



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA**  
**INSTITUTO MULTIDISCIPLINAR EM SAÚDE**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOCÊNCIAS**

**ANDRESSA ARAÚJO OLIVEIRA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E  
ANTINOCICEPTIVA DO EXTRATO ETANÓLICO DO  
CAULE DE *Aeschynomene martii* BENTH (TRIPA DE  
GALINHA)**

Vitória da Conquista, BA

2016

**ANDRESSA ARAÚJO OLIVEIRA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E  
ANTINOCICEPTIVA DO EXTRATO ETANÓLICO DO  
CAULE DE *Aeschynomene martii* BENTH (TRIPA DE  
GALINHA)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em  
Biociências, Universidade Federal da Bahia, como requisito para  
obtenção do título de Mestre em Biociências.

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Regiane Yatsuda  
Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup> Mariluze Peixoto Cruz  
Universidade Federal da Bahia – UFBA

Vitória da Conquista, BA

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

**ANDRESSA ARAÚJO OLIVEIRA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E  
ANTINOCICEPTIVA DO EXTRATO ETANÓLICO DO  
CAULE DE *Aeschynomene martii* BENTH (TRIPA DE  
GALINHA)**

Esta dissertação foi julgada adequada à obtenção do grau de Mestre em Biociências e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Biociências, Universidade Federal da Bahia. Vitória da Conquista – BA, 2016.

---

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Regiane Yatsuda  
Universidade Federal da Bahia

---

Prof. Dr. Ricardo Evangelista Fraga  
Universidade Federal da Bahia

---

Prof. Dr. Raphael Ferreira Queiroz  
Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

Dedico a Deus e a todos aqueles que sempre torceram e apoiaram a realização deste trabalho.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me conceder a graça de estar viva e por todas as vitórias alcançadas.

Aos meus queridos pais Iris e Célia, e meu irmão Bruno por todo amor, incentivo, companheirismo e paciência pela ausência costumeira.

Ao meu esposo Rafael pela ajuda desde o início. Por ser uma pessoa tão especial e aguentar meu choro (muitas e muitas... e muitas vezes), por sua compreensão e apoio fundamental neste e em outros projetos de minha vida.

À Prof.<sup>a</sup> Regiane, por aceitar orientar o meu trabalho, por todo o conhecimento, paciência e dedicação para a realização desse trabalho.

À Prof.<sup>a</sup> Mariluze pelos ensinamentos, pela inestimável ajuda, por toda colaboração e disponibilidade.

À Érika, que de companheira de laboratório tornou-se amiga, por me ouvir e muitas vezes me consolar (também chorei muito), pelo apoio, pelos ensinamentos e incentivo.

Aos companheiros e aos amigos de laboratório, aos que estão desde o início da jornada até os mais novos no grupo: Aracelly, Camila, Cassya, Emanuella, Gladistone, Joseline, Maiana, Rafael e Saboia; Alana, Carol e Lorena; Carline, Danyella, Ivo, Patrícia, Talita, Verônica, Sarah e Alana. Agradeço ainda, à (já Doutora) Kelle, que esteve em todas essas fases e proporcionou muitas caronas, além de toda ajuda. A todos, meus sinceros agradecimentos por toda união, convívio, aprendizado e empenho de cada um de vocês.

A Marcos por caminhar junto (até agora): graduação, estágio supervisionado e mestrado, proporcionando situações de bom humor. Tornou-se um grande amigo.

Às minhas amigas-irmãs incondicionais, Geysa e Neiva, agradeço demais por toda a amizade, carinho, palavras de incentivo e otimismo. Sei que posso contar sempre com vocês.

À Taiane por sua amizade, alegria e entusiasmo, sempre prestativa e disposta a ajudar.

Aos meus amigos Dil, Ana, Larissa, Jaqueline e Simone, que sempre ouviam meus relatos da UFBA. Obrigada pela força, apoio e por proporcionarem momentos de descontração. Vocês alegram meus sábados.

Aos meus familiares e amigos que sempre torceram por mim e se alegram com a conclusão dessa etapa.

À FAPESB pela concessão da bolsa de estudo e financiamento do projeto.

“Por vezes, sentimos que aquilo que fazemos não é, senão, uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”

(Madre Tereza de Calcutá)



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Distribuição geográfica (ocorrência confirmada) de <i>Aeschynomene martii</i> Benth no Brasil .....	22
<b>Figura 2</b> - Unidades de conservação do Estado da Bahia .....	30
<b>Figura 3</b> - Fluxograma do protocolo utilizado no estudo dos possíveis mecanismos de ação antinociceptivos do extrato etanólico da casca de <i>A. martii</i> Benth .....	35

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Metabólitos, sistemas de eluição e reveladores utilizados para a análise fitoquímica em CCD do extrato etanólico do caule de <i>A. martii</i> Benth.....	32
---	----

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>5-HT<sub>3</sub></b>	Receptor 5-hidroxitriptamina 3
<b><i>A. martii</i></b>	<i>Aeschynomene martii</i>
<b><i>A. arbuscula</i></b>	<i>Aeschynomene arbuscula</i>
<b>AINES</b>	Anti-inflamatórios não-esteroidais
<b>ANOVA</b>	Análise de variância
<b>Bchl <math>\alpha</math></b>	Bacterioclorofila $\alpha$
<b>BSTFA</b>	N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida
<b>CCD</b>	Cromatografia em Camada Delgada
<b>CG-EM</b>	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa
<b>COX</b>	Cicloxigenase
<b>COX-1</b>	Cicloxigenase do tipo 1
<b>COX-2</b>	Cicloxigenase do tipo 2
<b>EDTA</b>	Ácido etileno diamino tetra acético
<b>eV</b>	Elétron-volt
<b>GABA<sub>A</sub></b>	Receptor do tipo A para ácido gama amino butírico
<b>i.p.</b>	Intraperitoneal
<b>IL-1</b>	Interleucina-1
<b>IL-6</b>	Interleucina-6
<b>IL-8</b>	Interleucina-8
<b>LTB<sub>4</sub></b>	Leucotrieno B <sub>4</sub>
<b>mmHg</b>	Milímetro de mercúrio
<b>m/v</b>	Massa/volume
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Fator Nuclear $\kappa$ B

<b>nm</b>	Nanômetro
<b>nM</b>	Nanomolar
<b>PAF</b>	Fator ativador de plaqueta
<b>PBS</b>	Tampão de Fosfato Salina
<b>PGD2</b>	Prostaglandina D2
<b>PGE2</b>	Prostaglandina E2
<b>PGF2<math>\alpha</math></b>	Prostaglandina F2 $\alpha$
<b>PGI2</b>	Prostaciclina
<b>s.c.</b>	Subcutânea
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>TMCS</b>	Trimetilclorosilano
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral-alfa
<b>U.V.</b>	Ultravioleta
<b>v/v</b>	Relação entre volume e volume

## **LISTA DE SIGLAS**

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
FAPESB	Fundação de Amparo à Pesquisa e à Inovação Tecnológica do Estado da Bahia
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
OMS	Organização Mundial da Saúde
UFBA	Universidade Federal da Bahia
UESB	Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

OLIVEIRA, Andressa Araújo. Avaliação da atividade anti-inflamatória e antinociceptiva do extrato etanólico do caule de *Aeschynomene martii* Benth (tripa de galinha). 83f. il. 2016. Dissertação (Mestrado) – Instituto Multidisciplinar em Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2016.

## RESUMO

A espécie vegetal estudada, *Aeschynomene martii* Benth, conhecida popularmente como tripa de galinha faz parte do gênero *Aeschynomene* (Leguminosae) composto por 350 espécies. Esta é uma espécie endêmica da região do povoado de Palmeiras, distrito da cidade de Contendas do Sincorá – BA, cujos estudos foram realizados com o objetivo de avaliar o potencial medicinal dessa planta. Para isso, foram conduzidos testes *in vivo* com o extrato bruto (etanólico) do caule de tripa de galinha no intuito de analisar a ação antinociceptiva e anti-inflamatória. Inicialmente, foram realizados testes de análise fitoquímica por cromatografia de camada delgada (CCD) e por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (CG-EM). Para avaliação antinociceptiva e anti-inflamatória foram utilizados os seguintes testes: teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético, recrutamento de leucócitos para a cavidade peritoneal, avaliação do extravasamento peritoneal com azul de Evans, nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina, avaliação da hipernocicepção - teste de pressão crescente na pata. Com a finalidade de esclarecer alguns possíveis mecanismos antinociceptivos do extrato etanólico, os camundongos *Balb-C* foram pré-tratados com diferentes antagonistas receptor-específico no teste das contorções abdominais. Os dados mostraram que o extrato etanólico do caule de *A. martii* apresentou atividade antinociceptiva significativa reduzindo as contorções abdominais em camundongos (12,5 - 50 mg/kg), bem como diminuiu os episódios de flinches no teste de formalina, na fase 1 caracterizada pela dor de origem neurogênica (0,39 – 6,25 mg/kg) e na fase 2 caracterizada pela dor de origem inflamatória (0,78,- 6,25 mg/kg), também conseguiu diminuir a hiperalgesia observada no teste de hipernocicepção mecânica (1,56 mg/kg). Em relação a atividade anti-inflamatória do extrato, o mesmo foi capaz de inibir o recrutamento de neutrófilos (1,56 e 3,13 mg/kg) e diminuir o extravasamento peritoneal (12,5 mg/kg). Os resultados obtidos foram expressos com média  $\pm$  desvio padrão da média e analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Bonferroni, com nível de significância inferior a 0,05. Os resultados revelaram que *A. martii* Benth é uma espécie rica em atividade biológica, sendo promissor o isolamento e identificação de seus compostos bioativos.

**Palavras-chave:** *Aeschynomene martii* Benth, bioensaio, plantas medicinais.

OLIVEIRA, Andressa Araújo. Evaluation of anti-inflammatory and antinociceptive activity of the ethanolic extract of *Aeschynomene martii* Benth stem. 83f. il. 2016. Dissertation (Masters) – Multidisciplinary Institute of Health, Federal University of Bahia, Vitória da Conquista, 2016.

### ABSTRACT

*Aeschynomene* genus (Leguminosae) is composed of 350 species. *Aeschynomene martii* Benth is an endemic species of Contendas do Sincorá - BA, studies were conducted to evaluate the medicinal potential of this plant. Tests were conducted *in vivo* with the crude extract (ethanol) of the bark of *A. martii* in order to examine the antinociceptive and anti-inflammatory activities. Initially, phytochemical analysis was performed by thin layer chromatography (TLC) and gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS). Anti-inflammatory and antinociceptive activities were analyzed by writhing test, formalin-induced hypernociception test, leukocyte recruitment to the peritoneal cavity, evaluation of vascular permeability (Evans Blue test) and evaluation of mechanical hypernociception. In order to assess some possible antinociceptive mechanisms of action of the bark ethanolic extract, Balb-C mice were pre-treated with different receptor-specific antagonists in the in the writhing test induced by acetic acid model. The data revealed the stem ethanolic extract of *A. martii* presented significant antinociceptive activity reducing writhings in mice (12.5 - 50 mg/kg); in the formalin test, flinches episodes decreased in phase 1, characterized by neurogenic pain (0.39 - 6.25 mg/kg) and in phase 2 characterized by inflammatory pain (0.78 - 6.25 mg/kg); the extract was also able to reduce mechanical hypernociception (1.56 mg/kg). The ethanolic extract of *A. martii* showed anti-inflammatory activity by inhibiting neutrophil recruitment (1.56 and 3.13 mg/kg) and decreasing the vascular permeability (12.5 mg/kg). The results are presented as the mean  $\pm$  S.D. Statistical comparisons between groups were conducted using analysis of variance (ANOVA) (one -way) followed by the Bonferroni test. The established level of significance was  $P < 0.05$ . The results showed that *A. martii* Benth possess biological activity and the isolation and identification of their bioactive compounds is promising.

**Keywords:** *Aeschynomene martii* Benth, biological assay, medicinal plants.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	17
2. REVISÃO DA LITERATURA .....	19
2.1 – ATIVIDADE BIOLÓGICA DE PLANTAS MEDICINAIS .....	19
2.2 – GÊNERO <i>AESCHYNOMENE</i> .....	21
2.3 – PROCESSO INFLAMATÓRIO .....	22
2.4 – DOR E NOCICEPÇÃO .....	25
3. JUSTIFICATIVA.....	28
4. OBJETIVOS .....	29
4.1 – OBJETIVO GERAL.....	29
4.2 – OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	29
5. MATERIAL E MÉTODOS .....	30
5.1 – COLETA E IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE VEGETAL.....	30
5.2 – PREPARO DO EXTRATO ETANÓLICO E ANÁLISE FITOQUÍMICA.....	31
5.2.1 – Preparo do extrato .....	31
5.2.2 – Análise fitoquímica do extrato em Cromatografia em Camada Delgada (CCD).....	31
5.2.3 – Análise fitoquímica do extrato em Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (CG-EM).....	33
5.3 – BIOENSAIOS .....	33
5.3.1 – Animais .....	33
5.3.2 – Teste das Contorções Abdominais Induzidas por Ácido Acético .....	34
5.3.3 – Análise de possíveis mecanismos de ação antinociceptivos do extrato etanólico de <i>A. martii</i> Benth .....	34
5.3.4 – Recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal.....	36
5.3.5 – Avaliação da permeabilidade vascular.....	36
5.3.6 – Teste de nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina em camundongos.....	37
5.3.7 – Avaliação da Hipernocicepção - Teste de Pressão Crescente na Pata.....	37
6. REFERÊNCIAS.....	39
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	77
ANEXOS.....	78



## 1. INTRODUÇÃO

A utilização de produtos naturais é uma prática realizada desde a antiguidade, mas apenas em meados de 1970 que o interesse em pesquisas sobre o potencial terapêutico das plantas se intensificou, quando a Organização Mundial de Saúde (OMS) reconheceu a fitoterapia como uma alternativa complementar às terapias medicamentosas alopáticas e passou a incentivar a criação de programas norteadores para um uso seguro e sustentável de plantas medicinais (ANTONIALLI, 2009; OLIVEIRA et al., 2006).

Apesar dos muitos avanços da medicina alopática, o uso da fitoterapia tem sido estimulado com o objetivo de prevenir, reduzir ou mesmo curar os sintomas e agravos à saúde. Além disso, muitas patologias tornam-se crônicas devido à falta de cuidado ou mesmo porque muitas pessoas não conseguem custear os medicamentos tradicionais da indústria farmacêutica para o seu tratamento. Dessa forma, a utilização de plantas medicinais vem crescendo com o passar dos anos por apresentar-se como uma alternativa financeiramente mais acessível à população e aos serviços de saúde (DUTRA, 2009; OLIVEIRA et al., 2006).

Em 1985, a OMS estimou que aproximadamente 65% da população mundial depende de medicamentos tradicionais derivados de plantas para os seus cuidados de saúde primários (CRAGG; NEWMAN, 2013). Muitas vezes o uso popular de plantas medicinais para o tratamento de doenças ou manutenção da saúde, representa o único recurso terapêutico de muitas comunidades (HOEFFEL et al., 2011). Essa prática apresenta grande relevância na área da saúde, e tem sido muito observado o uso desse sistema por diferentes culturas, seja pela tradição, no que concerne às práticas antigas passadas através de gerações ou mesmo porque a maioria expressiva da população mundial não dispõe de uma condição socioeconômica favorável para financiar os elevados custos dos medicamentos alopáticos e/ou sintéticos (CRAGG; NEWMAN, 2013; DUTRA, 2009; VEIGA JUNIOR, 2008).

O Brasil possui uma imensa cobertura vegetal, atualmente são reconhecidas 46172 espécies para a flora brasileira, das quais somente 1.110 espécies foram estudadas acerca de suas propriedades medicinais, e apenas 8% do total de espécies foram estudadas em relação aos compostos bioativos (FLORA DO BRASIL 2020, 2016; RODRIGUES et al., 2015). Grande parte desses compostos naturais constituem modelos para síntese de fármacos, sendo que essas substâncias com atividade biológica são fontes promissoras de novas moléculas que podem ser utilizadas para tratamento de várias enfermidades (RODRIGUES et al., 2015).

Um dos maiores desafios na área farmacêutica tem sido a elucidação dos compostos ativos presentes nas plantas, bem como seus mecanismos de ação, já que muitos desses compostos, de classes ou estruturas diferentes, podem levar a uma mesma atividade, apresentando efeitos sinérgicos (MACIEL et al., 2002). Sixel e Pecinalli (2005) retratam que esse sinergismo provocado pelos vários princípios ativos da planta aumenta a eficácia em relação aos compostos isolados. E relatam ainda que a espécie poderia ser comercializada na forma de fitoterápicos ou “in natura”, mesmo que não houvesse a identificação dos compostos ativos, mas que as plantas tivessem sua segurança e eficácia comprovadas.

Muitas plantas ainda são utilizadas com base no conhecimento popular, sem registro ou regulamentação e sem estudos que comprovem a sua segurança. Desse modo, apesar da grande utilização das plantas como recurso terapêutico, existe pouca informação disponível sobre seus compostos, potenciais riscos e toxicidade, uma vez que, aparente para a sua defesa contra agentes patológicos, as plantas possuem a capacidade de produzir diferentes agentes tóxicos em quantidades elevadas (DUTRA, 2009; FONSECA; PEREIRA, 2004).

Deste modo, para que um uso correto das plantas medicinais ocorra, estudos científicos devem ser estimulados, reforçando a necessidade de otimização de novas linhas de pesquisas e incentivo às já existentes, haja vista que um número expressivo das plantas medicinais que são utilizadas no Brasil não possui ou possui pouca comprovação de suas ações farmacológicas, por não terem sido submetidas a testes científicos prévios (ANTONIALLI, 2009; VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

Para a realização desta pesquisa, a coleta da planta *Aeschynomene martii* Benth, conhecida popularmente como “tripa de galinha”, ocorreu no Semiárido da Bahia, na Floresta Nacional Contendas do Sincorá (FLONA), uma área de reserva ambiental. Este é o primeiro relato de estudo da atividade biológica de *A. martii* Benth. Dessarte, foram realizados estudos com o objetivo de avaliar o potencial farmacológico dessa planta. Dessa forma, esta pesquisa se justifica pela necessidade de estudos para avaliação terapêutica de plantas da flora brasileira e seu uso sustentável, para posterior isolamento de compostos, colaborando para o desenvolvimento de novos fitoterápicos e fitofármacos.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 – ATIVIDADE BIOLÓGICA DE PLANTAS MEDICINAIS

As plantas são utilizadas desde a antiguidade como alimento, veneno e também na cura de doenças, a diferença em tais aplicabilidades está relacionada à dose, à via de administração e à finalidade para a qual foi usada. Dentre as várias formas de utilização, o emprego terapêutico tornou-se notável ao longo das gerações. Acredita-se que os humanos passaram a fazer uso das plantas com finalidade medicinal, ingerindo ervas e folhas para alívio e cura de doenças, a partir da observação dos animais. No Brasil, essa prática está presente desde antes da colonização, quando os índios, que já faziam uso das plantas, transmitiram esse conhecimento aos colonizadores (ANTONIALLI, 2009; BADKE, et al., 2012; DUTRA, 2009; LIMA-SARAIVA et al., 2015; PEREIRA; CARDOSO, 2012).

O conhecimento adquirido foi passado de geração em geração durante séculos, assim, devido ao uso de plantas medicinais estar tão intimamente ligado ao saber popular, as políticas públicas voltadas para um manejo seguro da flora medicinal reconhecem e valorizam o conhecimento popular. Porém, deve-se ponderar que muitas vezes a utilização não é feita de maneira adequada, já que não são considerados aspectos de indicações, forma de preparo, modo de armazenamento, interação com medicamentos tradicionais ou mesmo com outras plantas, além de efeitos adversos e toxicidade (DUTRA, 2009; FIGUEREDO; GURGEL; JUNIOR, 2014).

Após um declínio no uso de produtos naturais em detrimento dos fármacos produzidos por via sintética, especialmente após a Segunda Guerra Mundial, desde a década de 90 o uso de fitoterápicos vem crescendo de maneira considerável, e mesmo com o avanço da medicina alopática, as populações mais carentes continuaram a fazer uso das plantas medicinais devido ao alto custo e dificuldades no acesso à assistência médica tradicional. Hoje em dia, muitos são os aspectos que favorecem a ocorrência dessa prática de maneira generalizada, como efeitos colaterais decorrentes do uso crônico de medicamentos tradicionais, além dos fatores anteriormente citados. Há ainda o fato de o saber popular, em muitos casos, já estar comprovado cientificamente, legitimando desse modo, a eficácia do uso de plantas na terapêutica (ANTONIALLI, 2009; BRASIL, 2012; DUTRA, 2009).

Com o avanço da química, muitos compostos de plantas puderam ser isolados, identificados e sintetizados, levando ao desenvolvimento de novos medicamentos. Um

composto farmacologicamente ativo pode estar em pequena proporção no extrato vegetal, ou seja, não necessariamente, a substância em maior proporção é o princípio ativo. Dessa forma, testes sequenciais devem ser conduzidos até que seja possível isolar um ou mais compostos que possuam atividade biológica. A análise fitoquímica é bastante relevante quando acompanhada de testes biológicos que avaliem a eficácia da fração isolada, contribuindo para a identificação da substância ativa (PEREIRA; CARDOSO, 2012; SIXEL; PECINALLI, 2005).

Atualmente no Brasil, a maioria das espécies vegetais não foi estudada de maneira adequada, e seu uso é realizado a partir da cultura popular, sem a realização de estudos pré-clínicos e clínicos que comprovem sua eficácia e segurança farmacológica. O ideal é que as plantas medicinais passem por vários estágios de testes que envolvam a química orgânica, fitoquímica, farmacologia, química orgânica sintética, medicinal e farmacológica, integrando ações que vão desde a identificação e isolamento do composto ativo, passando pela avaliação farmacológica dos extratos e substâncias ativas isoladas, modificações químicas nas mesmas, avaliação do seu mecanismo de ação, para então obter formulações que levem ao produto fitoterápico e este seja utilizado de maneira segura, alcançando os resultados esperados (LIMA-SARAIVA et al., 2015; PEREIRA; CARDOSO, 2012; SANTOS et al., 2011).

Muitas indústrias farmacêuticas têm se empenhado em produzir formulações a base de compostos extraídos de plantas, na busca por uma redução dos custos com medicamentos sintéticos. Outra vantagem é que esses compostos podem servir de base para a produção de fármacos com atividades terapêuticas similares às substâncias naturais originais, podendo ainda ser modificadas, fazendo que com se convertam em substâncias menos tóxicas. As pesquisas nessa área vem se intensificando na tentativa de elaborar novos produtos que apresentem maior ação terapêutica, menos toxicidade e um menor custo (GADELHA et al., 2013; PINTO et al., 2013).

As plantas são uma fonte riquíssima de constituintes fitoquímicos importantes com ação protetora ou preventiva contra doenças, não apenas para elas mesmas, mas também para animais e humanos. A adaptação das plantas ao ambiente levou a alterações em seus níveis fitoquímicos, com produção de metabólitos secundários (também chamados produtos naturais, fitoquímicos ou metabolitos especializados). Vários são os fitoquímicos conhecidos, entre eles estão: alcaloides, saponinas, flavonoides, taninos, glicosídeos, antraquinonas, esteroides e terpenos (KLIEBENSTEIN; OSBOURN, 2012; MAOBE et al., 2013).

Os metabólitos primários (açúcares, ácidos graxos, aminoácidos, proteínas, celulose) originados a partir do metabolismo o qual a planta utilizou água, dióxido de carbono e

minerais, são aqueles responsáveis pela realização de funções vitais das células. Os metabólitos secundários são geralmente de estrutura complexa, de baixo peso molecular e, ao contrário dos primários, encontram-se em pequenas proporções e em determinados grupos de plantas. Esses metabólitos secundários apresentam grande interesse não apenas pelas atividades biológicas exercidas pelas plantas em relação ao meio, mas também pelas atividades biológicas relacionadas à saúde humana, apresentando grande relevância na área farmacológica. (KLIEBENSTEIN; OSBOURN, 2012; MAOBE et al., 2013; PEREIRA; CARDOSO, 2012).

## 2.2 – GÊNERO *AESCHYNOMENE*

O gênero *Aeschynomene* é estimado em 350 espécies, ocorrendo principalmente em regiões tropicais e pouco em zonas temperadas: América Central, América do Sul, África, sudeste da Ásia e Ilhas do Pacífico (REY; MROGINSKI, 1996; SONODA; LENNE, 1986), sendo que 160 espécies foram listadas para o continente americano (SOUZA et al., 2012), e na lista da Flora do Brasil foram registradas 49 espécies e 24 variedades no país, sendo encontradas 32 espécies na Região Nordeste, 29 na Caatinga e 31 no estado da Bahia (LIMA; OLIVEIRA; SOUZA, 2014a).

Grande parte das espécies de *Aeschynomene* é hidrófita e inclui plantas herbáceas e arbustivas, anuais e perenes (REY; MROGINSKI, 1996). Isolados de caule de *Aeschynomene spp.* são de bastante interesse por apresentarem uma capacidade peculiar de produzir pigmentos fotossintéticos, como bacterioclorofila  $\alpha$  (Bchl  $\alpha$ ) e carotenoides (MOLOUBA et al., 1999). Espécies desse gênero têm importante papel forrageiro, servindo de alimento para bovinos e outros animais da fauna nativa, porém algumas apresentam efeitos tóxicos; fornecem madeira leve (espécies aquáticas), são fixadoras de nitrogênio, e apresentam utilizações apícolas, ornamentais e medicinais (LIMA; SARTORI; POTT, 2006). Ignoato e colaboradores (2012) relatam que estudos de algumas espécies do gênero mostraram atividade inseticida, espermicida, citotóxica e anti-tumoral, e presença de compostos flavonoides: neoflavonoides, isoflavonoides e rotenoides.

*Aeschynomene martii* Benth apresenta como sinonímia *A. arbuscula* Rizzini (LEWIS, 1985). *A. martii* é considerada espécie endêmica do Brasil, de característica arbustiva e subarbustiva, e sua ocorrência geográfica se dá na região Nordeste (Bahia, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe) e na região Sudeste em Minas Gerais (**Figura 1**) (LIMA; OLIVEIRA; SOUZA, 2014b).

**Figura 1** - Distribuição geográfica (ocorrência confirmada) de *Aeschynomene martii* Benth no Brasil



Fonte: LIMA; OLIVEIRA; SOUZA, 2014b

### 2.3 – PROCESSO INFLAMATÓRIO

A inflamação é uma resposta adaptativa do organismo frente a uma infecção ou lesão tecidual a fim de restaurar a homeostasia. Esse processo quando controlado é compreendido como uma resposta fisiológica e benéfica que oferece proteção e reparação tecidual. Quando desregulada, torna-se um evento patológico (MEDZHITOV, 2008; SILVA, 2013). São descritos cinco sinais cardinais da inflamação: dor, rubor, calor, edema e perda de função. O tempo e a intensidade da resposta inflamatória vão depender, entre outros fatores, do tipo de injúria ou estímulo nocivo (SANTOS, 2013; SILVA, 2013).

Inicialmente a resposta inflamatória é inespecífica (reação inata), ocorre localmente e é independente do tipo de estímulo agressor, levando a alterações vasculares e celulares. Os mediadores da inflamação derivados do plasma e das células endoteliais, principalmente óxido nítrico e prostaglandinas, alteram o calibre e a permeabilidade dos vasos, fazendo com que haja um aumento do fluxo sanguíneo (rubor e calor). O extravasamento de exsudato para o interstício (edema) devido ao aumento da pressão oncótica e da permeabilidade vascular ocorre através da liberação de histamina, bradicinina, fator ativador de plaqueta (PAF), e leucotrienos (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009; VIEIRA, 2014).

Na fase celular, os agentes quimiotáticos (componentes do sistema complemento, PAF, leucotrieno B<sub>4</sub>, produtos de bactérias e quimiocinas) recrutam os leucócitos presentes na circulação sanguínea, destes, são os neutrófilos as primeiras células a chegarem ao local da

lesão. Nesse processo de recrutamento de neutrófilos, eles se movimentam do centro para a periferia do vaso, se aderem ao endotélio vascular e transmigram para o interstício onde fagocitam o agente agressor para promover o reparo tecidual. Após a reação inicial, ocorre a reação específica ou adaptativa que é dependente de fatores associados ao agente agressor e ao próprio tecido. Nela, os linfócitos chegam ao local da inflamação por meio de sua interação com as moléculas de adesão e as células endoteliais e produzem anticorpos que irão melhorar a resposta imunológica (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009; SILVA, 2013).

No processo inflamatório, vários são os mediadores químicos produzidos e liberados: aminas vasoativas, peptídeos vasoativos, fragmentos do sistema complemento, mediadores lipídicos, citocinas, quimiocinas e as enzimas proteolíticas. A substância P é um peptídeo vasoativo que ao ser liberado leva a degranulação dos mastócitos, liberando a amina vasoativa histamina que atua nos receptores H1, promovendo vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, síntese de prostaciclina e liberação de óxido nítrico pelo endotélio. O óxido nítrico produzido, a bradicinina, que é outro peptídeo vasoativo, e os fragmentos C3a, C4a e C5a também possuem ação sobre a vasculatura, os fragmentos do sistema complemento além de atuarem nos vasos através da degranulação dos mastócitos, também agem como fatores quimiotáticos para neutrófilos, eosinófilos e monócitos (PIONERDO, 2010).

Os mediadores lipídicos são aqueles derivados do ácido araquidônico liberado pelos fosfolipídeos de membrana quando há presença de algum estímulo. São duas as vias principais produzidas a partir do metabolismo do ácido araquidônico: a via das ciclooxigenases (COX) e a via das lipooxigenases. Os produtos da COX são as prostaglandinas (envolvidas na patogenia da dor e da febre na reação inflamatória), prostaciclina e tromboxano, chamados de prostanoídeos. A COX-1 contribui para a manutenção das funções fisiológicas, sendo a COX-2 a via enzimática envolvida no processo inflamatório. As prostaglandinas PGD2 e PGF2 $\alpha$ , promovem vasodilatação e o leucotrieno LTB4 possui grande ação quimiotática para os granulócitos que migram até o local da inflamação. O tromboxano é vasoconstritor e leva à agregação plaquetária, enquanto as prostaciclinas vão inibir a agregação de plaquetas e levar ao relaxamento vascular. A prostaciclina (PGI2) e a prostaglandina PGE2 são vasodilatadoras, aumentando a permeabilidade dos vasos, e agem como quimiotáticos para outros mediadores (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009; PIONERDO, 2010).

As principais citocinas liberadas na resposta inflamatória são o TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6 e a quimiocina IL-8. As citocinas aumentam a aderência dos leucócitos às células endoteliais, aumentam a síntese de prostaciclina, fatores de crescimento, óxido nítrico e outras citocinas. Em consequência à ação do TNF- $\alpha$  e IL-1, há ativação de fatores de transcrição celular como

o NF- $\kappa$ B (fator nuclear  $\kappa$ B) que aumenta a expressão dos genes que codificam as proteínas pró-inflamatórias (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009; PIONERDO, 2010).

Na tentativa de eliminar o agente invasor, os neutrófilos liberam conteúdo tóxico dos seus grânulos que é capaz de levar a lise celular, são eles: espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, proteinase 3, catepsina G e elastase (MEDZHITOV, 2008; SILVA, 2013). Em situações nas quais há uma formação elevada de radicais livres e oxidantes, devido a instabilidade e reatividade da maioria das espécies, elas reagem com lipídeos, carboidratos e ácidos nucleicos, provocando estresse oxidativo que pode culminar em dano celular caso não haja reparo (PEREIRA; CARDOSO, 2012). As serinaproteases armazenadas nos grânulos azurófilos dos neutrófilos, a elastase, a proteinase 3 e a catepsina G participam na via não-oxidativa de destruição intracelular e extracelular de agentes patogênicos (KORKMAZ et al., 2010).

Contudo, a ação dessas substâncias não diferencia os agentes nocivos das células locais, podendo provocar lesão do tecido íntegro próximo. Após esses eventos, os neutrófilos entram em processo de apoptose e quando a resposta inflamatória aguda é bem sucedida, há destruição dos agentes infecciosos acompanhada de uma fase de resolução e reparo. Para isso, é indispensável a mudança de mediadores inflamatórios para anti-inflamatórios. Nesse caso, as lipoxinas irão atuar inibindo o recrutamento de neutrófilos, mas recrutando monócitos que vão eliminar as células mortas e iniciar o processo de remodelamento juntamente com resolvinas, protectinas, fator de crescimento transformacional  $\beta$  e outros fatores de crescimento produzidos por macrófagos (MEDZHITOV, 2008; SILVA, 2013).

Quando a inflamação aguda não é capaz de eliminar o agente agressor, o processo inflamatório pode persistir. Há uma alteração no infiltrado celular, os neutrófilos dão lugar não apenas aos macrófagos, mas também aos linfócitos T. A persistência do agente nocivo ou falhas na resolução do processo inflamatório resultam em fibrose e formação de granulomas, e levam a progressão da resposta para a fase crônica, podendo variar de semanas a anos. Dessa maneira uso de fármacos anti-inflamatórios é capaz de minimizar os danos causados com a progressão da lesão (MEDZHITOV, 2008; PIONERDO, 2010; SANTOS, 2013; VIEIRA, 2014).

Os fármacos anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) são os principais medicamentos utilizados no tratamento da inflamação. Além da sua ação anti-inflamatória possui ainda efeito analgésico (principalmente em casos de dor relacionada à inflamação) e antipirético. Suas atividades terapêuticas estão relacionadas à inibição da síntese de prostanoídeos em decorrência da inibição das enzimas COX-1 e COX-2. Outro grupo de fármacos empregados no tratamento de processos inflamatórios e alérgicos, são os



glicocorticoides, que apresentam potente efeito imunossupressor e anti-inflamatório, em grande parte, resultante do efeito sobre a transcrição gênica dos receptores de glicocorticoide.

Tanto os glicocorticoides quanto os AINES apresentam efeitos adversos que limitam a terapia prolongada. No caso destes, manifestam, dentre vários outros eventos colaterais, efeitos gastrointestinais importantes, efeitos de toxicidade renal, asma induzida por AINES, hipersensibilidade e alteração no tempo de coagulação (PIONERDO, 2010). O uso de glicocorticoides também induz diversos efeitos colaterais sistêmicos severos associados principalmente às ações catabólicas e administração prolongada ou em altas doses, sendo os principais: osteoporose, fraqueza do músculo esquelético, dislipidemia, hipertensão, resistência periférica à insulina, hiperglicemia, retardo do crescimento em crianças, irritação gástrica, distúrbios do sono, irritabilidade, estigmas cushingóides, entre outros (TORRES; INSUELA; CARVALHO, 2012).

#### 2.4 – DOR E NOCICEPÇÃO

A dor foi conceituada pela primeira vez em 1986 pela Associação Internacional para o Estudo da Dor como uma experiência sensorial e emocional desagradável que está associada a lesões reais ou potenciais (CORDEIRO, 2013). A dor, mais que uma sensação, é uma experiência que pode sofrer influências pessoais (fatores emocionais, patológicas, cognitivos e genéticos) e ambientais. A nocicepção é a percepção do estímulo nocivo pela transformação da informação de lesão tissular em estímulo doloroso, sem considerar o aspecto emocional (SILVA et al., 2013; VIEIRA, 2014). Outros dois termos relacionados a sensibilização de nociceptores são hiperalgesia e alodínia. Na hiperalgesia ocorre uma resposta aumentada a um estímulo que comumente é doloroso, enquanto alodínia é a sensação de dor frente a um estímulo que normalmente não provoca dor (CORDEIRO, 2013).

Para estudos realizados em animais de laboratório devem ser empregados os termos nocicepção e antinocicepção, uma vez que estes não são capazes de expressar verbalmente os aspectos subjetivos da dor, de modo que os termos dor e analgesia devem ser utilizados quando realizados estudos com seres humanos (SILVA, 2013). Os neurônios responsáveis pela resposta aos sinais dolorosos são chamados nociceptores e estão localizados na pele, músculo, vísceras e tecido conjuntivo. Quando ativados, eles sofrem alterações na membrana gerando potenciais de ação que são transmitidos das fibras nervosas periféricas ao sistema nervoso

central (SNC) e percebidos no córtex cerebral como sensação dolorosa (VARANDAS, 2013; VIEIRA, 2014).

Quando há ativação dos nociceptores por um estímulo mecânico, térmico ou químico, a informação é transmitida principalmente através do glutamato, que é o principal neurotransmissor excitatório em todos os nociceptores. Vários mensageiros moleculares intracelulares e extracelulares estão envolvidos na transdução do sinal nociceptivo, dentre eles estão a acetilcolina, serotonina, bradicinina, substância P, leucotrienos, prostaglandinas, tromboxano, íons potássio, citocinas, entre outros. Esses mediadores são liberados em decorrência de processos inflamatórios, traumáticos ou isquêmicos (CORDEIRO, 2013; GARLAND, 2012; SILVA et al., 2013).

Após a detecção de um estímulo nocivo, ocorrem eventos elétricos e químicos que estão envolvidos em processos chamados transdução, transmissão, modulação. Na transdução há uma decodificação dos estímulos nocivos em impulsos elétricos pelas terminações nervosas. O estímulo provoca alterações na permeabilidade da membrana celular a íons, assim, os canais iônicos dos nociceptores transduzem a energia do estímulo em potenciais de ação, gerando uma onda de despolarização/repolarização que percorre a fibra nociceptiva de maneira unidirecional da periferia ao SNC. A transmissão é a fase na qual a informação é transmitida da medula espinhal ao tronco encefálico e tálamo (SILVA, 2013; VARANDAS, 2013). Na fase de modulação ocorrem alterações na propagação do estímulo nocivo por meio de mecanismos endógenos. A via de controle descendente inibitório da dor é responsável pela liberação de neurotransmissores no corno dorsal da medula capazes de inibir a informação de dor, mas é capaz de apresentar não somente efeito antinociceptivo, mas também nociceptivo. As principais vias de neurotransmissão estudadas tanto para inibição quanto facilitação da nocicepção são: glutamatérgica, gabaérgica, serotoninérgica, opioidérgica, adrenérgica, colinérgica, entre outros (GARLAND, 2012; SILVA, 2013).

As fibras de pequeno diâmetro dão origem a maioria dos nociceptores. Os nociceptores mecânicos e térmicos são constituídos por fibras A aferentes mielinizadas, sendo as fibras A $\beta$  altamente mielinizadas, e por conta disso, com velocidade de condução bastante rápida; as fibras A $\delta$  são pouco mielinizadas e também conduzem rapidamente o impulso doloroso. Os nociceptores polimodais respondem a estímulos térmicos, mecânicos e químicos, constituídos por fibras C aferentes não-mielinizadas, responsáveis pela transmissão lenta da dor. Os nociceptores silenciosos respondem a estímulos químicos ou mediadores inflamatórios, e a estímulos mecânicos e térmicos apenas depois de terem sido ativados (SILVA, 2013; SILVA et al., 2013; VARANDAS, 2013; VIEIRA, 2014).

As fibras nervosas aferentes primárias detectam o estímulo nocivo e conduzem os impulsos nervosos ao corno dorsal da medula espinhal, a informação segue então para as estruturas supraespinhais através dos neurônios de segunda ordem, que constituem as vias ascendentes (espinotalâmica, espinoreticular, espinomesencefálica, cervicotalâmica e espinohipotálâmica), são ativados pela liberação de glutamato e substância P e fazem sinapse com os neurônios aferentes primários. A via espinotalâmica é a de maior relevância na transmissão do estímulo doloroso, os neurônios de segunda ordem enviam suas projeções diretamente ao tálamo ventroposterolateral, onde a informação é processada. A partir do tálamo, a informação é transmitida a várias regiões corticais e subcorticais do cérebro, como amígdala, hipotálamo, gânglios basais e posteriormente, é transmitida ao córtex sensorial primários por neurônios de terceira ordem (GARLAND, 2012; SILVA, 2013).

A chegada do sinal até o sistema límbico (tálamo) e córtex cerebral representa a etapa final da via de sinalização nociceptiva. O sintoma de dor pode ser percebido em qualquer parte do trajeto da via talâmico-cortical. No tálamo, o estímulo nocivo é somatizado, gerando a informação de sensação nociceptiva e no córtex, há a discriminação do tipo de sensação em relação a qualidade, intensidade, duração e localização da dor. (SILVA, 2013; VIEIRA, 2014).

Atualmente, a terapia farmacológica ainda é o método de eleição para o tratamento da dor. Uma ampla variedade de medicamentos está disponível para melhoria dos sintomas de dor, são eles: medicamentos analgésicos, analgésicos opióides, anti-inflamatórios, relaxantes musculares e anestésicos. Esses fármacos são altamente eficazes e promovem um maior conforto ao paciente, em contrapartida apresentam uma série de efeitos colaterais indesejáveis, fazendo com que haja um grande interesse em pesquisas por novas substâncias mais seguras para o controle da dor e com menos efeitos colaterais. Nesse contexto, os produtos naturais mostram-se como promissores na identificação de novas substâncias com potencial atividade analgésica e anti-inflamatória (SILVA et al., 2013; VARANDAS, 2013).

### 3. JUSTIFICATIVA

A utilização de plantas medicinais de forma indiscriminada e de maneira totalmente inadequada sem considerar possíveis efeitos nocivos à saúde, como toxicidade, efeitos exacerbados e interações inesperadas quando ingeridos concomitantemente com outros fármacos tradicionais indica a necessidade de estudos. As plantas podem apresentar além de substâncias responsáveis por alguma atividade biológica, outras substâncias potencialmente tóxicas. Desse modo, os impactos na utilização da flora medicinal sem comprovação de sua eficácia e avaliação de seus possíveis efeitos colaterais podem levar a um efeito contrário ao que se espera, apresentando um risco à saúde, e por esta razão, seu uso deve ser feito com cuidado, respeitando seus riscos toxicológicos.

A importância das pesquisas realizadas nessa área ainda se justifica, pois mesmo sendo o Brasil um país favorecido por possuir uma imensa diversidade biológica e isso favorecer o desenvolvimento de pesquisas e busca de compostos, essa rica biodiversidade continua pouco aproveitada. Ainda considerando o crescente aumento de pesquisas referentes ao uso de plantas medicinais, colaborando com o desenvolvimento de produtos naturais e produção de fitoterápicos no país, o Brasil não se destaca no mercado mundial de medicamentos elaborados a partir de plantas, ficando atrás de outros países menos desenvolvidos tecnologicamente.

O estudo sobre o uso de plantas medicinais é promissor, pois a pesquisa fitoquímica ao avaliar a presença e identificar os constituintes das espécies vegetais, ou ainda indicar o grupo de metabólitos secundários, possibilita o desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos e a identificação de novas moléculas ou protótipos básicos para geração de novos medicamentos sintéticos. Assim, faz-se necessário o desenvolvimento de pesquisas que comprovem a atividade farmacológica de plantas medicinais a fim de promover a geração de fontes alternativas e mais econômicas no tratamento e melhoria da atenção à saúde da população.

Além disso, este é o primeiro relato de atividade biológica de *A. martii* Benth, uma planta com grande distribuição na região Nordeste, podendo gerar a identificação de novos compostos químicos, ou futuramente, ser indicado com um novo fitoterápico.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 – OBJETIVO GERAL

Avaliar as atividades anti-inflamatória e antinociceptiva *in vivo* do extrato etanólico de *A. martii* Benth, coletadas na região da Floresta Nacional Contendas do Sincorá (FLONA), semiárido da Bahia.

### 4.2 – OBJETIVOS ESPECIFICOS

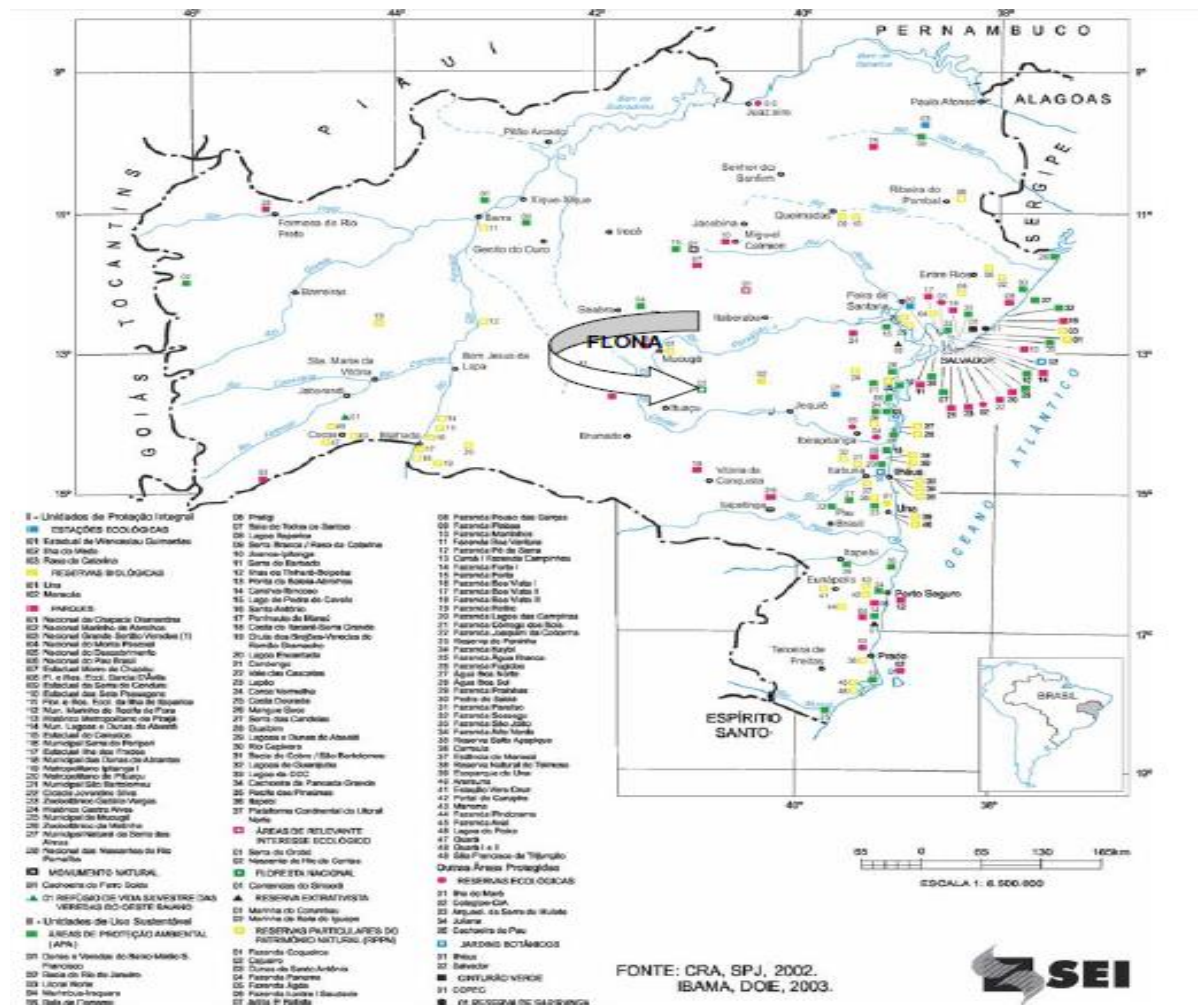
- Identificar alguns dos principais metabólitos secundários encontrados no caule de *A. martii*;
- Comprovar a atividade antinociceptiva *in vivo* do extrato etanólico do caule da planta *A. martii* Benth;
- Analisar as prováveis vias antinociceptivas do extrato etanólico de *A. martii*;
- Avaliar a influência do extrato etanólico do caule da planta *A. martii* no recrutamento leucocitário e no extravasamento vascular em modelos de inflamação.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 – COLETA E IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE VEGETAL

Para a realização da coleta da planta, foi concedido pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA) o registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico (N 12292-1) e a autorização para atividade com finalidade científica (N 13258-1). A espécie vegetal foi coletada na Floresta Nacional Contendas do Sincorá (FLONA), que está sediada na Rodovia BA 026, à 132 km de distância do município de Vitória da Conquista. A FLONA é uma área de conservação ambiental da Bahia (Figura 2) com 11.034,34 ha, com vegetação de caatinga e clima semiárido, cuja Coordenada Geográfica (UTM): 271468, 8460009 (sede) (BRASIL, 2006).

Figura 2 - Unidades de conservação do Estado da Bahia



Fonte: BRASIL, 2006

A planta estudada para o desenvolvimento dessa pesquisa foi *A. martii* Benth (Tripa de galinha), espécie endêmica da região. A espécie coletada foi fotografada, catalogada e depositada no Herbário da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), campus de Vitória da Conquista, exsicatas nº 4994, sob a coordenação do Prof. Dr. Avaldo de Oliveira S. Filho. As exsicatas foram preparadas a partir das orientações de Mori e colaboradores (1989) e a identificação taxonômica foi feita por comparação no herbário e através de literatura.

## 5.2 – PREPARO DO EXTRATO ETANÓLICO E ANÁLISE FITOQUÍMICA

### 5.2.1 – Preparo do extrato

O extrato etanólico foi preparado a partir do caule e triturado e levados a um processo de maceração com etanol agitado esporadicamente até a exaustão. Após esse período, o extrato foi filtrado e levado a um evaporador rotativo sob pressão reduzida de 500 a 750 mmHg, à temperatura de 50 °C até a eliminação do etanol, fornecendo assim o extrato bruto para realização dos testes e análise fitoquímica.

### 5.2.2 – Análise fitoquímica do extrato em Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

As análises fitoquímicas possibilitaram a revelação qualitativa das diferentes classes de metabólitos secundários presentes no caule do extrato etanólico da planta. As amostras foram analisadas quanto a presença de polifenóis, saponinas, flavonoides, ácidos fenólicos, esteroides e alcaloides (HASHIMOTO; KAWANISHI; MORIYAS, 1988; REGO, 2012; SOFIATI, 2009; WAGNER; BLADT, 2001), como descrito pelos autores. Na Tabela 1 pode ser observado um resumo dos metabólitos, sistemas de eluição e reveladores utilizados para a abordagem fitoquímica utilizando cromatografia de camada delgada.

Para a detecção de **polifenóis** utilizou-se a fase móvel acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético: água (10:11:11:27). Foi pulverizada uma mistura de 1:1 das soluções aquosas de ferrocianeto de potássio 1% (m/v) e cloreto de ferro 2% (m/v) nas placas (Anexo A), as quais foram analisadas no visível. O aparecimento de manchas azuladas sugere a presença de polifenóis.

Para a detecção de **saponinas** utilizou-se como fase móvel clorofórmio: metanol (9:1) e eluiu-se duas vezes. As saponinas foram visualizadas pela pulverização de ácido sulfúrico concentrado em etanol a 5% (v/v) e aquecimento das placas a 110°C, durante 5 minutos. O aparecimento de manchas de coloração roxo beringela, no visível, indicou a presença de saponinas.

Para a análise de **flavonoides** e **ácidos fenólicos** utilizou-se a fase móvel clorofórmio: metanol (9:1). Na placa de sílica, pulverizou-se o reagente cloreto de alumínio em etanol a 1% (m/v). A placa foi observada à luz Ultravioleta no comprimento de onda de 366 nm. Os flavonoides são sugeridos como manchas verdes fluorescentes, enquanto que os ácidos fenólicos, como manchas azuis fluorescentes.

Para a análise de **esteroides** utilizou-se como fase móvel clorofórmio: metanol (9:1). O reagente de Liebermann-Burchard (Anexo A) foi pulverizado na placa e esta foi levada a aquecimento a 110 °C durante 5 minutos. O aparecimento de manchas roxas no visível sugere a presença de esteroides.

Para a detecção de **alcaloides** utilizou-se como fase móvel acetato de etila: metanol: água (4:1:2). O reagente de Wagner (Anexo A) foi pulverizado na placa e o aparecimento de manchas castanho-avermelhadas, no visível, sugere a presença de alcaloides.

**Tabela 1:** Metabólitos, sistemas de eluição e reveladores utilizados para a análise fitoquímica em CCD do extrato etanólico do caule de *A. martii* Benth

METABÓLITO	SISTEMA DE ELUIÇÃO	REVELADOR
<i>Polifenóis</i>	AcOEt – HCOOH – AcOH – H <sub>2</sub> O (10:11:11:27)	Ferrocianeto de potássio 1% (m/v) + cloreto de ferro 2% (m/v)
<i>Saponinas</i>	CHCl <sub>3</sub> – CH <sub>3</sub> OH (9:1)	Ácido sulfúrico em etanol a 5% (v/v)
<i>Flavonoides</i>	CHCl <sub>3</sub> – CH <sub>3</sub> OH (9:1)	Cloreto de alumínio em etanol a 1% (m/v) (U.V.)
<i>Ácidos fenólicos</i>	CHCl <sub>3</sub> – CH <sub>3</sub> OH (9:1)	Cloreto de alumínio em etanol a 1% (m/v) (U.V.)
<i>Esteroides</i>	CHCl <sub>3</sub> – CH <sub>3</sub> OH (9:1)	Liebermann-Burchard
<i>Alcaloides</i>	AcOEt – CH <sub>3</sub> OH – H <sub>2</sub> O (4:1:2)	Reagente de Wagner

**AcOEt:** acetato de etila; **HCOOH:** ácido fórmico; **AcOH:** ácido acético; **H<sub>2</sub>O:** água destilada; **CHCl<sub>3</sub>:** clorofórmio; **CH<sub>3</sub>OH:** metanol.



### 5.2.3 – Análise fitoquímica do extrato em Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa (CG-EM)

As análises por CG-EM foram realizadas em aparelho QP2010SE (GC2010 Plus) da marca Shimadzu usando coluna capilar de sílica fundida Rtx-5MS (30 m; 0,25 mm de diâmetro interno; filme de 0,25 µm) e hélio como gás de arraste. Os extratos foram analisados por cromatografia gasosa acoplada a detector de massas (CG-EM).

Antes de serem analisados por cromatografia gasosa, as amostras foram submetidas a derivatização por sililação. Para esta reação foram pesados 3 mg da amostra em vial, onde foram diluídos em 60 µL de piridina. A esta solução foram adicionados 100 µL da mistura reacional de N,O-Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida (BSTFA) contendo 1% de trimetilclorosilano (TMCS) (Sigma-Aldrich®). Essa mistura foi aquecida a 70 °C por 30 minutos e 1 µL da mistura foi injetado no CG-EM (CRUZ et al., 2016).

A temperatura empregada na análise no injetor, detector e interface do sistema CG-EM foi 290 °C. A temperatura inicial da análise foi de 80 °C por 5 min, aumentando de a 285 °C na razão de 4 °C/min. A temperatura final permaneceu em 285 °C por 40 minutos (CRUZ et al., 2016). O detector de massas operou com ionização por impacto de elétrons (70 eV) e varredura de massas entre o intervalo de 30 a 600 Da.

A identificação dos compostos foi realizada por meio da comparação dos espectros de massas das amostras, com aqueles existentes no banco de dados do aparelho (NIST 08, FFNSC1.3 e WILEY8) (Anexo B).

## 5.3 – BIOENSAIOS

### 5.3.1 – Animais

Para todos os experimentos, foram utilizados camundongos machos *Balb-C* (20-30 g) acomodados no biotério do Instituto Multidisciplinar em Saúde, Campus Anísio Teixeira da Universidade Federal da Bahia e mantidos no ciclo claro-escuro de 12 horas (luzes acessas das 7 às 19 horas), à temperatura de  $23 \pm 2$  °C e umidade relativa de  $50 \pm 2\%$ . Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno contendo maravalha na base da caixa, sendo permitido livre acesso à comida (Labina®, Purina) e água. Foram utilizados grupos de 6 animais.

A utilização dos animais nos testes que envolvem a avaliação da atividade antinociceptiva e da atividade anti-inflamatória foi aprovada pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal UNIUBE, ofício CEEA 173/2009 (Anexo C). Todos os animais utilizados foram climatizados no laboratório pelo menos uma hora antes dos testes, realizados na fase clara do ciclo. O número de animais e a intensidade dos estímulos utilizados foram os mínimos necessários para demonstrar o efeito dos tratamentos de forma segura.

### 5.3.2 – Teste das Contorções Abdominais Induzidas por Ácido Acético

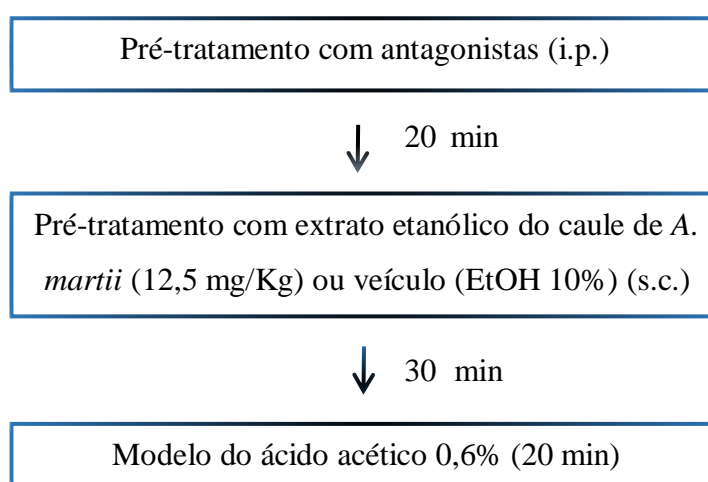
O teste de contorção abdominal induzida por ácido acético é um teste sensível à avaliação de substâncias com propriedades analgésicas, porém não é seletivo para estudo de substâncias antinociceptivas, considerado um modelo geral. A injeção intraperitoneal de ácido acético provoca irritação peritoneal que gera no animal uma resposta caracterizada por contorções da parede abdominal seguida de torção do tronco e extensão dos membros posteriores (SILVA et al., 2013). A avaliação da atividade antinociceptiva do extrato etanólico de *A. martii* foi feita a partir modelo experimental descrito por Koster, Anderson e Beer (1959) e Vacher, Duchêne-Marullaz e Barrat (1964). Os animais foram tratados com extrato etanólico do caule (3,13; 6,25; 12,5; 25 ou 50 mg/kg, s.c.) ou veículo (etanol 10%, v/v) 30 minutos antes da injeção de ácido acético 0,6% por via intraperitoneal (i.p.) (0,1 mL/10g). Os animais do controle negativo receberam somente solução salina 0,9% (i.p.). Os camundongos foram colocados em caixas separadas e depois da administração do ácido acético, foi contabilizado o número de contorções e movimentos de alongamento produzidos pelo animal em cada 5 minutos por um período total de 20 minutos.

### 5.3.3 – Análise de possíveis mecanismos de ação antinociceptivos do extrato etanólico de *A. martii* Benth

Nessa etapa da pesquisa, a fim de determinar alguns possíveis mecanismos das propriedades antinociceptivas do extrato etanólico da casca de *A. martii*, foram estudadas as seguintes vias de neuromodulação: via serotoninérgica, opioide, adrenérgica, colinérgica e sistema inibitório do receptor de ácido gama aminobutírico (GABA<sub>A</sub>). Foram utilizados antagonistas em doses já estudadas na literatura (HESS, 2006; PEREIRA, 2013; SANTOS, 2010; SPINDOLA et al., 2011). Para a investigação dos possíveis mecanismos de ação pelos

quais o extrato etanólico da casca da planta de exerce seu efeito antinociceptivo foi elegido o teste de contorções abdominais induzidas pela administração intraperitoneal de ácido acético. E foi analisada a possível reversão dos efeitos antinociceptivos do extrato em relação à nocicepção provocada pelo ácido acético. Para isso, camundongos *Balb-C* foram pré-tratados (i.p.) com diferentes antagonistas receptor-específicos. Após 20 minutos, receberam o tratamento com o extrato etanólico do caule de *A. martii* (12,5 mg/kg, s.c.). Após 30 minutos, houve a administração de solução de ácido acético 0,6 % (v/v). O protocolo adotado está representado através do fluxograma abaixo (Figura 3):

**Figura 3** - Fluxograma do protocolo utilizado no estudo dos possíveis mecanismos de ação antinociceptivos do extrato etanólico da casca de *A. martii* Benth



Com a finalidade de avaliar a possível participação do sistema opióide, os animais foram pré-tratados com naloxona (antagonista inespecífico de receptores opióides, 1 mg/kg, i.p.); dos receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos no efeito antinociceptivo, com ioimbina (antagonista de receptores  $\alpha_2$ -adrenérgicos, 0,2 mg/kg, i.p.); das vias descendentes inibitórias colinérgicas-muscarínicas na ação antinociceptiva do extrato, com atropina (antagonista não seletivo de receptores muscarínicos, 5 mg/kg, i.p.); de mecanismos envolvendo receptores serotoninérgicos, os animais foram pré-tratados com ondansetrona (antagonista de receptores 5-HT<sub>3</sub>, 0,2 mg/kg, i.p.) ou metissergida (antagonista não-seletivo de serotonina, 2,0 mg/Kg, i.p.); do receptor GABA<sub>A</sub>, com bicuculina (antagonista de receptores GABA<sub>A</sub>, 0,7 mg/kg, i.p.).

### 5.3.4 – Recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal

A migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal foi avaliada em camundongos (*Balb-C*) inicialmente tratados com o extrato etanólico do caule de *A. martii* (0,78; 1,56 ou 3,13 mg/kg) por via subcutânea (s.c.) ou veículo (etanol 10%, v/v, s.c.). Após 30 minutos, os animais receberam a administração intraperitoneal do estímulo álgico, carragenina (500 µg por cavidade), enquanto os animais do grupo controle negativo receberam somente solução salina 0,9% (i.p.). Os animais foram sacrificados após quatro horas da injeção de carragenina e foi realizado o lavado peritoneal com 3 mL de tampão fosfato (PBS) acrescido de EDTA 1 nM. O volume recuperado foi semelhante em todos os grupos experimentais e correspondeu a aproximadamente 95% do volume injetado. A partir do lavado peritoneal foram feitas contagem total e diferencial das células. A contagem total de células foi realizada com o auxílio de câmara de *Newbauer* e a contagem diferencial foi realizada pelo preparo de esfregaços em citocentrífuga, os quais foram corados por corante Panótico e as células foram examinadas em microscópio óptico através da objetiva de imersão em óleo (aumento de 1000x), sendo contadas 100 células por lâmina. Os resultados são apresentados como o número de neutrófilos por cavidade (NUNES et al., 2009).

### 5.3.5 – Avaliação da permeabilidade vascular

Avaliação do extravasamento peritoneal foi avaliada em camundongos (*Balb-C*) através da quantificação do extravasamento do azul de Evans, uma substância com alta ligação a albumina sérica. 15 min antes da administração do extrato etanólico do caule, o corante azul de Evans (50 mg/kg) diluído em 50 µL de solução salina foi injetado por via venosa no plexo ocular. O extrato etanólico do caule da planta (3,13; 6,25; 12,5 ou 25 mg/kg) foi administrado por via subcutânea 30 minutos antes do estímulo inflamatório, injeção de carragenina por via intraperitoneal (500 µg/cavidade). Os camundongos foram sacrificados 3 h após a administração de carragenina e a cavidade peritoneal foi lavada com 3 mL de PBS. O conteúdo do azul de Evans (o extravasamento de proteína) foi calculado usando uma curva padrão de azul Evans e a absorbância de cada amostra foi medida em 620 nm usando um espectrofotômetro (LYKBE; CUMMINGS, 1969; MUSTARD et al., 1965).

### 5.3.6 – Teste de nociceção induzida pela injeção intraplantar de formalina em camundongos

O teste de nociceção induzida pela injeção intraplantar de formalina é um modelo de avaliação comportamental, na qual apresenta um padrão bifásico bem definido. A primeira fase é relacionada com a estimulação direta dos nociceptores das fibras do tipo C, e parcialmente com as fibras do tipo A $\delta$ . A segunda fase compreende a liberação de vários mediadores inflamatórios (SILVA et al., 2013). O comportamento de nociceção induzido por formalina foi avaliado como descrito anteriormente por Tjølsen e colaboradores, 1992.

Um volume de 20  $\mu$ L de solução de formalina 1,5% foi injetado por via intraplantar (i.pl.) na pata direita traseira dos animais pré- tratados 30 minutos antes com extrato etanólico do caule de *A. martii* (0,39; 0,78; 1,56; 3,13; 6,25 mg/kg, s.c.), veículo (10% etanol, v/v, s.c.), ou morfina (5 mg/kg, s.c.). Os camundongos foram observados individualmente e comportamento indicador de nociceção foi quantificado pelo número de *flinches* (balanço da pata) e por mordidas e lambidas na pata injetada durante um período de 30 minutos. Os primeiros cinco minutos determinam resposta caracterizada pela dor neurogênica; entre 15-30 minutos ocorre a fase 2 que corresponde a resposta à dor de origem inflamatória. Ao final do experimento, as patas posteriores foram removidas e pesadas em uma balança analítica. O peso da pata que recebeu formalina foi diminuído do peso da pata que não recebeu injeção, a fim de determinar a formação de edema. Os resultados foram expressos como g.

### 5.3.7 – Avaliação da Hipernociceção - Teste de Pressão Crescente na Pata

O teste de Von Frey é um método utilizado para avaliar a sensibilidade tecidual ao estímulo mecânico. O experimento é realizado com um analgesímetro eletrônico, que consiste em um transdutor de pressão ligado por um cabo a um contador digital de força, a qual é expressa em gramas (g). Em uma sala silenciosa, os camundongos foram colocados em gaiolas de acrílico (12 x 20 x 17 cm) cujo assoalho é uma rede de malha constituída de arame não maleável, durante 30 minutos antes do experimento para adaptação ao ambiente. O teste consistiu de produzir uma pressão na pata do animal com um transdutor de força adaptado a uma ponteira (0,8 mm<sup>2</sup> diâmetro). Foi aplicada, por entre as malhas da rede, uma pressão linearmente crescente no centro da pata traseira até que o animal produza uma resposta caracterizada como sacudida (*flinch*) da pata estimulada. O estímulo foi automaticamente interrompido, e sua

intensidade foi registrada quando a pata foi retirada. O intervalo entre dois ensaios consecutivos na mesma pata foi de pelo menos 1 min, totalizando seis ensaios de cada animal. O limiar mecânico para retirada da pata foi considerado entre de 0,3 g até 7-10g. A intensidade de hipernocicepção será quantificada como a variação na pressão ( $\Delta$  de reação em gramas) obtida subtraindo-se o valor observado um dia antes do experimento do valor de reação (após a administração do estímulo nociceptivo). Os camundongos foram pré-tratados com extrato etanólico do caule de *A. martii* (0,78; 1,56 ou 3,13 mg/kg (s.c.) ou veículo (etanol 10%, v/v) e depois de 30 min, foi injetado carragenina (100  $\mu$ g/pata, i.pl.) na região central da pata traseira dos animais. Após três horas o teste Von Frey foi realizado (BARROT, 2012; MÖLLER; JOHANSSON; BERGE, 1998).

## 6. REFERÊNCIAS

ANTONIALLI, C. S. **Avaliação do efeito do ácido mirsinóico B em diferentes modelos de hipernocicepção inflamatória e neuropática persistente em camundongos.** 2009. 97 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí. 2009.

BADKE, M. R. et al. Saberes e práticas populares de cuidado em saúde com o uso de plantas medicinais. **Texto Contexto Enfermagem**, Florianópolis, v. 21 n. 2, p. 363-70, 2012.

BARROT, M. Tests and models of nociception and pain in rodents. **Neuroscience**, v. 211, p. 39–50, 2012.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. **Plano de Manejo: Floresta Nacional Contendas do Sincorá**, Volume I, 2006.

BRASIL. Conselho Regional de Farmácia do Estado de São Paulo. **Plantas Medicinais e Fitoterápicos**, São Paulo: Conselho Regional de Farmácia do Estado de São Paulo, 2012.

CORDEIRO, S. L. **Atividades antinociceptiva e anti-inflamatória de uma fração rica em heterogalactana sulfatada extraída da alga *Codium isthmocladum* (Vickers 1905).** 2013. 98 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica), Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal. 2013.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 3, p. 241-256, 2009.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, p. 3670-3695, 2013.

CRUZ, M. P. et al. Antinociceptive and Anti-inflammatory Activities of the Ethanolic Extract, Fractions and Flavones Isolated from *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir (Leguminosae). **PLoS ONE**, v. 1, n. 3, p. 1-29, 2016.

DUTRA, M. G. **Plantas medicinais, fitoterápicos e saúde pública: um diagnóstico situacional em Anápolis, Goiás.** 2009. 112 f. Dissertação (Mestrado em Sociedade, Tecnologia e Meio Ambiente) - Centro Universitário de Anápolis UniEVANGÉLICA, Anápolis. 2009.

FIGUEREDO, C. A. D.; GURGEL, I. G. D.; JUNIOR, G. D. G. A Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos: construção, perspectivas e desafios. **Physis Revista de Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 24 n. 2, p. 381-400, 2014.

FLORA do Brasil 2020. **Flora do Brasil 2020 em construção**, Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em: 05 Set 2016.

FONSECA, C. A. D.; PEREIRA, D. G. Aplicação da genética toxicológica em planta com atividade medicinal. **Infarma**, v. 16, n. 7-8, 2004.

GADELHA, C. S. et al. Estudo bibliográfico sobre o uso das plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, Mossoró, v. 8, n. 5, p. 208 - 212, 2013.

GARLAND, E. L. Pain processing in the human nervous system: a selective review of nociceptive and biobehavioral pathways. **Primary Care**, v. 39, n. 3, p. 561–571, 2012.

HASHIMOTO Y, K. K. M. M. **Forensic chemistry of alkaloids by chromatographic analysis**. In: Brossi A. The Alkaloids: Chemistry and Pharmacology. San Diego: Academic Press Inc, 1988, v. 32, p. 1-77.

HESS, S. **Atividade antinociceptiva do ácido mirsinóico B**. 2006. 108 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí. 2006.

HOEFFEL, J. L. M. et al. Conhecimento tradicional e uso de plantas medicinais nas APAS'S Cantareira/SP e Fernão Dias/MG. **Revista VITAS – Visões Transdisciplinares sobre Ambiente e Sociedade**, n. 1, 2011.

IGNOATO, M. C. et al. Estudo fitoquímico e avaliação da atividade anti-inflamatória de *Aeschynomene fluminensis* Vell. (Fabaceae). **Química Nova**, v. 35, n. 11, p. 2241-2244, 2012.

KLIEBENSTEIN, D. J.; OSBOURN, A. Making new molecules – evolution of pathways for novel metabolites in plants. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 15, p. 415–423, 2012.

KORKMAZ, B. et al. Neutrophil elastase, proteinase 3, and cathepsin G as therapeutic targets in human diseases. **Pharmacological Reviews**, v. 62, n. 4, p. 726–759, 2010.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; DE BEER, E. J. Acetic acid for analgesic screening. **Federation proceedings**, v.18, p.412-416, 1959.

LEWIS, G. P. Two new taxa and one little-known species of *Aeschynomene* (Leguminosae-Papilionoideae) from Brazil. **Kew Bulletin**, v. 40, n. 3, p. 599-605, 1985.



LIMA, L. C. P.; OLIVEIRA, M. L. A. A.; SOUZA, V. C. Aeschynomene. **Lista de Espécies da Flora do Brasil**, 2014a. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB22777>>. Acesso em: 23 jan 2016.

LIMA, L. C. P.; OLIVEIRA, M. L. A. A.; SOUZA, V. C. Aeschynomene. **Lista de Espécies da Flora do Brasil**, 2014b. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB18041>>. Acesso em: 23 jan 2016.

LIMA, L. C. P.; SARTORI, A. L. B.; POTT, V. J. Aeschynomene L. (Leguminosae, Papilionoideae, Aeschynomeneae) no Estado de Mato Grosso do Sul, Brasil. **Hoehnea**, v. 33, n. 4, p. 419-453, 2006.

LIMA-SARAIVA, S. R. G. et al. A implantação do programa de plantas medicinais e fitoterápicos no sistema público de saúde no Brasil: uma revisão de literatura. **Revista Interdisciplinar de Pesquisa e Inovação**, v. 1, n. 1, p. 1-11, 2015.

LYKBE, A. M. J.; CUMMINGS, R. Inflammation in healing. 1. Time course and meditation of exudation in wound healing in the rat. **British Journal of Experimental Pathology**, v. 50, p. 309-318, 1969.

MACIEL, M. A. M. et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quim. Nova**, v. 25 n. 3, p.429-438, 2002.

MAOBE, M. A. G. et al. Preliminary Phytochemical Screening of Eight Selected Medicinal Herbs Used for the Treatment of Diabetes, Malaria and Pneumonia in Kisii Region, Southwest Kenya. **European Journal of Applied Sciences**, v. 5, n. 1, p. 01-06, 2013.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, p. 428-435, 2008.

MÖLLER, K. Ä.; JOHANSSON, B.; BERGE, O.-G. Assessing mechanical allodynia in the rat paw with a new electronic algometer. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 84, p. 41-47, 1998.

MOLOUBA, F. et al. Photosynthetic Bradyrhizobia from Aeschynomene spp. Are Specific to Stem-Nodulated Species and Form a Separate 16S Ribosomal DNA Restriction Fragment Length Polymorphism Group. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n. 7, p. 3084-3094, 1999.

MORI, S. A. et al. **Manual de manejo do herbário fanerogâmico**. CEPLAC. Ilhéus. 1989.

MUSTARD, J. F. et al. Release of permeability factors from blood platelet. **Proceedings of the society experimental biology and medicine**, v. 119, p. 981-988, 1965.

NUNES, B. S. et al. Lectin extracted from *Canavalia grandiflora* seeds presents potential anti-inflammatory and analgesic effects. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 379, p. 609–616, 2009.

OLIVEIRA, A. B. et al. A Normatização de Fitoterápicos no Brasil. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 7, n. 2, p. 37-46, 2006.

PEREIRA, C. K. S. **Atividade antinociceptiva e anti-inflamatória de *Herissantia crispa* (L.) Brizicky em camundongos**. 2013. 123 f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa. 2013.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. D. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. 4, p. 146-152, 2012.

PINTO, A. T. M. et al. Atividade Antimicrobiana de Dentifrícios Fitoterápicos Contra *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus*. **UNOPAR Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v.15, n. 4, p. 259-63, 2013.

PIONERDO, R. D. R. **Atividade anti-inflamatória de *Gochnatia polymorpha ssp. floccosa* em camundongos**. 2010. 85 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia), Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2010.

REGO, E. A. **Avaliação da Actividade Anti-inflamatória de Plantas dos Açores**. 2012. 101 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas). Universidade dos Açores. Departamento de Ciências Tecnológicas e Desenvolvimento, Ponta Delgada. 2012.

REY, H. Y.; MROGINSKI, L. A. Regeneration of plants from callus tissue of *Aeschynomene* spp. (Leguminosae). **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.45. p. 185-190, 1996.

RODRIGUES, L. C. C. et al. Avaliação da atividade anti-inflamatória do extrato hidroalcoólico do caroço de abacate sobre peritonite induzida por carragenina em ratos. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações, v. 13, n. 2, p. 367-376, 2015.

SANTOS, C. M. D. F. **Estudo da estimulação elétrica nervosa transcutânea na nociceção e no edema induzidos pela administração de serotonina intradérmica**. 2010. 75 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Reabilitação) - Escola de Educação Física, Fisioterapia e Terapia Ocupacional, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2010.

SANTOS, R. L. et al. Análise sobre a fitoterapia como prática integrativa no Sistema Único de Saúde. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 13, n. 4, p. 486-491, 2011.

SANTOS, S. D. A. D. **Novos agentes anti-inflamatórios tiazolidínicos: síntese, elucidação estrutural e efeitos biológicos**. 2013. 130 f. Dissertação (Mestrado em Inovação Terapêutica) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2013.

SILVA, J. C. et al. Modelos experimentais para avaliação da atividade antinociceptiva de produtos naturais: uma revisão. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 94, n. 1, p. 18-23, 2013.

SILVA, M. D. D. **Atividade antinociceptiva e anti-inflamatória da acupuntura no acuponto “Spleen” 6 (SP6) em camundongos: análise dos seus mecanismos neurobiológicos**. 2013. 214 f. Tese (Doutorado em Neurociências) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis. 2013.

SIXEL, P. J.; PECINALLI, N. R. Características farmacológicas gerais das plantas medicinais. **Infarma**, v. 16, n. 13-14, 2005.

SOFIATI, F. T. **Estudo fitoquímico e atividades biológicas preliminares de extratos de Polygonum acre (Polygonaceae) H.B.K. e Synadenium carinatum (Euphorbiaceae) boiss**. 2009. 100 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Campus de Araraquara. 2009.

SONODA, R. M.; LENNE, J. M. Diseases of Aeschynomene Species. **Tropical Grasslands**, v. 20, n. 1, p. 30-34, 1986.

SOUZA, M. C. et al. O gênero Aeschynomene L. (Leguminosae, Faboideae, Dalbergieae) na planície de inundação do alto rio Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 10, n. 2, p. 198-210, 2012.

SPINDOLA, H. M. et al. Geranylgeraniol and 6 $\alpha$ ,7 $\beta$ -dihydroxyvouacapan-17 $\beta$ -oate methyl ester isolated from Pterodon pubescens Benth.: Further investigation on the antinociceptive mechanisms of action. **European Journal of Pharmacology**, v. 656, p. 45–51, 2011.

TJÖLSEN, A. et al. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, v. 51, p. 5-17, 1992.

TORRES, R. C.; INSUELA, D. B. R.; CARVALHO, V. D. F. Mecanismos celulares e moleculares da ação antiinflamatória dos glicocorticoides. **Corpus et Scientia**, v. 8, n. 2, p. 36-51, 2012.

VACHER, J.; DUCHÊNE-MARULLAZ, P.; BARRAT, P. A propos de quelques produits usuels. Comparaison de deux méthodes d'étude des analgésiques. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 11, p. 51-58, 1964.

VARANDAS, C. M. B. **Fisiopatologia da Dor**. 2013. 79 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Fernando Pessoa, Porto. 2013.

VEIGA JUNIOR, V. F. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 308-313, 2008.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Quim. Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VIEIRA, A. C. S. **Avaliação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do extrato etanólico de Punica granatum L. (Romã)**. 2014. 60 f. Dissertação (Mestrado em Enfermagem) - Escola de Enfermagem e Farmácia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió. 2014.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis: a Thin Layer Chromatography Atlas**. Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2001.

1 **ANTIOXIDANT, ANTI-INFLAMMATORY AND ANTINOCICEPTIVE**  
2 **ACTIVITIES OF STEM EXTRACT OF *Aeschynomene martii* BENTH**  
3 **(LEGUMINOSAE)**

4  
5 **Andressa A Oliveira<sup>1\*</sup>, Gladistone M Correa<sup>1\*</sup>, Rafael S D M Dórea<sup>1\*</sup>, Cassya M F**  
6 **Andrade<sup>1\*</sup>, Maiana F Andrade<sup>1\*</sup>, Kelle O Silva<sup>1\*</sup>, Erika P de Souza<sup>1\*</sup>, Lucas M Marques<sup>1\*</sup>,**  
7 **Mariluze P Cruz<sup>1\*</sup>, Regiane Yatsuda<sup>1\*</sup>**

8 <sup>1</sup> Instituto Multidisciplinar em Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, BA,  
9 Brazil,

10 \*These authors contributed equally to this work

11 • Corresponding author

12  
13 Address: Multidisciplinary Institute of Health, Federal University of Bahia, CEP 45029-094  
14 Vitória da Conquista, BA, Brazil

15  
16 Email adress:

17 Andressa A Oliveira - [dessa.aol@gmail.com](mailto:dessa.aol@gmail.com)

18 Gladistone M Correa - [gladmessias@hotmail.com](mailto:gladmessias@hotmail.com)

19 Rafael S D M Dórea - [rafadorea@hotmail.com](mailto:rafadorea@hotmail.com)

20 Cassya M F Andrade - [ca.mavy@hotmail.com](mailto:ca.mavy@hotmail.com)

21 Maiana F Andrade - [maiferraz@hotmail.com](mailto:maiferraz@hotmail.com)

22 Kelle O Silva - [kelle.oliveira@gmail.com](mailto:kelle.oliveira@gmail.com)

23 Erika P de Souza - [erika\\_psouza@hotmail.com](mailto:erika_psouza@hotmail.com)

24 Lucas M Marques - [lmirandamarques@gmail.com](mailto:lmirandamarques@gmail.com)

25 Mariluze P Cruz - [mariluzec@yahoo.com.br](mailto:mariluzec@yahoo.com.br)

26 Regiane Yatsuda - [reyatsuda@yahoo.com](mailto:reyatsuda@yahoo.com)

27

28 ABSTRACT

29 **Background:** The study aimed to evaluate the pharmacological activity of the stem ethanolic  
30 extract of *Aeschynomene martii* Benth (EESAM), searching for possible antioxidant, anti-  
31 inflammatory and antinociceptive activities. **Methods:** Primarily, it was carried out a preliminary  
32 phytochemical screening performed by thin layer chromatography (TLC) and gas  
33 chromatography–mass spectrometry (GC-MS). Antioxidant activity was evaluated using the  $\beta$ -  
34 Carotene-linoleic acid assay with concentrations of EESAM at 500 and 1000  $\mu\text{g/mL}$ . Anti-  
35 inflammatory and antinociceptive activities were analyzed by writhing test, formalin-induced  
36 nociception test, neutrophil recruitment to the peritoneal cavity, evaluation of vascular  
37 permeability (Evans blue test) and evaluation of mechanical hypernociception (Von Frey). The  
38 hydroalcoholic (HESAM) extract was tested in doses of 0.39, 0.78, 1.56, 3.13, 6.25, 12.5, 25 or 50  
39 mg/kg, vehicle (10 % ethanol, v/v). **Results:** The EESAM presented a high scavenging activity in  
40 the first 20 min with the 500  $\mu\text{g/mL}$  concentration ( $92.22 \pm 2.69\%$ ) and 1000  $\mu\text{g/mL}$  ( $91.10 \pm 9.31\%$ )  
41 comparable to BHT ( $p > 0.05$ ); and a lower but good antioxidant activity in 120 min. HESAM  
42 showed a significant antinociceptive result in writhing test (12.5 - 50 mg/kg), in formalin test:  
43 phase 1 (0.78 - 6.25 mg/kg) and phase 2 (0.78, - 6.25 mg/kg), and in mechanical hypernociception  
44 (1.56 mg/kg), some doses similar to morphine ( $p > 0.05$ ); and reducing the hypernociception ( 1.56  
45 mg/kg). Animals pretreated with naloxone, atropine and bicuculline, the antagonists of the opioid,  
46 cholinergic and GABAergic systems respectively, significantly reduced the antinociception caused  
47 by the HESAM before ( $p < 0.05$ ). HESAM showed an anti-inflammatory effect by inhibiting the

48 neutrophils recruitment (1.56 and 3.13 mg/kg) and decreasing the vascular permeability (12.5 and  
49 25 mg/kg) and paw edema (1.56 mg/kg). **Conclusions:** The stem ethanolic extract of *A. martii*  
50 possess antioxidant and anti-inflammatory, probably because it contains flavonoids, oleic and  
51 linoleic acid and  $\beta$ -sitosterol. The antinociceptive activities occur probably by central and  
52 peripheral mechanisms involving opioid, cholinergic and GABAergic systems. This is the first  
53 relate of biological activity of *A. martii*, and further studies should be conducted attempting to  
54 identify new bioactive compounds and its mechanisms of action.

55

56 **Keywords:** *Aeschynomene martii* Benth, anti-inflammatory, antinociceptive, antioxidant,  
57 phytochemical analysis.

58

## 59 BACKGROUND

60 World Health Organization (WHO) has estimated that approximately 65% of the world population  
61 relies on plant-based traditional medicine for their primary health care [1]. Plants can synthesize  
62 phytochemicals that provide protective or preventive action against diseases [2]. The investigation  
63 for new drugs derived from plants for treatment of diseases is stimulated since there is not an ideal  
64 analgesic and anti-inflammatory drug. The reliable drugs are highly effective, but may promote  
65 collateral and undesirable effects [3].

66 *Aeschynomene* genus is estimated in 350 species, and 160 species were identified in America [4].

67 Some species of *Aeschynomene* genus presented insecticidal, spermicide, cytotoxic and anti-tumor  
68 activities. Among the compounds identified in plants of this genus, we highlight the flavonoid  
69 compounds, such as neoflavonoids, isoflavones and rotenoids [5].

70 *Aeschynomene martii* (Benth), Leguminosae family, is popularly known in Brazil as “tripa de  
71 galinha” (chicken bowel), it is a shrub 2-4 meters tall with long stems and trunk of rough skin. *A.*  
72 *martii* presents as synonyms *A. arbuscula* Rizzini and *A. rizzini* Shoenberg. *A. martii* is an endemic  
73 species of caatinga, distributing from south of Pernambuco, Bahia, and north of Minas Gerais [6].  
74 The plant is also found at tropical regions and temperate areas of Central America, South America,  
75 Africa, Southeast Asia and Pacific Islands [4].  
76 *A. martii* is rarely explored in the literature and there is no study about its biological properties.  
77 Besides, this plant is an endemic species in the National Forest Contendas do Sincorá. This region  
78 is predominantly caatinga vegetation (11,034.34 hectares) and contains native species with  
79 scientific research potential and sustainable multiple use of resources.

80 This is the first report of biological activities and phytochemical study of the stem *A. martii*  
81 described in literature.

82

## 83 METHODS

### 84 **Plant material**

85 The stem of *A. martii* Benth was collected (IBAMA’s license # 12292–1) from the National Forest  
86 Contendas do Sincorá (S13°55.380 and W041°07.078) at Contendas do Sincorá, Bahia State,  
87 Northeast Brazil in August 2009. The plant material was identified by Prof. Avaldo de Oliveira  
88 Soares Filho, and voucher specimen (HUESBVC 4994) was deposited at the Herbarium of  
89 Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) in Vitória da Conquista, Bahia, Brazil.

90

### 91 **Preparation of plant extract**



92 The dried stem (400 g) was macerated in EtOH, resulting in the ethanolic extract of *A. martii* (22.8  
93 g). The dry ethanolic extract (EESAM) was solubilized in the vehicle ethanol 10% (v/v) and this  
94 hydroalcoholic stem extract of *A. martii* (HESAM) was tested in biological tests. The stem  
95 ethanolic extract (EESAM) yield 22.8 g and was used in the phytochemical studies and antioxidant  
96 tests.

97

### 98 **Phytochemical study of the stem ethanolic extract of *A. martii* Benth**

99 Phytochemical analysis of ethanolic extract of the stem of *A. martii* (EESAM) was carried out  
100 using standard methods of chromatography to identify the mainly constituents following the  
101 procedures described by [7], [8], [9], [10], [11]. The EESAM was applied on a silica gel pre-coated  
102 Thin Layer Chromatography (TLC) plate. The solvent systems used were chloroform: methanol  
103 (9:1), ethyl acetate: formic acid: acetic acid: H<sub>2</sub>O (10:11:11:27), ethyl acetate: methanol: H<sub>2</sub>O  
104 (4:1:2).

105 Qualitative phytochemical tests for the identification of flavonoids, phenolic acids, saponins,  
106 sterols, polyphenols and alkaloids were carried out using the following reagents and chemicals:  
107 the presence of flavonoids and phenolic acids were suggested by using aluminum chloride -  
108 ethanol solution 1%; saponins with the use of sulfuric acid - ethanol solution 5%; sterols with  
109 Liebermann-Burchard Reagent; polyphenols with 1% aqueous solution of potassium ferrocyanide  
110 and 2% aqueous solution of ferric chloride; and alkaloids were detected using Wagner's Reagent.

111

### 112 **Gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS) analysis**

113 The GC-MS analysis were performed in a QP2010SE Shimadzu mass spectrometer (mod. GC2010  
114 Plus) employing an Rtx-5MS (30 m, 0.25 mm diameter, film thickness 0.25 µm) column, using

115 helium as carrier gas. Prior to injection, the sample (3 mg) was dissolved in 60  $\mu$ L of pyridine in  
116 capped vials, followed by the addition of 100 $\mu$ L of N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide  
117 (BSTFA) containing 1% trimethylchlorosilane (TMCS) (Sigma-Aldrich1) for derivatization. The  
118 mixture was heated at 70°C for 30 min, and a 1  $\mu$ L of mixture was injected in the GC-MS. The  
119 GC conditions were: temperature of 290°C in the injector, initial temperature of 80°C in the oven  
120 for 5 min and a final temperature of 285°C (range 4°C/min) [12]. GC-MS was operated in the 70  
121 eV electron ionization mode with a mass range of 30-600 Da. The identification of the compounds  
122 were made by the comparison of the mass spectrum of the sample to the data of the equipment.

123

## 124 **Biological activities**

### 125 ***$\beta$ -Carotene-linoleic acid assay***

126 In this assay [13],  $\beta$ -carotene (10 mg) was dissolved in 100 mL of chloroform, and 3 mL was added  
127 to 40 mg of linoleic acid and 400 mg of Tween 40. Chloroform was removed under a stream of  
128 nitrogen gas, and the residue obtained was redissolved in 100 mL of aerated water for 30 min.  
129 Aliquots (3 mL) of the  $\beta$ -carotene/linoleic acid emulsion were mixed with 50  $\mu$ L of the ethanolic  
130 extract of *A. martii* (100 or 500  $\mu$ g/mL) and incubated in water bath at 50°C. Oxidation of the  
131 emulsion was monitored spectrometrically by absorbance at 470 nm at 20 min and 120 min.  
132 Control sample contained 50  $\mu$ L of solvent in place of extract. Reference substances (BHT and  $\alpha$ -  
133 tocopherol) concentration was 90  $\mu$ g/mL. The antioxidant activity is expressed as percent  
134 inhibition relative to the control after a 20 or 120-min incubation using the equation:

135

$$136 \quad \% AA = [(A_{A(\text{time})} - A_{C(\text{time})}) / (A_{C(0)} - A_{C(\text{time})})] \times 100$$

137

138  $A_{C(0)}$  = Absorbance of negative control at the moment of solution preparation.

139  $A_{A(\text{time})}$  = Absorbance of sample after incubation for 20 or 120 min.

140  $A_{C(\text{time})}$  = Absorbance of control after incubation for 20 or 120 min.

141

#### 142 ***Determination of antinociceptive and anti-inflammatory activities***

143 **Animals.** All experiments were performed with male *Balb/C* mice (20–25 g) obtained and  
144 maintained at the Animal Facility of Multidisciplinary Health Institute of Federal University of  
145 Bahia. The animals were maintained in a temperature-controlled room ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ) with controlled  
146 humidity (50–70%) and a 12/12 h light/dark cycle. The animals were housed in polypropylene  
147 boxes containing wood shavings at the base of the box with free access to food (Labina<sup>®</sup>, Purina)  
148 and filtered water. The mice were evenly distributed among the groups. All animals were allowed  
149 to acclimatize to the air-conditioned laboratory for at least 2h before the tests, which were  
150 performed during the light cycle phase. Animal care and research protocols were in accordance  
151 with the principles and guidelines adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation  
152 (COBEA) and were approved by the Ethical Committee for Animal Research of the University of  
153 Uberaba, Brazil (protocol 0107/2009). The number of animals used was the minimum necessary  
154 to show consistent effects of the drug treatments. At the end of the experiments, the animals were  
155 anesthetized with 60 mg/kg ketamine plus 7.5 mg/kg xylazine, and euthanized by anesthetic depth.

156

157 **Writhing test induced by acetic acid.** The antinociceptive effect of EESAM was evaluated in  
158 mice using the writhing test induced by acetic acid according to the procedures previously  
159 described [14], [15]. Animals were treated subcutaneously (s.c.) with the hydroalcoholic extract  
160 of the stem of *A. martii* - HESAM (3.12, 6.25, 12.5, 25 or 50 mg/kg) 30 min prior to intraperitoneal  
161 (i.p.) injection of 0.6% acetic acid (0.1 mL/10g; Sigma<sup>®</sup>, St. Louis, MO, USA). The negative  
162 control received only vehicle (s.c.). After the administration of the acetic acid, the number of

163 writhes and stretching movements (contraction of the abdominal musculature and extension of the  
164 hind limbs) was counted at 5 min intervals for a period of 30 min.

165  
166 **Investigation of antinociceptive mechanisms of action.** To address the mechanisms by which  
167 the HESAM causes antinociception in the writhing test induced by acetic acid model, animals were  
168 pretreated with different drugs: naloxone (non-selective opioid receptor antagonist, 1 mg/kg, i.p.)  
169 to examine the opioid system, yohimbine ( $\alpha_2$ -antagonist, 0.2 mg/kg, i.p.) to analyze  $\alpha_2$ -adrenergic  
170 system, atropine (non-selective cholinergic receptor antagonist, 5 mg/kg, i.p) to examine  
171 cholinergic system; bicuculline (GABA<sub>A</sub> antagonist, 0.7 mg/kg, i.p) to examine GABAergic  
172 system; ondansetron (5-HT<sub>3</sub>-antagonist, 0.2 mg/kg, i.p.) or methysergide (non-selective serotonin  
173 antagonist, 2.0 mg/Kg, i.p.) to examine serotonergic system. After 20 min, animals were treated  
174 with EESAM (12.5 mg/Kg, s.c.) or vehicle. After 30 min, the animals received injection of acetic  
175 acid 0.6% (i.p.). The drug doses used were selected on the basis of literature data [16], [17], [18],  
176 [19].

177  
178 **Nociception induced by intraplantar injection of formalin.** Formalin-induced hypernociception  
179 behavior was assessed as described previously [20]. Mice were acclimated for 15 min in a plastic  
180 box and pre-treated with HESAM (0.78, 1.56, 3.13 or 6.25 mg/kg, s.c.), vehicle (s.c.), morphine  
181 (5 mg/kg, s.c.). Then after 30 min, it was injected subcutaneously 20  $\mu$ l of 1.5% formaldehyde  
182 (Sigma<sup>®</sup>, St. Louis, MO, USA) in 0.9% saline into the plantar right hindpaws. The mice were  
183 observed for 30 min after the formalin injection, and pain behavior was determined by the number  
184 of flinches, biting and licking of the injected paw counted during the observation period time. The

185 acute phase (phase 1) was defined as 0–15 min after injection, and the persistent tonic phase (phase  
186 2) was defined as 15–30 min after injection.

187

188 **Paw edema induced by intraplantar injection of formalin.** At the end of the experiment of  
189 nociception induced by intraplantar injection of formalin, both posterior paws were removed and  
190 weighed using an analytical balance. The contralateral paw was used as a control. The weight of  
191 the paw that did not receive the formalin injection was subtracted from the weight of the injected  
192 paw to determine edema formation. The results were expressed in grams (g).

193

194 **Evaluation of neutrophil migration.** To investigate neutrophil migration to the peritoneal cavity,  
195 the HESAM (0.78, 1.56 or 3.13 mg/kg), or vehicle were administered subcutaneously 30 min prior  
196 to the administration of the inflammatory stimulus, an intraperitoneal injection of carrageenan (Cg)  
197 at a dose of 500 µg/cavity [21]. The mice were sacrificed 4 h after Cg administration, and the  
198 peritoneal cavity cells were harvested by washing the cavity with 3 mL of phosphate-buffered  
199 saline (PBS) containing 1 mM EDTA. The recovered volume was similar in all experimental  
200 groups and equated to approximately 95% of the injected volume. Total counts were performed in  
201 a Newbauer chamber. Differential cell counts (100 cells in total) were performed on a  
202 cytocentrifuge (PRESVAC CT12, Curitiba, Brazil) using slides stained with Panoptic. The results  
203 are presented as the number of neutrophils per cavity.

204

205 **Evaluation of vascular permeability.** Vascular permeability was analyzed by the Evans Blue test  
206 [22]. Fifteen min prior to HESAM administration, Evans Blue (50 mg/kg) diluted in 50 µL of  
207 saline solution was intravenously injected into the ocular plexus. The HESAM (3.13, 6.25, 12.5 or

208 25 mg/kg) or vehicle was administered subcutaneously 30 min prior to the intraperitoneal injection  
209 of Cg (500 µg/cavity), the inflammatory stimulus [23]. The mice were sacrificed 3 h after Cg  
210 administration, and the peritoneal cavity was washed with 3 mL of PBS. The Evans blue content  
211 (protein extravasation) was calculated using an Evans blue standard curve, and the absorbance of  
212 each sample was measured at 620 nm using a spectrophotometer (Genesys, Thermo Scientific,  
213 Waltham, MA, USA).

214

215 **Test of increasing pressure on paw.** The hypernociceptive mechanical threshold was measured  
216 by the electronic Von Frey method with modifications [12]. Mice were placed in acrylic cages (12  
217 x 20 x 17 cm) with wire grid floors in a quiet room 30 min before the experiment. The test consisted  
218 of evoking a hind paw flexion reflex with a hand-held force transducer adapted with a tip (0.8-  
219 mm<sup>2</sup> tip diameter, electronic Von Frey, Insight Equipments©, Brazil). The stimulus was  
220 automatically discontinued and its intensity was recorded when the paw was withdrawn. The  
221 maximal force applied was 12 g. The endpoint was characterized by the removal of the paw in a  
222 clear flinch response. The mice were pretreated with HESAM (0.78, 1.56, 3.13, 12.5, 25 or 50  
223 mg/kg, s.c.) or vehicle (s.c.). After 30 min, the mice were injected with Cg (100 µg/paw, i.pl.) on  
224 the ventral surface of the hind paw. After 3h, the Von Frey test was conducted. The results was  
225 expressed as the delta (Δ) withdrawal threshold (g) calculated by subtracting the basal mean  
226 measurements from the mean measurements obtained 3 h after Cg i.p. injection.

227

## 228 **Statistical analysis**

229 The results were presented as the mean ± S.D. (n = 6 per experiment). Statistical comparisons  
230 between groups were conducted using analysis of variance (ANOVA) (one -way) followed by the

231 Bonferroni test for multiple comparisons in the GraphPad PRISM version 5.00 program. The  
232 established level of significance was  $p < 0.05$ .

233

## 234 RESULTS AND DISCUSSION

### 235 TLC analysis

236 Phytochemical screening of the ethanolic extract of *A. martii* (EESAM) revealed the  
237 presence of various bioactive compounds such as flavonoids, saponins, sterols, alkaloids and  
238 polyphenols (**Table 1**). Previous studies have shown that these phytochemicals possess a wide  
239 range of therapeutic properties, most are related to anti-inflammatory, anti-bacterial, and  
240 antioxidative activities, but also it's been reported some antitumor, antifungal activities and many  
241 more [24].

242

243 **Table 1.** Phytochemical analysis of ethanolic extract of stem of *Aeschynomene martii*.

Phytochemicals	Ethanolic extract of
	stem of <i>A. martii</i>
	+/-
<i>Flavonoids</i>	+
<i>Phenolic Acids</i>	-
<i>Saponins</i>	+
<i>Sterols</i>	+
<i>Polyphenols</i>	+
<i>Alkaloids</i>	+

244 (+) Presence, (-) Absence

245

### 246 Gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS) analysis

247 The ethanolic stem extract of *A. martii* was subjected to a detailed GC-MS analysis to determine  
248 their chemical composition (**Table 2**). Sixteen compounds were identified representing 51.48 %  
249 of the total % composition of stem extract (97.45). The analysis revealed that the extract have

250 carbohydrates, steroids and flavonoids compounds that comprised 4.17 %, 2.55 % and 34.81 %,  
 251 respectively, of the stem material. This extract also contained unidentified compounds that  
 252 corresponded to 6.99 %.

253 Plants sterols (phytosterols) have important pharmacological properties, including, cardiogenic,  
 254 anti-inflammatory, analgesic and antimicrobial activities [24].  $\beta$ -sitosterol is one of the most  
 255 common plant sterols. They are able to reduce blood cholesterol levels, and possess other  
 256 beneficial health effects as antioxidant activity [25].

257

258 **Table 2.** CG-MS phytochemical analysis (%) of stem ethanolic extract of *Aeschynomene martii*.

RT	Identification	[M <sup>+</sup> ]	Formula	% of area
34.913	Ethyl hexadecanoate	284	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	7.85
36.172	Hexadecanoic acid	328	C <sub>19</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub> Si	8.10
38.730	Ethyl octadeca-9,12-dienoate	308	C <sub>20</sub> H <sub>36</sub> O <sub>2</sub>	5.02
38.855	Ethyl octadec-9-enoate	310	C <sub>20</sub> H <sub>38</sub> O <sub>2</sub>	3.89
39.430	Ethyl octadecanoate	312	C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub>	1.77
39.850	Linoleic acid	352	C <sub>21</sub> H <sub>40</sub> O <sub>2</sub> Si	5.19
39.960	Oleic acid	354	C <sub>21</sub> H <sub>42</sub> O <sub>2</sub> Si	4.13
40.520	Stearic acid	356	C <sub>21</sub> H <sub>44</sub> O <sub>2</sub> Si	2.36
47.460	Ethyl dodecanoate	368	C <sub>24</sub> H <sub>48</sub> O <sub>2</sub>	0.74
47.605	Hexadecanoic 2,3-diidroxipropila	474	C <sub>25</sub> H <sub>54</sub> O <sub>2</sub> Si <sub>2</sub>	1.06
48.310	Acid docosanoic	412	C <sub>25</sub> H <sub>52</sub> O <sub>2</sub> Si	0.56
51.085	Ethyl Tetracosanoate	396	C <sub>26</sub> H <sub>52</sub> O <sub>2</sub>	2.12
51.800	Acid tetracosanoic	440	C <sub>27</sub> H <sub>56</sub> O <sub>2</sub> Si	1.96
54.415	Ethyl Hexacosanoate	424	C <sub>28</sub> H <sub>56</sub> O <sub>2</sub>	1.98
55.060	Acid hexacosanoic	468	C <sub>29</sub> H <sub>60</sub> O <sub>2</sub> Si	1.49
60.925	$\beta$ -Sitosterol	486	C <sub>32</sub> H <sub>58</sub> O <sub>2</sub> Si	3.26
	<b>Identified</b>			<b>51,48</b>
	<b>Carbohydrates</b>			<b>4,17</b>
	<b>Sterols</b>			<b>2,55</b>
	<b>Flavonoids</b>			<b>34,81</b>
	<b>Not identified</b>			<b>6,99</b>

259 RT = Retention time



260

261 Flavonoids are responsible for a wide range of therapeutic properties, including, antioxidant,  
262 anti-cancer, anti-inflammatory and anti-allergy effects [26]. The anti-inflammatory activity of  
263 flavonoids has been attributed to inhibitory effects on the cyclooxygenase (COX) and/or 5-  
264 lipoxygenase (5-LOX) pathways of arachidonic metabolism and the inhibition of nitric oxide  
265 production by iNOS [27].

266 Among the fatty acids found in EESAM, oleic acid and linoleic acid are present. Oleic acid  
267 seems to have a moderate anti-inflammatory activity in inhibiting platelet aggregation induced  
268 by arachidonic acid, with little inhibition of thromboxane formation. Linoleic acid (LA) is  
269 described as a dual agent, presenting pro-inflammatory effect (it is an arachidonic acid  
270 precursor) and anti-inflammatory role. The anti-inflammatory effect is observed by the  
271 production of 13-hydroxyoctadecanoic acid (13-HODE), a substance that reduces NADPH  
272 oxidase activity and leukocytes migration. Furthermore, studies pointed out that LA inhibits  
273 COX-1 and COX-2 activities *in vitro*, diminishes the secretion of IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  and  
274 reduce the expression of NF- $\kappa$ B [28].

275

### 276 **$\beta$ -Carotene-linoleic acid assay**

277  $\beta$ -Carotene-linoleic acid assay is a method that measure the ability of an antioxidant to inhibit  
278 the lipid peroxidation. The  $\beta$ -carotene bleaching method is based on the loss of the yellow color  
279 of  $\beta$ -carotene due to its reaction with radicals formed by linoleic acid oxidation in an emulsion.  
280 The rate of  $\beta$ -carotene bleaching can be slowed down in the presence of antioxidants. The free  
281 linoleic acid radical formed upon the abstraction of a hydrogen atom from one of its methylene  
282 groups attacked the  $\beta$ -carotene molecules, which lost the double bonds and therefore, its  
283 characteristic orange color [29]. The rate of bleaching of the  $\beta$ -carotene solution was measured  
284 by the difference between the initial reading in spectral absorbance at 470 nm at time 0 min

285 and after 20 min and 120 min. The antioxidant activity was expressed as percent inhibition  
 286 relative to the control.

287 In Table 3, the  $\alpha$ -Tocopherol showed the antioxidant activity of 71.33% in the first 20 minutes  
 288 and 87.83% at the time of 120 min, while BHT showed 91.39% and 98.14%, at 20 min and  
 289 120 min respectively, which is considered the best standard antioxidant for this test. Thus, the  
 290 antioxidant activity of the tested EESAM presented a high scavenging activity (92.22% in 20  
 291 min and 86.48% in 120 min with the concentration of 500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; and 91.10% in 20 min and  
 292 87.65% in 120 min with the concentration of 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). The antioxidant activity of EESAM  
 293 was better and similar to the BHT at the concentrations of 500 and 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  only at the 20  
 294 min ( $p > 0.05$ ), decreasing the antioxidant activity at 120 min compared to BHT at both times  
 295 ( $p < 0.05$ ). The concentration of 500 and 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of EESAM at 120 min showed similar  
 296 antioxidant activity of  $\alpha$ -Tocopherol ( $p > 0.05$ ).

297 Probably, the antioxidant activity of the EESAM would be due to the presence of substances  
 298 such as Linoleic acid [28], flavonoids [26] and  $\beta$ -sitosterol that have antioxidant activities.  
 299 Treatment of diabetic rats with  $\beta$ -sitosterol decreased serum NO levels towards levels seen in  
 300 healthy rats, suggesting its free radical-scavenging ability in diabetes [25].

301

302 **Table 3.** Antioxidant activity of the stem ethanolic extract of *A. martii* in the autoxidation  $\beta$ -  
 303 carotene / linoleic acid method.

	ETHANOLIC EXTRACT OF <i>A. MARTII</i>				BHT		$\alpha$ -TOCOPHEROL	
	Concentration		Concentration		Concentration		Concentration	
	500 $\mu\text{g}/\text{mL}$		1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$		90 $\mu\text{g}/\text{ml}$		90 $\mu\text{g}/\text{ml}$	
Time	20 min	120 min	20 min	120 min	20 min	120 min	20 min	120 min
AA	92,22 $\pm$	86,48 $\pm$	91,10 $\pm$	87,65 $\pm$	91.39 $\pm$	98.14 $\pm$	71.33 $\pm$	87.83 $\pm$
	2,69% <sup>b</sup>	7,48% <sup>a</sup>	9,31% <sup>b</sup>	2,88% <sup>a</sup>	0.01% <sup>b</sup>	0.01% <sup>b</sup>	0.09% <sup>a</sup>	0.05% <sup>a</sup>

304 <sup>a</sup> Values followed by the same letter do not demonstrate a significant difference comparing the values of BHT,  $\alpha$ -  
 305 tocopherol and the crude ethanolic extracts of *A. martii* in time periods (20 or 120 min),  $p < 0.05$  (two-way analysis

306 of variance followed by Bonferroni post-test). Values are from triplicates measurements, shown as mean  $\pm$  SD (n  
307 = 3).

308

309 At each time, 20 min or at 120 min, the antioxidant activity did not increased with increasing  
310 concentration of the extract used. The time was more important to the antioxidant activity of  
311 EESAM than the concentration.

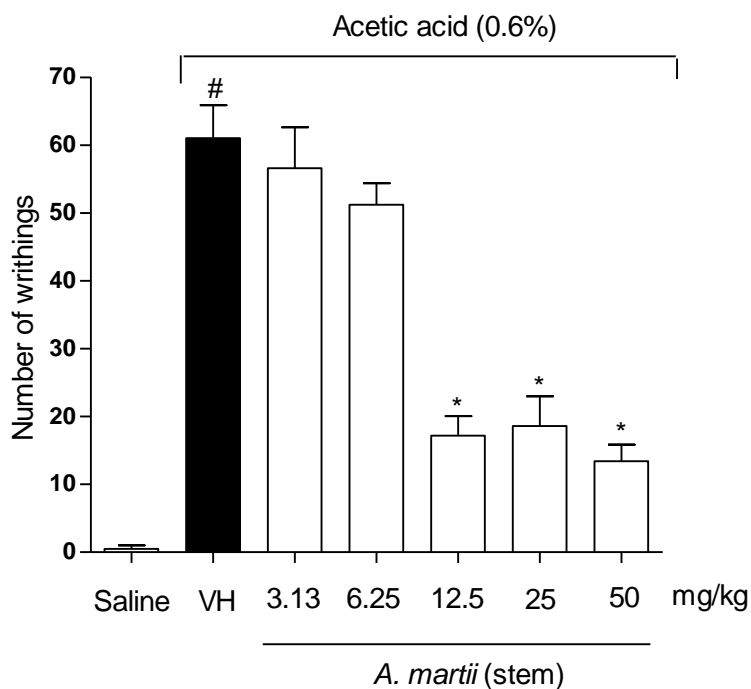
312 Several substances derived from plants, natural antioxidants, seems to be more effective in  
313 reducing the reactive oxygen species (ROS) level than synthetic single dietary antioxidants.  
314 [27]

315 Thus, the stem ethanolic extract inhibited significantly the activity of free radicals generated  
316 during peroxidation of linoleic acid. Antioxidants are important to retard aging and  
317 degenerative diseases, in addition EESAM also can be a new and natural source of antioxidant  
318 substances for its use as natural additives in food.

319

### 320 **Acetic acid-induced writhing test**

321 The acetic acid is an irritant that causes abdominal constrictions and the release of pro-  
322 inflammatory mediators. The method of writhing induced by acetic acid is a model widely used  
323 for the evaluation of central and peripheral antinociceptive activity [30], [31]. The acetic acid-  
324 induced writhing test was performed to evaluate the antinociceptive effect of the stem  
325 hydroalcoholic extract of *A. martii* – HESAM (3.13, 6.25, 12.5, 25 or 50 mg/kg). As shown in  
326 **Figure 1**, the highest doses of HESAM, 12.5, 25 and 50 mg/kg, significantly reduced  
327 nociceptive behavior (writhing episodes) in mice, indicating the inhibition of acetic acid-  
328 induced visceral nociception, compared to control group treated with vehicle ( $p < 0.05$ ). On  
329 the other hand, the 3.13 and 6.25 mg/kg doses did not present a significant reduction in the  
330 number of writhes compared to the vehicle group ( $p < 0.05$ ). Thus, the ethanolic extract of the  
331 stem of *A. martii* resulted in a dose-dependent inhibition of writhing in response to nociception.



332

333 **Figure 1.** Effect of the stem hydroalcoholic extract of *A. martii* (HESAM) on acetic acid-induced writhing test in  
 334 mice. VH is the vehicle group (negative control). The HESAM was tested at doses of 3.13, 6.25, 12.5, 25 or 50  
 335 mg/kg (s.c.). The results are presented as the mean ± S.D. of writhing in mice (n = 6). Statistical significance was  
 336 calculated by ANOVA followed by Bonferroni's test. \*p < 0.05 compared to the vehicle-negative control treated  
 337 group.

338

### 339 **Investigation of antinociceptive mechanisms of action of HESAM**

340 To investigate if the HESAM act on the opioid,  $\alpha_2$ -adrenergic, serotonergic, cholinergic and  
 341 GABAergic systems, which are involved in the pain modulation induced by acetic acid, the  
 342 animals were pre-treated with drugs that act as antagonists on the receptors of these systems.

343 If the administration of the antagonists was able to reduce the antinociceptive effect HESAM,  
 344 it was observed an increasing in nociception in animals, showing that the antagonist dislocated  
 345 the HESAM from the receptor. Thus, by this test, it is possible to infer in which pathway the  
 346 HESAM may acts to produce antinociception.

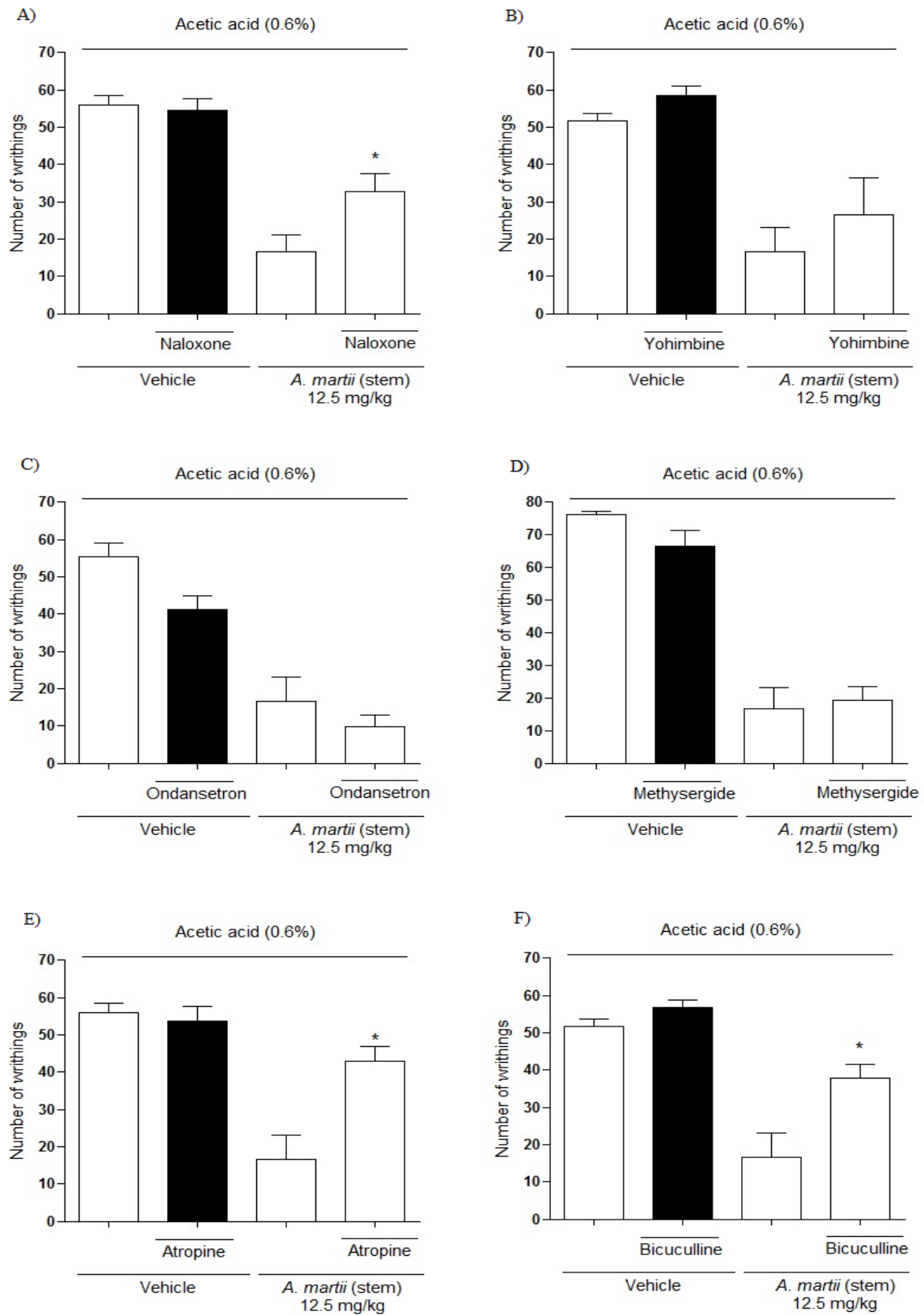
347 The results showed at **Figure 2** demonstrated that the animals pretreated with naloxone,  
 348 atropine and bicuculline, the antagonists of the opioid, cholinergic and GABAergic systems

349 respectively, significantly reduced the antinociception caused by the HESAM before ( $p < 0.05$ ).  
350 However, the pre-treatment with  $\alpha_2$ -adrenergic (yohimbine) and serotonergic (ondansetron and  
351 methysergide) antagonists did not reverse the antinociception caused by HESAM ( $p > 0.05$ ).  
352 The activation of opioid receptors is able to reduce effectively the nociception induced in  
353 animal models of pain [32]. Opioid receptors are expressed in nerves involved in pain  
354 transmission and modulation in periphery, spinal cord and brain. They are Gi protein-coupled  
355 receptors that inhibit adenylyl cyclase when they are activated. Besides, they decrease  $Ca^{++}$   
356 conductance and increase  $K^+$  conductance, causing the reduction of neuronal excitability and  
357 diminishing the release of neurotransmitters (e.g. Substance P). This prevents the activation  
358 and sensitization of pain fibers. [17] [33]. Endogenous ligands (endorphins, enkephalin,  
359 dinorphins) are also produced and released to bind opioid receptors producing analgesia.  
360 Naloxone is a potent drug used to revert the effect of the activation of opioid receptors by  
361 agonists [16]. The treatment with naloxone, a nonselective opioid antagonist, succeeded to  
362 diminish the HESAM antinociception, which means that HESAM antinociceptive response is  
363 due to the activation of opioid receptors.  
364 Atropine is a non-selective antagonist of central and peripheral muscarinic receptors [17]. The  
365 results of this study also suggests that cholinergic system may be involved in the  
366 antinociceptive mechanisms of HESAM in view of the fact that it seems that atropine was able  
367 to revert the antinociception caused by HESAM.  
368 Substances involved in nociception transmission alters endogenous levels of acetylcholine  
369 (Ach), which can module pain transmission and may participate in descendent inhibition  
370 process [16] [17] [32] [33]. Cholinergic way is related to the rostral ventrolateral medulla  
371 modulation of cardiovascular functions and antinociceptive mechanisms. The activation of pre-  
372 synaptic opioid receptors by morphine increases the release of Ach in Central Nervous System  
373 neurons (CNS), and this will potentiate the antinociceptive effect. Studies have demonstrated

374 that the antinociception induced by systemic morphine administration may be reverted by  
375 muscarinic antagonists. This reinforces the idea that the opioid and cholinergic systems acts  
376 synergistically. Nicotine cholinergic receptors demonstrated antinociceptive effects mainly in  
377 models of pain induced by thermic stimuli, but they also presented antinociceptive response in  
378 writhing induced by acetic acid model, in both phases of formalin test and in nociception  
379 induced by pro-inflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IFN- $\gamma$  [16]. Cholinergic way  
380 plays an important role in endogenous pain control since muscarinic agonists increases de  
381 release of inhibitory neurotransmitters (GABA and glycine).

382 Physiological and behavioral responses observed in rodents led to the conclusion that GABA  
383 may have an important inhibitory function in nociceptive transmission. Some GABA analogues  
384 act inhibiting ionic channels, contributing to analgesia. Spinal cord neurons which contain  
385 GABA can be found in lamina I and II (where the initial modulation of sensory and nociceptive  
386 information are processed after they receive nociceptive stimuli from afferent fibers A- $\delta$  and  
387 C.) and also in lamina III. GABAergic interneurons in lamina II form synapsis with primary  
388 afferent neurons, what suggests a presynaptic mechanism of action of GABA. Some GABA  
389 receptors agonists are being successfully used in the treatment of neuropathic pain, reducing  
390 the release of neurotransmitters, such as glutamate [16]. The results showed that GABAergic  
391 system is possibly involved in the antinociceptive action of HESAM, because bicuculline, a  
392 GABA<sub>A</sub> antagonist, reverted the antinociceptive response of *A. martii*.

393 The evaluation of a few specific receptors in pain systems was assessed by the writhing test  
394 model of nociception. Therefore, it can be assumed that the opioid, cholinergic and GABAergic  
395 neurons are involved in nociceptive transmission, since the antagonists reverted the pain  
396 inhibitory effect of the ethanolic extract of stem *A. martii*.



397

398 **Figure 2.** Effect of pretreatment of mice with the antagonists (mg/kg) and the *A. martii* stem hydroalcoholic extract

399 (HESAM) on acetic acid (0.6%)-induced writhing. VH is the vehicle group (negative control). Figure A shows

400 the response of animals pretreated with naloxone. Figure B shows the response of animals pretreated with  
401 yohimbine. Figure C shows the response of animals pretreated with ondansetron. Figure D shows the response of  
402 animals pretreated with methysergide. Figure E shows the response of animals pretreated with atropine. Figure F  
403 shows the response of animals pretreated with bicuculline. The HESAM was tested at dose of 12.5 mg/kg (s.c.).  
404 The results are presented as the mean  $\pm$  S.D. of writhing in mice ( $n = 6$ ). Statistical significance was calculated  
405 by ANOVA followed by Bonferroni's test.  $*p < 0.05$  compared to the vehicle-negative control treated group.

406

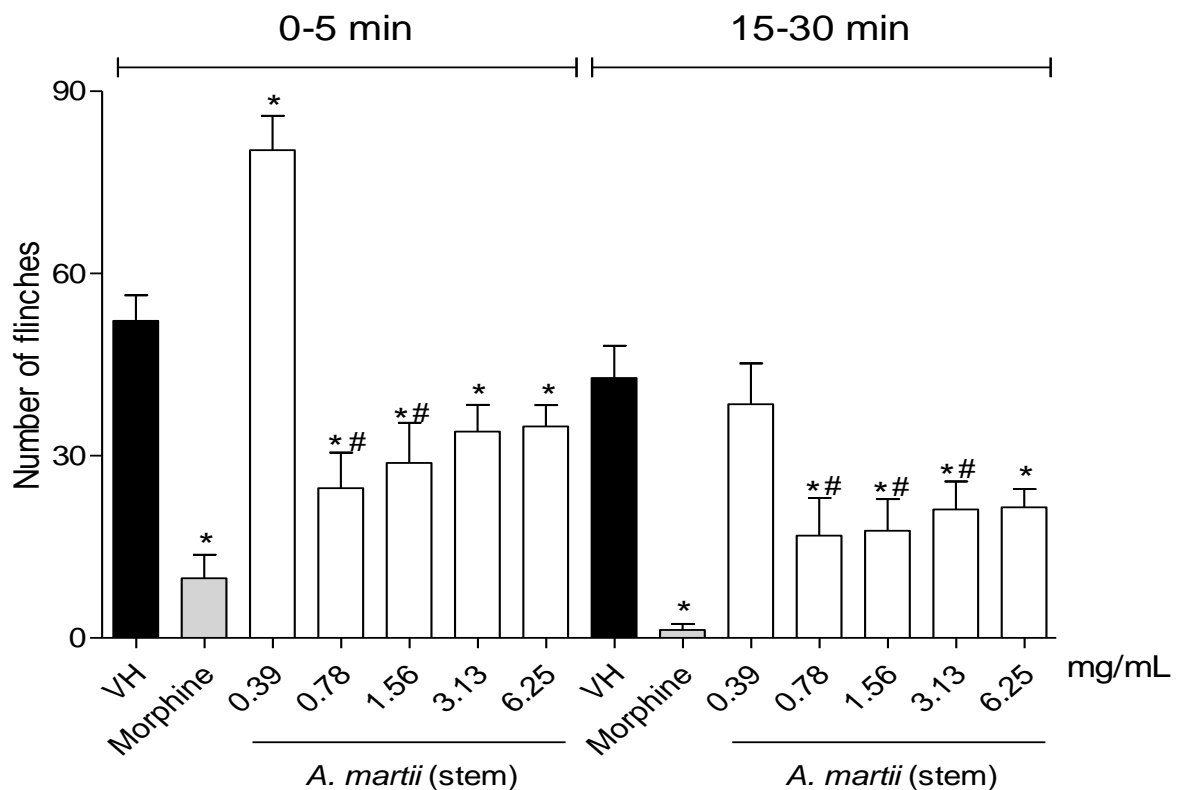
### 407 **Effect of the extract HESAM on nociception and paw edema induced by intraplantar** 408 **injection of formalin**

409 The formalin test is a chemical experimental model that evaluate the antinociceptive activity  
410 centrally and peripherally, it produces a biphasic behavioral response. Neurogenic phase  
411 occurs from 0 – 5 min after pain induction, which may be the related to the direct activation of  
412 nociceptors in C and A $\delta$  afferent fibers. Inflammatory phase occurs between 15 and 30 min  
413 after the injection of formalin and is characterized by release of inflammatory mediators [34].  
414 As revealed in **Figure 3**, morphine and almost all of tested doses (0.78, 1.56, 3.13 and 6.25  
415 mg/kg) of the HESAM induced analgesic effect on biphasic responses after intraplantar  
416 injection of formalin. However, the dose of 0.39 mg/kg of HESAM showed significant algesic  
417 reponse on phase 1 ( $p < 0.05$ ) and no antinociception activity at phase 2 compared to the vehicle  
418 group ( $p > 0.05$ ). The HESAM demonstrated analgesic effects comparable to morphine, in  
419 early phase with the dose of 0.78 and 1.56 mg/kg, and at late phases with the doses 0.78, 1.56  
420 and 3.13 mg/kg ( $p > 0.05$ ).

421 Formalin test is an experiment that evaluate nociception with high sensitivity and specificity,  
422 is widely used to investigate mechanism of action of numerous substances, nociception  
423 transmission and central analgesia [32]. Opioids, such as morphine, acts centrally and can  
424 inhibit both phases of formalin test. Opioid peptides act in spinal cord preventing the release  
425 of substance P and glutamate from pre-synaptic neurons, and act as well in brainstem



426 stimulating analgesic descending systems in periaqueductal gray by GABAergic neurons  
427 inhibition [16] [35].



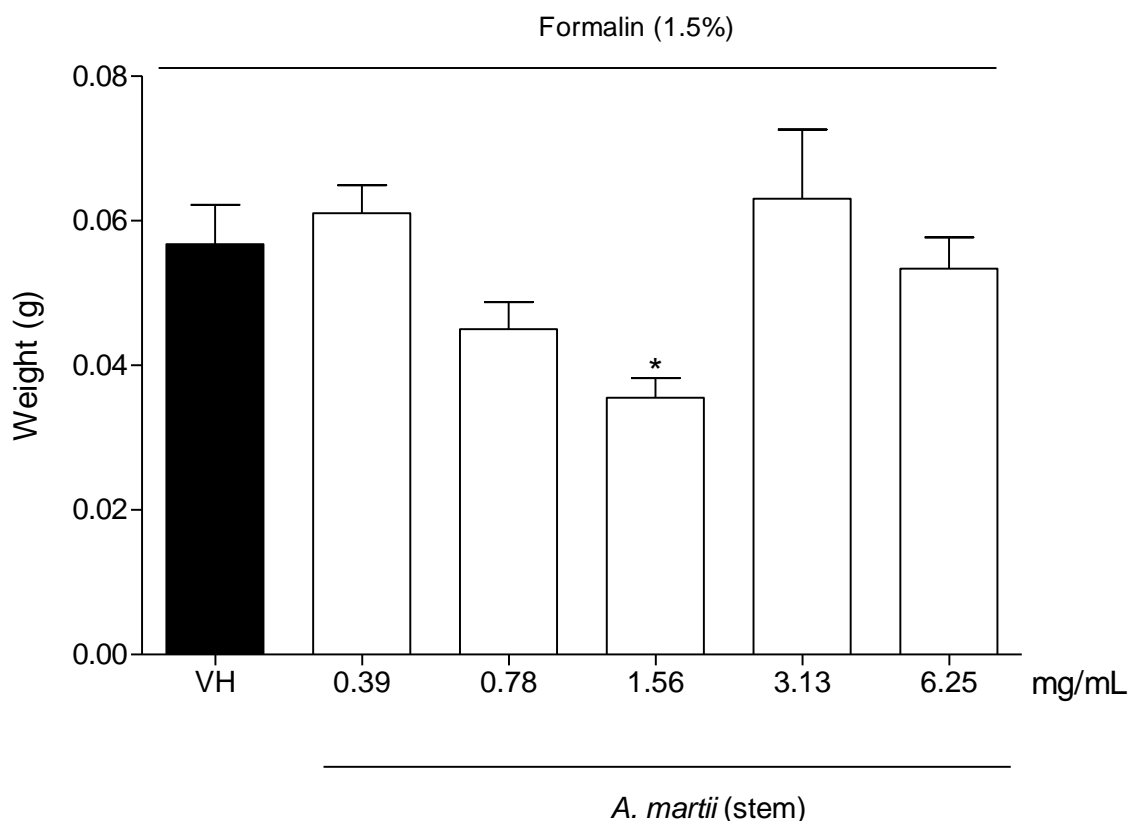
428

429 **Figure 3.** Effects of hydroalcoholic extract of *A. martii* stem (HESAM) on the response to nociception induced by  
430 intraplantar formalin injection in mice during the neurogenic phase (0-5) and inflammatory phase (10-30).  
431 Morphine (5 mg/kg, s.c.) was the positive control group. VH is the vehicle group (negative control). The HESAM  
432 was tested at doses of 0.39, 0.78, 1.56, 3.13 or 6.25 mg/kg (s.c.). The results are presented as the mean  $\pm$  S.D. (n  
433 = 6) of the number of flinches in the injected paw for a period of 30 min. Statistical significance was calculated  
434 by ANOVA followed by Bonferroni's test. \* $p < 0.05$  compared to the vehicle-negative control treated group. # $p$   
435  $> 0.05$  compared to morphine positive control group.

436

437 Opioid receptors can be found in various levels of pain transmission, they are activated by  
438 opioid agonists producing direct and indirect reduction of nociception. [32]. The experiments  
439 in this study revealed that opioid receptors seems to be involved in the antinociceptive  
440 properties of HESAM, which may be reverted by naloxone (non-selective opioid receptor  
441 antagonist) (**Figure 2**).

442 Mediators of inflammation, such as histamine, serotonin, bradykinin and prostaglandins are  
443 released when tissue injury occurs. They activate primary nociceptors and second order  
444 neurons, what leads to persistent pain. The inflammatory phase of formalin test can be inhibited  
445 by non-steroidal anti-inflammatory drugs or by drugs that act in CNS [32] [36].  
446 The cholinergic receptors can also be involved with the antinociceptive activity of HESAM at  
447 first and second phase of formalin test, since nicotine cholinergic receptors demonstrated  
448 antinociceptive effects mainly in writhing induced by acetic acid model and in both phases of  
449 formalin test, as showed by HESAM.  
450 The evaluation of paw edema after formalin injection is exhibited in **Figure 4**. Only the dose  
451 of 1.56 mg/kg significantly reduced the edema formation when compared to the vehicle group  
452 ( $p < 0.05$ ).



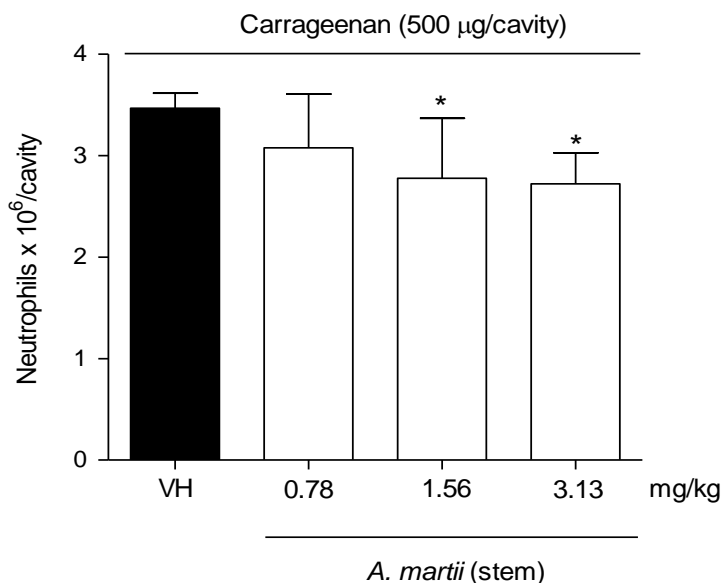
453  
454 **Figure 4.** Effect of hydroalcoholic extract of *A. martii* stem (HESAM) on the induction of paw edema in mice  
455 pretreated with an intraplantar injection of 1.5% formalin. VH is the vehicle group (negative control). The

456 HESAM was tested at doses of 0.39, 0.78, 1.56, 3.13 or 6.25 mg/kg mg/kg (s.c.). The results are presented as the  
457 mean  $\pm$  S.D. (n = 8). Statistical significance was calculated by ANOVA followed by Bonferroni's test. \* $p$  < 0.05  
458 compared to the vehicle negative control treated group.

459

#### 460 **Neutrophil Recruitment to Peritoneal Cavity**

461 During the inflammatory response, it initiates signaling cascades are initiated and trigger the  
462 release of chemotactic agents that recruit leukocytes to the injury site. Neutrophils are the first  
463 leukocytes recruited to the site of inflammation, and they attack microorganisms through  
464 oxidative and non-oxidative mechanisms, producing ROS that cause tissue damage and  
465 contribute to inflammatory disorders [26]. The method for testing *in vivo* neutrophil migration  
466 induced by the injection of carrageenan was performed to verify if the HESAM was able to  
467 inhibit the neutrophil recruitment into the peritoneum, once the recruitment of leukocytes  
468 (neutrophils are the first cells that reach the site of injury) from the circulating bloodstream is  
469 a key event in inflammatory process. After tissue trauma, the acute inflammatory reaction  
470 happens by activation of cellular and molecular effectors of the innate immune system, such as  
471 complement activation and recruitment and activation of neutrophils [37]. The doses of 1.56  
472 and 3.13 mg/kg of HESAM showed significant anti-chemotaxis activity after carrageenan  
473 injection (**Figure 5**), which may suggest a potential anti-inflammatory role.



474

475 **Figure 5.** Effect of hydroalcoholic extract of *A. martii* stem (HESAM) on inhibition of neutrophil migration. The  
 476 animals were pretreated with HESAM (0.78, 1.56, 3.13 mg/kg, s.c.) or vehicle (VH, 10% ethanol, v/v) 30 min  
 477 before intraperitoneal injection of carrageenan (500 μg). The results are presented as mean ± SD (n = 6). Statistical  
 478 significance was calculated by ANOVA followed by Bonferroni test.  $p < 0.05$  compared to the vehicle negative  
 479 control treated group.

480

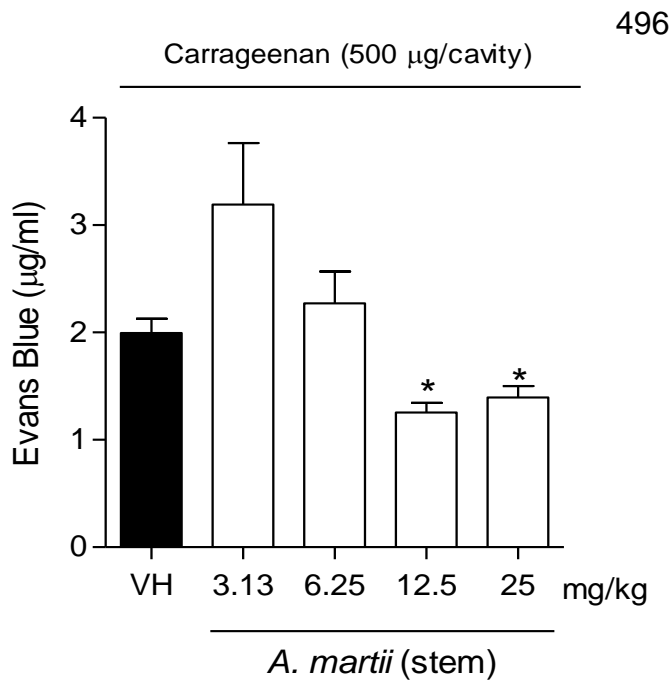
#### 481 **Effect of HESAM on vascular permeability**

482 The release of other substances, in particular, histamine, bradykinin and leukotrienes can  
 483 promote vascular alterations, by causing vasodilation, increasing blood flow and vascular  
 484 permeability. This allows plasma proteins and leukocytes to leak from the blood [17].

485 The anti-inflammatory action of HESAM was also assessed with Evans Blue Dye test (EBD).

486 This test allows the study of cellular membrane permeability. The acute inflammation causes  
 487 changes in blood flow, in vessels and vascular permeability. The exudate produced when there  
 488 is alteration of the permeability vascular contains more proteins in plasma than in normal  
 489 situation. The Evans Blue is combined to plasma albumin forming a dye-albumin complex that  
 490 goes beyond by damaged endothelial barrier [38]. EBD bound to serum albumin that leaked  
 491 into the cavity and can be identified by spectrophotometry [39]. Therefore, as the extravasation

492 of plasma constituents is inhibited, there is a reduction of edema formation, visualized by the  
493 Evans Blue. The HESAM in the doses of 12.5 and 25 mg/kg succeeded in decrease of the  
494 vascular permeability in a dose dependent way (**Figure 6**), what probably means that the  
495 release of mediators of inflammation that cause the vascular dilatation is reduced by HESAM.



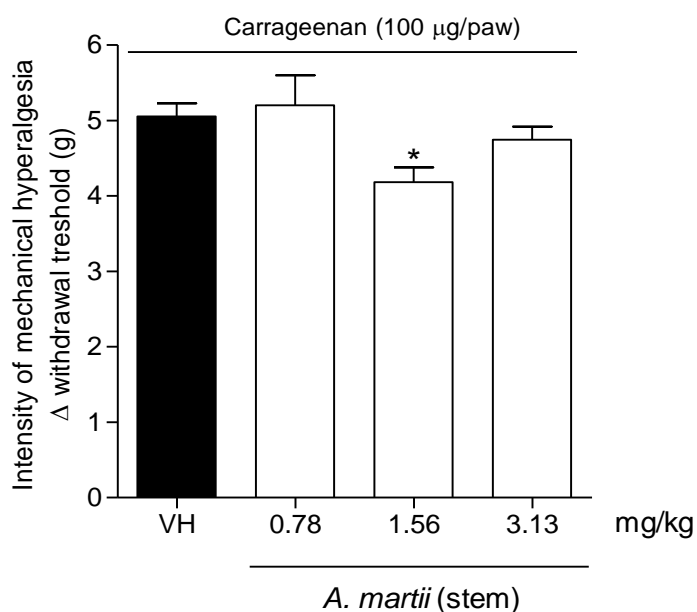
497  
498 **Figure 6.** Effect of the hydroalcoholic extract of *A. martii* stem (HESAM) in vascular permeability - Evans Blue  
499 test. The animals were pretreated with HESAM (3.13, 6.25, 12.5 or 25 mg/kg, s.c.) or vehicle (VH, 10% ethanol,  
500 v/v) 30 min before intraperitoneal injection of carrageenan (500 µg). The results are presented as mean ± SD (n =  
501 6). Statistical significance was calculated by ANOVA followed by Bonferroni test.  $p < 0.05$  compared to the  
502 vehicle negative control treated group.

503

#### 504 **Effect of HESAM on mechanical hypernociception**

505 Tissue sensitivity to mechanical stimulation induced by Cg was performed using the Von Frey  
506 test. Cg injection significantly decreased the basal values measured by electronic Von Frey  
507 mechanical stimulation. The injection of carrageenan into the hindpaws of mice induces a local  
508 inflammatory response, characterized by paw edema, neutrophil migration, and the release of

509 several mediators such as cytokines, which precedes inflammatory hypernociception [40].  
 510 Only the HESAM at 1.56 mg/kg was able to significantly inhibit the Cg-induced mechanical  
 511 hyperalgesia after 3h Cg injection ( $p < 0.05$ ), **Figure 7**. Von Frey test is used to assess  
 512 allodynia, because Cg induces a mechanical hypernociception initiated by the release of  
 513 cytokines such as TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , PGs, and chemokine CK, which are responsible for nociceptor  
 514 sensitization [41]. This result may suggest that HESAM might operate by preventing the  
 515 release of these pro-inflammatory mediators.



516  
 517 **Figure 7.** Effect of hydroalcoholic extract of *A. martii* stem (HESAM) on the inhibition of Cg-induced  
 518 hyperalgesia. VH is the vehicle group (negative control). The HESAM was tested at a dose of 0.78, 1.56 or 3.13  
 519 mg/kg (s.c.). The results are presented as the mean  $\pm$  S.D. ( $n = 6$ ). Statistical significance was calculated by  
 520 ANOVA followed by Bonferroni's test. \* $p < 0.05$  compared to the vehicle-negative control treated group.

521  
 522 The anti-inflammatory and antiedematogenic activities of HESAM could be explained by the  
 523 presence of 34.81 % of flavonoids in the extract, which inhibit the enzymes cyclooxygenase  
 524 (COX) and/or 5-lipoxygenase (5-LOX) pathways of arachidonic metabolism and the inhibition  
 525 of nitric oxide production by iNOS [27]. Oleic acid and linoleic acid can also contribute to the  
 526 anti-inflammatory effect, mainly by reducing NADPH oxidase activity and leukocytes

527 migration, besides the inhibition of COX-1 and COX-2 *in vitro*, diminishing the secretion of  
528 IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  and reduce the expression of NF- $\kappa$ B [28].

529

### 530 CONCLUSION

531 This is the first relate of biological activity of *A. martii*, The stem extract of *A. martii* possess  
532 antioxidant, anti-inflammatory, antinociceptive and antiedematogenic activities at low  
533 concentration/doses, which was characterized by the reduction of lipid peroxidation, reduction  
534 of the neutrophils migration, reduction of vascular permeability and edema formation, and  
535 reduction of neurogenic and anti-inflammatory nociception, possibly by central and peripheral  
536 mechanisms involving opioid, cholinergic and GABAergic systems.

537

### 538 ACKNOWLEDGEMENTS

539 The authors are grateful to the CNPq, CAPES, PET (SESU/MEC) and FAPESB for grants and  
540 fellowships.

541

### 542 REFERENCES

543 [1] Cragg GM, Newman DJ. Natural products: A continuing source of novel drug leads.  
544 *Biochimica et Biophysica Acta*. 2013; 1830: 3670-3695.

545 [2] Maobe MAG, Gatebe E, Gitu L, Rotich H. Preliminary Phytochemical Screening of Eight  
546 Selected Medicinal Herbs Used for the Treatment of Diabetes, Malaria and Pneumonia in Kisii  
547 Region, Southwest Kenya. *European Journal of Applied Sciences*. 2013; 5 (1): 1-6.

548 [3] Silva JC, Saraiva SRGL, Júnior RGO, Almeida JRGS. Modelos experimentais para  
549 avaliação da atividade antinociceptiva de produtos naturais: uma revisão. *Revista Brasileira de*  
550 *Farmácia*. 2013; 94(1): 18-23.

- 551 [4] Souza MC, Vianna LF, Kawakita, K, Miotto STS. O gênero *Aeschynomene* L.  
552 (Leguminosae, Faboideae, Dalbergieae) na planície de inundação do alto rio Paraná, Brasil.  
553 Revista Brasileira de Biociências. 2012; 10(2): 198-210.
- 554 [5] Ignoato MC, Fabrão, RM, Schuquel, ITA, Botelho, MFP, Santin, SMO. Estudo fitoquímico  
555 e avaliação da atividade anti-inflamatória de *Aeschynomene fluminensis* Vell. (Fabaceae).  
556 Química Nova. 2012; 35(11): 2241-2244.
- 557 [6] Queiroz LP. Leguminosas da caatinga. Feira de Santana: Universidade Estadual de Feira  
558 de Santana 2009; 467.
- 559 [7] Sharma V, Paliwal R. Preliminary phytochemical investigation and thin layer  
560 chromatography profiling of sequential extracts of *Moringa oleifera* pods. International  
561 Journal of Green Pharmacy. 2013; 7: 41-45.
- 562 [8] Hashimoto Y, Kawanishi K, Moriyas M. Forensic chemistry of alkaloids by  
563 chromatographic analysis. In: Brossi A. The Alkaloids: Chemistry and Pharmacology. Vol. 32,  
564 San Diego: Academic Press Inc,1988. p. 1-77.
- 565 [9] Rego EA. Avaliação da Actividade Anti-inflamatória de Plantas dos Açores. Dissertation  
566 (Master in Biomedical Science). University of Açores. Ponta Delgada. 2012.
- 567 [10] Sofiati FT. Estudo fitoquímico e atividades biológicas preliminares de extratos de  
568 *Polygonum acre* H.B.K. (Polygonaceae) e *Synadenium carinatum* Boiss (Euphorbiaceae).  
569 Dissertation (Master in Pharmaceutical Science). Paulista State University, Araraquara. 2009.
- 570 [11] Wagner H, Blatt S. Plant Drug Analysis: a Thin Layer Chromatography Atlas. Edn 2.  
571 Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2001.
- 572 [12] Cruz MP, Andrade CMF, Silva KO, Souza EP, Yatsuda, R, Marques LM, David JP, David  
573 JM, Napimoga MH, Clemente-Napimoga, JT. Antinoceptive and Anti-inflammatory Activities  
574 of the Ethanolic Extract, Fractions and Flavones Isolated from *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir  
575 (Leguminosae). PLoS ONE. 2016; 1(3): 1-29.



- 576 [13] Moraes de Souza RA, Oldoni TLC, Regitano d'Arce MAB, Alencar SM. Antioxidant  
577 activity and phenolic composition of herbal infusions consumed in Brazil. *Ciencia y*  
578 *Tecnología Alimentaria*. 2008; 6(1): 41-47.
- 579 [14] Koster R, Anderson M, Beer EJ. Acetic acid for analgesic screening. *Fed Proc*. 1959; 18:  
580 412–416.
- 581 [15] Vacher J, Duchêne-Marullaz P, Barrat P. A propos de quelques produits usuels.  
582 Comparaison de deux méthodes d'étude des analgésiques. *J Exp Med*. 1964; 11: 51–58.
- 583 [16] Hess S. Atividade antinociceptiva do ácido mirsinóico B. Dissertation (Master in  
584 Pharmaceutical Science), Vale do Itajaí University, Itajaí. 2006.
- 585 [17] Pereira CKS. Atividade antinociceptiva e anti-inflamatória de *Herissantia crispera* (L.)  
586 Brizicky em camundongos. Thesis (Doctorate in Natural Products and Bioactive Synthetic).  
587 Federal University of Paraíba, João Pessoa. 2013.
- 588 [18] Santos CMDF. Estudo da estimulação elétrica nervosa transcutânea na nocicepção e no  
589 edema induzidos pela administração de serotonina intradérmica. Dissertation (Master in Rehab  
590 Science). Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte. 2010.
- 591 [19] Spindola HM, Servat L, Rodrigues RAF, Sousa IMO, Carvalho JE, Foglio MA.  
592 Geranylgeraniol and 6 $\alpha$ , 7 $\beta$ -dihydroxyvouacapan-17 $\beta$ -oate methyl ester isolated from  
593 *Pterodon pubescens* Benth: Further investigation on the antinociceptive mechanisms of action.  
594 *European Journal of Pharmacology*. 2011; 656: 45–51.
- 595 [20] Tjølsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K. The formalin test: an evaluation  
596 of the method. *Pain*. 1992; 51: 5–17.
- 597 [21] Nunes BS, Rensonnet NS, Dal-Secco D, Vieira SM, Cavada BS, Teixeira EH, et al. Lectin  
598 extracted from *Canavalia grandiflora* seeds presents potential anti-inflammatory and analgesic  
599 effects. *N-S Arch Pharmacol*. 2009; 379: 609–616.

600 [22] Thurston G, Rudge JS, Ioffe E, Zhou H, Ross L, Croll SD, et al. Angiopoietin-1 protects  
601 the adult vasculature against plasma leakage. *Nat Med.* 2000; 6: 460–463.

602 [23] Alves PM, Pereira JV, Higino JS, Pereira MSV, Queiroz LMG. Atividade antimicrobiana  
603 e antiaderente in vitro do extrato de *Rosmarinus officinalis* Linn. (Alecrim) sobre  
604 microrganismos cariogênicos. *Arq Odontol.* 2008; 44: 53–58.

605 [24] Maobe MAG, Gatebe E, Gitu L, Rotich H. Preliminary phytochemical screening of eighth  
606 selected medicinal herbs used for the treatment of diabetes, malaria and pneumonia in Kisii  
607 Region, Southwest Kenya. *European Journal of Applied Sciences.* 2013; 5(1): 01-06.

608 [25] Gupta R, Sharma A K, Dobhal MP, Sharma MC, Gupta RS. Antidiabetic and antioxidant  
609 potential of b-sitosterol in streptozotocin-induced experimental hyperglycemia. *Journal of*  
610 *Diabetes.* 2011; 3: 29–37.

611 [26] Lojek A, Denev P, Ciz M, Vasicek O, Kratchanova M. The effects of biologically active  
612 substances in medicinal plants on the metabolic activity of neutrophils. *Phytochem Rev.* 2014;  
613 13(2): 499-510.

614 [27] Gomathi R, Nagarajan A, Manian S. A dietary antioxidante supplementation of cherries  
615 (*Muntingia calabura* L.) attenuates inflammatory related disorders. *Food Sci. Biotechnol.*  
616 2013; 22(3): 787-794.

617 [28] Saraiva RA. Efeito anti-inflamatório do óleo fixo do mesocarpo interno de *Caryocar*  
618 *coriaceum* WITTM sobre o edema induzido por agentes flogísticos em modelos animais.  
619 Dissertation (Master in Molecular Bioprospecting). Regional University of Cariri, Crato. 2009

620 [29] Lai H Y and Lim Y Y. Evaluation of Antioxidant Activities of the Methanolic Extracts of  
621 Selected Ferns in Malaysia. *International Journal of Environmental Science and Development.*  
622 2011; 2(6): 442-7.

623 [30] Quintans-Júnior L, Moreira JCF, Pasquali MAB, Rabie SMS, Pires AP, Schröder R,  
624 Rabelo TK, Santos JPA, Lima PSS, Cavalcanti SCH, Araújo AAS, Quintans JSS, Gelain DP.

625 Antinociceptive Activity and Redox Profile of the Monoterpenes (+)-Camphene, *p*-Cymene,  
626 and Geranyl Acetate in Experimental Models. *ISRN toxicology*. 2013(7-8):459-530.

627 [31] Pinto NCC, Duque APN, Pacheco NR, Mendes RF, Motta EVS, Bellozi PMQ, Ribeiro A,  
628 Salvador MJ, Scio E. *Pereskia aculeata*: A plant food with antinociceptive activity. *Pharm*  
629 *Biol*. 2015; 53(12):1780-5.

630 [32] Jürgensen S. Estudos dos mecanismos envolvidos no efeito antinociceptivo de uma fração  
631 de alcaloides oxindólicos de *Uncaria tomentosa*. Dissertation (Master in Pharmacology),  
632 Federal University of Santa Catarina, Florianópolis. 2007.

633 [33] Benedito RB. Estudo do mecanismo de ação antinociceptivo e avaliação histopatológica  
634 cerebral do (S)-(-)-álcool perfílico em camundongos. Thesis (Doctorate in Natural Products and  
635 Bioactive Synthetic). Federal University of Paraíba, João Pessoa. 2013.

636 [34] Taherian AA, Vafaei AA, Ameri J. Opiate System Mediate the Antinociceptive Effects  
637 of *Coriandrum sativum* in Mice. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*. 2012; 11(2):  
638 679-688.

639 [35] Rocha APC, Lemonica L, Barros GAM. Uso de medicações por via subaracnóidea no  
640 tratamento da dor crônica. *Rev Bras Anesthesiol*. 2002; 52(5): 628-643.

641 [36] Santos UD. Avaliação do potencial antinociceptivo e anti-inflamatório do ácido  
642 rosmarínico. Thesis (Doctorate in Neuroscience). Federal University of Santa Catarina,  
643 Florianópolis. 2013.

644 [37] Neher MD, Weckbach S, Flierl MA, Huber-Lang MS, Stahel PF. Molecular mechanisms  
645 of inflammation and tissue injury after major trauma-is complement the “bad guy”? *Journal of*  
646 *Biomedical Science*. 2011; 18: 90.

647 [38] Steele RH, Wilhelm DL. The inflammatory reaction in chemical injury. Increased vascular  
648 permeability and erythema induced by various chemicals. *Br J Exp Pathol*. 1966; 47:612-23.

- 649 [39] Mitul Patel, Muruganathan, Shivalinge Gowda KP. *In Vivo* Animal Models in Preclinical  
650 Evaluation of Anti-Inflammatory Activity-A Review. International Journal of Pharmaceutical  
651 Research & Allied Sciences. 2012; 1: 01-05.
- 652 [40] Cunha TM, Verri WA, Jr. Silva JS, Poole S, Cunha FQ, Ferreira SH. A cascade of  
653 cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. Proceedings of the  
654 National Academy of Sciences. 2005; 102: 1755–60.
- 655 [41] Mori LS. Atividade antinociceptiva do extrato etanólico e do derivado semi-sintético da  
656 xilopina, n-acetil xilopina, obtidos de *Magnolia ovata*. Dissertation (Master in pharmacology).  
657 Federal University of Paraná, Curitiba. 2010.

## 7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo evidenciou que a espécie pode ser considerada uma nova fonte para a identificação de compostos bioativos, uma vez que a *A. martii* demonstrou-se eficaz em inibir os processos álgicos e inflamatórios nos modelos avaliados. O extrato etanólico de *A. martii* revelou ser rico em metabólitos secundários, muitos dos quais já tiveram comprovadas as suas ações farmacológicas.

O extrato etanólico do caule de *A. martii* apresentou atividade antinociceptiva, possivelmente por mecanismos centrais e periféricos, como observado no teste formalina. Além disso, os resultados obtidos mostraram que a atividade antinociceptiva parece envolver os sistemas opióide, colinérgico e GABAérgico, pois foi observado que o efeito antinociceptivo causado pelo extrato da planta foi revertido quando os antagonistas dos receptores (naloxona, atropina, bicuculina) foram administrados.

Os resultados demonstraram ainda que extrato etanólico do caule de *A. martii* possui atividade anti-inflamatória, a qual foi caracterizado pela redução da migração de leucócitos, especialmente neutrófilos, pela redução da permeabilidade vascular e da formação de edema.

Devido a sua rica atividade biológica, novos estudos devem ser realizados para o isolamento e elucidação dos compostos puros responsáveis pelos seus efeitos, além de testes que avaliem a toxicidade e possíveis efeitos adversos. Os resultados deste estudo são relevantes pois não há relatos anteriores da atividade biológica desta espécie, nem de sua utilização na medicina popular.

# ANEXOS

## **Anexo A – REVELADORES PARA CCD**

### **Ferrocianeto de potássio 1% (m/v) (WAGNER; BLADT, 2001)**

A solução foi preparada pela dissolução de 0,10 g de ferrocianeto de potássio em 10 mL de água destilada e foi armazenada a -4°C.

### **Cloreto de Ferro III 2% (m/v) (WAGNER; BLADT, 2001)**

O reagente foi preparado pela adição de 0,20 g de cloreto de ferro a 10 mL de água destilada e guardou-se a -4°C.

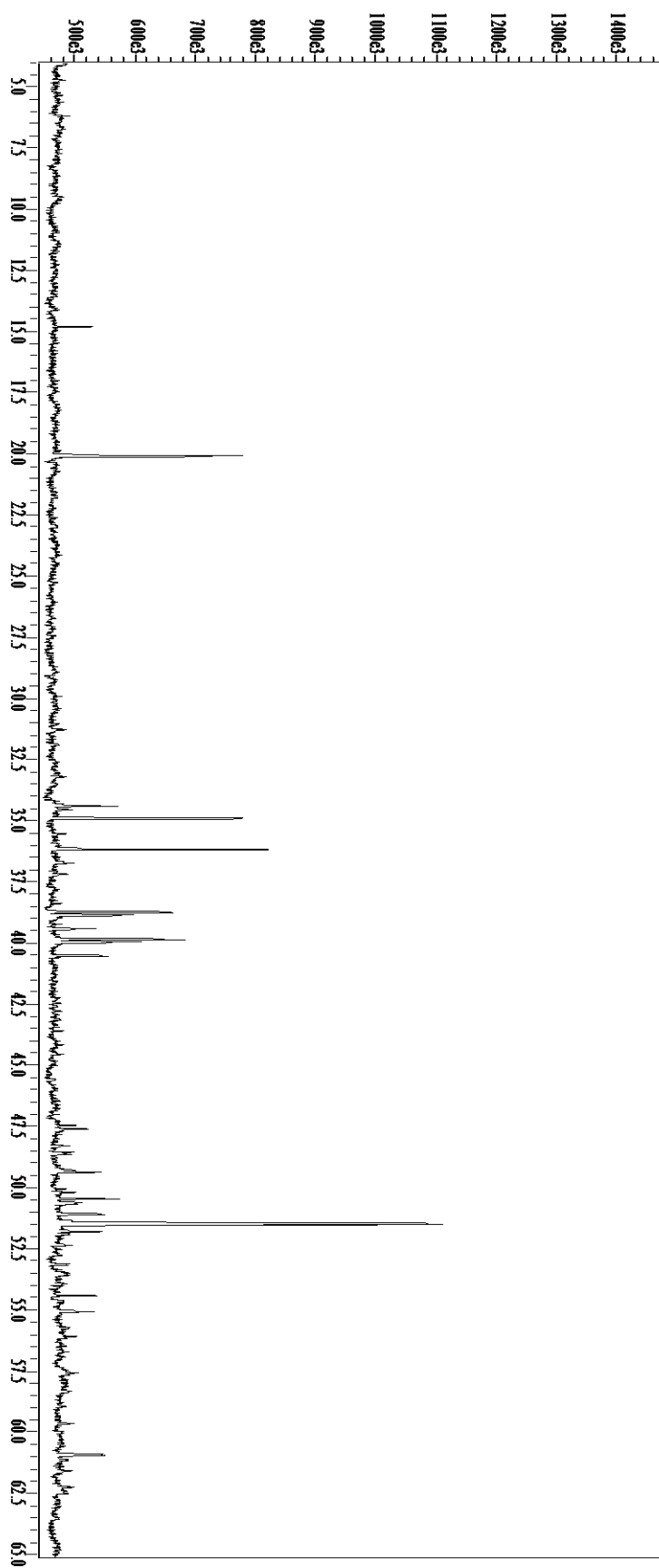
### **Reagente de Liebermann-Burchard (WAGNER; BLADT, 2001)**

O reagente foi preparado pela adição cuidadosa de 1 mL de anidrido acético e 1 mL de ácido sulfúrico a 10 mL de etanol, enquanto se arrefece em gelo. O reagente foi preparado na altura do ensaio, devido à sua instabilidade.

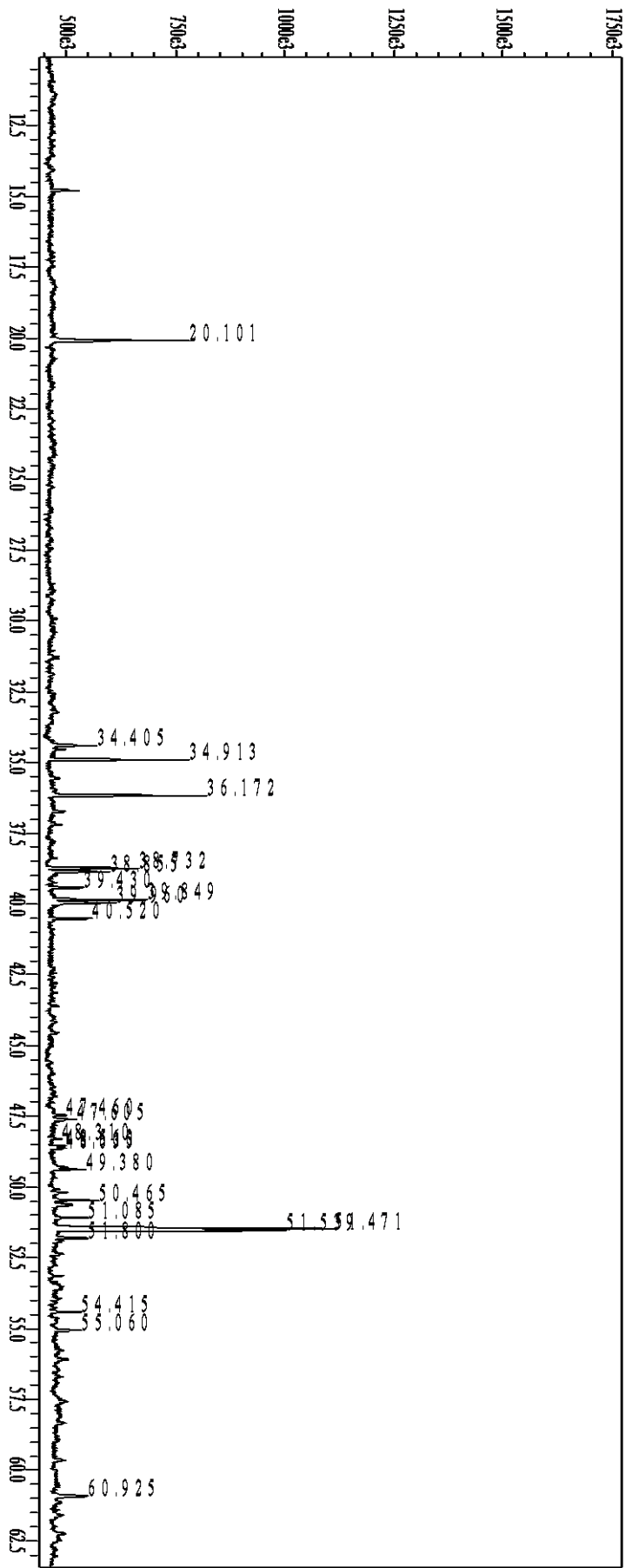
### **Reagente de Wagner (HASHIMOTO Y, 1988, v. 32, p. 1-77)**

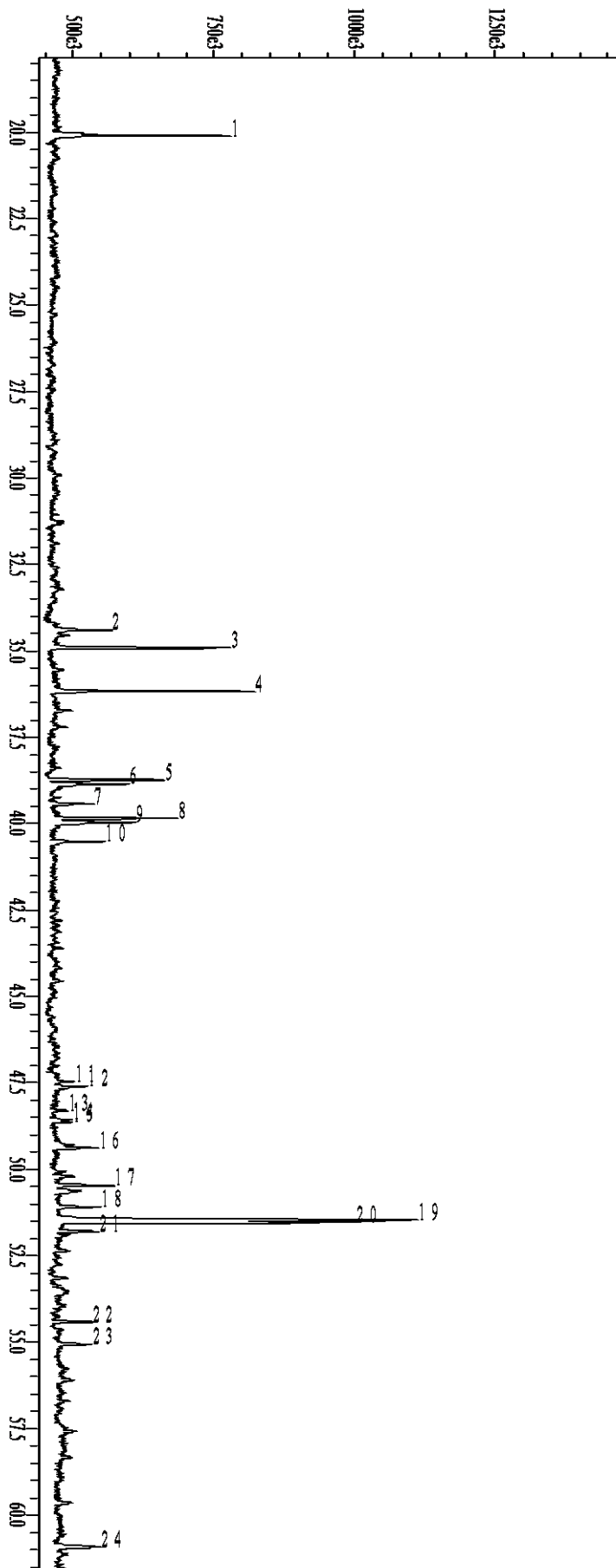
O reagente foi preparado pela dissolução de 0,2 g de iodo e 2 g de iodeto de potássio em 10 mL de água destilada e pela adição de 0,4 mL de ácido acético glacial. O volume foi completo até 20 mL com água destilada.

## Anexo B – CROMATOGRAMAS









## Anexo C – TERMO DE APROVAÇÃO DE COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL



Comitê de Ética em Experimentação Animal

Ofício CEEA-173/2009

Uberaba, 21 de dezembro de 2009


### CERTIFICADO

Certificamos que o protocolo nº 0107/2009 relativo ao projeto intitulado "**Avaliação da atividade biológica de compostos isolados de plantas medicinais do semi-árido da Bahia**" que tem como responsável **Profª Regiane Yatsuda**, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA/UNIUBE) regido pela lei nº 11.704/09.

### CERTIFICATE

We hereby certify that the protocol nº 0107/2009 related to the project entitled "**Evaluation of biological activity of compounds isolated from medicinal plants of the semi-arid of Bahia**", under the supervision of **Profª Regiane Yatsuda**, is in agreement with the Ethical Principles in Animal Experimentation, adopted by the Ethics Committee in Animal Experimentation (CEEA/UNIUBE) according to the law nº 11.704/09.

Atenciosamente,

  
*Prof.ª Joely S. Figueiredo Bittar*  
Vice-Coordenadora do CEEA-UNIUBE