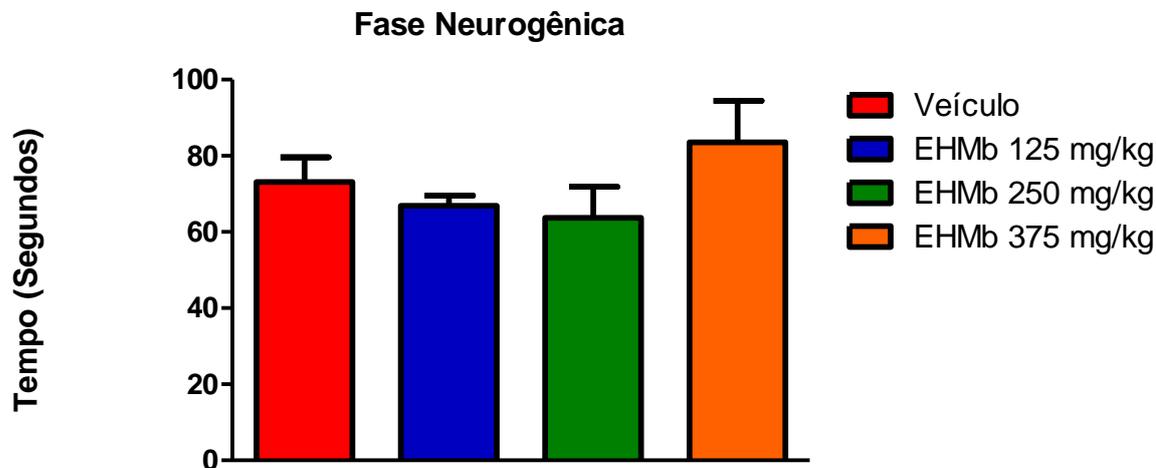


Os dados são expressos pela média \pm erro padrão da média (n=9). ANOVA seguida de teste de Dunnett $**p < 0,01$.

6.5. Teste da formalina

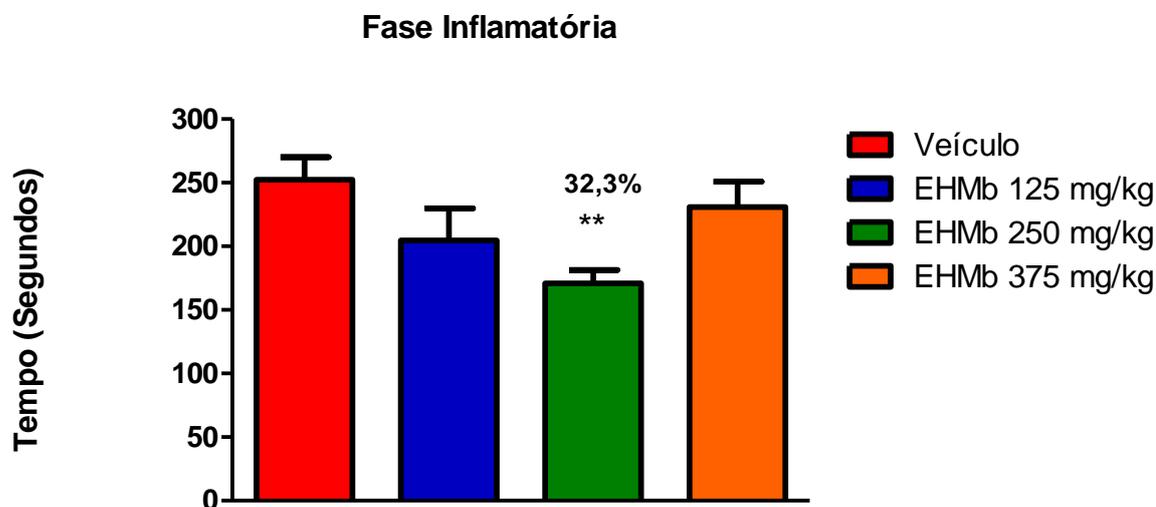
No modelo experimental de indução de dor por formalina, o EHMb não apresentou redução significativa no tempo de lambida na fase neurogênica em nenhuma das doses testadas, como demonstra a figura 8. Porém na fase inflamatória, os animais apresentaram uma diminuição significativa da nocicepção. Somente a dose de 250 mg/Kg do EHMb reduziu em 32,3% ($170,8 \pm 10,7s$) a resposta a dor quando comparada ao grupo veículo ($252,64 \pm 17,68s$). As demais doses do EHMb avaliadas não apresentaram diminuição significativa no tempo de resposta dos animais. Estes resultados são apresentados nas figuras 8 e 9.

Figura 8. Avaliação da atividade antinociceptiva do extrato hidroalcoólico de *Myrcia bella* (EHMb) nas doses de 125, 250 e 375 mg/Kg no modelo de formalina na fase neurogênica.



Os dados são expressos pela média \pm erro padrão da média (n=10-12). ANOVA seguida de teste de Dunnett.

Figura 9. Avaliação da atividade antinociceptiva do extrato hidroalcoólico de *Myrcia bella* (EHMb) nas doses de 125, 250 e 375 mg/Kg no modelo de formalina na fase inflamatória.



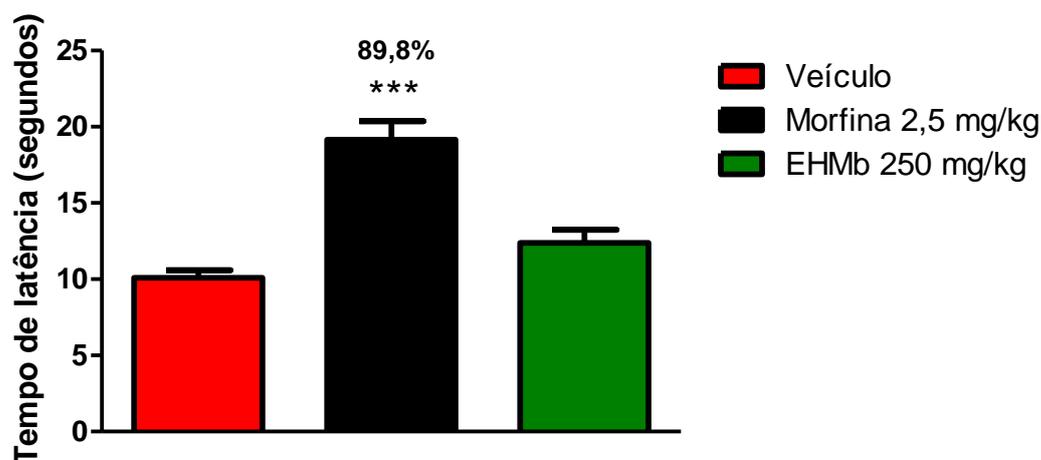
Os dados são expressos pela média \pm erro padrão da média (n=10-12). Seguida de teste de Dunnett **p<0,01. Os valores (%) correspondem á redução da média em relação ao grupo controle (veículo - salina).

6. 6. Teste da placa quente

No teste da placa quente a 50°C, os animais tratados com morfina aumentaram o tempo de reação ao estímulo térmico em 89,8% (19,17 \pm 1,19s) após 30 minutos do

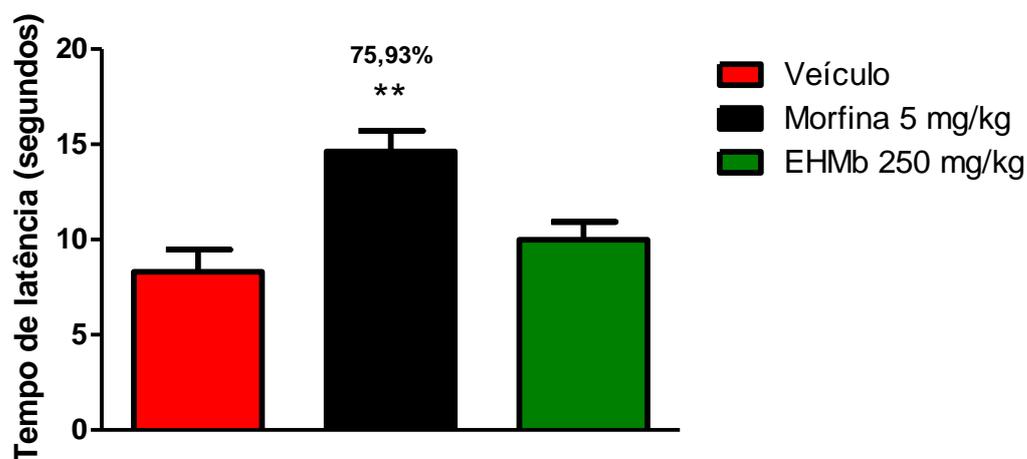
tratamento, 75,93% ($14,62 \pm 1,1s$) após 60 minutos e 73,38% ($16,09 \pm 2,28s$) após 120 minutos, como pode ser observado nas figuras 10, 11 e 12, respectivamente. O EHMb na dose de 250 mg/Kg não foi capaz de aumentar o tempo de reação ao estímulo térmico dos animais após 30 minutos ($12,38 \pm 0,87s$), 60 minutos ($9,99 \pm 0,93s$) e nem após 120 minutos ($13,78 \pm 1,18s$).

Figura 10. Avaliação da atividade antinociceptiva do extrato hidroalcoólico de *Mycia bella* (EHMb) na dose de 250 mg/Kg no teste da placa quente a 50°C, avaliação após 30 minutos da administração da morfina.



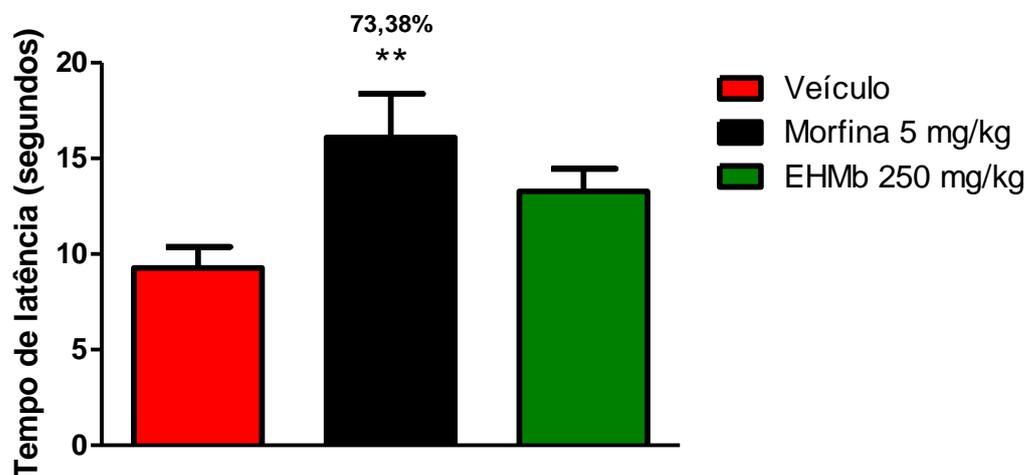
Os dados são expressos pela média \pm erro padrão da média (n=10-12). ANOVA seguida de teste de Dunnett ***p<0,001. Os valores (%) correspondem ao aumento da média em relação ao grupo controle (veículo - salina).

Figura 11. Avaliação da atividade antinociceptiva do extrato hidroalcoólico de *Mycia bella* (EHMb) na dose de 250 mg/kg no teste da placa quente a 50°C, avaliação após 60 minutos da administração da morfina.



Os dados são expressos pela média \pm erro padrão da média (n=10-12). ANOVA seguida de teste de Dunnett **p<0,01. Os valores (%) correspondem ao aumento da média em relação ao grupo controle (veículo - salina).

Figura 12. Avaliação da atividade antinociceptiva do extrato hidroalcoólico de *Mycia bella* (EHMb) na dose de 250 mg/Kg no teste da placa quente a 50°C, avaliação após 120 minutos da administração da morfina.

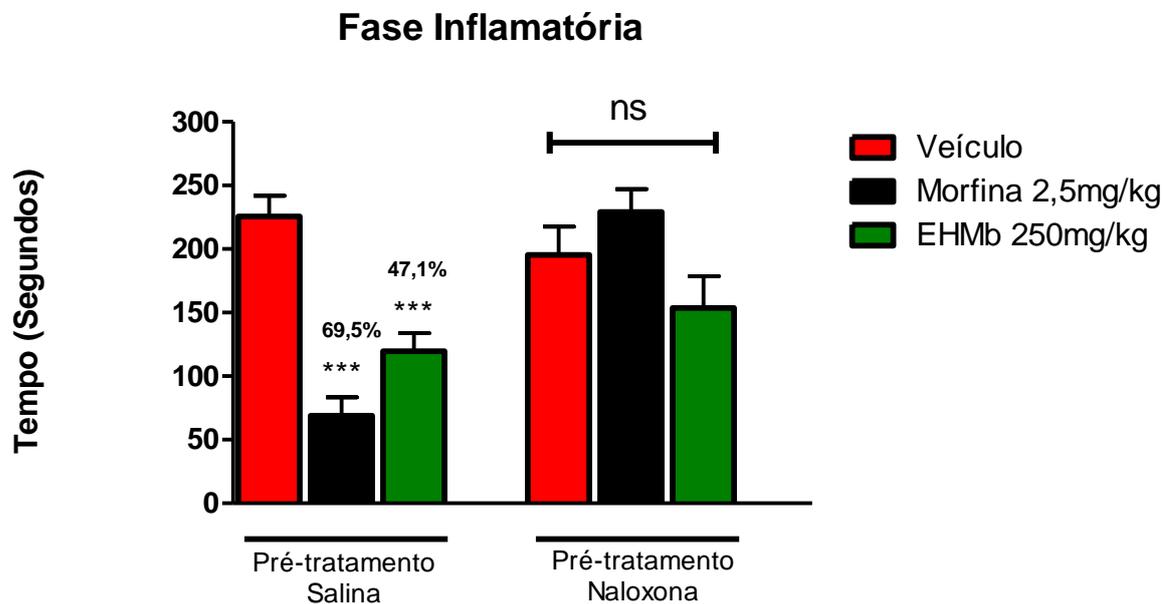


Os dados são expressos pela média \pm erro padrão da média (n=10-12). ANOVA seguida de teste de Dunnett $**p < 0,01$. Os valores (%) correspondem ao aumento da média em relação ao grupo controle (veículo - salina).

6.7. Avaliação da participação do sistema opioidérgico na anti-nociceção.

Como a observação da ação antinociceptiva do extrato ocorreu apenas na fase inflamatória, esta fase foi utilizada para caracterização do mecanismo de ação da via opioideérgica. Neste ensaio, os animais que receberam o pré-tratamento com veículo - salina 10 mL/Kg (i.p.) e o tratamento com morfina apresentaram uma redução de 69,5% ($68,88 \pm 14,58s$) na nociceção e o EHMb obteve uma redução de 47,1% ($119,6 \pm 14,39s$). Quando foi realizado o pré-tratamento com naloxona e o tratamento com a morfina, a naloxona reverteu a antinociceção causada pela morfina ($229,1 \pm 17,94s$) e também pelo EHMb ($153,6 \pm 25,07s$). No entanto, quando se compara os animais que receberam o pré-tratamento de salina e os animais que receberam o pré-tratamento com naloxona (ambos recebendo o tratamento com o extrato) não ocorreu uma diferença significativa entre eles.

Figura 13. Avaliação da participação do sistema opióide na atividade antinociceptiva do extrato hidroalcoólico de *Myrcia bella* (EHMb) na dose de 250 mg/Kg no modelo de formalina na fase inflamatória.



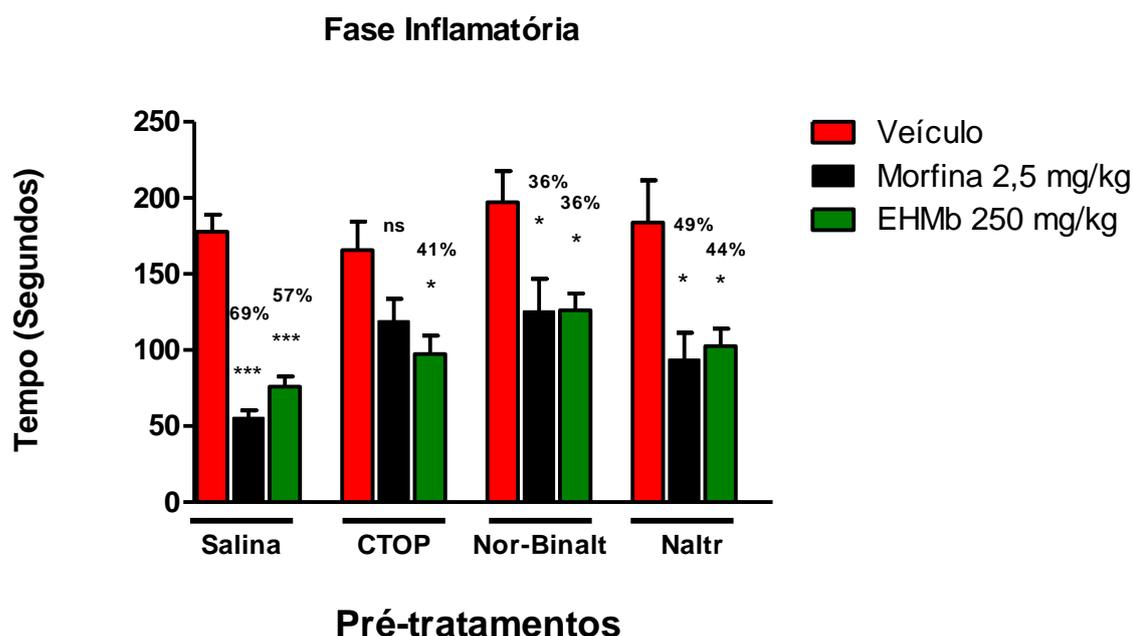
ANOVA seguida de teste Dunnett *** $p < 0,001$; ns = não significativo. As barras representam os valores de média em segundos \pm erro padrão da média. As porcentagens indicam a ação antinociceptiva em relação aos seus respectivos grupos controles tratado com veículo (n= 10-12).

6.8. Avaliação da participação dos receptores opióides na antinocicepção.

Para avaliar o envolvimento dos receptores opióides na atividade antinociceptiva do EHMb foi utilizado o modelo de formalina (figura 14) na qual se avaliou a fase inflamatória. O grupo de animais que recebeu o pré-tratamento de veículo e tratamento com morfina apresentou uma redução de 69% ($55,42 \pm 4,96s$) do tempo de resposta a dor. Os animais que foram tratados com o EHMb também apresentaram uma redução de 57% da resposta a dor ($76 \pm 6,50s$) quando comparados as animais que receberam o tratamento de salina ($177,8 \pm 11,26s$). Os animais que receberam o pré-tratamento de CTOP (antagonista do receptor opióide μ), e posteriormente foram tratados com morfina, como esperado não apresentaram antinocicepção ($119,1 \pm 14,45s$). Porém os animais pré-tratados com CTOP e posteriormente tratados com o EHMb mantiveram sua propriedade antinociceptiva reduzida para 41% quando são comparados aos animais que receberam o tratamento de veículo. Os animais que receberam o pré-tratamento com o antagonista do receptor opióide κ (nor-binaltorfimina), apresentaram uma resposta antinociceptiva de 36% ($125,4 \pm 21,27s$) quando tratados com morfina e de 36% ($126,1 \pm 11,13$) quando tratados com o EHMb. O pré-tratamento com o

naltrindole (antagonista do receptor opióide δ) também reduziu em 49% ($93,86 \pm 17,51s$) a nocicepção quando os animais foram tratados com a morfina e em 44% ($102,7 \pm 11,43s$) nos animais que receberam o extrato quando comparados ao grupo que recebeu veículo ($183,9 \pm 27,77s$).

Figura 14. Avaliação da participação do sistema opióide na atividade antinociceptiva do extrato hidroalcoólico de *Myrcia bella* (EHMb) na dose de 250 mg/Kg no modelo de formalina na fase inflamatória.

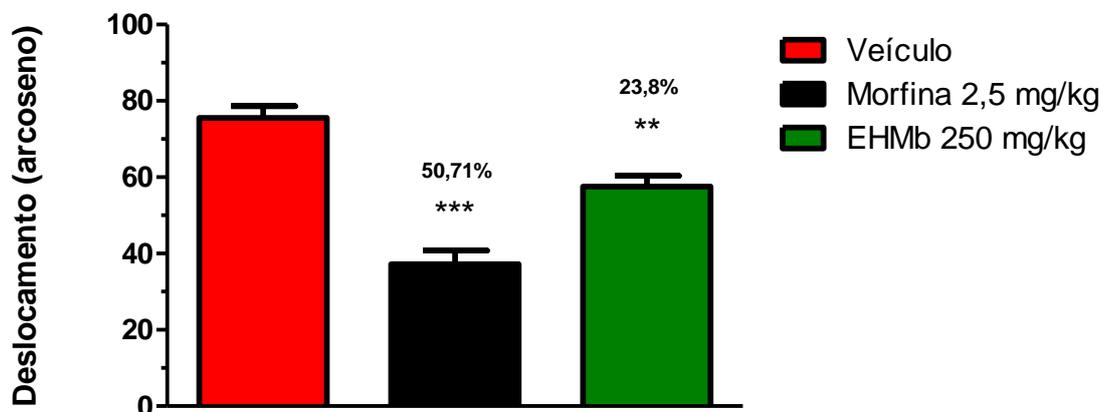


ANOVA seguida de Dunnett, * $p < 0,05$ ou *** $p < 0,001$. As barras representam os valores de média em segundos \pm erro padrão da média. As porcentagens indicam a ação antinociceptiva em relação aos seus respectivos grupos controles tratados com o veículo ($n = 10-12$).

6.9. Avaliação da motilidade intestinal

Os animais que receberam morfina apresentaram uma redução significativa da motilidade intestinal de 50,71% ($37 \pm 3,6cm$) quando comparados com os animais que receberam o veículo ($70 \pm 3,1$). Os animais tratados com o EHMb também apresentaram redução de 23,8% ($58 \pm 2,9$) na motilidade intestinal também comparados com o grupo tratado com veículo (figura 15).

Figura 15. Efeito do extrato hidroalcoólico de *Myrcia bella* (EHMb) na dose de 250 mg/Kg sobre a motilidade intestinal de camundongos com a utilização de carvão ativado.

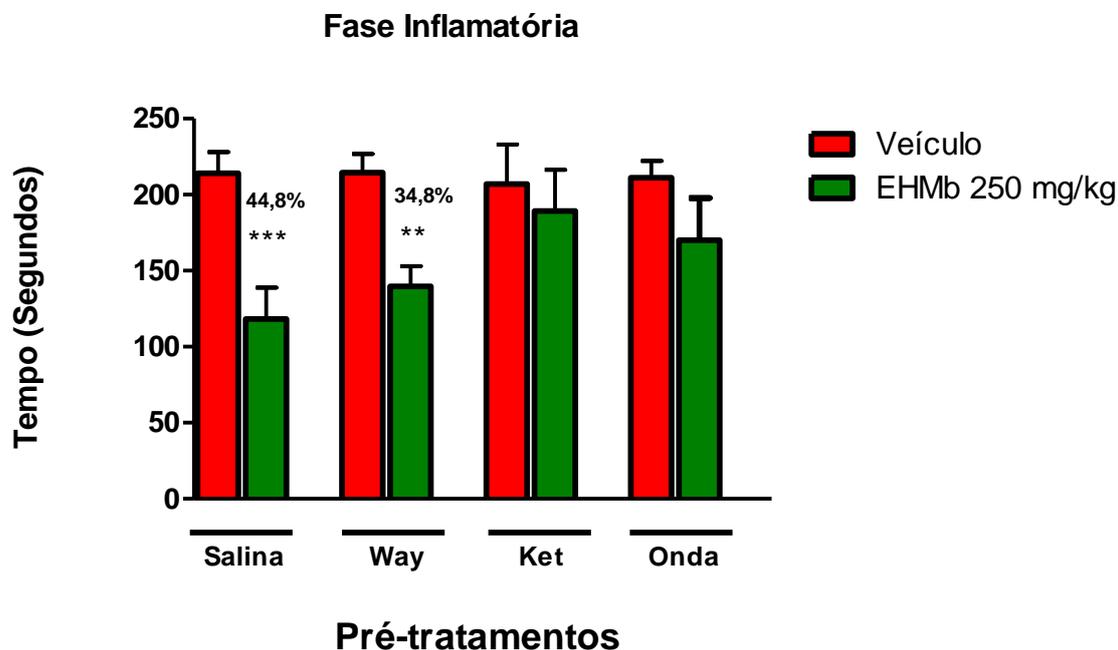


Os dados são expressos pela média \pm erro padrão da média (n=10). ANOVA seguida de teste de Dunnett **p<0,01 e ***p<0.001. Os valores (%) correspondem à redução da média em relação ao grupo controle (veículo – salina).

6.10. Avaliação da participação dos receptores serotoninérgicos na antinociceção

Para avaliar participação dos diferentes subtipos de receptores serotoninérgicos na ação antinociceptiva do EHMb, foram utilizados os antagonistas dos receptores 5 HT_{1A} (WAY100635), 5 HT₂ (ketanserina) e 5 HT₃ (ondansetron) no modelo de formalina (fase inflamatória). A ação antinociceptiva do EHMb pode ser confirmada através da redução do tempo de resposta a dor dos animais tratados com o EHMb que foi reduzida em 44,8% (118,1 \pm 20,66s) quando comparado ao grupo tratado com veículo. O pré-tratamento dos animais com o antagonista de receptores 5 HT_{1A} (WAY100635) não foi capaz de reverter a resposta antinociceptiva do EHMb que se manteve reduzida em 34,8% (139,5 \pm 13,46s). Mas a participação da via serotoninérgica na ação do extrato foi evidenciada com o tratamento dos animais com ketanserina e ondansetron. A figura 16 evidencia que a ação antinociceptiva do EHMb foi revertido com os antagonistas de receptores 5HT₂ e 5HT₃.

Figura 16. Avaliação da participação do sistema serotoninérgico na atividade antinociceptiva do extrato hidroalcoólico de *Myrcia bella* (EHMb) na dose de 250 mg/Kg no modelo de formalina na fase inflamatória.

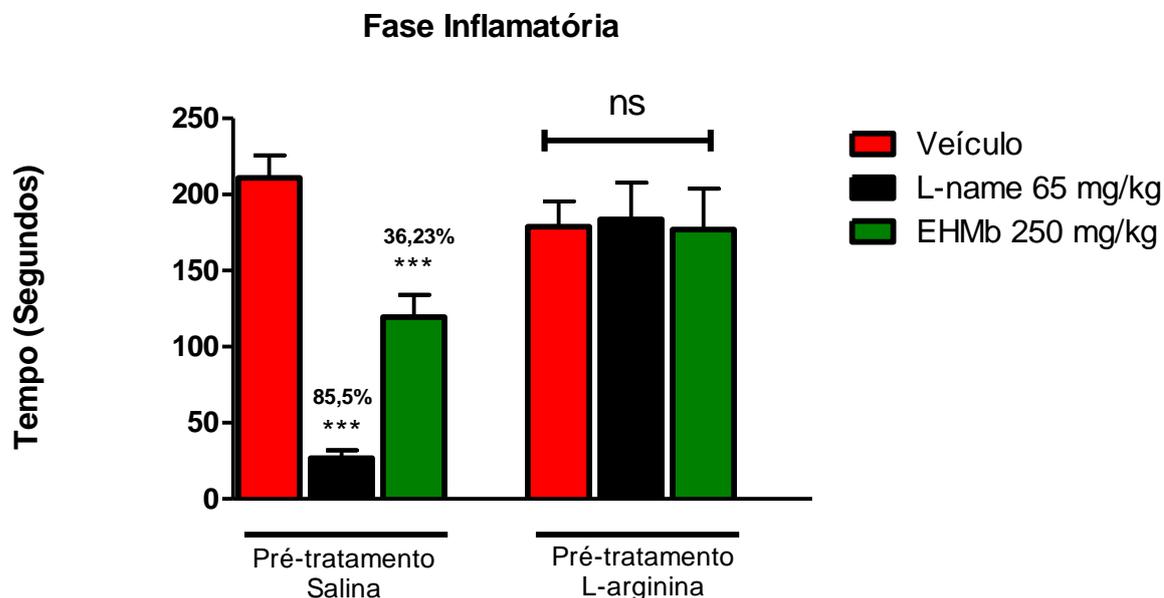


ANOVA seguida de Dunnett, ** $p < 0,01$ ou *** $p < 0,001$. As barras representam os valores de média em segundos \pm erro padrão da média. As porcentagens indicam a ação antinociceptiva em relação aos seus respectivos controles. (n= 10-12).

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

Para a avaliação da participação da via l-arginina-óxido-nítrico os animais foram pré-tratados com veículo e apresentaram uma redução da nocicepção quando tratados com L-name em 85,5% ($26,75 \pm 5,24s$) e de 36,23% ($148,5 \pm 18,53s$) quando tratados com EHMb (figura 17). Os animais pré-tratados com L-arginina e tratados com L-name apresentaram uma reversão da ação antinociceptiva ($176,9 \pm 26,91s$) assim como o grupo de animais tratado com o extrato ($183,6 \pm 24,16s$), demonstrou também o envolvimento dessa via na ação antinociceptiva do EHMb.

Figura 17. Avaliação da participação do sistema serotoninérgico na atividade antinociceptiva do extrato hidroalcoólico de *Myrcia bella* (EHMb) na dose de 250 mg/Kg no modelo de formalina na fase inflamatória.

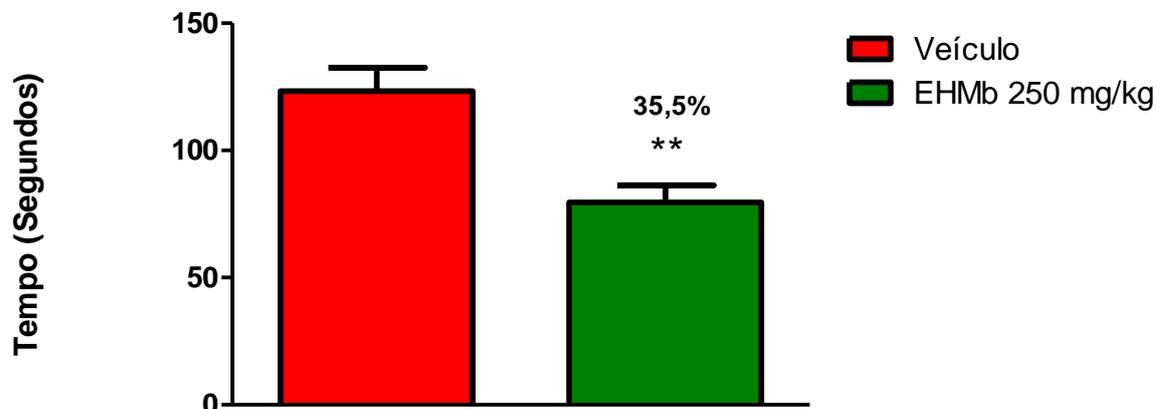


ANOVA seguida de Dunnett, *** $p < 0,001$; ns = não significativo. As barras representam os valores de média em segundos \pm erro padrão da média. As porcentagens indicam a ação antinociceptiva em relação aos seus respectivos controles. (n= 10-12).

6.12. Avaliação da participação do sistema glutamatérgico na antinociceção.

Através da indução de nociceção pela administração do glutamato, foi possível observar que o EHMb apresentou ação antinociceptiva pela redução significativa do tempo de resposta 35,5% ($79,5 \pm 6,76s$) (figura 18).

Figura 18. Avaliação da participação do sistema glutamatérgico na atividade antinociceptiva do extrato hidroalcoólico de *Myrcia bella* (EHMb) na dose de 250 mg/Kg no modelo de indução de dor pelo glutamato.

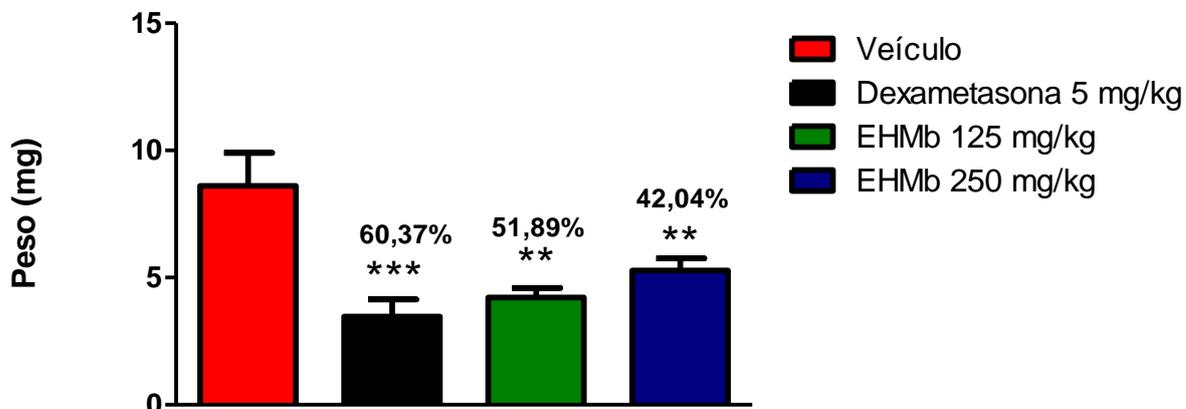


Os dados são expressos pela média \pm erro padrão da média (n=10-12). Teste t “Student” ** $p < 0,01$. Os valores (%) correspondem à redução da média em relação ao grupo controle (veículo- salina).

6.13. Modelo de edema de orelha induzido pelo xilol.

No teste de edema de orelha induzido por xilol, foram observadas reduções significativas do edema em 60,37% ($3,48 \pm 0,67$ mg) nos animais tratados com dexametasona e também foram observadas reduções de 51,89% ($4,31 \pm 0,28$ mg) no grupo de animais tratados com o EHMb na dose de 125 mg/kg e de 42,02% ($5,28 \pm 0,48$ mg) quando tratados com o EHMb na dose de 250 mg/Kg (figura 19).

Figura 19. Avaliação da atividade anti-inflamatória do extrato hidroalcoólico de *Myrcia bella* (EHMb) nas doses de 125 mg/Kg e 250 mg/Kg no modelo de edema de orelha induzido pelo xilol.

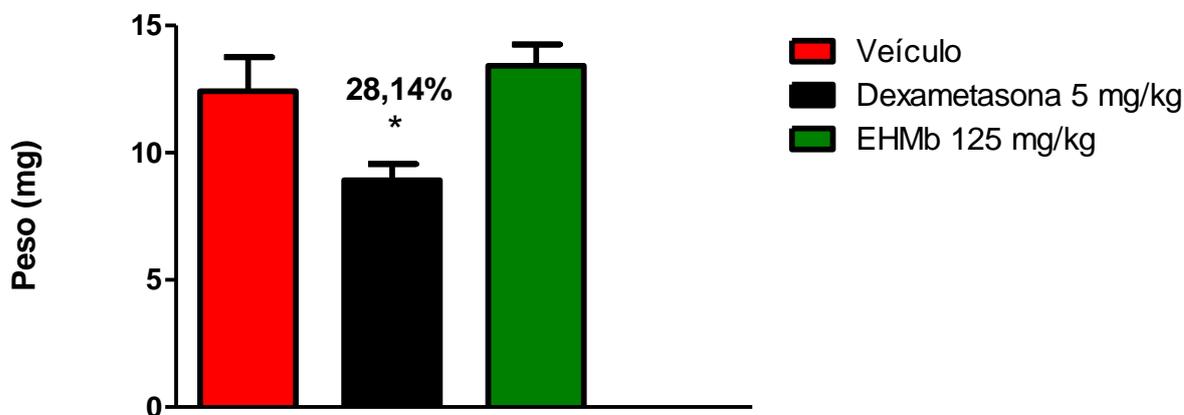


Os dados são expressos pela média \pm erro padrão da média (n=10). ANOVA seguida de teste de Dunnett $**p < 0,01$ e $***p < 0,001$. Os valores (%) correspondem à redução da média em relação ao grupo controle (veículo – salina).

6.14. Modelo de edema de orelha induzido pelo ácido araquidônico (AA).

Os resultados (figura 20) nos mostram uma diminuição do edema dos animais que foram tratados com o controle positivo (dexametasona) com redução de 28,14% ($8,91 \pm 0,64$ mg) quando comparado ao grupo tratado somente com o veículo. Os animais que receberam o tratamento com EHMb na dose de 125 mg/Kg ($13,41 \pm 0,84$ mg) não apresentaram redução do edema de orelha.

Figura 20. Avaliação da atividade anti-inflamatória do extrato hidroalcoólico de *Myrcia bella* (EHMb) nas doses de 125 mg/Kg no modelo de edema de orelha induzido pelo AA.



Os dados são expressos pela média \pm erro padrão da média (n=10). ANOVA seguida de teste de Dunnett * $p < 0,05$. Os valores (%) correspondem à redução da média em relação ao grupo controle (veículo – salina).

7. DISCUSSÃO

Quando se fala em Pesquisa e Desenvolvimento, é muito comum associar este termo com ciência. Segundo Krieger (2003), é a ciência que gera conhecimento para que o setor produtivo o transforme em tecnologia e inovação. No caso específico da indústria farmacêutica, a área de pesquisa e desenvolvimento é quase sempre associada com as atividades e o conhecimento necessário para o desenvolvimento de novos fármacos que tem como objetivo o frequente lançamento de novos produtos, que é condição básica para a manutenção e/ou ampliação da presença no mercado. As atividades relacionadas com o ciclo de pesquisa e desenvolvimento de um novo fármaco são: atividades de desenvolvimento dos processos de síntese de novas substâncias ou extração de princípios ativos de fontes naturais, testes de eficácia, toxicidade, potencial teratogênico, testes farmacológicos, estudos farmacotécnicos e ensaios clínicos (Santos, 2001). Os investimentos nessa área na indústria farmacêutica ganham destaque, como exemplificada pela indústria norte-americana Pfizer que gerou US\$ 45,2 bilhões de vendas em 2003, e seu orçamento estimado foi de US\$ 7,9 bilhões em pesquisa e desenvolvimento (Rover, 2010).

No Brasil, a indústria nacional focava os esforços na cópia de medicamentos porque não havia o estímulo para o investimento em pesquisa e desenvolvimento. Em 2004, os laboratórios nacionais passaram a procurar parcerias com universidades e instituições de pesquisa, de maneira a buscar a viabilização de novas drogas e patentes. O potencial latente

do mercado mundial de fitoterápicos, no qual o Brasil ocupa posição vantajosa, por causa da abundante flora disponível, está em torno de US\$ 60 bilhões/ano, o que justifica os investimentos em pesquisa e desenvolvimento neste setor (Bellinghini, 2004). A Organização Mundial da Saúde, também 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).

Portanto, motivados pela busca de novas opções terapêuticas para o tratamento da dor e inflamação utilizando espécies medicinais da flora brasileira, este trabalho buscou caracterizar a ação do extrato hidroalcoólico das folhas de *Myrcia bella* em modelos experimentais *in vivo*.

Com os modelos experimentais *in vivo* foi possível avaliar a toxicidade aguda, o desempenho locomotor e a atividade antinociceptiva e ou/ anti-inflamatória do extrato hidroalcoólico das folhas de *Myrcia bella* Cambess, bem como elucidar os possíveis mecanismos de ação envolvidos nessas atividades farmacológicas.

O primeiro experimento realizado foi à avaliação da toxicidade aguda do extrato, que avalia o efeito que um conjunto de substâncias pode produzir no animal dentro de um curto período de tempo resultante da administração de uma única dose ou de várias doses. 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).

No modelo de toxicidade aguda foi caracterizado os possíveis efeitos tóxicos da administração de uma elevada dose (5000 mg/Kg) do EHMB. Os animais tratados com o extrato não apresentaram sinais clínicos relevantes de toxicidade no *screening* hipocrático, e também pela ausência de mortes no grupo de EHMB durante o período de observação, para ambos os sexos. O *screening* hipocrático é um ensaio útil e comumente usado na triagem preliminar de plantas para detectar atividades farmacológicas e toxicológicas (Lucio *et al.*,

2000). Neste trabalho, ocorreram alterações do peso corporal dos animais machos tratados com o EHMB durante o 3º até o 8º dias de observação. Porém, esta queda do peso corporal foi normalizada a partir do 9º dia e prosseguiu sem alteração até o final do experimento naturalmente. Nas fêmeas tratados com o EHMB não ocorreram alterações dos pesos corporais durante os 14 dias observados. Em estudos de toxicidade, observações clínicas, peso dos órgãos e alterações do peso corporal pode fornecer indicadores úteis do estado de saúde geral do animal (Jahn e Günzel, 1997).

Outro parâmetro analisado nesse modelo experimental foi o peso relativo de alguns órgãos, obtidos pela razão entre o peso do órgão e peso total do animal transformado em arco seno para adequação estatística. Após a realização do teste estatístico, foi verificada uma diferença significativa no peso dos pulmões de fêmeas tratadas com o EHMB em comparação com o grupo tratados com o veículo. Os demais órgãos analisados não apresentaram nenhuma alteração assim como os órgãos dos animais machos tratados com o EHMB.

Os pulmões são locais de captação, acúmulo e metabolismo de numerosas substâncias químicas (endógenas e exógenas) e sítios frequentes de reações adversas às drogas (Kilburn, 1980; Bend *et al.*, 1985; Boyd, 1985). As ações sobre os sistemas oxidante-antioxidante, imunológico, proteolítico e de reparo da matriz do pulmão têm sido revisadas, embora a patogenia exata da maioria dessas reações seja desconhecida. Entre as síndromes clínicas importantes no pulmão de reação adversa a drogas estão: edema, hipertensão e hemorragia pulmonar, doença intersticial crônica, infiltrado pulmonar agudo, síndrome da angústia respiratória do adulto, bronquiolite obstrutiva, derrame pleural e bronco espasmo (Kay, 1996). No entanto, seriam necessárias avaliações histopatológicas dos pulmões dos animais tratados com o EHMB para elucidar a alteração de peso observada nos pulmões das fêmeas. É importante ressaltar que a toxicidade deve ser descrita como uma relação dose-efeito entre compostos, ou seja, qualquer substância pode ser tóxica se a dose ou a exposição se tornarem suficientemente altas (Loomis e Hayes, 1996; Sipes e Dart, 1997; Diniz, 2000). Neste trabalho, os resultados obtidos com o EHMB demonstram a necessidade de estudos complementares de toxicidade para que se possa garantir a segurança de seu uso e a ausência de toxicidade em humanos.

O primeiro modelo experimental de dor utilizado no presente trabalho foi o de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos. Esse modelo experimental é empregado como ferramenta de triagem de novas drogas a serem testadas, como extratos de plantas e também substâncias isoladas, com possíveis propriedades

analgésicas e/ou anti-inflamatórias (Vyklicky, 1979; Tjolsen e Hole, 1997). Esse ensaio, apesar de simples e pouco específico, é de fácil observação além de apresentar boa sensibilidade às drogas analgésicas e anti-inflamatórias não esteroidais, bem como a drogas semelhantes à morfina e outros analgésicos que atuam centralmente (Koster *et al.*, 1959; Ikeda *et al.*, 2001; Le Bars *et al.*, 2001). Além disso, os resultados obtidos com várias classes de drogas analgésicas, neste ensaio, mostram boa correlação com a ação analgésica em outros estudos pré-clínicos (Siegmund *et al.*, 1957; Blumberg *et al.*, 1965; Blane *et al.*, 1967; Collier *et al.*, 1968).

A resposta nociceptiva induzida pelo ácido acético pode envolver diretamente as fibras aferentes nociceptivas devido à síntese de mediadores inflamatórios juntamente com a redução do pH (França, 2001). Os prótons resultantes desta resposta do ácido acético despolarizam neurônios sensoriais diretamente pela ativação de um canal não-seletivo catiônico cutâneo, visceral ou outros tipos de fibras C de aferentes periféricos (Reeh e Kress, 2001; Julius e Basbaum, 2001). O ácido acético pode atuar indiretamente causando a liberação de mediadores endógenos envolvidos na modulação da dor, bem como diretamente sobre os neurotransmissores incluindo 5-HT, histamina, bradicinina, prostaglandinas, acetilcolina e SP. A nocicepção causada pelo ácido acético depende também da liberação de citocinas, proteínas reguladoras produzidas por macrófagos e basófilos encontrados na cavidade abdominal, principalmente a IL-1 β e o TNF- α . Sendo assim, o modelo de contorção induzido por ácido acético é sensível às substâncias analgésicas de ação periférica, bem como as de ação central (Whittle, 1964; Cervero, *et al.*, 1999; Ribeiro *et al.*, 2000; Piek e Winter, 2003; Shafiee, 2003).

Utilizando esse modelo experimental foi possível demonstrar, pela primeira vez, que a administração oral de EHMB produziu inibição dose-dependente do número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. O EHMB promoveu redução nas contorções na ordem de 32,57% (125 mg/Kg) e 55,79% (250 mg/Kg) quando comparado ao grupo de animais que recebeu o veículo. Esses resultados indicam, portanto que o efeito causado pelo EHMB pode ser devido a inibição direta ou indireta da liberação de mediadores pró-inflamatórios ou até mesmo por uma modulação central da transmissão nociceptiva. No entanto, devido a pouca especificidade da resposta antinociceptiva desse modelo experimental foram necessários ensaios complementares para a interpretação dos mecanismos de ação envolvidos no efeito antinociceptivo do EHMB (Rates e Barros, 1994).

No modelo de contorção abdominal, pode ocorrer uma possível resposta antinociceptiva falso-positiva devido à possibilidade de algumas drogas capazes de induzir alterações motoras ou efeitos inespecíficos. Sendo assim, modificação na performance motora que o animal possa vir a sofrer, em decorrência de uma ação miorelaxante ou sedativa, pode induzir a um grande número de erros em estudos sobre drogas que atuam na nocicepção (central e periférica) (Millan, 1999; Millan, 2002). Para descartar esta ação do EHMB, adicionalmente foi realizado neste trabalho a avaliação do EHMB na performance motora através do teste com o *rota rod*.

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 a). 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 trabalho 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 EHMB não foi capaz de alterar o desempenho motor dos animais na dose de 250 mg/Kg (a dose que apresentou uma melhor inibição significativa do número de contorções) comprovando assim que a redução dos movimentos de contorção abdominais dos animais tratados com EHMB é resultante de uma ação antinociceptiva e não decorrente de uma redução do desempenho motor.

Posteriormente a ação antinociceptiva do EHMB, foi avaliado no modelo de formalina, um dos modelos mais utilizados em ensaios de dor e que mais se assemelha a dor clínica (Tjolsen *et al.*, 1992; Mogil *et al.*, 2006)

O teste de formalina é um modelo de indução da nocicepção por agente químico que fornece uma resposta mais específica quando comparado ao modelo do ácido acético. Este modelo permite avaliar dois tipos distintos de nocicepção: a de origem neurogênica (através da estimulação direta dos neurônios nociceptivos) e a inflamatória (caracterizada pela liberação de mediadores pró-inflamatórios) (Hunskar e Hole, 1987; Tjolsen *et al.*, 1992, Mogil *et al.*, 2006).

Em roedores, o teste de formalina caracteriza-se por observações de dois períodos distintos. A fase 1 (neurogênica) é iniciada logo após a injeção da formalina e transcorre durante 5 minutos subsequentes a aplicação da formalina. Esta fase é caracterizada pela dor de origem neurogênica devido à estimulação direta de terminações nociceptivas aferentes (tipo C e A δ). Respostas positivas, através da redução do tempo de lambida da pata, indicam participação de mediadores periféricos como histamina, serotonina, bradicinina e substância P. Nesta fase uma redução da resposta à dor pode ocorrer também pela atuação através da liberação de glutamato e também da substância P na medula. Nesta fase a resposta nociceptiva pode ser inibida pela administração de agonistas opióides como a morfina (Hunskaar *et al.*; 1986; Hunskaar e Hole, 1987).

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).

A fase 2, conhecida como dor de origem inflamatória, inicia-se após 15 minutos da indução da dor pela formalina e permanece durante os 45 minutos subsequentes. Esta fase está relacionada com a produção e liberação de vários mediadores pró-inflamatórios como a histamina, serotonina, prostaglandinas e também bradicinina. Esta fase pode ser inibida por medicamentos anti-inflamatórios não esteroidais e esteroidais e também pelos analgésicos opióides (Hunskaar e Hole, 1987).

A estimulação nociceptiva induzida pela formalina promove a liberação de SP e de aminoácidos excitatórios de neurônios aferentes da medula dorsal. A SP produz despolarização, associada com os potenciais excitatórios rápidos produzidos pelo glutamato que age nos receptores AMPA (amino-3-hidroxi-5-metil-isoxanol) promovendo a desinibição dos receptores NMDA que são bloqueados pelo magnésio. Com a ativação dos receptores NMDA ocorre o influxo de cálcio, a ativação da síntese de prostanóide e também de NO nas células do corno dorsal, que ao serem difundidos para fora das células, aumentam a excitação dos neurônios da medula (Sorkin, 1993; Liu *et al.*, 1994; Liu *et al.*, 1997).

Sendo assim, na primeira fase do modelo de formalina, na qual ocorre à liberação de aminoácidos excitatórios e de SP pelas fibras C, ocorre à ativação de receptores NMDA. O NO sensibiliza neurônios espinhais, juntamente com a prostaglandina, e leva a sensibilização central e hiperalgesia que é manifestada na segunda fase do modelo experimental (Wiertelak *et al.*, 1994; Carr e Goudas, 1999; Rang e Dale, 2007).

Estudos têm mostrado que a formalina também ativa fibras aferentes de neurônios sensoriais primários através de uma ação específica e direta sobre TRPA1 (receptor de potencial transitório relacionado a proteína Anquirina 1), um membro da família de receptores de potencial transitório (TRP), altamente expressos por um subconjunto de nociceptores nas fibras C (McNamara *et al.*, 2007). A formalina também aumenta os níveis de SP no corno dorsal da medula (McCarson Goldstein, 1989; McCarson e Goldstein 1990).

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

No teste de formalina, o EHMB promoveu ação antinociceptiva nos animais tratados com o extrato apenas na segunda fase e somente na dose de 250 mg/kg, reduzindo em 32,3% o tempo de lambida do animal após a injeção de formalina. Considerando que drogas capazes de reduzir a resposta inflamatória, demonstram atividade na segunda fase desse modelo, podemos inferir que existe uma possível ação anti-inflamatória para o EHMB (Esfahani *et al.*, 2011).

A caracterização da antinociceção do EHMB obtidos no teste de formalina, foi também observado no teste da placa quente que evidencia a ação antinociceptiva de origem neurogênica. Atualmente, a placa quente é um dos modelos mais utilizados para testar nociceção em roedores por ser rápido, preciso, simples e com baixo custo (Mai, 2007).

Este modelo caracteriza-se por produzir resposta rápida ao estímulo nocivo, mediada pela ativação de nociceptores das fibras C e das fibras A δ . As fibras nociceptoras respondem após a ativação dos receptores vanilóides, especificamente o receptor do tipo TRPV-1 (ativada aos 43°C), sendo os receptores mais importantes na medição da resposta aos estímulos térmicos nocivos (Dickenson e Besson, 1997; Julius e Basbaum, 2001).

No ensaio da placa quente, o estímulo térmico ativa nociceptores que transmitem a informação ao corno dorsal da medula espinhal e, posteriormente, aos centros corticais, produzindo uma resposta nociceptiva organizada (Mogil e Adhikari, 1999). Por este motivo este modelo é muito utilizado no estudo de drogas analgésicas, principalmente de drogas que possuem ação no sistema nervoso central, tais como os opióides (Ankier, 1974; Le Bars *et al.*, 2001).

O modelo experimental da placa quente também é muito utilizado como triagem de extratos vegetais com ação analgésica que possuem envolvimento do sistema nervoso central

como é o caso do extrato metanólico das partes aéreas de *Ammannia baccifera* que possui essa ação analgésica central (Loganayaki *et al.*, 2012) e Nguemfo *et al.* (2007), também avaliou o mesmo envolvimento da ação analgésica central do extrato e frações da casca de *Allanblackia monticola*.

Em concordância com os resultados obtidos no teste de formalina, o teste da placa quente mostrou que o EHMB não promoveu o aumento do tempo de latência dos animais submetidos ao estímulo térmico. Este resultado negativo, portanto indica que a atividade antinociceptiva do EHMB não atua de mecanismos supra-espinhais.

A partir deste momento, descartada a ação antinociceptiva do EHMB na fase neurogênica desenvolvemos novos estudos para caracterizar a ação anti-inflamatória do extrato somente na segunda fase desse mesmo teste. O primeiro mecanismo de ação elucidado foi à participação da via opioidérgica na antinocicepção do extrato. Para realização do teste utilizou-se como controle positivo a morfina que é um analgésico opióide e cujo efeito pode ser revertido com pré-tratamento com naloxona (antagonista inespecífico dos receptores opióides). 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; Longhi-Balbinot *et al.*, 2011).

O sistema descendente inibitório da dor estimula os neurônios da medula a secretar opióides endógenos, que causam inibição pré e pós-sináptica das fibras A δ e C. Essa analgesia é causada pelo bloqueio de canais de Ca⁺² e abertura de canais K⁺, levando a uma diminuição da liberação de neurotransmissores excitatórios que resulta em inibição pré-sináptica da dor (Kuraish *et al.*, 1985).

Existem três tipos majoritários de receptores opióides, os receptores μ , κ e δ que estão localizados em vários níveis nas vias de transmissão da dor, como no corno dorsal, mesencéfalo e tálamo, e têm sido associados com analgesia espinhal e supra-espinhal (Todd e Spike, 1993; Coggeshall e Carlton, 1997; Fürst, 1999). Existem basicamente dois subtipos de receptores μ , um responsável pela atividade antinociceptiva (μ_1) e o outro pela depressão respiratória (μ_2). Os receptores κ quando são ativados produzem analgesia em nível espinhal. Os receptores δ são responsáveis primariamente pela analgesia, mas também por modular funções cognitivas e de dependência física (Fürst, 1999; Dhawan *et al.*, 2006). Os receptores opióides são ativados tanto por peptídeos opióides produzidos endogenamente quanto por drogas opióides naturais (como a morfina), semi-sintéticas ou sintéticas (Waldhoer *et al.*, 2004). Opióides endógenos ou exógenos atuam na excitabilidade de nociceptores periféricos,

na propagação de potenciais de ação, na liberação de peptídeos pró-inflamatórios (como a SP e CGRP) de terminais sensoriais periféricos e na vasodilatação que ocorre pela estimulação das fibras C (Stein *et al.*, 2003).

Neste trabalho foi observado que os animais tratados com o EHMB e pré-tratados com naloxona tiveram seu efeito antinociceptivo revertido. Dessa forma, este resultado demonstrou claramente a participação dessa via na antinocicepção do EHMB. Porém, quando se comparar os animais que receberam o tratamento com o EHMB e que foram pré-tratados com salina, com aqueles que foram pré-tratados com naloxona e tratados com o EHMB, não se observa diferença estatisticamente significativa. Portanto, estes resultados indicam que houve uma reversão parcial da ação do extrato mediado por receptores opióides.

Avaliando a participação dos tipos de receptores opióides na antinocicepção do EHMB, podemos observar que o extrato perde parcialmente a sua proteção nos três grupos que receberam o pré-tratamento com antagonistas opióides CTOP (antagonista do receptor opióide μ), nor-binaltorfirmina (antagonista do receptor opióide κ) e naltrindole (antagonista do receptor opióide δ). Sendo assim, podemos afirmar que existe uma participação parcial dos receptores opióides μ , κ e δ na propriedade antinociceptiva do EHMB.

Para confirmação deste resultado foi avaliado a atuação do EHMB na motilidade intestinal. A motilidade intestinal está relacionada com a velocidade de esvaziamento gástrico, a contínua situação de contração, relaxamento e secreção. Essas funções são controladas pelo sistema neuromotor, que é regulado por vários sistemas de receptor, entre eles o sistema opióide, bem como o colinérgico, adrenérgico e serotoninérgico (Kamm, 2000). Nesse modelo experimental os animais que receberam o EHMB responderam com uma diminuição do trânsito intestinal, comparado aos animais que receberam o veículo como tratamento. A morfina, um agonista opióide, foi utilizado como controle positivo.

Várias drogas afetam o trânsito gastrointestinal pela ação de agonistas ou antagonistas no receptor celular específico (Konur e Ghosh, 2005). A morfina combina-se seletivamente a vários sítios de reconhecimento existentes no organismo para produzir seus efeitos farmacológicos. Os locais no cérebro envolvidos na transmissão da dor e na alteração da reatividade aos estímulos nociceptivos parecem ser os principais sítios nos quais os opióides atuam (Zylicz e Twycross, 1991; Katzung, 1992; Harvey e Champe, 1998). 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 e 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 SNC 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 e Wexner, 2006; Becker e Blum, 2009).

Sendo assim, os animais tratados com EHMB apresentaram uma diminuição do trânsito intestinal, assim como a morfina. Podendo então, confirmar a participação do EHMB no sistema opióide, corroborando com os já resultados encontrados no teste de formalina.

Vários estudos também demonstram o envolvimento do sistema serotoninérgico no mecanismo de regulação da informação nociceptiva no SNC (Basbaum e Fields, 1984; Yaksh, 1985; Millan, 1997; Besson, 1999; Millan, 1999). Deste modo, o próximo mecanismo a ser elucidado foi a participação dessa via na atividade antinociceptiva do EHMB. Para tanto, foi realizado o pré-tratamento dos animais com o antagonista seletivo do receptor 5-HT_{1A} (WAY 100635), 5-HT_{2A} (cetanserina) ou 5-HT_{3A} (ondansetron), três receptores serotoninérgicos envolvidos na antinocicepção (Bardin *et al.*, 2000; Millan, 2002).

A via serotoninérgica atua na via descendente inibitória e na via excitatória da dor, ambas as vias são originárias dos núcleos da rafe, local de grande síntese de serotonina nos mamíferos (Fields *et al.*, 1991; Millan, 1999; Millan, 2002). O sistema serotoninérgico descendente inibitório faz parte de uma via que suprime impulsos que chegam à medula espinhal, diminuindo assim a transmissão da dor (Millan, 1995).

Os múltiplos tipos de receptores 5-HT na medula espinhal parecem ter diferentes funções no controle da nocicepção (Millan, 1995; Bardin *et al.*, 2000). No SNC a 5-HT está envolvida com o processamento e modulação da dor. A analgesia causada pela 5-HT se dá quando essa é liberada no corno dorsal da medula por estimulação da PAG, através da excitação de neurônios inibitórios, ocorrendo então à inibição dos neurônios inibitórios do corno da dorsal (Sommer, 2004). A inibição da transmissão da dor pela 5-HT é mediada por receptores 5-HT₂, embora o efeito dominante seja atribuído aos receptores 5-HT₁ (Sawinok e Reid, 1996). O 5-HT₃ também tem participação no processamento doloroso e está relacionado com a modulação de neurotransmissores e neuropeptídeos. O 5-HT₃ são expressos nos terminais periféricos de fibras C e A δ e sua ativação medeia uma despolarização rápida desses neurônios (Faber *et al.*, 2004).

Conforme os resultados apresentados neste trabalho podemos afirmar que existe uma efetiva participação da via serotoninérgica na antinocicepção do EHMB. Esse extrato pode estar induzindo a liberação de 5-HT endógena (atuando de forma direta nos receptores serotoninérgicos 5-HT_{2A} e 5-HT_{3A}) ou atuando indiretamente na liberação de outros mediadores endógenos que controlam a transmissão da nocicepção (Millan, 2002).

Foi avaliado também a participação do sistema glutamatérgico na antinocicepção do EHMB. Esse modelo experimental foi realizado com a injeção intraplantar de glutamato como agente álgico. 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 e Rustioni, 1988). O glutamato está envolvido na transmissão da informação nociceptiva da periferia até regiões supraespinhais (Beirith *et al.*, 2002; Beirith *et al.*, 2003).

Os receptores do glutamato são responsáveis por mediar em grande parte a neurotransmissão excitatória no sistema nervoso central de mamíferos. Esses receptores podem ser ionotrópicos ou 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 (Sorkin, 1993; Jackson *et al.*, 1995). 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 e Strchartz, 2004; Caruso *et al.*, 2005).

Os resultados apresentados no teste de indução da dor pelo glutamato, no qual ocorreu uma inibição significativa de 35% da nocicepção causada por esse agente flogístico dos animais tratados com EHMB, sugere a participação do sistema glutamatérgico na propriedade antinociceptiva do extrato.

Devido à importância do NO na antinocicepção foi avaliada a via L-arginina-óxido-nítrico, visto que esse sistema exerce uma importante participação na modulação da nocicepção (Yaksh e Rudy, 1977, Haley *et al.*, 1992, Snyder, 1992; Ferreira *et al.*, 1999). Para realização desse experimento, os animais receberam o pré-tratamento com o veículo ou L-arginina (inibidor da síntese de NO) que causa efeito antinociceptivo no teste de formalina (Moore *et al.*, 1991; Kitto *et al.*, 1992).

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 e 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 (Millan, 1999; Zhuo, 2007).

Neste trabalho foi observado a participação da via L-arginina-óxido nítrico na antinocicepção causada pelo EHMB, devido a reversão do seu efeito antinociceptivo do EHMB (36%) quando animais receberam o pré-tratamento de L-arginina (Beirith *et al.*, 2002).

Para caracterizar a atividade do EHMB sobre o processo inflamatório 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 EHMB apresentaram uma redução significativa do edema de orelha nas doses de 125 mg/kg ou 250 mg/kg (redução de 51,89% ou 42,04% respectivamente).

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 e capsaicina que provoca a liberação direta dos neuropeptídeos, pela excitação dos neurônios, com ativação dos seus receptores (Richardson e Vasko, 2002; Li *et al.*, 2011). 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 e Vasko, 2002). Neurônios sensoriais são sensíveis à capsaicina que ativa o receptor TRPV1, sendo responsável pela despolarização

e pela liberação direta de neuropeptídeos, como a SP e o CGRP (Holzer, 1988, Rotelli, *et al.* 2003).

Neste trabalho verificou-se a redução do edema de orelha induzido pelo xilol dos animais tratados com EHMB, provavelmente devido a presença de flavonóides no extrato, que tem apresentado essa propriedade em estudos com essa classe fitoquímica (Adeyemi *et al.*, 2008).

Para uma melhor elucidação da via anti-inflamatória pelo qual o EHMB atua foi utilizado o modelo de indução do edema de orelha com o uso do AA. Neste experimento foi utilizado como controle positivo dexametasona, um glicocorticóide com ação anti-inflamatória (Rang e Dale, 2007).

A aplicação tópica de AA é capaz de provocar uma intensa resposta inflamatória, causando vasodilatação e a hiperemia observadas após 5 minutos da aplicação, enquanto que o edema pôde ser visualizado após 15 minutos e com maior intensidade aos 60 minutos. Os principais produtos metabólicos do AA que estão envolvidos com processos inflamatórios são a PGE2 e os leucotrienos C4 e D4 (Young *et al.*, 1983; Chang *et al.*, 1986; Humes *et al.*, 1986; Crummey *et al.*, 1987). A PGE2 é um potente vasodilatador e atua de modo sinérgico com outros vasodilatadores inflamatórios, como a histamina e a bradicinina. A PGE2 intensifica a formação de edema e a infiltração de leucócitos pelo aumento do fluxo sanguíneo no sítio inflamatório (Lee *et al.*, 2003). A aplicação tópica do AA ou PGE2 induz um aumento da expressão de COX-2 (Sánchez e Moreno, 1999). No entanto, outros autores também sugerem que o edema induzido pelo AA é preferencialmente um modelo de triagem anti-inflamatória para identificação de inibidores da lipoxigenase, já que compostos com capacidade de inibi-la são geralmente mais eficazes em inibir o edema induzido causado pelo AA do que por outros agentes flogísticos (Carlson *et al.*, 1985; Recio *et al.*, 2000). A lipoxigenase é encontrada em células responsáveis por respostas inflamatórias, como mastócitos e eosinófilos (Eppler *et al.*, 2007). Entretanto, os metabólitos do AA também são capazes de promover a degranulação de mastócitos, ocorrendo à liberação de histamina e contribui parcialmente para a formação do edema neste modelo (Camp, 1982). Assim, deve-se considerar que o modelo do AA não é específico para a identificação de compostos que inibem exclusivamente a COX e/ou lipoxigenase, uma vez que outros agentes como antagonistas da histamina e antioxidantes também reduzem o edema induzido pelo AA (Crummey, 1987).

Sendo assim, os resultados obtidos nos modelos de xilol no qual o EHMB promove a diminuição do edema e não promove essa diminuição no modelo de edema causado pelo AA, demonstram que a ação inflamatória desse extrato não se deve pela redução dos níveis dos metabólitos do AA no tecido cutâneo.

8. CONCLUSÃO

A partir dos resultados apresentados neste projeto é possível afirmar que o EHMB possui uma efetiva ação antinociceptiva. Essa antinocicepção do EHMB ocorre por atuação do sistema opioidérgico, serotoninérgico, glutamatérgico e nitrérgico. O EHMB também possui uma importante atuação na inflamação que não é via metabólitos do AA e que deve ser melhor investigado.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adeyemi, O. O.; Yemitan, O. K.; Afolabi, L. Inhibition of chemically induced inflammation and pain by orally and topically administered leaf extract of *Manihot esculenta* Crantz in rodents. *J. Ethnopharmacol.*, v.119, p.6-11, 2008.

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

Alcaraz, M. J.; Carvalho, J. C. T. Flavonóides como agentes anti-inflamatórios. Carvalho, J. C. T. In: *Fitoterápicos anti-inflamatórios: Aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas*. São Paulo: Tecmedd, 2004.

Aley, K. O.; McCarte, G.; Levine, J. D. Nitric oxide signaling in pain and nociceptor sensitization in the rat. *J. Neurosci.*, v. 18, p. 7008-7014, 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.

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

Anvisa, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/hotsite/sngpc/Nota_TecnicaCOX2.pdf. Acessado em: 25 de junho de 2012.

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. Acessados em 30 de junho de 2012.

Arya, S.; Kumar, V. L. Antiinflammatory efficacy of extracts of latex of *Calotropis procera* against different mediators of inflammation. *Mediat. Inflamm.*, v. 5, n. 4, p. 228-232, 2005.

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

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

Bardin, L.; Lavarenne, J.; Eschalier, A. Serotonin receptor subtypes involved in the spinal antinociceptive effect of 5-HT in rats. *Pain*, v. 86, p. 11–18, 2000.

Basbaum, A. L.; Fields, H. L. Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathway and endorphin circuitry. *Annu. Rev. Neurosc.*, v. 7, p. 309-338, 1984.

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

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

Beirith, A.; Santos, A. R. S.; Calixto, J. B. Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. *Brain Res.*, v. 924, p. 219-228, 2002.

Beirith, A.; Santos, A. R. S.; Calixto, J. B. The role of neuropeptides and capsaicin-sensitive fibres in glutamate-induced nociception and paw oedema in mice. *Brain Res.*, v. 969, p. 110-116, 2003.

Bellinghini, R. H. Laboratórios do País redescobrem a pesquisa. A indústria passou décadas copiando remédios, mas agora está atrás de novidades. Reportagem publicada no jornal O Estado de São Paulo, em 15/2/2004. Disponível em <http://www.jornaldaciencia.org.br/Detalhe.jsp?id=16315>. Acessado em 30 de julho de 2012.

Bend, J. R.; Serabjit-Singh, C. J.; Philpot, R. M.; The pulmonary uptake, accumulation, and metabolism of xenobiotics. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, v. 25, p. 97-125, 1985.

Berne, R. M.; Levy, M. N. *Fisiologia*. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1996.

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

Blane, G. F. Blokade of bradikinin induced nociception in the rat as a test for analgesic drugs with particular reference to morphine antagonists. *J. Pharmacol.*, v. 19, p. 367-373, 1967.

Botting, R. M.; Cyclooxygenase: past, present and future. A tribute to John R. Vane (1927-2004). *J. Therm. Biol.* v. 31, p. 208-219, 2006.

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

Boyd, M.R.; Biochemical mechanisms in chemical-induced lung injury. Roles of metabolic activation. *Crit. Rev. Toxicol.*, v.7, p. 103-76, 1985.

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

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

Bromm, B.; Lorenz, J. Neurophysiological evaluation of pain. *Electroen. Clin. Neurophysiol.*, v. 107, p. 227-253, 1998.

Bruno, A. A. Abordagem clínica na dor crônica. *RBM Rev.*, v. 8, p. 1-10, 2001.

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

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. 179-189. 2000a.

Calixto, J. B. *et al.*, Kinins in pains and inflammations. *Pain*, v. 87, p.1-5, 2000 b.

Camp, R. D. Prostaglandins, hydroxyl fatty acids, leukotrienes and inflammation of the skin. *Clin. Ex.p Dermatol.*, v. 7, p. 435-444, 1982.

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

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

Caruso, C. *et al.* NMDA and group I metabotropic glutamate receptors activation modulates substance P release from the arcuate nucleus and median eminence. *Neurosc. Lett.*, v. 393, p. 60-64, 2005.

Cervero, F.; Laird, J. M. Visceral pain. *Lancet.*, v. 353, p. 2145-2148, 1999.

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

Chevlen, E. Opioids: a review. *Curren. Pain Headache Rep.*, v. 7, p. 15-23, 2003.

Chiu, Y. *et al.* Analgesic and antiinflammatory activities of the queous extract from *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. Both in vitro and in vivo. *Evid-Based Compl. Alt.*, v. 2012m, p. 1-11, 2011.

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

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

Collier, H. O. J. *et al.* The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. *Braz. J. Pharmacol. Chemother.*, v. 32, p. 295-310, 1968.

Costa, T. R. *et al.* Antifungal activity of volatile constituents of *Eugenia dysenterica* leaf oil. *J. Ethnopharmacol.*. V. 72, n. 1-2, p. 111-117, 2000.

Criado, P. R. *et al.* Histamina, receptores de histamina e anti-histamínicos: novos conceitos. *An. Bras. Dermatol.*, v. 85, n. 2, p. 195-210, 2010.

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

Cruz, A. V. M.; Kaplan, M. A. C. Estudo comparativo do perfil químico e o uso popular de espécies das famílias myrtaceae e melastomataceae. Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2004.

Cruz, F. G. *et al.*, Seasonal variation and antimicrobial activity of *Myrcia myrtifolia* essential oils. J. Braz. Chem. Soc., v. 18, p. 998-1003, 2007.

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

Dhawan, B. N. *et al.* International Union of Pharmacology. XII. Classification of opioid receptors. Pharmacol. Rev. n. 48, v. 4, p. 567-92, 2006.

Dickenson, A.; Besson, J. M. The Pharmacology of Pain. Handbook of Experimental Pharmacology, Berlin: Springer Verlag, 1997.

Diniz, M. F. M. Ensaio toxicológico pré-clínico com as folhas de *Cissampelos sympodialis* Eichl. Tese (Doutorado em Farmacologia) Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2000.

Dunham, N. W.; Myia, T. S. A note on a simple apparatus for detection of neurological deficit in rats and mice. J. Am. Pharm. Assoc. v. 46, p. 208-209, 1957.

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

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

Esfahani, H.M. *et al.* Anti-inflammatory and antinociceptive effect of the ethanolic extract of *Alkanna frigida* and *Alkanna orientalis*. J. Nat. Med., 2011.

Faber, L. *et al.* Physiology and pathophysiology of the 5-HT₃ receptor. Scand. J. Rheumatol. Suppl., n. 119, p 2-8, 2004.

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

Fields, H. L., Heinricher, M. M., Mason, P. Neurotransmitters in nociceptive modulatory circuits. Annu. Rev. Neurosci., v. 14, p. 219- 245, 1991.

França, D. S. *et al.* B vitamins induce an antinociceptive effect in the acetic acid and formaldehyde models of nociception in mice. Eur. J. Clin. Pharmacol, n. 2, v. 421, p. 157-164, 2001.

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.

- Fürst, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. *Brain Res. Bull.*, v. 48, n. 2, p. 129-41, 1999.
- Gasbarri, A. *et al.* Comparative effects of lesions to the ponto-cerebellar and olivo-cerebellar pathways on motor and spatial learning in the rat. *Neurosci.*, v. 116, n. 4, p. 1131-40, 2003.
- Gilroy, D. W. *et al.* A novel role for phospholipase A2 isoforms in the checkpoint control of acute inflammation. *Faseb. J.*, v. 18, p. 489-498, 2004.
- Goadsby, P. J.; Lipton, R. B.; Ferrari, M. D. Migraine: current understanding and treatment. *New England J. Med.*, v. 336, p. 257-270, 2002.
- Goyal, R. K.; Hirano, I. The enteric nervous system. *New England J. Med.*, v. 334, n. 17, p. 1106-1115, 1996.
- Guieu, R. *et al.* Adenosine and neuropathic pain. *Pain. V.* 68, p. 271-274, 1996.
- Guyton, A. C.; Hall, J. E. *Tratado de Fisiologia Médica*. 12. ed. Rio de Janeiro, RJ: Elsevier, 2011.
- Harvey, R. A.; Champe, P. C. *Farmacologia ilustrada*. 2a ed. Artmed; 1998.
- Heinricher, M. M.; Ingram, S. L. The brainstem and nociceptive modulation. Bushnell, M.C., Basbaum, A. I., *The Senses, a Comprehensive Reference*. *Pain*, v. 5., p. 593–626, 2008.
- Heinricher, M. M. *et al.* Descending control of nociception: Specificity, recruitment and plasticity. *Brain Res. Rev.*, v. 60, p. 214-225, 2009.
- Hill, R. G. Molecular basis for the perception of pain. *Trends Neurosci*, v. 7, p. 282 -292, 2001.
- Hohmann, A. G. *et al.* An endocannabinoid mechanism for stress-induced analgesia. *Nature*, v. 435, p. 1108–1112, 2005.
- Holzer, P. Capsaicin as a tool for studying sensory neuron functions. *Advances Adv. Exp. Med. Biol.*, v. 298, p. 3-16, 1991.
- Hume, D. A.; Fairlie, D. P.; Therapeutic targets in inflammatory disease. *Curr. Med. Chem.*, v. 12, n. 25, p. 2925-2929, 2005.
- Humes, J. L.; Opas, E. E.; Bonney, R. J. Arachidonic acid metabolites in mouse ear oedema. In: Lewis, A.; Capetola, R. *Advances in inflammations research I*. Otternes, Raven Press, New York, p. 57-65, 1986.
- Hunskar S.; Hole K.; The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain*, v. 30, n. 1, p. 103-104, 1987.
- Hunskar, S.; Fasmer, O.B.; Hole, K. Formalin tes in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. *J. Neurosci. Methods*, v. 14, p. 69-73, 1985.

Hunskar, S; Berger, O. G.; Hole, K. Dissociation between antinociceptive and anti-inflammatory effects of acetylsalicylic acid and indomethacin in the formalin test. *Pain*, v. 25, p. 125-132, 1986.

Ieda Y., Waguri-Nagaya Y., Iwahasi T., Otsuka T., Matsui N, Namba M, Asai K., Kato T.; IL-1beta-induced expression of matrix metalloproteinases and gliostatin/platelet-derived endothelial cell growth factor (GLS/PD-ECGF) in a chondrosarcoma cell line (OUMS-27). *Rheumatol. Int.*, v. 21, p. 45-52, 2001.

Ikeda, Y.; Ueno, A.; Naraba, H. OH-ISHL. Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanoids in the acid-induced writhing response of mice. *Life Sci.*, v. 69, p.2911-2919, 2001.

Jackson, D. L. *et al.* Glutamate participates in the peripheral modulation of thermal hyperalgesia in rats. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 284, p. 321-325, 1995.

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.

Ji, R. R.; Strichartz, G. Cell signalling and the genesis of neuropathic pain. *Sci.*, v. 252, p. 1–19, 2004.

Jones, S. L. *et al.* *Acute Pain: Mechanisms & Management*, St. Louis: Mosby-Year Book, 1992.

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

Kamm, M. A. Why the enteric nervous system is important to clinicians. *Gut.*, v. 47, Suppl4: iv8-iv10, 2000

Kandel, E. R.; Schwartz, J. H.; Jessel, T. M. *Principles of Neural Science*. New York: McGraw-Hill, p. 73-491, 2000.

Katzung, B. G. *Farmacologia básica e clínica*. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1992

Kay, J. M.; Drug-induced lung disease. In: Hasleton PS, editor. *Spencer's pathology of the lung*. 5th ed. New York: McGraw-Hill, p. 551-95, 1996.

Khanna, D. *et al.* Aggarwal A. and Aggarwal B.B.; Natural products as a gold mine for arthritis treatment. *Current Opinion in Pharm.* V. 7, p. 344-351, 2007.

Kilburn, K. H. Pulmonary disease induced by drugs. In: Fishman AP, editor. *Pulm. diseases and disorders*. New York: McGraw-Hill, p. 707-24, 1980.

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.

Konur, S.; Ghosh, A. Calcium signaling and the control of dendritic development, *Neuron*, v. 46, n. 3, p. 401-405, 2005.

Koster, R.; Anderson, M.; De Beer, E. J. Acetic acid for analgesic screening. *Fed. Proc.*, v. 18, p. 412-416, 1959.

Krieger, E. M. A ciência só avança com a participação da sociedade. Entrevista disponível em http://lqes.iqm.unicamp.br/canal_cientifico/pontos_vista/pontos_vista_entrevistas5-1.html. Acessado em 30 de junho de 2012.

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

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

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

Laine, L.; Gastrointestinal effects of NSAIDs and Coxibs. *Perspectives in Pain Management: The role of coxibs. J. Pain 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.1525-1530, 1984.

Le Bars, D.; Gozariu, M.; Cadden, S. W. Animal models of nociception. *Pharmacol. Rev.*, v. 53, p. 597-652, 2001.

Lee, J. L. *et al.*, Cyclooxygenase in the skin: pharmacological and toxicological implications. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, v. 192, p. 294-306, 2003.

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

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

Levy, D.; Zochodne, D. W. No pain: potential roles of nitric oxide in neuropathic pain. *Pain Practice.*, v. 4, p. 11-18, 2004.

Li, M. *et al.* The effect of substance P on asthmatic rat airway smooth muscle cell proliferation, migration, and cytoplasmic calcium concentration in vitro. *J. Inflamm.*, v. 8, n. 18, p. 1-9, 2011.

Li, Y. *et al.* Anti-inflammatory activity of patchouli alcohol isolated from *Pogostemonis herba* in animals models. *Fit.*, 82: 1295-1301, 2011.

Lima, R. R. *et al.* Inflamação em doenças neurodegenerativas. Ver. Para. Med., v. 21, n. 2, p. 29-33, 2007.

Limberger, R. P.; Sobral, M.; Henriques, A. T. Óleos voláteis de espécies de *Myrcia* nativas do Rio Grande do Sul. Quim. Nova, v. 27, n. 6, p. 916-919, 2004.

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

Liu, H.; Mantyh, P. W.; Basbaum, A. I. NMDA-receptor regulation of substance P release from Primary afferent nociceptors. Nature, v. 386, p. 721-724, 1997.

Longhi-Balbinot, D. T. *et al.* Further analyses of mechanisms underlying the antinociceptive effect of the triterpene 3 β , 6 β , 16 β -trihydroxylup-20(29)-ene in mice. Eur. J. Pharmacol., v. 373, p. 32-40, 2011.

Loomis, T. A.; Hayes A. W. Toxicologic testing methods. In: Loomis's Essential of Toxicology, Loomis T. A.; Hayes A. W. Academic Press, 4 th edition., San Diego, p. 205-248, 1996.

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

Machado, A. Neuroanatomia Funcional. São Paulo: Atheneu, p. 101-130, 2000.

Mai, C. M. G. Avaliação do potencial antinociceptivo de novos 3-metil-1h-1-pirazol metil esteris 5-substituídos em camundongos. Dissertação de Mestrado da Universidade Federal de Santa Maria, 2007.

Martins, R. T. *et al.* Receptores opioides até o contexto atual, Rev. dor [online],v. 13, p. 75-79, 2012.

Matsuda, H. *et al.* Aldose reductase and new triterpene and its oligoglycoside, centellasapogenol A and centellasaponina, from *Centela asiatica* (gotu kola). Heterocycles, v. 55, n. 8, p. 1499-1504, 2001.

Matsuda, H.; Morikawa, T.; Yoshikawa, M. Antidiabetogenic constituents from several natural medicines. Pure Appl. Chem., v. 74, n. 7, p. 1301-1308, 2002a.

Matsuda, H.; Nishida, N; Yoshikawa, M. Antidiabetic Principles of Natural Medicines. V.1) Aldose Reductase Inhibitors from *Myrcia multiflora* DC. (2): Structures of Myrciacitrins III, IV, and V, Chem. Pharm. Bull., v. 50, n. 3, p. 429-431, 2002b.

McCarson, K. E.; Goldstein, B. D. Naloxone blocks the formalin-induced increase of substance P in the dorsal horn. Pain, v. 38, p. 339-345, 1989.

- McCarson, K. E.; Goldstein, B. D. Time-course of the alterations in dorsal horn substance P levels following formalin: blockade by naloxone. *Pain*, v. 41, p. 95-100, 1990.
- McNamara, R. C. *et al.* TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, v. 104, 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. Nut.*, V. 130, n. 4, p. 1007S-15S, 2000.
- Meyer, R. A.; Campbell, J. N.; Raja, S. N. Peripheral mechanisms of pain. In: Wall, P. D. & Melzack, R. *Textbook of Pain.*, 1994.
- Millan, M. J. Descending control of pain. *Progr. Neurobiol.*, v. 66, p. 355–474, 2002.
- Millan, M. J. Serotonin (5-HT) and pain: a reappraisal of its role in the light of receptor multiplicity. *Seminars Neurosci.*, v. 7, p. 409– 419, 1995.
- Millan, M. J. The induction of pain: an integrative review. *Progr. Neurobiol.*, v. 57, n. 1, p. 164, 1999.
- Millan, M. J. The role of descending noradrenergic and serotonergic pathways in the modulation of nociception: focus on receptor multiplicity. In: Dickenson, A.; Besson, J. M. *The Pharmacology of Pain. Handbook of Experimental Pharmacology*, Berlin: Springer Verlag, 1997.
- Mogil, J. S. *et al.* Screening for pain phenotypes: analysis of three congenic mouse strains on a battery of nine nociceptive assays. *Pain*, v. 126, p. 24-34, 2006.
- Mogil, J. S.; Adhikari, S. M. Hot and cold nociception are genetically correlated. *J. Neurosci.*, v. 19, p. 1-5, 1999.
- Moore, P. K. *et al.* L-NG-nitro arginine methyl ester exhibits antinociceptive activity in the mouse. *Braz. J. Pharmacol.*, v. 102, p. 198-202, 1991.
- Mortaz, E. *et al.* Dual effects of acetylsalicylic acid on mast cell degranulation, expression of cyclooxygenase-2 and release of pro-inflammatory cytokines. *Biochem. Pharmacol.*, v. 69, p. 1049–1057, 2005.
- Motilva, V. *et al.* Cox Expression and PGE 2 and PGD 2 production in experimental acute and chronic gastric lesions. *Internat. Immunopharm.*, v. 5, p. 369-379, 2005.
- Mutoh, M. *et al.* Suppression by flavonoids of cyclooxygenase-2 promoter-dependent transcriptional activity in colon cancer cells: structure-activity relationship. *Jpn. J. Cancer Res.*, v. 91, p. 686-91, 2000.

Natalini, C. C. Comparative evaluation of the effects of epidural morphine, alfentanil, butorphanol, tramadol and U-50488H in horses. Tese de doutorado da University of Minnesota, 2000.

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

Newman, D. J.; Cragg, G. M. Natural products as sources of New Drugs over the 25 years. *J.Nat. Prod.*, v.70, p. 461-477, 2007.

Nguemfo, E. L. *et al.* Anti-inflammatory and anti-nociceptive activities of the stem bark extracts from *Allanblackia Monticola* STANER L.C. (Guttiferae). *J. Ethnopharmacol.*, v. 114, p. 417-24, 2007.

O'Connor, T. M. *et al.* The role of substance P in inflammatory disease. *J. Cel. Physiol.*, v. 2001, p. 167-180, 2004.

Okoli, C.O.; Akah, P. A.; Nwafor, S. V. *et al.* Anti-inflammatory activity of hexane leaf extract of *Aspilia Africana* C.D Adams. *J. Ethnopharmacol.*, v.109, p.219-25, 2007.

Ozawa, S.; Kamiya, H.; Tsuzuki, K. Glutamate receptors in the mammalian central nervous system. *Progr. Neurobiol.*, v. 54, n. 5, p. 581-618, 1998.

Peixoto, A.L. ; Amorim, M. P. Coleções botânicas: Documentação da biodiversidade Brasileira. *Cien. Cult.*, v. 55, n. 3, p. 21-24, 2003.

Person, B.; Wexner, S. D. The management of postoperative ileus. *Curr. Probl. Surg.*, v. 43, p. 6-65, 2006.

Piek, J. J.; Winter, R. J. Type II secretory phospholipase A2: the emerging role of biochemical markers of plaque inflammation. *Eur. Heart J.*, n. 24, p. 1804-1806, 2003.

Pokharel, Y. R. *et al.* Potent inhibition of the inductions of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 by taiwaniaflavone. *Nitric Oxide Biol. Chem.*, v. 15, p. 217-225, 2006.

Rang, H. P.; Dale, M. M.; Ritter, J. M. *Farmacologia*. 6. ed., Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 2007.

Raso, G. M. *et al.* Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774A.1. *Life Sci.*, v. 68, p. 921-31, 2001.

Rates, S. M. K. Plants as source of drugs. *Toxicon*, v. 39, p. 603-613, 2001.

Rates, S. M. K.; Barros, H. M. T. Modelos animais para avaliação da dor: métodos para triagem de novos analgésicos. *Rev. Bras. Cienc. Farma.*, v. 75, n. 2, p. 31-34, 1994.

Recio, M. C. *et al.* In vivo activity of pseudoguaianolide sesquiterpene lactones in acute and chronic inflammation. *Life Sci.*, v. 66, p. 2509-2518, 2000.

- Reeh, P. W.; Kress, M. Molecular physiology of proton transduction in nociceptors. *Curr. Opin. Pharmacol.*, v.1, p. 45–51, 2001.
- Rhind, S. G. *et al.* Indomethacin modulates circulating cytokine responses to strenuous exercise in humans *Cytokine*, v.19, p.153-158, 2002.
- Ribeiro, R. A. *et al.* Involvement of resistant macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. *Eur. J. Pharmacol.*, n, 387, p. 111-118, 2000.
- Richardson, J. D.; Vasko, M. R. Cellular mechanisms of neurogenic inflammation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v.302, p.839-45, 2002.
- Rocha, A. P. C. *et al.* Dor: aspectos atuais da sensibilização periférica e central. *Rev. Bras. Anesthesiol.*, v. 57, p. 94-105, 2007.
- Rosland, J. H.; Hunskaar, S.; Hole, K. Diazepam attenuates morphine antinociception test-dependently in mice. *J. Pharmacol. Toxicol.*, v. 66, p. 382-386, 1990 a.
- Rosland, J. H. *et al.* The formalin test in mice: effect of formalin concentration. *Pain*. v. 42, p. 235-242, 1990 b.
- Rotelli, A. E. *et al.* Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation. *Pharmacol. Res.*, v. 48, p. 601-6, 2003
- Rover, C. F. S. A Qualificação de Pesquisadores e as Exigências da Indústria publicado por Instituto Racine 2010. Disponível em <http://www.racine.com.br/pesquisa-desenvolvimento-pd/portal-racine/setor-industrial/pesquisa-desenvolvimento-pd/a-qualificacao-de-pesquisadores-e-as-exigencias-da-industria>. Acessado em 30 de junho de 2012.
- Russo, C. M.; Brose, W. G. Chronic pain. *Annu. Rev. Med.*, v. 49, p. 123-133, 1998.
- Sakurada, T. *et al.* Involvement of nitric oxide in spinally mediated capsaicin- and glutamate-induced behavioural responses in the mouse. *Neurochem*. v. 29, p. 271– 278, 1996.
- Sánchez, T.; Moreno, J. J. Role of prostaglandin H-synthase isoforms in murine ear edema induced by phorbol éster application on skin. *Prostagl. Othe. Lipid. Mediat.*, v. 57, p. 119-131, 1999.
- Sannomiya, M. *et al.* Flavonoids and antiulcerogenic activity from *Byrsonima crassa* leaves extracts. *J. Ethnopharmacol.*, v. 97, n.1, p.1-6, 2005.
- Santos, A. R. S. *et al.* 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.417–426, 1999.
- Santos, A.R.S. *et al.* Mechanisms involved in the antinociception caused by agmatine in mice. *Neuropharmacol.* V. 48, p. 1021- 1034, 2005.

Santos, S. C. M., Melhoria da equidade no acesso aos medicamentos no Brasil: os desafios impostos pela dinâmica da competição extra-preço. Capítulo 3: Mercado Farmacêutico: Caracterização e dinâmica competitiva. Fundação Oswaldo Cruz, Escola Nacional de Saúde Pública, 2001.

Sawynok, J.; Reid, A. Caffeine antinociception: role of formalin concentration and adenosine A₁ and A₂ receptors. *Eur. J. Pharmacol.*, v. 298, p. 105-111, 1996.

Schafers, M.; Sorkin, L. Effect of cytokines on neuronal excitability. *Neurosci. Lett.*, v. 437, p. 88-193, 2008.

Schlansky, B.; Hwang, J. H. Prevention of nonsteroidal anti-inflammatory drug-induced gastropathy. *J. Gastroenterol.*, v. 52, p. 44-52, 2009.

Serhan, C. N.; Savill, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. *Nat. Immunol.*, v. 6, p. 1191-1197, 2005.

Shafiee, A. *et al.* The antinociceptive activities of 1-(4-aryl-2-thiazolyl)-3,5-disubstituted-2-pyrazolines in mouse writhing test. *J. Pharmacol. Sci.*, v. 6, n. 3, p. 360 – 2, 2003.

Shen, W. *et al.* Nitric oxide production and NO synthase gene expression contribute to vascular regulation during exercise. *Med Sci Sports Exerc.*, v. 8, p.1125-1134, 1995.

Siegmund, E.; Cadmus, R.; Lu, G. Method for evaluating both non-narcotic and narcotic analgesics. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, v. 95, p. 729, 1957.

Silveira, P. F. *et al.* Farmacovigilância e reações adversas as plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. *Bras. J. Pharmacol.*, v. 18, n. 4, p. 618-626, 2008.

Silverstein, F. E. *et al.* Misoprostol reduces serious gastrointestinal complications in patients with rheumatoid arthritis receiving nonsteroidal anti-inflammatory drugs. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *Annu. Intern. Med.*, v. 123, p. 241-249, 1995.

Simões, C. M. O. *et al.* Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis, Ed: Universidade UFRGS / Editora da UFSC, 2004.

Simões, C. M. O. Investigação químico-farmacológica de *Achyrocline satureioides* (Lam.) DC., Compositae (marcela). Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 1984.

Sipes, I. G.; Dart, R. C. Toxicologia. In: Brody, T. M. *et al.* Farmacologia humana - da molecular à clínica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p.740-749, 1997.

Skarda, R.T. *et al.* Anestesia local en bovinos, ovejas, cabras y cerdos Cap. 5 In: "Manual de Anestesia Veterinaria" – 2^a ed. Mosby / Doyma Libros , S.A. Madrid, España. 53-77.1 997.

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

- Snyder, S. H. Nitric oxide: First in a new class of neurotransmitters. *Sci.*, v. 257, p. 494-496, 1992.
- Sommer, C. Serotonin in pain and analgesia, actions in the periphery. *Mol. Neurobiol.*, v. 30, p. 117-125, 2004.
- Sorkin, L. S.; Mcadoo, D. J.; Willis, W. D. Raphe magnus stimulation-induced antinociception in the cat is associated with release of amino acids as well as serotonin in the lumbar dorsal horn. *Brain Res.*, v. 618, p. 95-108, 1993.
- Souza, A. H. Avaliação do potencial antinociceptivo e mecanismo de ação do 2-[5-triclorometil-5-hidroxi-3-fenil-4,5-dihidro-1H-pirazol-1-IL]4-(4bromofenil)5-metiltiazol(B50) em camundongos. Dissertação de mestrado apresentada à Pós-Graduação da Universidade Federal de Santa Maria, 2008.
- Stein, C.; Schafer, M.; Machelska, H. Attacking pain at its source: new perspectives on opioids. *Nat. Med.*, v. 9, p. 1003–1008, 2003.
- Steinmeyer, J. Pharmacology basis for the therapy of pain and inflammation with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Arthritis Res.*, v. 2, p. 379-385, 2000.
- 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. 168-176, 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. *Neurosci.*, v. 44, p.131-135, 1991.
- 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. *et al.* The formalin test: an evaluation of the method. *Pain*, v. 51, n. 1, p. 5-17, 1992.
- Tjolsen, A.; Hole, K. Animal Models of analgesia. In: Dickenson, A.; Besson, J. *The pharmacology of Pain*, V. 130/I, Springer: Verlag , p. 1-20, 1997.
- Todd, A. J.; Spike, R. C. The localization of classical transmitters and neuropeptides within neurons in laminae I-III of the mammalian spinal dorsal horn. *Prog. Neurobiol.*, v. 41, n. 5, p. 609-45, 1993.
- Vallance, P.; Chan, N. Endothelial function and nitric oxide: clinical relevance. *Heart (British Cardiac Society)*, v. 85, p. 342-350, 2001.
- Van Loon, G. R.; Appel, N. M. β -endorphin-induced stimulation of central sympathetic outflow: β -endorphin increases plasma concentrations of epinephrine nor-epinephrine and dopamine in rats. *Endocrinol.*, v. 109, p.. 46-53, 1981.
- Vanderah, T. W. Pathophysiology of Pain. *Med. Clin. North Am.*, v. 91, p. 1-12, 2007.

- Vyklicky, L. Techniques for the study of pain in animals. *Adv. Pain Res. Ther.*, v. 3, p.727–745, 1979.
- Waldhoer, M.; Bartlett, S. E.; Whistler, J. L. Opioid receptors. *Annu. Rev. Biochem.*, v. 73, p. 953–990, 2004.
- Wallace, J. L. Prostaglandins, NSAIDs, and gastric mucosal protection: why doesn't the stomach digest itself?. *Physiol. Rev.*, v. 88, p.1547-1565. 2008.
- Wietelak, E. P. *et al.* Illness-induced hyperalgesia is mediated by a spinal NMDA–nitric oxide cascade. *Brain Res.*, v. 664, p. 9–16, 1994.
- Willis Jr, W. D. The somatosensory system, with emphasis on structures important for pain. *Brain Res. Rev.*, v. 55, n. 2, p. 297-313, 2007.
- Whittle, B. A. Release of a kinin intraperitoneal injection of chemical agents in mice. *Internal. J. Neuropharmacol.*, v. 32, p. 369-378, 1964.
- Yaksh, T. L. Central pharmacology of nociceptive transmission. In: Wall, P. D.; Melzack, R. (Eds). *Textbook of Pain*. 5 Ed. Edinburgo, RU: Elsevier Churchill Livingstone, P. 371-414, 2006.
- Yaksh, T. L. Pharmacology of spinal adrenergic system with modulate spinal nociceptive processing. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, v. 22, p. 845-858, 1985.
- Yaksh, T. L.; Rudy, T. A. Studies on the direct spinal action of narcotics on the production of analgesia in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, v.202, p. 411-428, 1977.
- Yoshikawa, M. *et al.* Antidiabetic principles of natural medicines. II: aldore redutase and a-glucosidase inhibitors from brazilian natural medicines, The leaves of *Myrcia multiflora* DC. (Myrtaceae): Struture of myrciacitrins I and II and myrciphenones A and B. *Chem. Pharm. Bull.*, v. 46, n. 1, p. 113-119, 1998.
- Young, J. M.; Wagner, B. M.; Spires, D. A. Tachyphylaxis. In: 12-0- tetradecanoylphorbol acetate- and arachidonic acid-induced ear edema. *J. Invest. Dermatol.*, v. 80, n. 1, p. 48-52, 1983.
- Young, J. M. *et al.* The mouse ear inflammatory response to topical arachidonic acid. *J. Invest. Dermatol.*, v. 82, p. 367- 371, 1984.
- Yuan, Y.; PadoL, I.T.; Hunt, R.H. Peptic ulcer disease today. *Nat. Clin. Pract. Gastroenterol. Hepatol.*, v. 3, p. 80-9, 2006.
- Zhuo, M. Neuronal mechanism for neuropathic pain. *Mol. Pain*, v. 3, n. 14, 2007 doi:10.1186/1744-8069-3-14.
- Zylicz, Z.; Twycross, R. G. Oral opioids in the treatment of cancer pain. *Neth. J. Med.*, n. 39, p. 108-114, 1991.

10. ANEXOS

10.1. Anexo 1 - Certificado do protocolo experimental do projeto “Avaliação Experimental de Myrcia bella na dor aguda e inflamação em modelos experimentais de roedores”



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
Campus de Botucatu



Certificado

Certificamos que o Protocolo nº 368-CEUA, sobre “AVALIAÇÃO DO EFEITO DO EXTRATO HIDROALCÓOLICO DE MYRCIA BELLA CAMESS NA DOR AGUDA E NA INFLAMAÇÃO EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE ROEDORES”, 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.ª Dr.ª Patrícia Fernanda Felipe Pinheiro
Presidente - CEUA

10.2. 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 osterior:</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

10.3. 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 EHMB 5000 mg/kg

Sintomas	<i>Normal</i>	Tempo para as análises comportamentais (minutos)				
		30`	60`	120`	240`	360`
Aparência geral	4	4	4	4	4	4
Frênilo 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.