



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

**CASSYA MAVIONY FIUZA ANDRADE**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E  
ANTINOCICEPTIVA DO EXTRATO ETANÓLICO E  
FRAÇÕES DA CASCA DA *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir.  
(JUREMA PRETA), COLETADA NO SEMIÁRIDO DA BAHIA**

**CASSYA MAVIONY FIUZA ANDRADE**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E  
ANTINOCICEPTIVA DO EXTRATO ETANÓLICO E  
FRAÇÕES DA CASCA DA *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir.  
(JUREMA PRETA), COLETADA NO SEMIÁRIDO DA BAHIA.**

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

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Regiane Yatsuda  
Universidade Federal da Bahia-UFBA

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

Vitória da Conquista - BA  
2015

**CASSYA MAVIONY FIUZA ANDRADE**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E  
ANTINOCICEPTIVA DO EXTRATO ETANÓLICO E  
FRAÇÕES DA CASCA DA *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir.  
(JUREMA PRETA), COLETADA NO SEMIÁRIDO DA BAHIA.**

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, 29/06/2015.

**Banca examinadora**

---

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Regiane Yatsuda - Orientadora**

Doutora em Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica pela  
Universidade Estadual de Campinas  
Docente da Universidade Federal da Bahia

---

**Profa. Dra. Mariluze Peixoto Cruz – Co-orientadora**

Doutora em Química pela Universidade Federal da Bahia  
Docente da Universidade Federal da Bahia

---

**Prof. Dr. Ricardo Evangelista Fraga**

Doutor em Imunologia pela Universidade Federal da Bahia  
Docente da Universidade Federal da Bahia

---

**Prof. Dr. Dirceu Joaquim Costa**

Doutor em Imunologia pela Universidade Federal da Bahia  
Docente da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

Dedico este trabalho aos meus amados pais, **Amélia Maria Fiuza Andrade** e **Alberto Renan Sousa Andrade**, e amada irmã, **Suzi Keila Fiuza Andrade**, por todo esforço, apoio, compreensão e carinho.

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar quero agradecer ao **Senhor Deus**, essência da minha vida. Seu amor e graça têm me acompanhado, fortalecido e inspirado.

Agradeço a **minha família**, em especial aos meus pais **Renan e Amélia**, e a minha irmã **Suzi**, por toda dedicação, apoio e acalento. Em vocês tenho a certeza do amor incondicional

A minha professora orientadora, **Regiane Yatsuda**, por ter aberto para mim as portas do universo da pesquisa, pelo conhecimento que me ajudou a construir, por ter me dedicado tempo, paciência e especialmente por ter me concedido sua amizade ao longo destes anos.

A minha professora co-orientadora, **Mariluze Peixoto Cruz**, que solicitamente me auxiliou sempre que precisei.

À professora **Daniela Rocha**, por ter me recebido tão abertamente no projeto leite, contribuindo para meu desenvolvimento e também para minha caminhada rumo à pós-graduação, assim como, por todo carinho ao longo desse período.

Aos **Professores** que participaram do meu processo de formação na UFBA, pelo apoio, por todo conhecimento compartilhado e por serem grandes exemplos como construtores do conhecimento.

Aos meus amigos e companheiros do grupo de inflamação **Kelle, Érika, Maiana, Rafael, Andressa, Aparecido, Ivo, João Paulo, Alinne, Carline, Patrícia, Verônica, Talita, Natália, Daniela, Maurício, Carolina, Alana e Lorena**, pelo trabalho desenvolvido, por todo apoio, dedicação, compreensão, carinho, pelas inúmeras risadas compartilhadas e tantas outras coisas boas. Trabalhar ao lado de pessoas como vocês foi um grande presente.

Aos **amigos e colegas do grupo de pesquisa em plantas medicinais e do projeto leite**, que preencheram essa caminhada com ótimos momentos.

Aos meus amigos do “Biosciences” **Geysa, Ricardo, Denis, Rafael, Andressa**, e ao nosso agregado do grupo de Ciências Fisiológicas, **Denisar**. Compartilhar esses dois últimos anos com vocês foi maravilhoso. Muitos momentos bons, muito apoio mútuo. Certamente esses dois anos foram mais recheados de alegrias por terem sido trilhados ao lado de vocês.

Agradeço às instituições financiadoras, **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), e à instituição que me concedeu a bolsa de estudo, **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB)**.

Por fim, agradeço a todos que me apoiaram, que me auxiliaram, ou que contribuíram de alguma forma para que eu alcançasse esse momento.

ANDRADE, Cassya Maviony Fiuza Andrade. Avaliação da atividade anti-inflamatória e antinociceptiva do extrato etanólico e frações da casca da *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. (Jurema preta), coletada no semiárido da Bahia. 81 f. il. 2015. Dissertação (Mestrado) – Instituto Multidisciplinar de Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2015.

## RESUMO

*Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. é uma espécie nativa da caatinga, região de semiárido do Nordeste Brasileiro, popularmente conhecida como jurema preta. Sua casca é utilizada na medicina popular para o tratamento da tosse e para promover a cicatrização de feridas. Deste modo, mediante a relação do processo de cicatrização com a resposta inflamatória, e desta com a dor, o objetivo deste estudo foi analisar *in vivo*, as atividades anti-inflamatória e antinociceptiva da casca da *M. tenuiflora* coletada na região de semiárido do estado da Bahia, visando identificar a bioatividade das frações de hexano (HEX), diclorometano (DIC), acetato de etila (AE) e butanol (BUT), e iniciar a compreensão dos mecanismos de ação envolvidos na atividade farmacológica do extrato bruto (etanólico). Para avaliação das atividades anti-inflamatória e antinociceptiva das frações, foram empregados os ensaios: nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina em camundongos; recrutamento de leucócitos para a cavidade peritoneal; avaliação da permeabilidade vascular – azul de Evans; e avaliação da hipernocicepção mecânica – von Frey. Para compreensão dos mecanismos de ação envolvidos na atividade farmacológica do extrato bruto foi empregado o ensaio: avaliação dos mecanismos de ação no modelo das contorções abdominais induzidas por ácido acético, para o qual, foram utilizados os antagonistas de receptores, naloxona, glibenclamida, atropina, metisergida e ondansetrona. Por fim, foi realizada a análise fitoquímica do extrato etanólico por cromatografia em camada delgada (CCD). A análise estatística foi realizada por meio do teste One-way ANOVA, seguida pelo pós-teste de Bonferroni ou de Dunnett, com  $p < 0,05$ . Os resultados obtidos indicaram: ação das frações HEX e BUT sobre a primeira fase do teste da formalina (100 mg/Kg) ( $p < 0,05$ ); HEX, DIC, AE e BUT sobre a segunda fase do teste da formalina (100 mg/Kg) ( $p < 0,05$ ); AE sobre a migração de leucócitos (50 mg/Kg) ( $p < 0,05$ ); DIC sobre a permeabilidade vascular do corante azul de Evans (100 mg/Kg) ( $p < 0,05$ ); e por fim, das frações HEX, AE e BUT sobre a hipernocicepção mecânica – von Frey (100 mg/Kg) ( $p < 0,05$ ). Quanto ao mecanismo de ação do extrato bruto, os resultados obtidos indicaram que a ondansetrona foi capaz de reverter a atividade analgésica do extrato (200 mg/Kg) ( $p < 0,05$ ), evidenciando sua ação sobre o receptor 5-HT<sub>3</sub>. Na análise fitoquímica foi verificada a presença de polifenóis, flavonoides, saponinas e alcaloides. Em conjunto, esses resultados mostraram o potencial antinociceptivo e anti-inflamatório das frações químicas da casca da *M. tenuiflora* coletada na região de semiárido do estado da Bahia, e que a ação analgésica do extrato bruto é mediada, pelo menos em parte, pelo subtipo 5-HT<sub>3</sub> dos receptores de serotonina.

**Palavras chave:** *Mimosa tenuiflora*, jurema preta, atividade antinociceptiva, atividade anti-inflamatória.

ANDRADE, Cassya Maviony Fiuza Andrade. Evaluation of anti-inflammatory and antinociceptive activity of ethanolic extract and fraction of *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. bark, collected in the semiarid of Bahia. 81 f. il. 2015. Master Dissertation – Multidisciplinary Health Institute, Federal University of Bahia, Vitória da Conquista, 2015.

## ABSTRACT

*Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. is a native species of caatinga, semiarid region of Northeastern Brazil, popularly known as jurema preta. Their bark is used in folk medicine for the treatment of cough and to promote wound healing. Thus, front of the existence of strict relationship between healing process and inflammatory response, and between this use and pain, the aim of this study was to analyze *in vivo* anti-inflammatory and antinociceptive activities of *M. tenuiflora* bark collected in the semiarid region of Bahia state, searching to identify the bioactivity of hexane (HEX), dichloromethane (DIC), ethyl acetate (AE) and butanol (BUT) fractions, and to start understanding the mechanisms involved in the pharmacological activity of crude ethanolic extract. For evaluation of anti-inflammatory and antinociceptive activities, the following assays were done with the fractions: nociception induced by intraplantar formalin injection in mice; leukocyte recruitment to the peritoneal cavity; evaluation of vascular permeability - Evans blue; and evaluation of mechanical hypernociception - von Frey. For understanding the mechanisms involved in pharmacological activity of crude extract, it was performed the evaluation of mechanisms of action in the model of writhing induced by acetic acid. using the receptors antagonists: naloxone, glibenclamide, atropine, ondansetron and methysergide. Finally, it was performed the phytochemical analysis of ethanolic extract by thin layer chromatography (TLC). Statistical analysis was performed by one-way ANOVA, followed by Bonferroni or Dunnett post-test, with  $p < 0.05$  The results indicate: action of HEX and BUT fractions on the first phase of formalin test (100 mg/Kg) ( $p < 0.05$ ); HEX, DIC, AE and BUT on the second phase of formalin test (100 mg/kg) ( $p < 0.05$ ); AE on leukocyte migration (50 mg/kg) ( $p < 0.05$ ); DIC on vascular permeability of Evans blue dye (100 mg/kg) ( $p < 0.05$ ); and finally, HEX, AE and BUT fractions on mechanical hypernociception - von Frey (100 mg/Kg) ( $p < 0.05$ ). About the mechanisms of action of the crude extract, the results indicate that ondansetron was able to reverse the analgesic extract activity (200 mg/kg) ( $p < 0.05$ ), showing its action on the 5-HT<sub>3</sub> receptor. In phytochemical analysis, it was verified the presence of polyphenols, flavonoids, saponins and alkaloids. Thus, these results showed the potential antinociceptive and anti-inflammatory activity of chemical fractions of *M. tenuiflora* bark, collected in the semiarid region of Bahia, and that the analgesic action of the crude extract is mediated, at least partially, by subtype 5-HT<sub>3</sub> serotonin receptor.

**Keywords:** *Mimosa tenuiflora*, jurema preta, antinociceptive activity, anti-inflammatory activity.

## LISTA DE SIGLAS

5-HT	Serotonina
5-LO	5-lipoxigenase
ACE	Enzima conversora de angiotensina
AE	Acetato de etila
AINEs	Anti-inflamatórios não esteroidais
ANOVA	Análise de variância
BK	Bradicinina
BUT	Butanol
Ca <sup>2+</sup>	Cálcio
CCD	Cromatografia em camada delgada
CEEA	Comitê de Ética de Experimentação Animal
Cg	Carragenina
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
COXs	Ciclooxigenases
CXCL1	Quimiocina ligante do motivo CXC 1
CXCL2	Quimiocina ligante do motivo CXC 2
CXCL5	Quimiocina ligante do motivo CXC 5
CXCL8	Quimiocina ligante do motivo CXC 8
DAMPs	Padrões moleculares associados ao dano
DBK	Des-Arg <sup>9</sup> -BK
DIC	Diclorometano
DMT	N, N-dimetiltriptamina
DRG	Gânglio da raiz dorsal
E.P.M	Erro padrão da média
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EROs	Espécies reativas de oxigênio
ESAM	Molécula de adesão seletiva de célula endotelial
Gi/G0	Proteína G inibitória
HEX	Hexano
i.p.	Intraperitoneal
i.pl.	Intraplantar
IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
ICAM-2	Molécula de adesão intercelular 2
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular 1
IL-1	Interleucina 1
IL1- β	Interleucina 1β
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IL-12	Interleucina 12
JAMs	Moléculas de adesão juncional
K <sup>+</sup>	Potássio
K <sub>ATP</sub>	Canais de K <sup>+</sup> sensíveis ao ATP
LDBK	Lys-des-Arg <sup>9</sup> -BK
LFA-1	Antígeno-1 Associado à Função Linfocitária
LTA <sub>4</sub> H	Leucotrieno A <sub>4</sub> hidrolase



LTB <sub>4</sub>	Leucotrieno B <sub>4</sub>
Lys-BK	Calidina
MAC-1	Antígeno do macrófago-1
Na <sup>+</sup>	Sódio
NGF	Fator de crescimento do nervo
NO	Oxido nítrico
PAG	Substância cinzenta periaquedutal
PAMPs	Padrões moleculares associados ao patógeno
PBS	Tampão fosfato-salino
PECAM-1	Molécula 1 de adesão celular endotelial à plaqueta
PG	Prostaglandinas
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E2
PGI <sub>2</sub>	Prostaciclina
PLA2	Fosfolipases A2
PRRs	Receptores de reconhecimento padrão
PSGL-1	Ligante 1 da glicoproteína P-selectina
RVM	Medula ventromedial rostral
s.c.	Subcutânea
SCC	Sistema caliceína-cinina
SNC	Sistema nervoso central
SP	Substância P
SUR.x	Receptores de sulfonilureia
TG	Gânglio trigeminal
TLRs	Receptores <i>Toll-Like</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TRPA-1	Proteína anquirina do tipo 1
TTX	Tetrodotoxina
UFBA	Universidade Federal da Bahia
UNIUBE	Universidade de Uberaba
VCAM-1	Molécula de adesão celular vascular-1
VE-caderina	Caderina endotelial vascular
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
δ	Receptor opioide delta
κ	Receptor opioide kapa
μ	Receptor opioide mi

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1A</b>	Reação positiva para a presença de polifenóis, saponinas e alcaloides.....	48
<b>Figura 1B</b>	Reação positiva para a presença de flavonoides. Reação negativa para a presença de ácidos fenólicos e esteroides.....	48
<b>Figura 2A</b>	Efeitos das frações de hexano (HEX), diclorometano (DIC), acetato de etila (AE) e butanol (BUT) obtidas da casca da <i>M. tenuiflora</i> na resposta à nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina 1,5 % em camundongos.....	49
<b>Figura 2B</b>	Efeitos das frações de hexano (HEX), diclorometano (DIC), acetato de etila (AE) e butanol (BUT) obtidas da casca da <i>M. tenuiflora</i> no edema de pata induzido por formalina 1,5%.....	50
<b>Figura 3A</b>	Efeitos das frações de hexano (HEX), diclorometano (DIC), acetato de etila (AE) e butanol (BUT) obtidas da casca da <i>M. tenuiflora</i> sobre a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida por carragenina (Cg).....	51
<b>Figura 3B</b>	Efeitos da fração de acetato de etila (AE) obtida da casca da <i>M. tenuiflora</i> sobre a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida por carragenina (Cg).....	51
<b>Figura 4</b>	Efeitos das frações de hexano (HEX), diclorometano (DIC), acetato de etila (AE) e butanol (BUT) obtidas da casca da <i>M. tenuiflora</i> na permeabilidade vascular, teste de azul de Evans.....	52
<b>Figura 5</b>	Efeitos das frações de hexano (HEX), diclorometano (DIC), acetato de etila (AE) e butanol (BUT) obtidas da casca da <i>M. tenuiflora</i> na inibição da nocicepção mecânica pelo teste de Von Frey.....	53
<b>Figura 6</b>	Efeito da naloxona sobre a atividade antinociceptiva do extrato etanólico da casca da <i>M. tenuiflora</i> .....	54
<b>Figura 7</b>	Efeito da glibenclamida sobre a atividade antinociceptiva do extrato etanólico da casca da <i>M. tenuiflora</i> .....	55
<b>Figura 8</b>	Efeito da atropina sobre a atividade antinociceptiva do extrato etanólico da casca da <i>M. tenuiflora</i> .....	56
<b>Figura 9</b>	Efeito da metisergida sobre a atividade antinociceptiva do extrato etanólico da casca da <i>M. tenuiflora</i> .....	57
<b>Figura 10</b>	Efeito da ondansetrona sobre a atividade antinociceptiva do extrato etanólico da casca da <i>M. tenuiflora</i> .....	58

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Rendimentos do extrato etanólico da casca da <i>M. tenuiflora</i> e de suas respectivas frações.....	47
-----------------	--	----

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO</b> .....	15
2.1 POTENCIAL VEGETAL PARA O DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS ANALGÉSICOS E ANTI-INFLAMATÓRIOS.....	15
2.2 INFLAMAÇÃO.....	17
2.2.1 Mecanismos envolvidos no recrutamento dos neutrófilos.....	19
2.2.2 Mediadores da resposta inflamatória.....	20
2.2.3 Drogas anti-inflamatórias de uso clínico e novas possibilidades terapêuticas.....	23
2.3 NOCICEPÇÃO E DOR.....	24
2.3.1 O sistema nociceptivo.....	25
2.3.2 Mecanismos de transdução na nocicepção.....	27
2.3.3 Mediadores inflamatórios na nocicepção.....	30
2.3.4 Envolvimento do sistema serotoninérgico na modulação nociceptiva.....	31
2.3.5 Envolvimento do sistema opioide e colinérgico na modulação nociceptiva.....	34
2.4 O ESTUDO DO POTENCIAL FARMACOLÓGICO DA ESPÉCIE <i>Mimosa tenuiflora</i> (Willd.) Poir.....	36
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	39
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	40
4.1 OBJETIVO GERAL.....	40
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	40
<b>5 METODOLOGIA</b> .....	41
5.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE VEGETAL.....	41
5.2 PREPARO DO EXTRATO E FRACIONAMENTO.....	41
5.3 ANÁLISE FITOQUÍMICA DO EXTRATO ETANÓLICO POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD).....	42
5.4 MODELOS EXPERIMENTAIS PARA A AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA.....	43
5.4.1 Animais.....	43
5.4.2 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina em camundongos.....	43
5.4.3 Recrutamento de leucócitos para a cavidade peritoneal.....	44
5.4.4 Avaliação da permeabilidade vascular – azul de Evans.....	44

5.4.5 Avaliação da nocicepção mecânica – Von Frey.....	45
5.4.6 Avaliação dos mecanismos de ação no modelo das contorções abdominais induzidas por ácido acético.....	46
5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	46
<b>6- RESULTADOS.....</b>	<b>47</b>
6.1 RENDIMENTOS DO EXTRATO ETANÓLICO E DAS FRAÇÕES DA CASCA DA <i>Mimosa tenuiflora</i> .....	47
6.2 ANÁLISE FITOQUÍMICA DO EXTRATO ETANÓLICO POR CCD.....	47
6.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA.....	49
<b>7 DISCUSSÃO.....</b>	<b>59</b>
<b>8 CONCLUSÃO.....</b>	<b>67</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>68</b>
<b>ANEXO A - Reveladores para cromatografia em CCD.....</b>	<b>80</b>
<b>ANEXO B – Aprovação do Comitê de Ética de Experimentação Animal da Universidade de Uberaba (CEE/UNIUBE).....</b>	<b>81</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A inflamação é uma estratégia de defesa do organismo contra agentes invasores e contra moléculas prejudiciais, que é ativada imediatamente após a exposição ao estímulo, promovendo a liberação de mediadores que ativam a resposta imune inata. Esses mediadores agem de forma conjunta para aumentar o fluxo sanguíneo e a permeabilidade vascular, facilitando o recrutamento de células efetoras para o sítio da injúria. Após a remoção do estímulo e resolução do dano gerado, a inflamação cessa, mas se o estímulo persistir por longo tempo sem reparo, a inflamação se torna crônica, gerando danos aos tecidos e sistemas. Tal inflamação persistente é associada com muitas condições e doenças humanas como artrite, câncer, doenças autoimunes, entre outras (WEISS, 2008; FERNANDES, 2015).

A dor por sua vez é uma importante fonte de sofrimento e geralmente envolve pacientes com condições inflamatórias. Circuitos neuronais altamente organizados existentes no cérebro e na medula espinhal regulam a dor e são ao mesmo tempo influenciados por vários estados patológicos, incluindo a própria inflamação. Tem sido demonstrado que a dor não controlada compromete uma série de funções no organismo e muitas vezes, a dor crônica pode causar mais sofrimento e incapacidade que a lesão ou doença que a causou. Dessa forma, alta prioridade deve ser atribuída ao tratamento da dor (LYNCH e WATSON, 2006; GOEIJ, et al., 2013).

Entre as drogas conhecidas, as mais importantes e utilizadas para o tratamento da inflamação e da dor são os opioides e os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs). Os opioides, drogas consideradas centrais na terapia da dor de intensidade moderada a severa, apresentam vários efeitos secundários relacionados ao seu uso, além de ainda poderem de forma paradoxal, tornar os pacientes mais sensíveis à dor e potencialmente agravar o quadro clínico preexistente. Já os AINEs que estão entre os medicamentos mais utilizados no mundo devido a sua eficácia na redução da dor e inflamação também estão associados ao significativo risco de sérios eventos adversos com o uso crônico (ANGST e CLARK, 2006; ONG, et al., 2007).

Diante desta perspectiva, fica clara a necessidade do desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para o tratamento da inflamação e da dor. As espécies vegetais são fontes potenciais para a busca e possível obtenção destes novos agentes, uma vez que para promover sua sobrevivência ecológica, as plantas produzem metabólitos secundários que tem evoluído

para interagir com alvos moleculares afetando células, tecidos e funções fisiológicas em animais, plantas e microrganismos competidores, podendo exercer suas ações por se assemelharem a metabólitos endógenos, ligantes, hormônios, moléculas de transdução de sinais ou neurotransmissores, sendo assim, passíveis de desempenhar efeitos medicinais benéficos em humanos devido a similaridades em seus potenciais sítios alvo (BRISKIN, 2000).

Nesse sentido, o Brasil apresenta potencial marcante para o desenvolvimento de pesquisas visando à identificação de novos agentes analgésicos e anti-inflamatórios derivados de plantas uma vez que abriga cerca de um terço da flora mundial, além de possuir uma riqueza de conhecimentos tradicionais acumulados pelas populações locais que têm acesso direto à natureza e aos produtos da biodiversidade, sendo que a informação oriunda dos grupos étnicos brasileiros sobre medicina tradicional tem contribuído para a descoberta de atividades farmacológicas de vários agentes derivados de plantas, e dentre os biomas brasileiros a caatinga (vegetação semiárida) apresenta biodiversidade significativa, mas pouco estudada e intimamente associada com uma herança cultural diversificada (ALBUQUERQUE et al., 2007; SILVA et al., 2011).

Dentre as espécies pertencentes à caatinga e associadas à herança cultural local, destaca-se a *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir., conhecida popularmente como Jurema Preta. Em estudo etnobotânico conduzido por Albuquerque e Andrade (2002), a casca de *M. tenuiflora*, entre outros usos, é utilizada para o tratamento da inflamação em Pernambuco. Em outro estudo etnofarmacológico realizado pelo grupo de pesquisa em plantas medicinais da Universidade Federal da Bahia (UFBA), na comunidade de Palmeiras em Contendas do Sincorá – BA, a casca de *M. tenuiflora* é utilizada para o tratamento da tosse e para a cicatrização (DUARTE et al., 2008). Deste modo, o objetivo deste estudo foi avaliar *in vivo* o potencial anti-inflamatório e antinociceptivo da casca da *M. tenuiflora* (Willd.) Poir, coletada na região de semiárido do estado da Bahia.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 POTENCIAL VEGETAL PARA O DESENVOLVIMENTO DE NOVOS FÁRMACOS ANALGÉSICOS E ANTI-INFLAMATÓRIOS**

A busca pela cura com plantas medicinais é tão antiga quanto à própria humanidade. Desde os tempos antigos, em busca por socorro para suas doenças, o povo procurava por drogas na natureza, embora essa procura fosse baseada apenas na experiência e não na relação entre os componentes fisiológicos e químicos das doenças e das moléculas. Com o tempo, as razões para o uso de plantas específicas sobre determinadas doenças foi gradualmente sendo esclarecido e atualmente os produtos naturais continuam sendo as mais importantes fontes de agentes terapêuticos inovadores para o tratamento de diversas doenças (CLARDY e WALSH, 2004, PETROVSKA, 2012).

Essa possibilidade de inovação em termos de substâncias terapêuticas, no caso das plantas, advém do fato destas produzirem milhares de metabólitos secundários com enorme diversidade química, conhecidos por desempenharem um papel importante na adaptação das espécies vegetais ao seu ambiente, representando uma importante fonte de produtos farmacêuticos de forma que, muitos dos medicamentos comercializados hoje são modificações sintéticas ou cópias de substâncias naturalmente obtidas (HUSSAIN, et al., 2012).

Plantas, especialmente aquelas de usos etnofarmacológicos, têm sido as principais fontes para a descoberta de medicamentos. Para obtermos uma dimensão da importância da seleção de plantas baseada em seus usos tradicionais, de 122 compostos avaliados, derivados de espécies vegetais, com estrutura definida e utilizados globalmente como drogas, 80% apresentaram usos etnofarmacológicos idênticos ou relacionados aos seus atuais empregos terapêuticos (FABRICANT e FARNSWORTH, 2001; VEERESHAM, 2012).

Esse potencial das espécies vegetais para a obtenção de moléculas com ação farmacológica, especialmente aquelas utilizadas na medicina tradicional, evidenciam a relevância da pesquisa com plantas medicinais na busca por novas possibilidades terapêuticas sendo que entre os problemas de saúde para os quais existe a necessidade de novas terapias, estão às doenças associadas à inflamação e a dor, uma vez que, os principais medicamentos empregados em seu manejo exibem limitações, especialmente relacionadas aos efeitos



colaterais durante o uso crônico. A exploração de novos analgésicos e anti-inflamatórios para restringir esses efeitos colaterais ainda é um projeto difícil, mas a pesquisa por drogas derivadas de plantas fornece uma série de possibilidades para encontrar novas alternativas terapêuticas (TASLEEM, et al., 2014).

A dor é o maior sintoma em muitas doenças e pode interferir significativamente na qualidade de vida, o que faz com que analgésicos potenciais estejam certamente entre as características mais bem valorizadas entre moléculas farmacologicamente úteis, sendo importante destacar que os principais e mais potentes agentes analgésicos/antinociceptivos atualmente empregados na prática clínica são alcaloides naturais encontrados em plantas (ex. morfina e codeína) ou derivados desses alcaloides (ex. oxicodona), atestando o potencial das espécies vegetais na obtenção de valiosas moléculas para o tratamento da dor (RADULOVIC, et al., 2013).

Da mesma forma, distúrbios inflamatórios desencadeiam graves problemas de saúde, e tem sido amplamente demonstrado que muitos compostos derivados de plantas apresentam efeitos anti-inflamatórios significativos e por essa razão, representam moléculas potenciais para o desenvolvimento de novos fármacos especialmente concebidos para o tratamento e/ou controle de estados inflamatórios crônicos (CALIXTO, et al., 2004).

Moléculas derivadas de plantas com atividade anti-inflamatória, recentemente exploradas, pertencem a várias classes químicas como alcaloides, glicosídeos, terpenoides, esteroides, saponinas, ácidos graxos e compostos polifenólicos, valendo ressaltar que assim como os analgésicos, um dos principais anti-inflamatórios em uso clínico atualmente é a aspirina, fármaco sintético que teve como precursor o glicosídeo fenólico salicilina obtida da *Salix alba* (CHOI, et al., 2005; BEG, et al., 2011).

Além da possibilidade de obtenção de moléculas naturais, ou do uso dessas moléculas como modelos para a síntese de medicamentos que sejam eficazes no tratamento da inflamação e da dor, existe ainda a possibilidade de desenvolvimento de fitoterápicos que são medicamentos obtidos empregando-se exclusivamente matérias primas vegetais, na forma de extratos padronizados (química e farmacologicamente quantificados) caracterizados pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade (BRASIL, 2008; YUNES, PEDROSA, CECHINEL FILHO, 2001).

Dentre algumas vantagens dos fitoterápicos que atualmente justificam seu uso estão: efeitos sinérgicos nos compostos do extrato, através do mesmo mecanismo de ação ou por mecanismos diferentes potencializando a atividade farmacológica pretendida; associação de mecanismos por compostos agindo em alvos moleculares diferentes, propiciando assim um perfil terapêutico mais amplo; menores custos de pesquisa, visto que o desenvolvimento de uma nova droga sintética envolve investimentos altíssimos, enquanto o desenvolvimento de um novo fitoterápico geralmente apresenta, comparativamente, custos muito menores; e por fim, possivelmente menores riscos de efeitos colaterais, considerando que os compostos ativos estão em concentrações reduzidas nos extratos, embora esse último tópico mereça ressalva (YUNES, PEDROSA, CECHINEL FILHO, 2001).

A ideia geral de que o uso de fitoterápicos é livre de efeitos colaterais é incorreta. As espécies vegetais possuem uma vastíssima variedade de componentes com diferentes características químicas, e alguns destes compostos são muito tóxicos. No entanto, os efeitos adversos da maioria dos fitoterápicos são relativamente menos frequentes em comparação com as drogas sintéticas, quando são usados corretamente (CALIXTO, 2000; EKOR, 2013).

Diante do exposto fica evidente a ampla possibilidade de pesquisa e desenvolvimento de novas terapias farmacológicas com o uso de plantas medicinais, e nesse campo o Brasil possui potencial elevado, visto que abriga aproximadamente um terço da flora mundial, com destaque para caatinga, bioma exclusivamente brasileiro considerado mais diverso que qualquer outro bioma do mundo e localizado, em maior parte, na região do Semiárido do Nordeste. Apesar disso, nosso país não tem uma atuação marcante no mercado mundial de fitoterápicos e drogas baseadas em moléculas vegetais, ficando atrás, inclusive, de países menos desenvolvidos tecnologicamente, o que necessita ser modificado (YUNES, PEDROSA, CECHINEL FILHO, 2001; BRASIL, 2002).

## **2.2 INFLAMAÇÃO**

A inflamação é uma resposta imediata do organismo a danos teciduais e celulares provocados por patógenos ou por estímulos nocivos físicos ou químicos, e pode ser aguda ou crônica. Quando aguda é uma resposta de curto período, na qual leucócitos alcançam o local da lesão, removem o estímulo e reparam o tecido. A inflamação crônica, por outro lado, é

uma resposta prolongada, desregulada e mal-adaptativa que envolve inflamação ativa e destruição tecidual coexistindo com tentativas de reparo (WEISS, 2008).

Ao nível tecidual a inflamação é caracterizada pela vermelhidão, calor, dor e edema resultantes das respostas locais das células imunes, vasculares e do parênquima à infecção ou a injúria. Já ao nível celular, a resposta é caracterizada por mudanças temporais na quantidade e nas características das células imunes. Mediante uma infecção, a fase inicial da resposta inflamatória é marcada pela rápida invasão de neutrófilos seguida por uma resposta secundária caracterizada pelo recrutamento de macrófagos derivados de monócitos, células imunes adaptativas, e células estromais (TABAS e GLASS, 2013).

De forma semelhante à inflamação induzida por microrganismos, à promovida por estímulos físicos ou químicos, que tem sido denominada como “inflamação estéril”, é também marcada pelo recrutamento de neutrófilos e de macrófagos assim como pela produção de citocinas pró-inflamatórias, especialmente fator de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ) e interleucina 1 (IL-1), e pela indução da resposta imune adaptativa mediada por células T (CHEN e NUÑEZ, 2010).

Embora a resposta inflamatória à lesão tecidual estéril possa neutralizar ou conter o processo prejudicial subjacente e promover a reparação dos tecidos, também pode causar o seu próprio conjunto de problemas. Os leucócitos que são recrutados, principalmente neutrófilos, liberam proteases e outros agentes nocivos que podem danificar o tecido viável circundante, podendo causar dano colateral substancial durante a resposta inflamatória. Dessa forma, o recrutamento elevado de neutrófilos em resposta a estímulos infamatórios estéreis contribui para a imunopatologia observada em muitas doenças (KONO e ROCK, 2008; MCDONALD, et al., 2010).

Esse potencial destrutivo exibido pelos neutrófilos requer o controle rigoroso sobre o seu recrutamento. A perturbação na homeostase do tecido provocada pela invasão de patógenos ou dano tecidual estéril gera alarmes moleculares reconhecidos por macrófagos residentes através da expressão, nesses leucócitos, de receptores de reconhecimento padrão (PRRs) levando a produção de citocinas pró-inflamatórias que iniciam o recrutamento dos neutrófilos para o tecido (SOEHNLEIN e LINDBOM, 2010; SADIK, KIM e LUSTER, 2011).

Os PRRs detectam porções estruturais conservadas encontradas em microrganismos, frequentemente chamadas de padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs), assim

como material de origem não infecciosa que pode causar danos aos tecidos e liberação de moléculas endógenas denominadas padrões moleculares associados ao dano (DAMPs), visto que são estímulos liberados após injúria tecidual ou morte celular que apresentam função similar aos PAMPs em termos de sua habilidade para ativação de vias pró-inflamatórias (CHEN e NUÑEZ, 2010).

Entre os PRRs, a classe melhor caracterizada é a dos receptores *Toll-Like* (TLRs), cuja ativação, em termos da resposta infamatória, levam os macrófagos teciduais a produzir citocinas pró-inflamatórias, incluindo TNF- $\alpha$ , interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e interleucina 6 (IL-6), que coordenam as respostas inflamatórias locais e sistêmicas. TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , por sua vez, ativam o endotélio local para induzir vasodilatação e aumento da permeabilidade dos vasos sanguíneos, permitindo que as proteínas do soro e os leucócitos alcancem o local da infecção ou lesão (MEDZHITOV, 2007).

### **2.2.1 Mecanismos envolvidos no recrutamento dos neutrófilos**

Mediante a vasodilatação, a velocidade do fluxo sanguíneo diminui e as células circulantes colidem mais frequentemente com as células endoteliais ativadas, que passam a expressar moléculas de superfície capazes de se ligar aos leucócitos circulantes, em resposta aos mediadores inflamatórios liberados pelos leucócitos teciduais residentes. Uma vez presente na superfície endotelial, a P-selectina e a E-selectina se ligam aos seus ligantes glicosilados, incluindo o ligante 1 da glicoproteína P-selectina (PSGL-1), levando a captura dos neutrófilos circulantes à superfície do endotélio e o seu subsequente rolamento no sentido do fluxo sanguíneo (CRUVINEL, et al., 2010; KOLACZKOWSKA e KUBES, 2013).

Quando se deslocam sobre o endotélio, os neutrófilos são ativados por quimiocinas, incluindo CXCL8 (IL-8) em humanos e CXCL1, CXCL2 e CXCL5 em camundongos, que estão ligadas ao endotélio por meio de moléculas de glicosaminoglicanos, o que permite a formação de gradientes quimiotáticos intravasculares. A ativação de receptores para quimiocina acoplados a proteína G nos neutrófilos induz então alterações na conformação das integrinas constitutivamente expressas na superfície da célula,  $\beta$ 2-integrinas LFA-1 ( $\alpha$ <sub>L</sub> $\beta$ <sub>2</sub>-integrina, CD11a/CD18) e MAC-1 ( $\alpha$ <sub>M</sub> $\beta$ <sub>2</sub>, CD11b/CD18), aumentando sua afinidade por moléculas de superfície endotelial tais como as moléculas de adesão intercelulares ICAM-1 e

ICAM-2, sendo a ligação da ICAM-1 a LFA-1 essencial para a firme adesão. (SIGAL, et al., 2000; SADIK, KIM e LUSTER, 2011; KOLACZKOWSKA e KUBES, 2013).

A transmigração através das paredes vasculares é o passo final do processo de migração de leucócitos para os tecidos inflamados e pode ocorrer com o mínimo de perturbação para a estrutura das paredes dos vasos. Antes de atravessar as paredes das vênulas pós-capilares, os neutrófilos rastejam dentro dos vasos sanguíneos de forma dependente da interação entre MAC-1 e ICAM-1 buscando os locais preferidos para transmigração. Assim, a adesão dependente de LFA-1 seguida do rastejamento dependente de MAC-1 contribuem para a eficiente emigração dos neutrófilos para o foco da lesão (PHILLIPSON, et al., 2006; LEY, et al., 2007)

A transmigração pode ocorrer via paracelular ou transcelular. A via paracelular é a preferencialmente seguida pelos neutrófilos e demanda a liberação de junções intercelulares como as formadas pela caderina endotelial vascular (VE-caderina). Essa etapa final do recrutamento de leucócitos requer ainda integrinas, ICAM-1, ICAM-2, molécula de adesão celular vascular-1 (VCAM-1), bem como diferentes proteínas juncionais incluindo molécula 1 de adesão celular endotelial à plaqueta (PECAM-1, também conhecida como CD31), CD99, moléculas de adesão juncional (JAMs), molécula de adesão seletiva de célula endotelial (ESAM) e algumas outras moléculas com funções pouco elucidadas. (PETRI e BIXEL, 2006; SADIK, KIM e LUSTER, 2011; KOLACZKOWSKA e KUBES, 2013).

Como a VE-caderina também está envolvida no aumento da permeabilidade vascular é relevante notar que a abertura de junções endoteliais para a passagem de proteínas do plasma ou de leucócitos é dependente de dois resíduos diferentes de tirosina, cuja fosforilação é regulada em sentidos opostos, assim o antagonismo desses eventos permitiria a intervenção seletiva no aumento da permeabilidade ou no extravasamento de leucócitos (WESSEL, et al., 2014).

## **2.2.2 Mediadores da resposta inflamatória**

A resposta inflamatória representa um processo biológico e bioquímico complexo envolvendo células do sistema imune e uma variedade de mediadores biológicos. Nesse contexto moléculas de comunicação célula-célula, conhecidas coletivamente como citocinas, desempenham um papel extremamente importante na mediação do processo inflamatório. As

citocinas constituem um elo entre a injúria celular ou reconhecimento de corpos estranhos ao desenvolvimento das manifestações locais e sistêmicas da inflamação, sendo que entre as citocinas, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 estão elevadas na maior parte, se não em todos os estados inflamatórios e têm sido reconhecidas como alvos para intervenção terapêutica (CUNHA, et al., 1992; RANKIN, 2004; SCHELLER, et al, 2011).

As citocinas IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$  são capazes de ativar a produção de prostaglandinas (PG), que são potentes mediadores lipídicos cuja biossíntese está significativamente aumentada no tecido inflamado, desempenhando um papel chave na resposta inflamatória. Eventos precoces da resposta inflamatória como a vasodilatação e o aumento da permeabilidade vascular refletem os efeitos das PGs principalmente PGE<sub>2</sub> e da prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) no sítio inflamatório que atuam em sinergismo com outros mediadores como a bradicinina e a histamina para aumentar a permeabilidade e o edema. Além disso, estudos experimentais fornecem evidências de que as PGs também funcionam na transição para inflamação crônica, assim como, em sua manutenção (FUNK, 2001; KUWANO, et al, 2004; RICCIOTTI e FITZGERALD, 2011; AOKI e NARUMIYA, 2012).

As PGs são moléculas derivadas do ácido araquidônico liberado da membrana plasmática pela ação da fosfolipases A2 (PLA2) e metabolizado pelas isoenzimas ciclooxigenases (COXs) referidas como COX-1 e COX-2. Enquanto a COX-1 é constitutivamente expressa na maioria das células, sendo a principal fonte de prostaglandinas de ação homeostática, a COX-2 é principalmente induzida mediante estímulo inflamatório, sendo a principal via de geração de prostaglandinas durante a inflamação. Contudo, ambas as enzimas contribuem para geração de prostaglandinas autoregulatórias e homeostáticas, assim como, para aquelas liberadas durante a inflamação (GRANGEIRO, et al., 2008; RICCIOTTI e FITZGERALD, 2011)

O leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) é outra molécula derivada do ácido araquidônico, amplamente apreciada por sua ação pró-inflamatória, sendo produzida predominantemente por leucócitos, como macrófagos residentes e neutrófilos, mediante ação sequencial da 5-lipoxigenase (5-LO) e da leucotrieno A<sub>4</sub> hidrolase (LTA<sub>4</sub>H). É um potente quimiotático e estimulador da adesão de leucócitos sobre as células endoteliais e em adição a esses efeitos é também um forte secretagogo das proteínas granulares dos neutrófilos e um indutor poderoso da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) através de sua ação sobre o receptor BLT1 na superfície dos neutrófilos (FUNK, 2001; TAGER e LUSTER, 2003; SOEHNLEIN e LINDBOM, 2010).

Bradicinina (BK) é também um importante mediador da resposta inflamatória que possui múltiplas funções, tanto fisiológicas quanto patológicas, relacionadas à sua capacidade de ativar células endoteliais, conduzindo à vasodilatação, ao aumento da permeabilidade vascular e a liberação de mediadores como óxido nítrico (NO) e prostaglandinas. Trata-se de um peptídeo bioativo, membro do sistema calicreína-cinina (SCC), que é formado por dois substratos (cininogênios), ativados por duas enzimas (calicreínas), para produzir quatro mediadores peptídicos inflamatórios denominados cininas (peptídeos relacionados à bradicinina) que se ligam aos receptores de BK, B1 e B2 (MOREAU, 2005; SHARMA e AL-BANOON, 2012).

Entre as cininas, a BK é a principal, porém não é a única farmacologicamente ativa. BK em conjunto com a calidina (Lys-BK) estão entre os mais potentes peptídeos pró-inflamatórios gerados durante a estimulação nociva, sendo ativas sobre o receptor B2. Quando sofrem a ação das enzimas carboxipeptidases N (plasma) e M (membrana plasmática) os peptídeos BK e Lys-BK perdem o resíduo de arginina na carboxila terminal dando origem aos metabólitos ativos des-Arg<sup>9</sup>-BK (DBK) e Lys-des-Arg<sup>9</sup>-BK (LDBK) respectivamente, que ativam o receptor B1. Além disso, as cininas também podem sofrer ação da enzima cininase II, idêntica à enzima conversora de angiotensina (ACE), que provoca a inativação destes peptídeos (COUTURE, et al., 2001; GOLIAS, et al, 2007; SHARMA e AL-BANOON, 2012).

Atualmente é bem estabelecido que as cininas são rapidamente geradas após injúria tecidual e que possuem um papel central no desenvolvimento e na manutenção do processo inflamatório. A maioria dos efeitos observados na inflamação aguda como a vasodilatação, edema, hiperalgesia e dor (estes dois últimos discutidos com mais detalhes adiante) estão relacionadas à ativação do receptor constitutivo B2, embora este apresente papel limitado sobre o recrutamento de leucócitos durante a resposta inflamatória (COUTURE, et al., 2001; COSTA-NETO, et al. 2008).

Já o receptor B1 está ausente na maioria dos tecidos, sendo fortemente induzido mediante inflamação e dano tecidual, principalmente por meio da ação da IL-1, produzindo um perfil pró-inflamatório similar ao do acionamento do receptor B2, porém também caracterizado pela participação ativa no recrutamento de leucócitos mediante ação pelo metabólito DBK que está elevado nos sítios inflamatórios e cuja meia vida é de quatro a doze vezes maior que a da BK (MCLEAN, AHLUWALIA, PERRETTI, 2000; COUTURE, et al., 2001).

A carragenina (Cg) é um agente comumente utilizado em modelos experimentais sobre inflamação e dor inflamatória. Sua injeção na cavidade peritoneal é geralmente caracterizada pelo acúmulo de exsudato e intensa migração de leucócitos, como os neutrófilos, além de resposta inflamatória marcante com desenvolvimento de hiperalgesia e edema quando injetado via intraplantar. A cascata inflamatória induzida por Cg envolve ativação de TLR4, levando ao aumento da produção de CXCL8 e da migração de neutrófilos para o sítio do estímulo. Além disso, a Cg ativa precocemente o sistema calicreína-cinina, com consequente produção das cininas que induzem a produção do TNF- $\alpha$  que por sua vez age através da liberação da IL-1 $\beta$  para estimular a produção de PGs. Contudo, a sequência desses eventos varia entre espécies (DI ROSA e SORRENTINO, 1970; CUNHA, et al., 2005; BORTHAKUR, et al., 2012; NUNES, 2012).

### **2.2.3 Drogas anti-inflamatórias de uso clínico e novas possibilidades terapêuticas**

Atualmente os principais fármacos utilizados para o tratamento da inflamação são os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) e os glicocorticóides. Estes últimos suprimem a inflamação através de vários mecanismos celulares e moleculares que incluem: indução de apoptose, inibição de citocinas e inibição da migração. O tratamento com glicocorticóides é capaz de suprimir a migração de neutrófilos durante a resposta inflamatória através da redução na expressão de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- $\alpha$ , da quimiocina CXCL8 e das moléculas de adesão ICAM-1, LFA-1 e MAC- 1, além dos receptores de BK e da COX-2. No entanto, o uso oral dos glicocorticóides de forma crônica mostrou-se limitado, uma vez que este tratamento induz diversos efeitos colaterais sistêmicos severos associados às suas ações catabólicas incluindo atrofia da pele, fraqueza muscular e osteoporose (BARNES, 2011; TORRES, INSUELA, CARVALHO, 2012).

Já os AINEs, são drogas com atividade inibitória sobre ambas as COXs ou com ação seletiva sobre a COX-2, nesse último caso, denominadas COXIBs. Embora os fármacos dessa classe sejam as principais ferramentas no tratamento da inflamação, podem levar a diversos efeitos colaterais, dentre os quais o mais importante é a tendência a produzir ulceração gástrica e duodenal para os AINES não seletivos, e no caso dos COXIBs, a ocorrência de distúrbios trombóticos, visto que a síntese da PGI<sub>2</sub> pelo endotélio, que é realizada principalmente via COX-2, passa a ser inibida, alterando a balança entre PGI<sub>2</sub>



(antitrombótica) e tromboxano (pró-trombótico) produzido pelas plaquetas via COX-1 (GRANGEIRO, et al., 2008; COUTINHO, MUZITANO, COSTA, 2009).

Diante dessas limitações, fica evidente a importância da pesquisa em busca de moléculas com atividade anti-inflamatória e desenvolvimento de novos fármacos, visando eficácia e redução de efeitos colaterais. Como os metabólitos secundários das plantas possuem larga ubiquidade e diversidade química a busca por essas moléculas entre espécies vegetais aumenta a probabilidade de descoberta de novos agentes terapêuticos (CORRÊA, MELO e COSTA, 2008).

### **2.3 NOCICEPÇÃO E DOR**

Dor, segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), é uma experiência sensorial e emocional desagradável associada ao dano tecidual potencial ou real, ou descrita em termos de tal lesão. Seu componente exclusivamente fisiológico é denominado nocicepção e consiste dos processos de transdução, transmissão e modulação de sinais neurais gerados em resposta a um estímulo nocivo aplicado sobre terminações nervosas especializadas denominadas nociceptores (LAMONT, TRANQUILLI e GRIMM, 2000).

De acordo com sua natureza, a dor apresenta diferentes facetas. Em primeiro lugar, é necessário destacar que a sensação de dor é um importante mecanismo de defesa contra danos potenciais ao organismo, dessa forma em um tecido normal a dor é disparada por estímulos de alta intensidade capazes de causar lesão. Esse tipo de dor é denominada como “nociceptiva fisiológica”, que corresponde a uma sensação de alerta absolutamente essencial para a manutenção da integridade corporal. Sua falta, portanto, é um grave problema clínico, devido ao seu importante papel protetivo (WOOLF, 2010; SCHAIBLE, EBERSBERGER, NATURA, 2011).

Por outro lado, a dor é também um importante sintoma de diversas doenças, ou uma doença em si mesma, e tais condições dolorosas geralmente permanecem refratárias aos tratamentos disponíveis. Na posição de sintoma emitido pelo tecido inflamado ou lesionado, a dor assume a denominação de nociceptiva patofisiológica ou simplesmente dor inflamatória e é resultante da sensibilização do sistema de dor, uma vez que o limiar de ativação dos nociceptores cai durante a inflamação, fazendo com que essa dor se pareça com a dor espontânea (sem estimulação intencional) ou com a hiperalgesia e/ou alodínia, sendo

hiperalgesia a dor de elevada intensidade sentida sob estimulação nociva, enquanto alodínia é a ocorrência de dor provocada por estímulos que estariam normalmente abaixo do limiar nociceptivo, ou seja, estímulos inócuos (SCHAIBLE e RICHTER, 2004; VERMA, SHEIKH e AHMED, 2014).

Já como doença em si mesmo, a dor é classificada como neuropática, e é resultante do funcionamento anormal do sistema nervoso. Esta é desencadeada pela presença de lesões no sistema nervoso somatossensorial que alteram a sua estrutura e função de tal modo, que a dor ocorre espontaneamente como resultado da geração de potenciais de ação ectópicos dentro das vias nociceptivas, e não, nos terminais periféricos em resposta a um estímulo, como ocorre na dor nociceptiva fisiológica ou patofisiológica. Essa alteração estrutural do sistema nervoso leva a respostas patologicamente amplificadas tanto a estímulos inócuos quanto aos nocivos e uma vez que a dor neuropática tenha sido gerada, a hipersensibilidade sensorial tipicamente persiste por períodos prolongados, mesmo que a lesão original já tenha desaparecido há muito tempo (COSTIGAN, SCHOLZ, WOOLF, 2009; WOOLF, 2010).

Embora a categorização dos diferentes tipos de dor seja importante para compreensão dos seus mecanismos fisiológicos, sob o ponto de vista clínico, emerge o questionamento sobre a existência permanente dessa distinção estrita. Condições como a osteoartrite, por exemplo, cuja dor é considerada principalmente como nociceptiva patofisiológica devido à intensa lesão e inflamação das articulações, pode apresentar respostas sensorio-neuronais, pelo menos em parte, como as observadas em modelos de dor neuropática, sugerindo algum nível de sobreposição nestas duas vias, o que leva a compreensão de que possivelmente os tipos de dor se tornam menos discerníveis com o passar do tempo (IM, et al., 2010; SCHAIBLE, EBERSBERGER, NATURA, 2011).

### **2.3.1 O sistema nociceptivo**

Todos os sistemas sensoriais convertem estímulos ambientais em sinais eletroquímicos, mas diferentes dos demais neurônios sensoriais primários, os nociceptores possuem a notável capacidade de detectar uma ampla gama de modalidades de estímulos, incluindo os de natureza física e química, respondendo a complexas mudanças no ambiente fisiológico. Como os demais neurônios sensoriais primários, os nociceptores são pseudounipolares, ou seja, um processo único emana do corpo celular no gânglio da raiz dorsal (DRG) ou gânglio trigeminal

(TG) e se bifurca, enviando um axônio periférico para inervar o órgão-alvo e um axônio central para fazer sinapse com os neurônios de segunda ordem no corno dorsal da medula espinhal ou ao subnúcleo trigeminal caudal, respectivamente (JULIUS e BASBAUM, 2001; DUBIN e PATAPOUTIAN, 2010).

Existem duas principais classes de nociceptores, a primeira classe inclui as fibras aferentes de médio diâmetro, levemente mielinizadas (A $\delta$ ) que medeiam a "primeira dor" percebida como rápida, afiada e bem localizada, e a segunda classe que inclui as fibras não mielinizadas (C) de pequeno diâmetro que sinalizam a "segunda dor", mais lenta e difusa. Tanto as fibras A $\delta$  quanto as fibras C são heterogêneas, classificadas com base em sua velocidade de condução, sensibilidade e limiar para os estímulos nocivos, sendo que entre as fibras do tipo C as mais comuns são as ditas polimodais, capazes de responder aos estímulos térmicos, mecânicos e químicos. A expressão de repertórios diferenciados de moléculas de transdução (especialmente sensores químicos) confere a essa classe de receptores uma rica heterogeneidade funcional (BASBAUM et al., 2009; DUBIN e PATAPOUTIAN, 2010; OBARA e HUNT, 2014).

A inflamação provoca a sensibilização desses nociceptores polimodais, levando a uma queda em seus limiares de excitação, de tal maneira que estímulos inócuos passam a ativá-los, e os estímulos nocivos evocam uma resposta ainda mais forte que aquela desencadeada no estado não sensibilizado, correspondendo respectivamente aos eventos de alodínia e hiperalgesia anteriormente citados. Além disso, a inflamação ainda é capaz de recrutar os nociceptores silenciosos, que são fibras do tipo C insensíveis a estímulos mecânicos e térmicos, mesmo os de extensão nociva, que a partir da ação dos mediadores inflamatórios se tornam mais excitáveis, passando a responder até mesmo a estímulos inócuos, e esses dois processos em conjunto configuram a sensibilização periférica (SCHMIDT et al., 1995; SCHAIBLE, 2004; SCHAIBLE, EBERSBERGER, NATURA, 2011).

Com o tempo, este aumento da atividade neuronal na periferia pode causar sensibilização na transmissão nociceptiva central no corno dorsal da medula espinhal, por um processo chamado de "wind-up" no qual os neurônios de segunda ordem na medula espinhal aumentam a sua taxa de disparo de tal modo que a transmissão da informação de dor para o córtex somatossensorial é reforçada. Tanto a sensibilização periférica quanto a central representam a "plasticidade" do sistema nervoso, que pode moldar-se a novas funções em resposta à mudança dos sinais de entrada (HUNTER, MCDOUGALL, KEEFE, 2008).

Essa plasticidade apresenta duas formas gerais: a modulação e a modificação. Modulação representa mudanças reversíveis na excitabilidade de neurônios sensoriais primários e centrais mediados por alterações pós-traducionais induzidas em receptores/canais iônicos. Já a modificação representa alterações duradouras na expressão de receptores e transmissores, além de reorganização estrutural (ou rearranjo físico dos neurônios) e desinibição dos nociceptores no corno dorsal de tal forma que o sistema está grosseiramente modificado, distorcendo suas características de estímulo-resposta normais (WOOLF e SALTER, 2000; HUNTER, MCDUGALL, KEEFE, 2008).

Os nociceptores podem também exercer funções eferentes nos tecidos. A ativação das fibras nervosas sensoriais provoca a liberação dos neuropeptídeos substância P (SP) e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) que induzem a vasodilatação local, o extravasamento de plasma, a adesão de leucócitos e plaquetas, assim como a degranulação de mastócitos. Esse fenômeno constitui a inflamação neurogênica, isto é, sintomas inflamatórios que resultam da liberação de substâncias a partir de terminais nervosos sensoriais primários (RICHARDSON e VASKO, 2002; SCHAIBLE e RICHTER, 2004; ROSA e FANTOZZI, 2013).

### **2.3.2 Mecanismos de transdução na nocicepção**

A dor nociceptiva fisiológica é iniciada pela abertura de canais iônicos sensoriais inseridos nos terminais nociceptivos, em sua maioria canais catiônicos não seletivos, em resposta aos estímulos danosos ou potencialmente prejudiciais. Uma vez que os terminais estejam suficientemente despolarizados pelo influxo de cátions, os canais de sódio ( $\text{Na}^+$ ) voltagem-dependentes são abertos e o potencial de ação é disparado (SCHAIBLE, EBERSBERGER, NATURA, 2011; DU e GAMPER, 2013).

Uma variedade de canais de  $\text{Na}^+$  é expressa nos neurônios somatossensoriais incluindo os sensíveis a tetrodotoxina (TTX) Nav1.1, 1.6 e 1.7 e os TTX-resistentes Nav1.8 e 1.9. Estudos em animais têm demonstrado que o canal Nav1.7 está supra-regulado em uma variedade de modelos de dor inflamatória, e análises em camundongos Nav1.7 deficientes mostraram, que as respostas de dor inflamatórias evocadas por uma variedade de estímulos, como a formalina, a carragenina, o adjuvante completo de Freund, ou o fator de crescimento

do nervo (NGF), foram reduzidas ou abolidas (NASSAR, et al., 2004; BASBAUM et al., 2009).

O canal Nav1.8 também tem sido associado a percepção da dor mediada pelo estímulo mecânico nocivo, inflamação e frio. Abrahamsen e colaboradores (2008) analisaram camundongos transgênicos, sem o grupo de neurônios sensoriais que expressam o canal Nav1.8. Esses animais apresentaram respostas normais aos estímulos inócuos mecânicos e aos nocivos termiais, contudo não apresentaram respostas comportamentais aos estímulos mecânicos nocivos e nem ao frio. Houve quase completa supressão na segunda fase da resposta evocada pela formalina e ausência da hiperalgesia provocada pela carragenina e outros mediadores. Já a dor neuropática permaneceu normal na ausência de neurônios que expressam Nav1.8.

Outros tipos de canais iônicos também podem ser alvos terapêuticos para o tratamento da dor. Canais de cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) voltagem-dependente são mediadores bem conhecidos da sinalização da dor nos neurônios aferentes primários. Os canais de  $\text{Ca}^{2+}$  do tipo N são críticos na transdução da dor sendo que os inibidores destes canais são analgésicos potentes, mas de utilização clínica limitada devido a ações indesejáveis em outras regiões do sistema nervoso. Contudo um único variante de “splicing” desse canal é expresso no subgrupo dos nociceptores no DRG, e essa isoforma pode representar um novo alvo para o manejo da dor sem afetar a transmissão basal mediada pelo canal de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo N (BELL, et al., 2004; ZAMPONI, et al., 2009).

Já os canais do tipo T são expressos nos corpos celulares e terminações nervosas das fibras aferentes, onde eles participam na regulação da excitabilidade neuronal, contribuindo para o início dos potenciais de ação. Evidências sugerem que a modulação das correntes do tipo T resulta em significativa alteração no limiar da nocicepção e, portanto os canais de  $\text{Ca}^{2+}$  tipo T podem ser alvos para agentes terapêuticos analgésicos. Os subtipos  $\text{Ca}_v3.2$ , localizados nos terminais nervosos são mediadores críticos da excitabilidade de neurônios aferentes primários, e facilitam a sinalização da dor nos nociceptores. Resultados de experimentos com animais  $\text{Ca}_v3.2^{-/-}$  mostraram redução na resposta aos estímulos dolorosos mecânicos, térmicos e químicos e também a dor tônica e visceral provocada pela formalina e pelo ácido acético respectivamente, sugerindo que o  $\text{Ca}_v3.2$  desempenha importante papel na nocicepção (TODOROVIC e JEVTOVIC-TODOROVIC, 2006; CHOI, et al., 2007; ZAMPONI, et al., 2009).

Menor atenção tem sido conferida ao papel dos canais de potássio ( $K^+$ ) nos mecanismos da dor, mas estes desempenham um papel essencial na determinação do potencial de membrana em repouso e no controle da excitabilidade dos neurônios, sendo assim, os canais de  $K^+$  representam alvos periféricos potencialmente atrativos para o tratamento de dor (DU, WANG, ZHANG, 2011).

A abertura de alguns desses canais de  $K^+$  desempenham um importante papel na antinocicepção induzida por agonistas de vários receptores acoplados a proteína G, entre eles, receptores opioides e serotoninérgicos  $5-HT_{1A}$ , assim como por AINEs, antidepressivos tricíclicos e produtos naturais. Entre os tipos específicos de canais de  $K^+$ , os mais amplamente estudados são os sensíveis ao ATP ( $K_{ATP}$ ), que participam da antinocicepção induzida por muitas drogas que ativam esses receptores, tanto no sistema nervoso periférico quanto no central (OCAÑA, 2004).

O  $K_{ATP}$  é formado por quatro subunidades Kir6.x associadas a quatro receptores de sulfonilureia ( $SUR_x$ ), inibidos por sulfonilureias, como a glibenclamida, e ativado pelo diazóxido ( $SUR1$ ) e pinacidil ( $SUR2$ ). Esses ativadores do canal foram capazes de antagonizar o comportamento nociceptivo induzido pela bradicinina, assim como por estímulos mecânicos e térmicos, e a hiperexcitabilidade induzida por bradicinina nos neurônios do DRG, que embora empreguem diferentes mecanismos para a indução da nocicepção, devem iniciar os sinais nociceptivos por aumento da excitabilidade dos nociceptores. Dessa forma, substâncias capazes de atuar por meio de ativação dos receptores  $K_{ATP}$  podem apresentar importante potencial analgésico (NICHOLS, 2006; AKROUH, A; et al., 2009; DU, WANG, ZHANG, 2011).

O receptor ionotrópico de potencial transitório relacionado à proteína anquirina do tipo 1 (TRPA-1) é um canal necessário para a excitação neuronal, liberação de neuropeptídeos inflamatórios e para o desenvolvimento da hipersensibilidade dolorosa subsequente, isso porque sua ativação envia sinal aferente para o sistema nervoso central (SNC), mas também sinal eferente promovendo a inflamação neurogênica por meio da liberação de substância P e CGRP. É altamente expresso nos nociceptores tipo C, assim como nos neurônios de pequeno diâmetro na raiz dorsal, e desempenha um importante papel na condução da informação nociceptiva em condições de inflamação periférica uma vez que é ativado pela liberação de agentes inflamatórios a partir de células não neuronais na área de lesão no tecido ou na doença (PATAPOUTIAN, TATE, WOOLF, 2009; BAUTISTA, PELLEGRINO, TSUNOZAKI, 2013).

O receptor TRPA-1 também poder ser ativado diretamente por substâncias químicas reativas. A formalina, agente químico largamente utilizado para avaliar os efeitos de compostos analgésicos em animais de laboratório tem mostrado ação específica e direta sobre o TRPA-1, levando ao disparo das fibras tipo C. Camundongos nocaute para o TRPA-1 demonstraram redução dramática do comportamento induzido pela formalina (MCNAMARA, et al, 2007, MACPHERSON, et al, 2007).

A injeção de formalina causa uma imediata e intensa elevação da atividade nas fibras C e evoca uma resposta bifásica quantificável com características distintas de ativação central (fase precoce 0-5 min) pela ação direta da formalina nos nociceptores, e periférica (fase tardia 15-30 min) pela ação dos mediadores inflamatórios. Os analgésicos opioides modulam a percepção do estímulo através da interação com seus receptores no sistema nervoso central, sendo efetivo em eliminar a dor associada à fase precoce, enquanto os AINES impedem a produção das prostaglandinas, reduzem a estimulação nervosa, resultando em redução da dor (HUNSKAAR e HOLE, 1987; SHIBATA et al., 1989; MATHIAZHAGAN, ANAND, PARTHIBAN, 2014).

### **2.3.3 Mediadores inflamatórios na nocicepção**

O dano tecidual provoca a liberação de agentes químicos endógenos que ativam tanto células neuronais quanto células não neuronais, contribuindo para fenômenos sensoriais incluindo dor e hiperalgesia. Células não excitáveis, como células epiteliais e fibroblastos que residem dentro do tecido danificado e células inflamatórias que migram para o local, liberam mediadores inflamatórios. Tais mediadores incluem ATP, bradicinina, PGs, leucotrienos, citocinas TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e proteases. Vários componentes dessa sopa inflamatória ativam aferentes primários promovendo a liberação de neuropeptídeos gerando o fenômeno da inflamação neurogênica anteriormente discutida (BAUTISTA, PELLEGRINO, TSUNOZAKI, 2013).

Entre esses mediadores, a bradicinina é um dos mais potentes indutores da dor e possui ação estimulatória direta sobre os neurônios sensoriais. Além disso, exerce papel fundamental no controle dos mecanismos de processamento nociceptivo ao nível da medula espinhal. Um número de efeitos da bradicinina parece ser mediado pelos produtos resultantes da ação da COX sobre o ácido araquidônico, sugerindo interações mútuas entre os mediadores. As ações

das cininas através da ativação dos receptores B1 e B2 parecem estar envolvidas também nas reações observadas nos testes da formalina e do ácido acético em ratos e camundongos (PETHÖ, DEROW, REEH, 2001; FERREIRA, et al, 2002; PETHÖ e REEH, 2012).

O antagonismo do receptor B2 reduz a reação típica da fase precoce (0-5 min) da indução da nocicepção pela formalina, que reflete ativação aguda e direta do receptor, assim como reduz a contorção abdominal induzida pelo ácido acético. Como o mesmo ocorre para o bloqueio do receptor B1, a expressão do mesmo no tecido não inflamado não deve ser desconsiderada e/ou a indução do processo é rápida, provavelmente no nível de tradução ou translocação. Na fase tardia (15-30 min) do teste da formalina também ocorre à participação dos receptores B1 e B2, sendo que o antagonismo do receptor B2 reduz o edema induzido pela formalina. Contudo, camundongos TRPA-1 deficientes exibiram pronunciada deficiência na excitação nociceptiva e hipersensibilidade evocada pela bradicinina (CORREA E CALIXTO, 1993; IKEDA, et al, 2001; BAUTISTA, et al, 2006; FERREIRA, 2008; PETHÖ E REEH, 2012).

As PGs, por sua vez, promoveram em uma variedade de modelos experimentais a sensibilização dos nociceptores ou hiperalgesia ao calor, estímulo mecânico e estímulo químico, com ação predominante da PGE<sub>2</sub> e PGI<sub>2</sub>. Como discutido anteriormente, as ações sensibilizantes da bradicinina estão envolvidas com esses produtos da COX em vários estudos. Além disso, PGE<sub>2</sub> reforça a contorção abdominal induzida por ácido acético (BERKENKOPF e WEICHMAN, 1988; PETHÖ e REEH, 2012).

### **2.3.4 Envolvimento do sistema serotoninérgico na modulação nociceptiva**

O sistema serotoninérgico há muito tempo é reconhecido por seu envolvimento com a dor e analgesia. A serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) é um dos neurotransmissores mais largamente distribuídos no SNC, e desempenha ação moduladora sobre o processamento da dor. Diversos subtipos de receptores 5-HT têm sido identificados no corno dorsal da medula espinhal, onde agem em sítios pré e pós-sinápticos de neurônios, tanto excitatórios quanto inibitórios. Contudo, os locais exatos e mecanismos subjacentes à ativação dos subtipos do receptor de 5-HT ainda não são esclarecidos rigorosamente (GIORDANO e SCHULTEA, 2004; XIE, et al., 2012).



A 5-HT exerce seus efeitos através de uma variedade de receptores que são encontrados no sistema nervoso central e periférico, assim como em tecidos não neuronais. Seus receptores são classificados em sete famílias (5-HT<sub>1</sub> a 5-HT<sub>7</sub>) que sofrem ainda outras subdivisões, representando assim, uma das mais complexas classes de receptores de neurotransmissores. As famílias 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, e 5-HT<sub>4-7</sub> são membros da superfamília de receptores acoplados a proteína G, enquanto os receptores da família 5-HT<sub>3</sub> são canais iônicos ativados por ligante. Algumas dessas famílias estão envolvidas na transmissão nociceptiva e entre elas estão às famílias 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub> e 5-HT<sub>3</sub> (BARNES e SHARP, 1999; HOYER, HANNON e MARTIN, 2002; XIE, et al., 2012).

Enquanto na periferia a 5-HT, gerada por meio da degranulação de mastócitos e plaquetas após lesão tecidual, é considerada um mediador inflamatório fortemente pró-algésico, capaz de induzir a sensibilização dos nociceptores por meio da ativação de vários subtipos de receptores de 5-HT, no SNC, está principalmente envolvida em mecanismos endógenos que diminuem a dor através de uma rede de inibição, que modula a transmissão nociceptiva originada na periferia. Essa modulação da dor existe na forma de um circuito descendente com entradas que surgem em múltiplas áreas centrais, e com saídas partindo da região da substância cinzenta periaquedutal (PAG, na sigla em inglês) que se comunica com a medula ventromedial rostral (RVM, na sigla em inglês), enviando projeções para o corno dorsal da medula espinhal, onde se encontram receptores de 5-HT: 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>3</sub> e 5-HT<sub>7</sub> (DRAY, 1995; SOMMER, 2004; OSSIPOV, DUSSOR, PORRECA, 2010 XIE, et al., 2012).

Evidências sugerem que os receptores 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub> e 5-HT<sub>3</sub> estão envolvidos nessa modulação da transmissão nociceptiva, contudo, o papel de cada subtipo do receptor na transmissão nociceptiva, tanto para a inibição quanto para a estimulação ainda são controversos. Os subtipos de receptores de 5-HT podem desempenhar diferentes papéis na regulação da dor e mesmo efeitos opostos têm sido descritos. No que diz respeito ao subtipo 5-HT<sub>1</sub>, estudos eletrofisiológicos indicam que sua estimulação inibe a transmissão nociceptiva no nível espinhal. Para os receptores 5-HT<sub>2</sub>, evidências sugerem que sua estimulação pode aumentar a transmissão nociceptiva na medula espinhal e que este efeito pode estar relacionado à liberação de substância P, embora alguns estudos tenham sugerido que a estimulação deste receptor possa induzir a antinocicepção. Já os receptores 5-HT<sub>3</sub> estão associados à redução da nocicepção quando estimulados na medula espinhal, e ao aumento da transmissão nociceptiva quando ativados periféricamente (EIDE e HOLE, 1993).

Estudos mais recentes continuam evidenciando a relação e a complexidade do envolvimento dos receptores de 5-HT na transmissão nociceptiva. Song, Meyerson e Linderoth (2011) estudaram o envolvimento dos receptores de 5-HT na estimulação da medula espinhal, técnica extensivamente empregada para o tratamento da dor neuropática, e identificaram que ativação dos receptores 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>3</sub> e também do 5-HT<sub>4</sub> estão relacionados com o alívio da dor neuropática mediada pela estimulação da medula espinhal, e que a ativação dos receptores 5-HT<sub>3</sub> parece operar via interneurônios gabaérgicos.

Sasaki e colaboradores (2001) verificaram através do teste da nocicepção evocada pela formalina que a administração intratecal de agonistas dos receptores 5-HT<sub>2</sub> e 5-HT<sub>3</sub> inibe o comportamento nociceptivo em ambas as fases do teste, e que o pré-tratamento com antagonistas desses receptores reverte à ação antinociceptiva dos agonistas. Já para agonistas dos receptores 5-HT<sub>1B</sub> não foi verificada redução do comportamento nociceptivo. Dessa forma, os autores concluíram que a ativação dos receptores 5-HT<sub>2</sub> e 5-HT<sub>3</sub> na medula espinhal inibe a transmissão nociceptiva. Jeong, Mitchell e Vaughan (2012) estudaram exclusivamente o papel dos receptores 5-HT<sub>1</sub> na transmissão espinhal, e encontraram que dentro dessa família o subtipo 5-HT<sub>1A</sub> predominantemente medeia a antinocicepção aguda na medula espinhal.

Em relação à função dos receptores 5-HT no processamento nociceptivo periférico, muitos aspectos permanecem obscuros uma vez que diferentes papéis tem sido atribuídos a diferentes subtipos dos receptores. Lin e colaboradores (2011) encontraram que os subtipos 5-HT<sub>2B</sub> e 5-HT<sub>2C</sub> estão envolvidos na hipernocicepção mecânica, mas não encontraram evidências da participação dos receptores 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2A</sub> e 5-HT<sub>3</sub>. Nascimento e colaboradores (2011) concluíram que receptores 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub>, 5-HT<sub>6</sub> e especialmente de 5-HT<sub>1B</sub> e 5-HT<sub>2A</sub>, estão envolvidos na geração da nocicepção na periferia, representada pelo comportamento de lambida da pata, visto que a administração local de antagonistas destes receptores é capaz de inibir o comportamento nociceptivo evocado pela 5-HT na pata dos animais. Contudo não encontraram inibição do comportamento nociceptivo com o emprego de diferentes doses do antagonista de 5-HT<sub>3</sub>, ondansetrona, administrada localmente (intraplantar, i.pl.). Assim nesse experimento, a ativação dos receptores 5-HT<sub>3</sub> na periferia não demonstrou participação na geração da nocicepção uma vez que seu antagonismo não promoveu analgesia.

Granados-Soto e colaboradores (2010), por outro lado, sugeriram que a ativação periférica dos subtipos 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1D</sub>, 5-HT<sub>1F</sub> e, provavelmente 5-HT<sub>1E</sub> levam a antinocicepção no teste da formalina. Essa proposta de ação antinociceptiva para a família 5-

HT<sub>1</sub> é consistente com a proposta de com o sistema de transdução de sinal do receptor 5-HT<sub>1</sub>, que acoplado a proteína G inibitória (Gi/GO), promove a abertura dos canais de K<sup>+</sup> levando a hiperpolarização neuronal (HANNON e HOYER, 2008).

Assim fica evidenciado que a atividade dos receptores de 5-HT é complexa e algumas vezes contrastante, e pode depender do subtipo de receptor sendo ativado; da contribuição relativa da ativação de receptores pré-sinápticos versus pós-sinápticos; do paradigma nociceptivo e da relação dose-efeito, que pode evocar nocicepção ou antinocicepção mediante o uso de agentes serotoninérgicos (HYLDEN e WILCOX, 1983; JÜRGENSENA, et al., 2005).

### **2.3.5 Envolvimento do sistema opioide e colinérgico na modulação nociceptiva**

Os sistemas opioides são críticos na modulação do comportamento relacionado à dor e a promoção da antinocicepção. Este sistema consiste dos neurônios que produzem os peptídeos opioides: beta-endorfinas; Met-enkefalinas; Leu-enkefalinas; e dinorfinas, que atuam como neurotransmissores e neuromoduladores sobre os receptores mi (μ), kapa (κ) e delta (δ). As drogas opioides, tais como seus homólogos endógenos, agem sobre esses mesmos receptores para produzir tanto analgesia como seus efeitos colaterais (HOLDEN, JEONG e FORREST, 2005).

A região da PAG é rica em receptores opioides e em opioides endógenos, constituindo o maior alvo para ação analgésica no sistema nervoso central. Nessa região, os agonistas opioides produzem analgesia através da supressão da influência inibitória do neurotransmissor GABA sobre os neurônios que fazem parte das vias descendentes antinociceptivas, uma vez que o GABA é o principal transmissor inibitório no cérebro, e atua de modo a reduzir ou evitar a saída do sinal antinociceptivo da PAG (VAUGHAN, et al., 1997, MCDONALD e LAMBERT 2005, CHEN, CHEN e PAN, 2005).

Já no corno dorsal da medula espinhal, importante sítio para a transmissão e modulação nociceptiva, a ativação dos receptores opioides produz analgesia através da atenuação das entradas sinápticas glutamatérgicas, provocando conseqüentemente a inibição de neurônios do corno dorsal. Assim a PAG e suas projeções descendentes para a RVM e medula espinhal compreendem um circuito neural essencial para a analgesia mediada por opioides endógenos

e exógenos (BASBAUM e FIELDS, 1984; MCDONALD e LAMBERT 2005, CHEN, CHEN e PAN, 2005; LOYD, MORGAN, MURPHY, 2007).

Além das ações no sistema nervoso central, os opioides também atuam periféricamente desempenhando um papel significativo no desenvolvimento de analgesia em alguns estados de dor, incluindo danos nos nervos, dor inflamatória, e destruição dos tecidos por expansão de tumor. Além disso, receptores opioides também são expressos em tecidos não neuronais (LESNIAK e LIPKOWSKI, 2011).

Os medicamentos que se ligam a receptores opioides são prescritos para o tratamento de diversas condições dolorosas, mas produzem vários efeitos adversos o que evidencia a necessidade de novas possibilidades terapêuticas para o manejo da dor. Um dos efeitos colaterais mais conhecidos é a dependência, que pode impossibilitar o manejo adequado das condições dolorosas. Outros efeitos secundários comuns associados a sua utilização são: sedação, tonturas, náuseas, vômitos, obstipação, tolerância e depressão respiratória. Além disso, a extensão de sua eficácia quando utilizado numa base crônica, como em casos de câncer, não foi definitivamente comprovado (BENYAMIN, 2008).

O sistema colinérgico também participa da modulação nociceptiva e está intimamente envolvido na antinocicepção produzida pela morfina. A administração sistêmica de inibidores da colinesterase que atravessam a barreira hematoencefálica produz analgesia, assim como, aumenta a analgesia promovida pelos fármacos opioides. Da mesma forma que para os demais agentes anteriormente discutidos, um importante local de ação analgésica dos agentes colinérgicos é a medula espinhal, onde estão concentrados os receptores muscarínicos (EISENACH, 1999; CHEN, CHEN e PAN, 2005).

Tanto ações muscarínicas quanto nicotínicas estão envolvidas na modulação da percepção dolorosa, uma vez que a ativação dos receptores muscarínicos induz analgesia, e a ativação repetida dos receptores nicotínicos previne e atenua a dor neuropática, o que parece ser um fenômeno complexo que envolve múltiplos subtipos de receptores nicotínicos (MUDO, BELLUARDO, FUXE, 2007; BARTOLINI e MANNELLI, 2011).

Contudo, a analgesia por ativação direta de receptores muscarínicos ou nicotínicos deve ser evitada devido aos graves efeitos colaterais, e uma possível alternativa seria a elevação dos níveis de acetilcolina por mecanismos indiretos. Um fator relevante nesse sentido é que os sistemas serotoninérgicos e colinérgicos estão inter-relacionados na modulação da dor por meio dos receptores 5-HT<sub>4</sub>, cuja estimulação eleva a liberação de acetilcolina endógena, o que

pode ser uma estratégia para a amplificação da transmissão colinérgica (GHELARDINI, et al., 1996; BARTOLINI e MANNELLI, 2011).

Como discutido até aqui, são muitos os alvos passíveis de modulação e, portanto, sobre os quais novas moléculas podem agir para promover a analgesia/antinociceção. Os metabólitos secundários derivados de plantas têm, ao longo dos anos, contribuído muito para a atual compreensão dos importantes mecanismos relacionados com o processo de transmissão e tratamento da dor, assim como têm permitido identificar alvos promissores para a descoberta de novas drogas analgésicas que sejam seguras e eficientes. Apesar desse progresso, deixando de lado seus efeitos colaterais, a morfina continua a ser uma das drogas mais usadas na prática clínica para o tratamento das desordens dolorosas, assim, drogas analgésicas mais seguras e mais eficazes são urgentemente necessárias (CALIXTO, et al., 2001).

#### **2.4 O ESTUDO DO POTENCIAL FARMACOLÓGICO DA ESPÉCIE *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir**

Um estudo etnofarmacológico, realizado pelo grupo de pesquisa em plantas medicinais da Universidade Federal da Bahia (UFBA), identificou espécies vegetais de uso medicinal popular no povoado de Palmeiras, município de Contendas do Sincorá-BA, dentre as quais se encontra a *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir., conhecida como jurema preta, que é utilizada pela população de Palmeira no tratamento de feridas e contra a tosse (DUARTE et al., 2008).

Trata-se de uma leguminosa arbustiva que ocorre em larga escala na caatinga, nas regiões de semiárido do Nordeste. Ela é pertencente à família Fabaceae-Mimosoideae, ao gênero *Mimosa* e espécie *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir, possuindo alguns sinônimos botânicos, entre eles o de *Mimosa hostilis* Benth. Contudo, é encontrada também em outros países da América Latina (OLIVEIRA, et. al., 1999; CAMARGO-RICALDE, 2000 RODRIGUES e AMADOR, 2014).

No México, em 1984, o pó seco da casca da *M. tenuiflora* foi utilizado empiricamente para aliviar o sofrimento de centenas de pessoas, vítimas de uma explosão de gás. Nesta ocasião o pó da casca da planta, conhecida no país como tepescohuit, foi aplicado diretamente sobre as queimaduras e resultou na facilitação da regeneração da pele e prevenção de cicatrizes em muitos casos (RIVERA-ARCE, et al., 2007a).

Estudos fitoquímicos e farmacológicos apoiam a existência de compostos naturais com propriedades cicatrizantes do córtex da *M. tenuiflora*, e concluíram que os extratos alcoólico e aquoso obtidos da casca seca da *M. tenuiflora* são particularmente ricos em taninos, contendo também saponinas esteroidais e triterpênicas, e que a ação destas moléculas de forma isolada ou sinérgica está associada à atividade cicatrizante da *M. tenuiflora* (ANTÓN, et al, 1993, RIVERA-ARCE, et al., 2007a, RIVERA-ARCE, et al., 2007b).

Estudo clínico randomizado controlado desenvolvido por Rivera-Arce e colaboradores (2007b) mostrou que o extrato das cascas da *M. tenuiflora*, contendo alto teor de polifenóis e pequenas concentrações de saponina e alcaloides indólicos facilitou a cicatrização de úlceras venosas de perna em pacientes ambulatoriais que sofriam com as ulcerações há anos e que tentaram ao longo desses anos diferentes tratamentos e procedimentos sem obter sucesso terapêutico. Em alguns casos, cicatrização total da área de lesão foi obtida entre 8 a 13 semanas de tratamento com hidrogel contendo o extrato de *M. tenuiflora*. Contudo, Lammoglia-Ordiales e colaboradores (2012) também conduziram um estudo clínico randomizado controlado em pacientes com úlceras venosas de perna utilizando hidrogel contendo o extrato da casca da planta, mas não observaram aumento na cicatrização de feridas em comparação aos controles.

Já outro estudo conduzido por Zippel, Deters e Hensel (2009) indicou que polímeros de arabinogalactanas presentes na casca da *M. tenuiflora* melhoraram a viabilidade e a proliferação *in vitro* de fibroblastos humanos, indicando que essas estruturas de carboidratos possuem também um importante papel na atividade da *M. tenuiflora* na cura de feridas.

Trabalhos realizados com a *M. tenuiflora* confirmam a presença de alcaloides na raiz da planta. No Nordeste do Brasil, algumas tribos indígenas fazem uso do “vinho de jurema preta” ou “ajucá” como uma “bebida milagrosa”, que contém o alcaloide N, N-dimetiltriptamina (DMT) que é um potente agonista serotoninérgico, e recentemente um novo fitoindol, juremamina, foi isolado das cascas da *Mimosa tenuiflora* (VEPSÄLÄINEN, et al., 2005; SOUZA *et. al.*, 2008).

Bitencourt e colaboradores (2014) avaliaram a ação da *M. tenuiflora* em um modelo de envenamento de camundongos induzidos por veneno de *Tityus serrulatus* (escorpião amarelo) e verificaram que o tratamento com extrato aquoso e frações da casca da planta, anterior a administração do veneno, suprimiu a migração de leucócitos para a cavidade peritoneal e reduziu os níveis de IL-6, IL-12 e IL-1 $\beta$ .

Por fim, Cruz (2013) identificou atividade anti-inflamatória e antinociceptiva ao estudar o extrato etanólico da casca da *M. tenuiflora*, e pesquisas realizadas por Almeida e colaboradores (2003), assim como por Oliveira e colaboradores (2009) encontraram atividade antinociceptiva para plantas da mesma família (Fabaceae).

### 3 JUSTIFICATIVA

A descoberta de novos agentes farmacológicos para tratamento da dor e inflamação se faz necessária atualmente, pois as plantas representam potenciais fontes para obtenção destes novos agentes, uma vez que são riquíssimas em compostos bioativos com ampla variedade molecular. Aliado a este fator, está a grande biodiversidade da flora brasileira, especialmente da caatinga que associado ao conhecimento tradicional das populações locais, fornece material precioso para a pesquisa farmacológica com plantas, guiada pela herança cultural popular.

Além disso, a pesquisa com plantas medicinais conduz ao desenvolvimento científico e tecnológico colaborando para a preservação do patrimônio intelectual e biológico do país, sendo extremamente relevante o desenvolvimento de patentes e agregação de valor econômico aos produtos naturais provenientes da biodiversidade brasileira. Assim, visa evitar que laboratórios internacionais assumam total domínio da tecnologia agrícola e de produção das espécies da nossa flora, como é o caso do jaborandi-brasileiro (*Pilocarpus pennatifolius*), do qual se extraem os sais de pilocarpina utilizados na formulação de colírios para tratamento do glaucoma, e sobre os quais a empresa alemã Merck<sup>®</sup> detém a patente sobre o isolamento (RODRIGUES e CARVALHO, 2007), gerando um grande prejuízo para o Brasil, que fica impossibilitado de vender esse produto no mercado internacional, além de ser obrigado a pagar royalties para importar um produto originado de sua própria flora.

Por fim, uma vez comprovada a atividade farmacológica e o efeito medicinal da *M. tenuiflora*, esta planta poderá ser uma fonte terapêutica para a produção de novos fitoterápicos e fitomedicamentos, ou uma nova alternativa de tratamento a ser utilizada pelo Sistema Único de Saúde (SUS), que passará a dispor de fontes de tratamento e prevenção mais acessíveis, eficazes e mais baratas que os tratamentos convencionais para a população.



## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Analisar *in vivo* a atividade anti-inflamatória e antinociceptiva dos extratos e frações da casca da *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir, coletada no semiárido da Bahia.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar a atividade anti-inflamatória das frações de hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol da casca da *M. tenuiflora* coletada na região de semiárido do estado da Bahia;
- b) Avaliar a atividade antinociceptiva nas frações de hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol da casca da *M. tenuiflora*.
- c) Compreender alguns possíveis mecanismos de ação envolvidos na atividade farmacológica do extrato etanólico da *M. tenuiflora*.

## 5 METODOLOGIA

### 5.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE VEGETAL

A casca da *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. foi coletada na Floresta Nacional (FLONA) Contendas do Sincorá, tendo sido 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 coletada foi localizada (S13°55'23.2" e W041°07'05.0", a 374 m altitude), catalogada e a exsicata foi depositada no Herbário da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (número de depósito 4907, 4980 e 4993), campus de Vitória da Conquista, sob coordenação do Prof. Avaldo de Oliveira S. Filho. As exsicatas foram preparadas seguindo as 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 E FRACIONAMENTO

O extrato etanólico da *M. tenuiflora* foi preparado a partir da casca da planta seca, moída e colocada em maceração com etanol PA, agitando esporadicamente. Após filtração, o extrato foi concentrado em evaporador rotativo até eliminação do etanol, fornecendo o extrato. Esse procedimento foi repetido três vezes. O extrato seco então foi particionado com solventes de polaridade crescente (hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol), dando origem às frações de hexano (HEX), diclorometano (DIC), acetato de etila (AE) e butanol (BUT), que foram concentradas em evaporador rotativo até a eliminação dos solventes. As frações foram diluídas em etanol 10% (v/v) e testadas farmacologicamente nas doses de 100 mg/kg para os testes de atividade anti-inflamatória e antinociceptiva. Para a avaliação dos mecanismos antinociceptivos foi utilizada a dose de 200 mg/kg do extrato bruto. Essas doses foram determinadas de acordo com os resultados obtidos em um estudo prévio conduzido por Andrade e colaboradores (2012), que verificou a existência de atividade anti-inflamatória e antinociceptiva no extrato etanólico da casca da *M. tenuiflora* nas doses citadas, sendo, portanto, pertinente a continuidade do estudo das frações com o emprego destas doses.

Exclusivamente para o teste do recrutamento de leucócitos para a cavidade peritoneal, foram empregadas as doses de 25 e 50 mg/kg, baseadas no estudo de Cruz (2013), sendo relevante destacar que ambos os estudos pertencem ao grupo de pesquisa “ Avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais de semiárido da Bahia” do Instituto Multidisciplinar em Saúde da Universidade Federal da Bahia (UFBA), Campus Anísio Teixeira.

### **5.3 ANÁLISE FITOQUÍMICA DO EXTRATO ETANÓLICO POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)**

A análise fitoquímica foi realizada para a detecção de polifenóis, saponinas, flavonoides, ácidos fenólicos, esteroides e alcaloides. Para a detecção de polifenóis, utilizou-se a fase móvel acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético: água (10:1,1:1,1:2,7). 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), que foram analisadas no visível. O aparecimento de manchas azuladas indicou a presença de polifenóis. Para a detecção de saponinas, utilizou-se como fase móvel clorofórmio: metanol (9:1) e a eluição foi realizada 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, foi empregada fase móvel de acetato de etila: hexano (7:1). Na placa de sílica, pulverizou-se o reagente cloreto de alumínio em etanol a 1% (m/v). A visualização das manchas foi realizada em luz UV, a 366 nm. Os flavonoides apareceram como manchas verdes fluorescentes, enquanto os ácidos fenólicos surgiram como manchas azuis fluorescentes. Para a análise de esteroides, utilizou-se como fase móvel hexano: acetato de etila (8:2). 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 indicou 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, indicou a presença de alcaloides (REGO, 2012).

## **5.4 MODELOS EXPERIMENTAIS PARA A AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA**

### **5.4.1 Animais**

Para todos os experimentos foram utilizados camundongos machos (*Balb/c*), pesando entre 20-30 g, obtidos do biotério setorial do Instituto Multidisciplinar em Saúde, da Universidade Federal da Bahia – Campus Anísio Teixeira. Os camundongos foram mantidos no ciclo claro-escuro de 12 horas (luzes apagadas das 18 às 6 horas), a temperatura de  $23 \pm 2^\circ\text{C}$  e a umidade relativa de  $50 \pm 2\%$ . Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno contendo maravalha na base da caixa, isolados das fêmeas, sendo permitido livre acesso à comida (Labina®, Purina) e água. Foram utilizados grupos de seis animais submetidos ao jejum de 12 horas, antes dos testes. Para realização dos experimentos em modelo animal, o projeto foi aprovado no Comitê de Ética de Experimentação Animal da Universidade de Uberaba/MG (CEE/UNIUBE) de acordo a lei no 11.704/09, no do protocolo107/2009 (ANEXO B). Os camundongos foram homoganeamente distribuídos entre os grupos. 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 de forma consistente o efeito dos tratamentos. Foram utilizados seis animais (n=6) por grupo em cada experimento.

### **5.4.2 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina em camundongos**

O comportamento de nocicepção induzido por formalina foi avaliado com base no descrito por Hunskaar e Hole, (1987) e Tjølsen e colaboradores (1992). Os animais foram tratados pela via subcutânea (s.c.), conforme o grupo ao qual pertenciam, com uma das quatro frações da planta (100 mg/kg), ou com veículo (10% etanol, v/v), ou com indometacina (10 mg/kg) ou com morfina (5 mg/kg). Trinta minutos após o tratamento, todos os animais receberam um volume de 20  $\mu\text{L}$  de solução de formalina 1,5%, injetado via intraplantar (i.pl.) na superfície ventral da pata direita posterior dos animais, e imediatamente após a administração da formalina, cada animal foi observado por um período total de 30 min para

avaliação do comportamento associado à nocicepção, determinado através da quantificação do número de *flinches* e lambidas da pata que recebeu o estímulo álgico. Nesse tempo, com base nos autores citados, o período de 0 a 5 min foi definido como a fase 1 (neurogênica), e o período de 15 a 30 min como a fase 2 (inflamatória) da nocicepção. Após os 30 min, os animais foram anestesiados e eutanasiados, e as patas posteriores direita e esquerda foram removidas e pesadas em uma balança analítica. O peso da pata que não recebeu formalina (esquerda) foi subtraído do peso da pata que recebeu formalina (direita), a fim de determinar a formação de edema. Os resultados foram expressos em gramas.

#### **5.4.3 Recrutamento de leucócitos para a cavidade peritoneal**

Para a determinação da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal, os animais foram tratados pela via s.c., conforme o grupo ao qual pertenciam, com uma das quatro frações da planta (50 mg/kg), ou com veículo (10% etanol, v/v). Exclusivamente para a fração AE foi estabelecido um grupo adicional de tratamento, na dose de 25 mg/kg. Trinta minutos após o tratamento, todos os animais de cada um dos grupos receberam o estímulo inflamatório correspondente a uma injeção intraperitoneal (i.p.) de Carragenina (Cg), 500 µg/cavidade. Os camundongos foram sacrificados 4 h após a administração de Cg e as células da cavidade peritoneal foram coletadas por lavagem da cavidade com 3 mL de tampão fosfato-salino (PBS) contendo EDTA 1 mM (NUNES et al., 2009). O volume recuperado foi semelhante em todos os grupos experimentais e correspondeu a aproximadamente 95% do volume injetado. A contagem total foi realizada em câmara de Neubauer e a contagem diferencial de células (100 células no total) foi realizada em lâminas preparadas em citocentrífuga e coradas com panótico (Laborclin, Brasil). Os resultados foram apresentados em número de neutrófilos por cavidade.

#### **5.4.4 Avaliação da permeabilidade vascular – azul de Evans**

A permeabilidade vascular foi analisada pelo teste azul de Evans (THURSTON et al., 2000). Para tanto, quinze minutos antes da administração dos tratamentos, os animais receberam, via plexo ocular, o corante azul de Evans (50 mg/kg) diluído em 50 µL de solução

salina. Decorridos 15 minutos, os animais foram tratados pela via s.c., conforme o grupo ao qual pertenciam, com uma das quatro frações da planta (100 mg/kg), ou com veículo (10% etanol, v/v). Trinta minutos após o tratamento, todos os animais de cada um dos grupos receberam o estímulo inflamatório correspondente a uma injeção i.p. de Cg, 500 µg/cavidade. Os camundongos foram sacrificados 3 h após a administração de Cg e a cavidade peritoneal foi lavada com 3 mL de PBS. O conteúdo do azul de Evans (o extravasamento de proteína plasmática) foi calculado usando uma curva padrão de azul Evans e a absorbância de cada amostra foi mensurada a 620 nm por meio de um espectrofotômetro (Genesys®, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA).

#### **5.4.5 Avaliação da nocicepção mecânica – Von Frey**

O limiar de hipernocicepção mecânica foi medido pelo método de Von Frey eletrônico (CUNHA, et al. 2004). O teste consistiu em produzir uma pressão na pata do animal com um transdutor de força de mão adaptado com uma ponta (0,8 mm<sup>2</sup> diâmetro da ponta, eletrônica de Von Frey, Insight Equipamentos®, Brasil). O estímulo foi automaticamente interrompido com a retirada da pata pelo animal, e a sua intensidade foi registrada pelo aparelho. O intervalo entre dois ensaios consecutivos na mesma pata foi de pelo menos 1 min, totalizando seis ensaios em cada animal. A força máxima aplicada e registrada foi de 12,8 g, sendo a força máxima do analgesímetro de 50 g. Os camundongos foram colocados em gaiolas de acrílico (12 x 20 x 17 cm) com piso de grade de arame, 30 min antes do experimento para adaptação. No primeiro momento (dia 0), os animais foram separados em grupos e testados apenas pra a verificação do limiar basal, sem receber qualquer tratamento ou estímulo. Após 24h (dia 1), os camundongos foram tratados via s.c., conforme o grupo ao qual pertenciam, com uma das quatro frações da planta (100 mg/kg), ou com veículo (10% etanol, v/v) e 30 minutos após o tratamento, todos os animais de cada um dos grupos receberam uma injeção de Cg (100 µg/pata, i.pl.) na superfície ventral da pata posterior direita. Após 3h, o teste Von Frey foi realizado. A intensidade da hipernocicepção mecânica foi quantificada por meio da variação na pressão ( $\Delta$  de reação em gramas), que consiste da subtração do limiar basal, obtido no dia 0, do valor de pressão obtido no dia 1, após administração do tratamento e da Cg.

#### **5.4.6 Avaliação dos mecanismos de ação no modelo das contorções abdominais induzidas por ácido acético**

A caracterização dos possíveis mecanismos de ação relacionados à atividade analgésica do extrato bruto da *M. tenuiflora* foi realizada por meio da administração de antagonistas de receptores relacionados à nocicepção 15 min antes da administração dos extratos no teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético (RIOS, et al., 2013). Os animais foram pré-tratados com os antagonistas via i.p. 15 min antes da administração do extrato etanólico da casca da planta (200 mg/kg, s.c.) ou veículo (etanol 10%, v/v) que por sua vez, precedeu em 30 min a injeção de ácido acético 0,6% (0,1 mL/10 g, i.p.). Os camundongos foram colocados em caixas separadas e depois da administração do ácido acético, o número de contorções e movimentos de alongamento (contração da musculatura abdominal e extensão dos membros posteriores) foi contado a cada 5 min por um período de 20 minutos como indicativo de nocicepção. Os inibidores utilizados para a caracterização dos mecanismos de ação foram: naloxona (1 mg/Kg); glibenclamida (2 mg/kg); metisergida (0,3 mg/kg); ondansetrona (0,2 mg/Kg) e atropina (5 mg/kg).

#### **5.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os dados foram analisados pelo programa GraphPad Prism (versão 5.0) e apresentados como média  $\pm$  erro padrão da média (E.P.M). Para as variáveis que apresentaram distribuição normal e homogeneidade das variâncias foi utilizado o teste One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Bonferroni ou de Dunnett. O nível de significância adotado foi de 5%.

## 6- RESULTADOS

### 6.1 RENDIMENTOS DO EXTRATO ETANÓLICO E DAS FRAÇÕES DA CASCA DA *Mimosa tenuiflora*

O extrato etanólico da casca da *M. tenuiflora*, obteve um rendimento de 16,51% (Tabela 1) em relação ao peso da casca seca utilizada para o processo de extração (301g). Do total de extrato bruto obtido, 44 g foram então submetidos ao processo de partição química e as frações obtidas após eliminação do solvente obtiveram os seguintes rendimentos: 2,44% (hexano), 2,38% (diclorometano), 47,19% (acetato de etila) e 27,44% (butanol); em relação ao peso do extrato etanólico da casca.

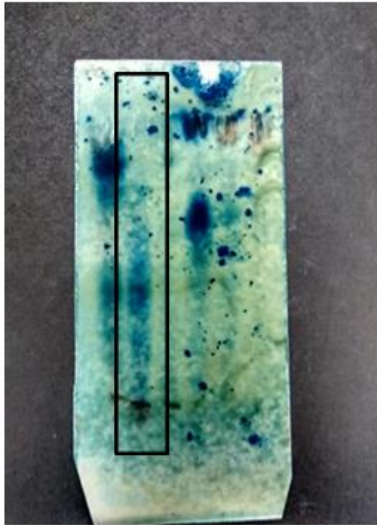
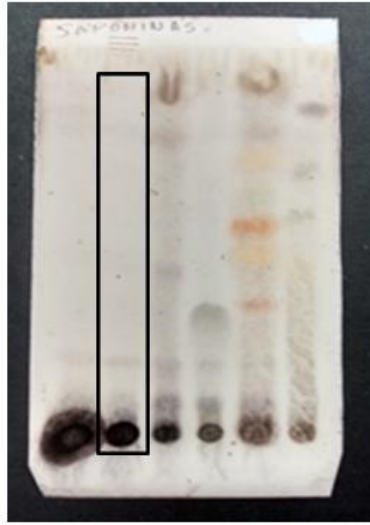
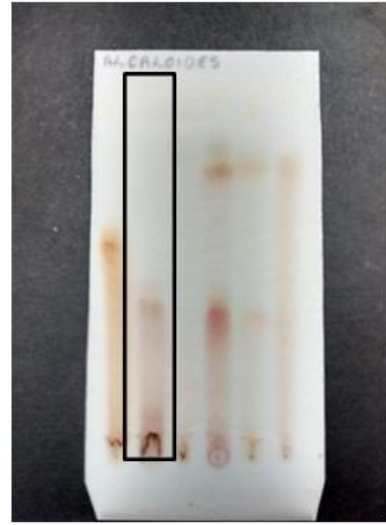
**Tabela 1** – Rendimentos do extrato etanólico da casca da *M. tenuiflora* e de suas respectivas frações.

<b>Rendimento dos Extratos/Fração da casca de <i>M. tenuiflora</i></b>		
<b>Parte da Planta</b>	<b>Extrato/Fração</b>	<b>Rendimento (%)</b>
<b>Casca</b>	Extrato Etanólico	16,51%
	Fração de Hexano	2,44%
	Fração de Diclorometano	2,38%
	Fração de Acetato de Etila	47,19
	Fração de Butanol	27,44

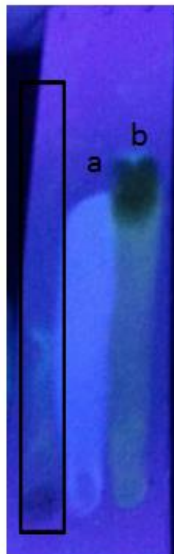
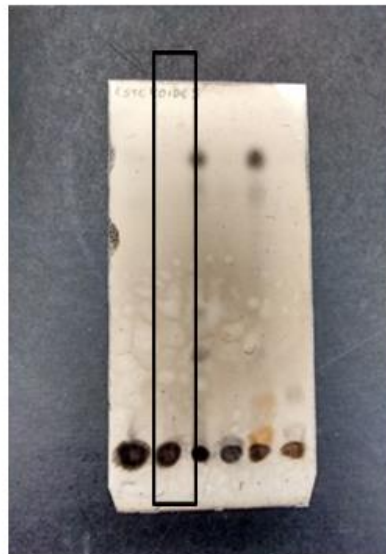
### 6.2 ANÁLISE FITOQUÍMICA DO EXTRATO ETANÓLICO POR CCD

As análises fitoquímicas possibilitam a revelação qualitativa das diferentes classes de metabólitos secundários presentes no extrato da planta. Nas figuras (Figuras 1A e 1B) a amostra da *M. tenuiflora* está delimitada pelas barras. As demais amostras que aparecem na imagem correspondem a outras plantas e não fazem parte da análise, exceto para a figura 1B na qual as colunas nomeadas de (a) e (b) correspondem respectivamente ao padrão para ácidos fenólicos e ao padrão para flavonoides. No extrato etanólico da *M. tenuiflora* foi detectado a presença de polifenóis, saponinas, alcaloides e flavonoides, mas não foi detectado a presença de ácidos fenólicos ou esteroides.



**Polifenóis****Saponinas****Alcaloides**

**Figura 1A** – Reação positiva para a presença de polifenóis, saponinas e alcaloides. As barras delimitam a coluna na qual foi aplicada a amostra da *M. tenuiflora*.

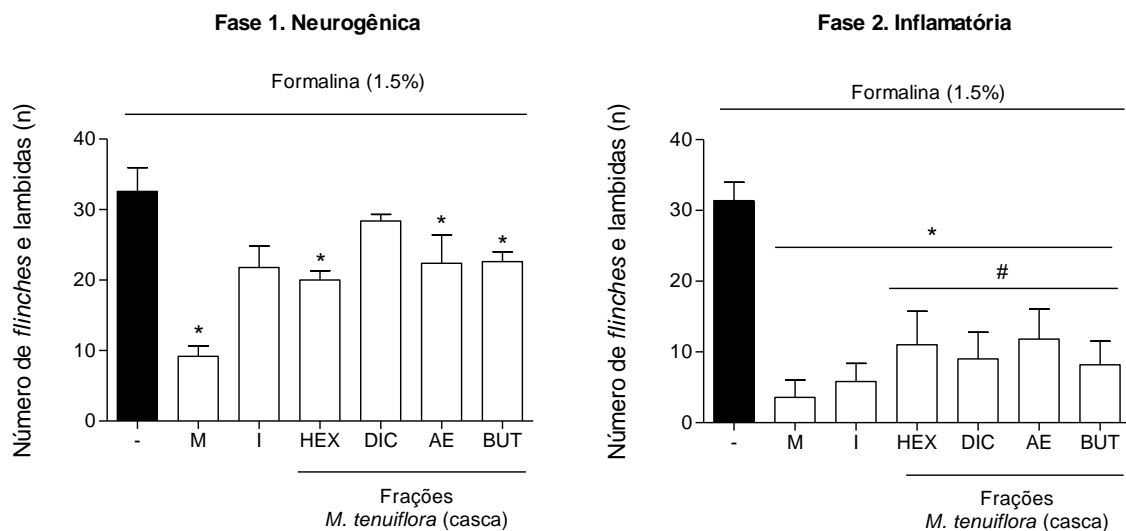
**Flavonoides e ácidos fenólicos****Esteroides**

**Figura 1B** – Reação positiva para a presença de flavonoides. Reação negativa para a presença de ácidos fenólicos e esteroides. As barras delimitam a coluna na qual foi aplicada a amostra da *M. tenuiflora*. (a) Padrão para ácidos fenólicos, (b) padrão para flavonoides.

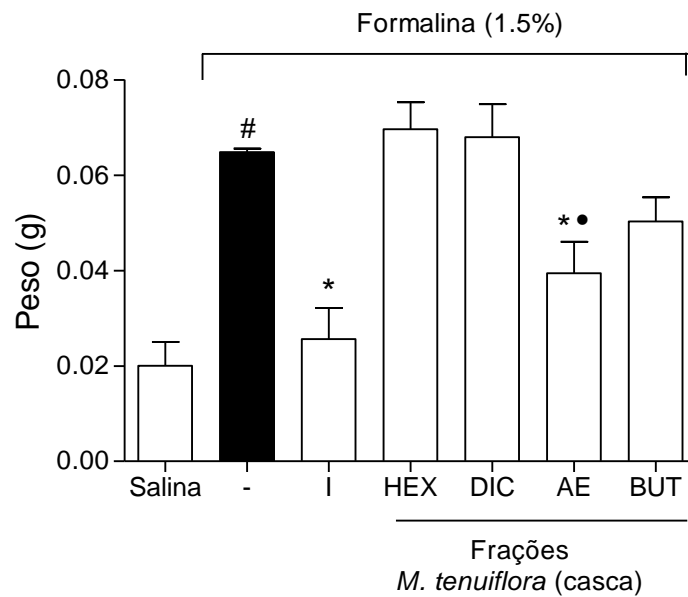
### 6.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA

O primeiro teste realizado para a avaliação da atividade farmacológica da *M. tenuiflora* foi o teste da nociceção induzida pela injeção intraplantar da formalina. Os resultados obtidos (Figura 2A) indicam que as frações HEX, AE e BUT (100 mg/kg) diminuíram estatisticamente o número de *flinches* e lambidas dos animais em relação ao grupo tratado com veículo durante a fase neurogênica ( $p < 0,05$ ).

Já durante a fase inflamatória, todas as frações (HEX, DIC, AE e BUT) na dose de 100 mg/kg foram capazes de reduzir o número de *flinches* e lambidas em relação ao grupo tratado com o veículo ( $p < 0,05$ ), e essa ação foi semelhante aos grupos tratados com os controles morfina e indometacina ( $p > 0,05$ ), que são drogas capazes de reduzir a nociceção associada a segunda fase do teste. Quanto à formação do edema (Figura 2B), a fração AE foi capaz de promover a redução de sua formação em relação ao grupo tratado com o veículo ( $p < 0,05$ ), e de forma semelhante ao grupo tratado com o controle indometacina ( $p > 0,05$ ).



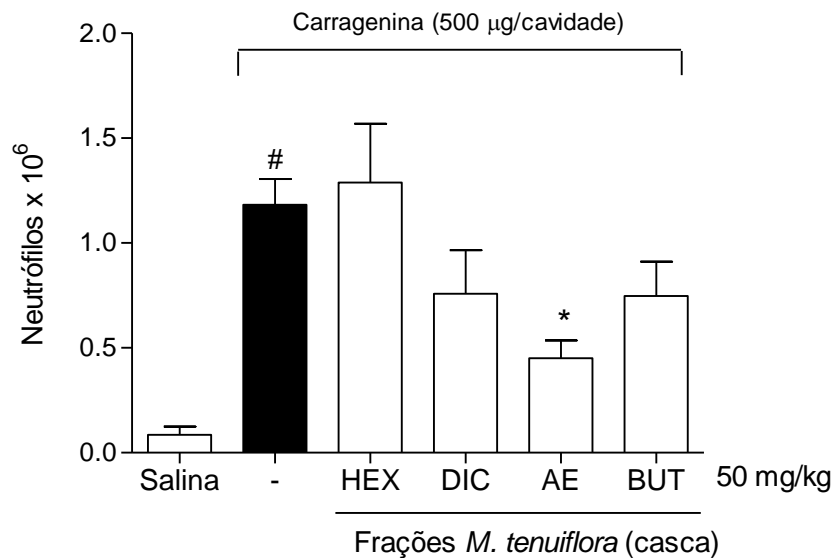
**Figura 2A** – Efeitos das frações de hexano (HEX), diclorometano (DIC), acetato de etila (AE) e butanol (BUT) obtidas da casca da *M. tenuiflora* na resposta à nociceção induzida pela injeção intraplantar de formalina 1,5 % em camundongos. A morfina (5 mg/Kg) foi o controle para a fase 1 (neurogênica) e também para a fase 2 (inflamatória). A indometacina (10 mg/Kg) também foi controle para a fase 2. As frações foram testadas em 100 mg/kg. A barra representada por (-) indica o grupo tratado apenas com o veículo (etanol 10%, v/v). Os resultados são apresentados como média  $\pm$  E.P.M. ( $n = 6$ ). A análise estatística foi realizada por meio do ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. \*  $p < 0,05$  quando comparado o grupo tratado com a fração ao grupo tratado com veículo. #  $p > 0,05$  quando comparado o grupo tratado com a fração ao grupo tratado com a morfina ou com a indometacina.



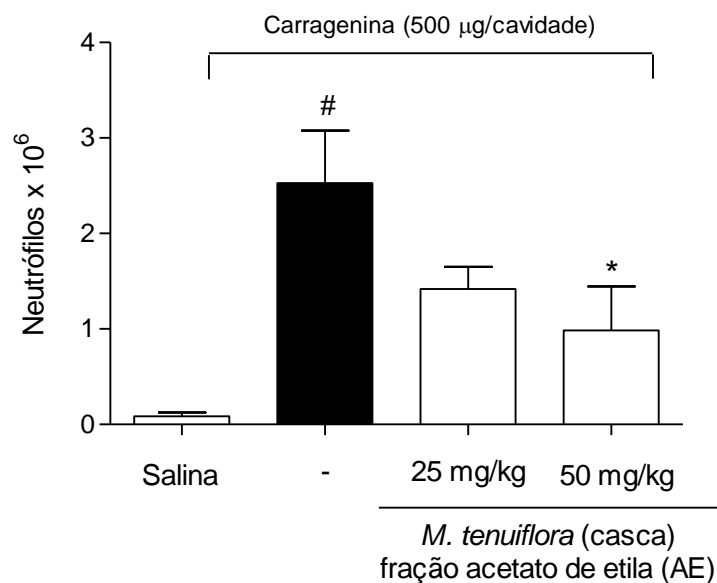
**Figura 2B** – Efeitos das frações de hexano (HEX), diclorometano (DIC), acetato de etila (AE) e butanol (BUT) obtidas da casca da *M. tenuiflora* sobre o edema de pata induzido por formalina 1,5%. A indometacina (10 mg/Kg) foi o padrão de ação anti-inflamatória. As frações foram testadas em 100 mg/kg. A barra representada por (-) indica o grupo tratado apenas com o veículo (etanol 10%, v/v). Os resultados são apresentados como média  $\pm$  E.P.M. (n = 6). A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. \*  $p < 0,05$  quando comparado o grupo tratado com a fração ou com indometacina ao grupo tratado com veículo. •  $p > 0,05$  quando comparado o grupo tratado com a fração ao grupo tratado com indometacina. #  $p < 0,05$  quando comparado o grupo veículo ao grupo salina.

Na sequência, foi realizado o teste do recrutamento de leucócitos para a cavidade peritoneal, contudo as doses avaliadas foram menores em relação às dos demais testes, uma vez que, Cruz (2013) avaliou a atividade anti-inflamatória das frações da casca de *M. tenuiflora* nas doses de 200 mg/kg e 100 mg/kg e encontrou atividade anti-inflamatória apenas para a fração HEX na dose de 200 mg/kg. Como para as demais frações não foi observada atividade anti-inflamatória nas doses de 200 e 100 mg/kg, verificou-se a possibilidade dessas doses estarem elevadas, o que poderia promover um efeito pró-nociceptivo. Deste modo, reduzindo a dose testada, haveria uma menor concentração dos compostos presentes, o que poderia diminuir esse efeito pró-nociceptivo. Assim, foram testadas as frações na dose de 50 mg/kg (Figura 3A e 3B). Os resultados obtidos com os testes de recrutamento de neutrófilos indicaram atividade anti-inflamatória somente para a fração AE da *M. tenuiflora* na dose de 50 mg/kg, uma vez que nesta dose a fração AE promoveu a redução do infiltrado de neutrófilos para a cavidade peritoneal, quando comparado ao grupo veículo ( $p < 0,05$ ). Já na dose de 25 mg/kg (Figura 3b) esta atividade foi

perdida, provavelmente devido a acentuada redução da concentração dos compostos ativos presentes na fração.



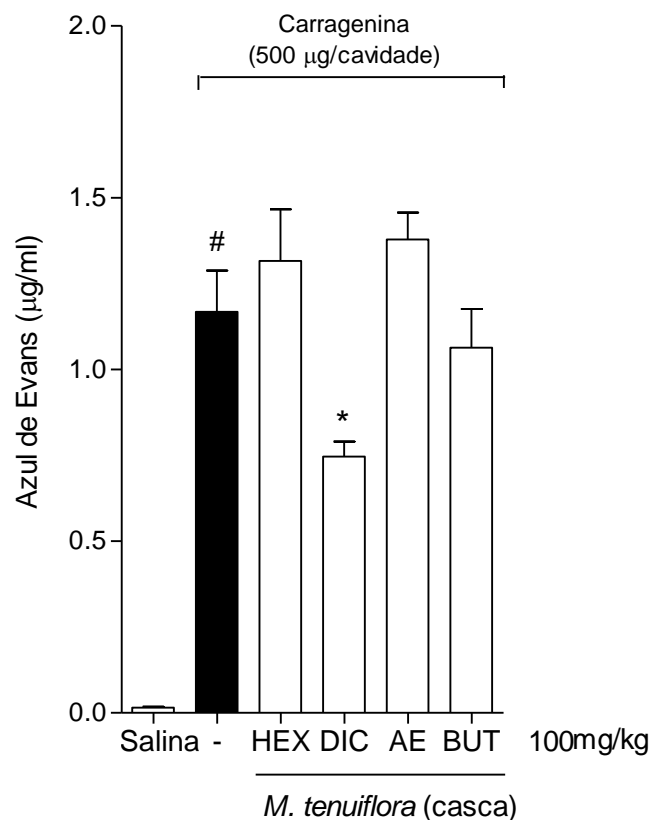
**Figura 3A** – Efeitos das frações de hexano (HEX), diclorometano (DIC), acetato de etila (AE) e butanol (BUT) obtidas da casca da *M. tenuiflora* sobre a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida por carragenina (Cg). Grupos de camundongos foram pré-tratados via s.c. com as frações (50 mg/kg) ou veículo (-, etanol 10%, v/v), 30 min antes da Cg (500 µg/cavidade) induzir a peritonite. Cada valor representa a média ± E.P.M. (n = 6). A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA seguido pelo teste de Dunnett. \* p < 0,05 quando comparado o grupo tratado com fração ao grupo tratado com veículo. # p < 0,05 quando comparado o grupo veículo ao grupo salina.



**Figura 3B** – Efeitos da fração de acetato de etila (AE) obtida da casca da *M. tenuiflora* sobre a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida por carragenina (Cg). Grupos de camundongos foram pré-tratados via s.c. com a fração (25 e 50 mg/kg) ou veículo (-, etanol 10%, v/v),

30 min antes da Cg (500 µg/cavidade) induzir a peritonite. Cada valor representa a média ± E.P.M. (n = 6). A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA seguido pelo teste de Dunnett. \* p < 0,05 quando comparado o grupo tratado com fração ao grupo tratado com veículo. # p < 0,05 quando comparado o grupo veículo ao grupo salina.

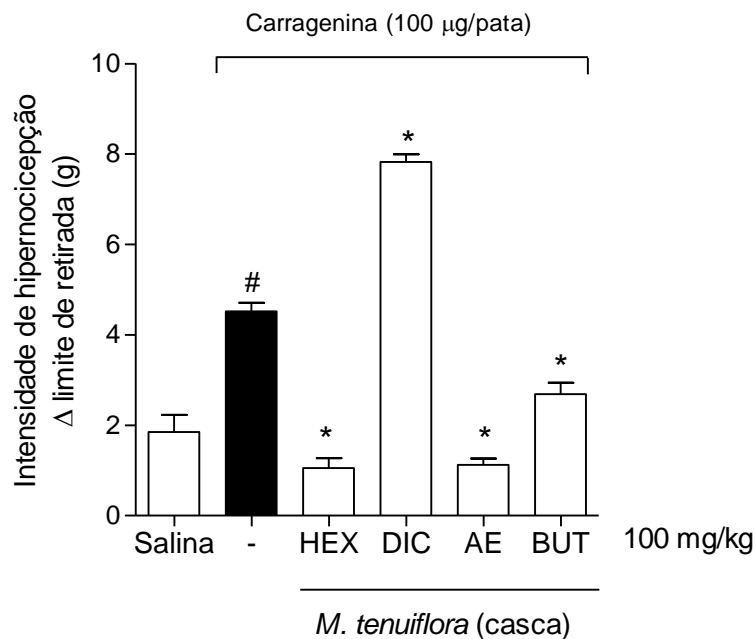
Para a avaliação da ação das frações no componente vascular da inflamação foi verificada a atividade destas sobre a permeabilidade vascular por meio da quantificação do extravasamento do corante azul de Evans. Os resultados obtidos com o teste indicaram que o grupo tratado com a fração DIC (100 mg/kg) apresentou redução da permeabilidade vascular de forma estatisticamente significativa quando comparado ao grupo tratado com veículo (p < 0,05). Os grupos tratados com as demais frações (HEX, AE e BUT) não apresentaram diferença estatística significativa em relação ao grupo tratado com veículo (p > 0, 05).



**Figura 4** – Efeitos das frações de hexano (HEX), diclorometano (DIC), acetato de etila (AE) e butanol (BUT) obtidas da casca da *M. tenuiflora* na permeabilidade vascular, teste de azul de Evans. Os animais foram pré-tratados via s.c. com as frações (100 mg/kg,) ou veículo (-, etanol 10%, v/v), 30 min antes da injeção de Cg (500 mg/cavidade, i.p.). O aumento da permeabilidade vascular foi avaliado após 4 h. Os resultados são apresentados como média ± E.P.M. (n = 6) da concentração de corante azul de Evans. A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA seguido pelo teste

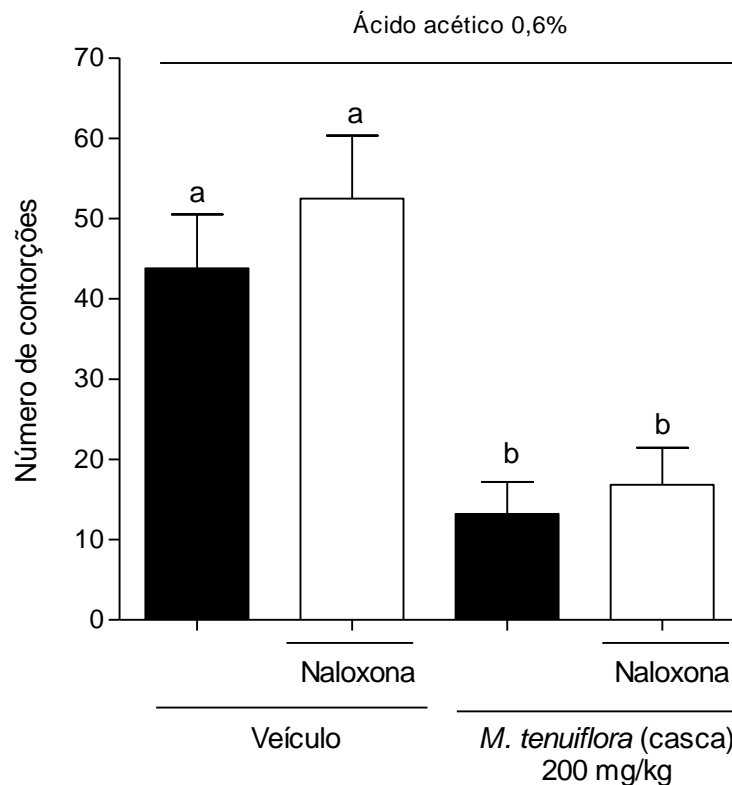
de Dunnett. \*  $p < 0,05$  quando comparado o grupo tratado com fração ao grupo tratado com veículo. #  $p < 0,05$  quando comparado o grupo veículo ao grupo salina.

O último teste realizado com as frações visou avaliar a atividade destas sobre a hipernocicepção mecânica, e para tanto foi utilizado o teste do Von Frey. Os resultados obtidos indicaram que os grupos tratados com as frações HEX, AE e BUT (100 mg/kg) reduziram a hipernocicepção mecânica de forma estatisticamente significativa em relação ao grupo tratado com veículo ( $p < 0,05$ ), exibindo portanto atividade antinociceptiva, enquanto que a fração DIC (100 mg/kg) acentuou a hipernocicepção mecânica de forma estatisticamente significativa quando comparada ao veículo ( $p < 0,05$ ), mostrando ação pró nociceptiva.



**Figura 5** – Efeitos das frações de hexano (HEX), diclorometano (DIC), acetato de etila (AE) e butanol (BUT) obtidas da casca da *M. tenuiflora* na inibição da nocicepção mecânica pelo teste de Von Frey. Os camundongos foram tratados com as frações (100 mg/kg, s.c.) ou veículo (-, etanol 10%, v/v, s.c.), 30 minutos antes da injeção i.pl. de Cg (100 mg/pata). As respostas hipernociceptivas foram avaliadas 3 h após estímulo. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  E.P.M. (n=6) A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA seguido pelo teste de Dunnett. \*  $p < 0,05$  quando comparado o grupo tratado com fração ao grupo tratado com veículo. #  $p < 0,05$  quando comparado o grupo veículo ao grupo salina.

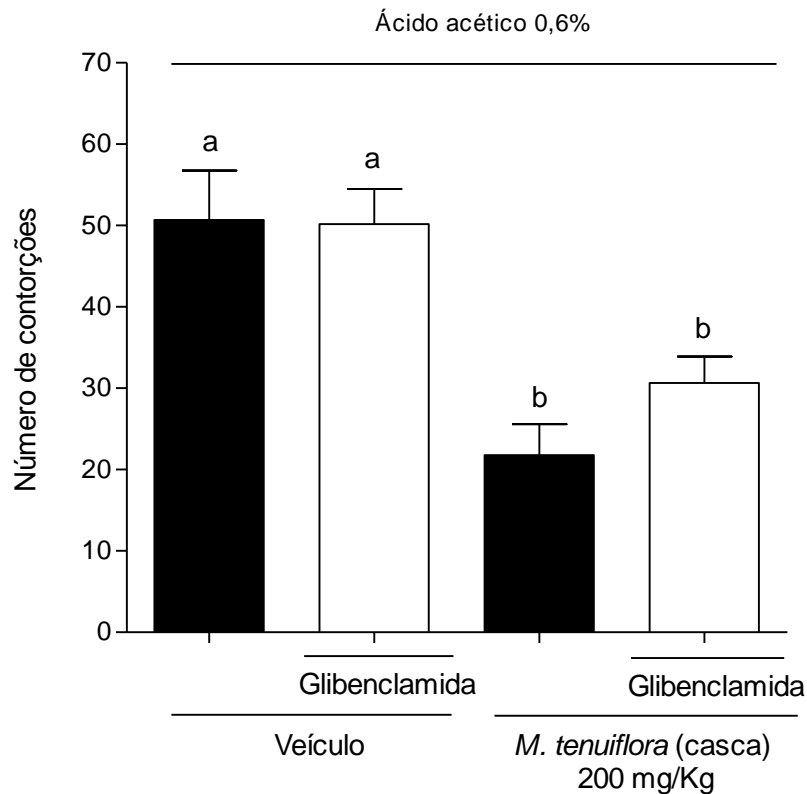
Após análise da atividade anti-inflamatória e antinociceptiva das frações, foi realizada com o extrato etanólico a avaliação dos possíveis mecanismos de ação antinociceptivos, por meio do modelo das contorções abdominais induzidas por ácido acético, utilizando diferentes antagonistas farmacológicos de receptores. A primeira via avaliada foi a via opioide, utilizando a naloxona, um antagonista não seletivo dos receptores opioides. O resultado obtido indica que a atividade antinociceptiva do extrato etanólico da casca da *M. tenuiflora* não está relacionado aos receptores opioides, uma vez que, a naloxona não foi capaz de reverter a resposta antinociceptiva do extrato ( $p > 0,05$ ).



**Figura 6** – Efeito da naloxona sobre a atividade antinociceptiva do extrato etanólico da casca da *M. tenuiflora*. Os animais foram pré-tratados com naloxona por via i.p. antes do tratamento com o extrato etanólico da casca da *M. tenuiflora* (200 mg/kg, s.c.), ou veículo (10% de etanol, v/v, s.c.). Os resultados são apresentados como média  $\pm$  E.P.M. ( $n = 6$ ). A significância estatística foi calculada por meio de ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. Letras diferentes representam diferença estatística ( $p < 0,05$ ). Letras iguais representam semelhança estatística ( $p > 0,05$ ).

A glibenclamida é um inibidor dos canais  $K_{ATP}$ , e ao inibir esse canal promove o aumento da excitabilidade neuronal. Os resultados obtidos indicam, portanto, que a atividade antinociceptiva do extrato etanólico da casca da *M. tenuiflora* não está relacionada à redução

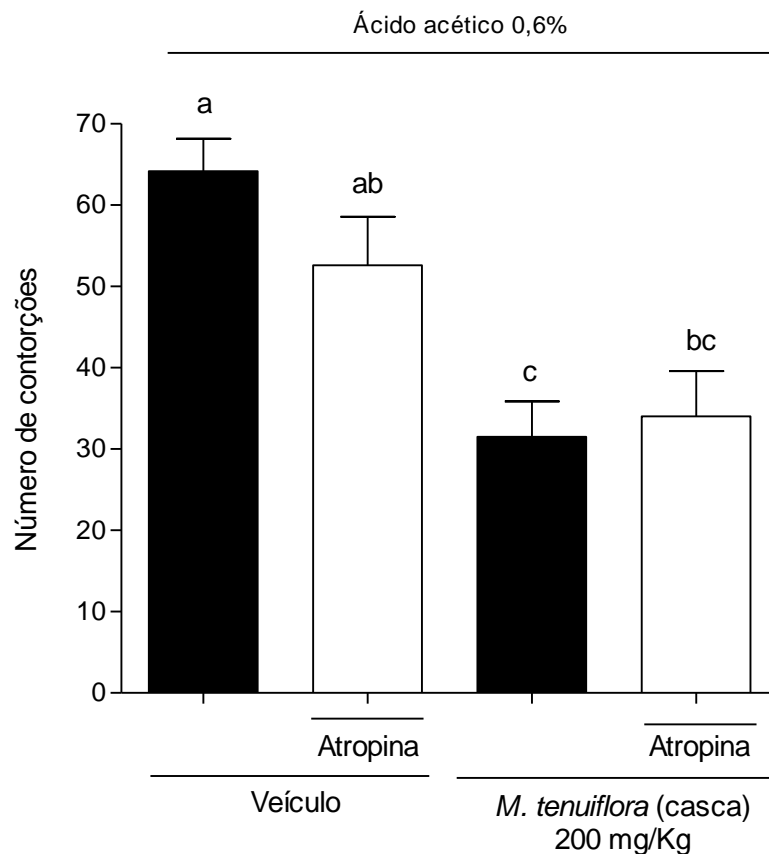
direta da excitabilidade neuronal por ativação dos receptores  $K_{ATP}$ , uma vez que o antagonismo promovido pela glibenclamida não foi capaz de reverter à ação do extrato ( $p > 0,05$ ).



**Figura 7** – Efeito da glibenclamida sobre a atividade antinociceptiva do extrato etanólico da casca da *M. tenuiflora*. Os animais foram pré-tratados com glibenclamida por via i.p. antes do tratamento com o extrato etanólico da casca da *M. tenuiflora* (200 mg/kg, s.c.), ou veículo (10% de etanol, v/v, s.c.). Os resultados são apresentados como média  $\pm$  E.P.M. (n = 6). A significância estatística foi calculada por meio de ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. Letras diferentes representam diferença estatística ( $p < 0,05$ ). Letras iguais representam semelhança estatística ( $p > 0,05$ ).

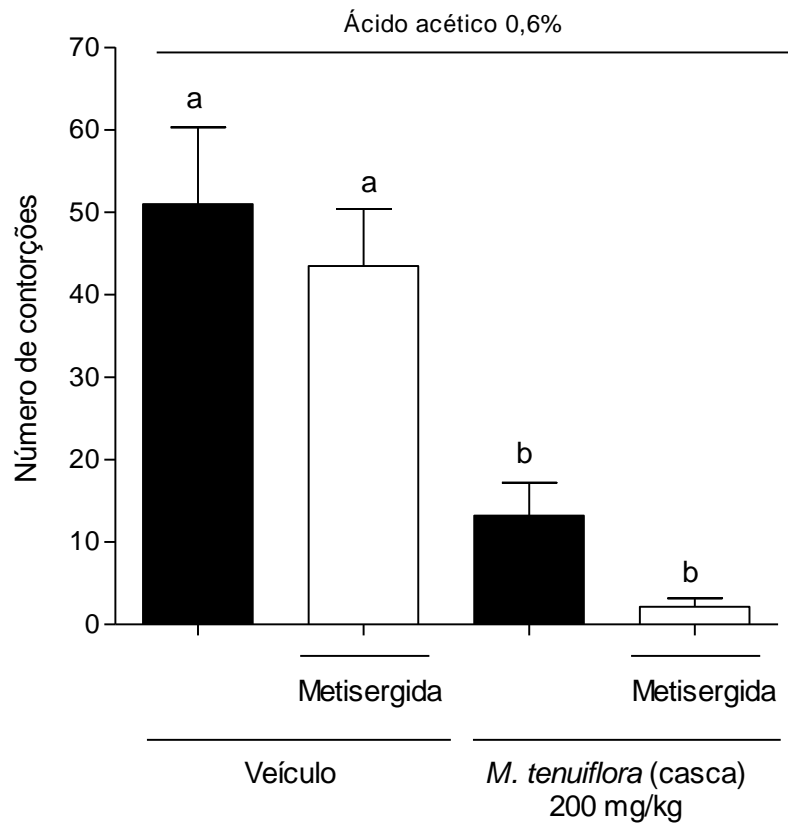
Já a atropina é um antagonista dos receptores muscarínicos. Os resultados obtidos indicam que sua ação não foi capaz de reverter à atividade antinociceptiva do extrato etanólico da casca da *M. tenuiflora* ( $p > 0,05$ ), levando ao entendimento que o mecanismo de ação do extrato não se relaciona a ativação de receptores muscarínicos.





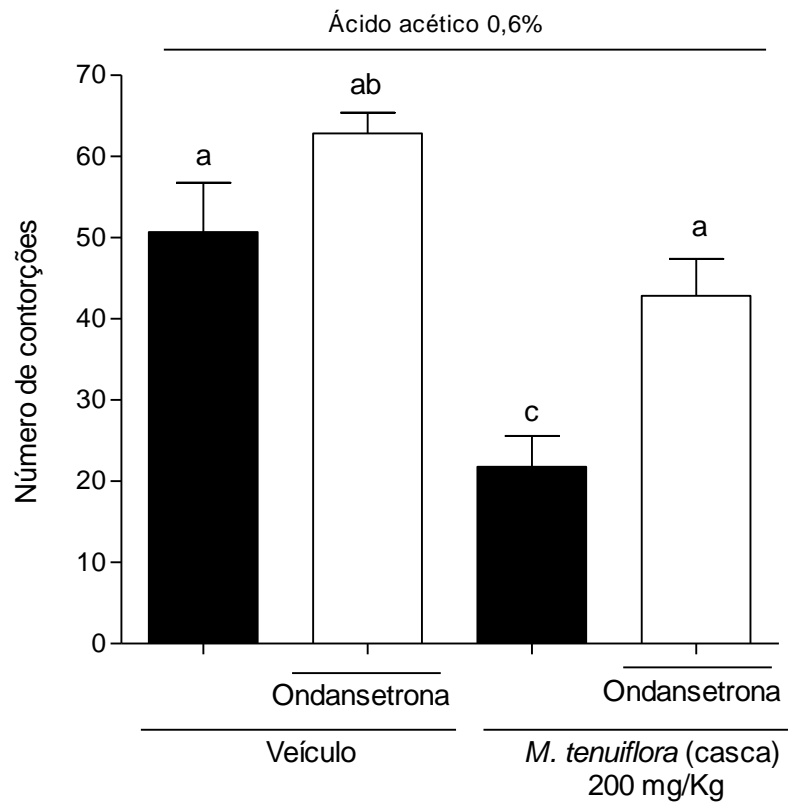
**Figura 8** – Efeito da atropina sobre a atividade antinociceptiva do extrato etanólico da casca da *M. tenuiflora*. Os animais foram pré-tratados com atropina por via i.p. antes do tratamento com o extrato etanólico da casca da *M. tenuiflora* (200 mg/kg, s.c.), ou veículo (10% de etanol, v/v, s.c.). Os resultados são apresentados como média  $\pm$  E.P.M. (n = 6). A significância estatística foi calculada por meio de ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. Letras diferentes representam diferença estatística ( $p < 0,05$ ). Letras iguais representam semelhança estatística ( $p > 0,05$ ).

Quantos as vias serotoninérgicas, a metisergida é um derivado semissintético do alcaloide natural ergometrina que possui potente ação antagonista sobre os receptores 5-HT<sub>2</sub>, subtipo 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub> e 5-HT<sub>2C</sub>, sendo ao mesmo tempo potente agonista de alguns subtipos dos receptores 5-HT<sub>1</sub> (5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, e 5-HT<sub>1D</sub>) (HOYER, et al. 1994; SILBERSTEIN, 1998). A metisergida não foi capaz de reverter à ação antinociceptiva do extrato etanólico da casca da *M. tenuiflora* ( $p > 0,05$ ).



**Figura 9** – Efeito da metisergida sobre a atividade antinociceptiva do extrato etanólico da casca da *M. tenuiflora*. Os animais foram pré-tratados com metisergida por via i.p. antes do tratamento com o extrato etanólico da casca da *Mimosa tenuiflora* (200 mg/kg, s.c.), ou veículo (10% de etanol, v/v, s.c.). Os resultados são apresentados como média ± E.P.M. (n = 6). A significância estatística foi calculada por meio de ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. Letras diferentes representam diferença estatística ( $p < 0,05$ ). Letras iguais representam semelhança estatística ( $p > 0,05$ ).

A Ondansetrona é um antagonista dos receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>3</sub>. Os resultados obtidos indicam que sua ação foi capaz de reverter a atividade antinociceptiva do extrato etanólico da *M. tenuiflora* ( $p < 0,05$ ), levando ao entendimento que o mecanismo de ação do extrato está relacionado ao sistema serotoninérgico envolvendo a ativação dos receptores 5-HT<sub>3</sub>.



**Figura 10** – Efeito da ondansetrona sobre a atividade antinociceptiva do extrato etanólico da casca da *M. tenuiflora*. Os animais foram pré-tratados com ondansetrona por via i.p. antes do tratamento com o extrato etanólico da casca da *Mimosa tenuiflora* (200 mg/kg, s.c.), ou veículo (10% de etanol, v/v, s.c.). Os resultados são apresentados como média  $\pm$  E.P.M. (n = 6). A significância estatística foi calculada por meio de ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni. Letras diferentes representam diferença estatística ( $p < 0,05$ ). Letras iguais representam semelhança estatística ( $p > 0,05$ ).

## 7 DISCUSSÃO

Nesse estudo foi avaliado *in vivo* a atividade anti-inflamatória e antinociceptiva das frações HEX, DIC, AE e BUT da casca da *M. tenuiflora* nativa do semiárido da Bahia, assim como foram avaliados os possíveis mecanismos relacionados à ação farmacológica do extrato etanólico, cujo potencial anti-inflamatório e antinociceptivo foi estudado previamente por Andrade e colaboradores (2012) e Cruz (2013). Desta forma, dando continuidade aos estudos e buscando o aprofundamento do conhecimento sobre a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória de *M. tenuiflora*, foi realizada a análise sequencial das frações quanto ao seu potencial anti-inflamatório e antinociceptivo, o que permite separar grupos de moléculas segundo a sua polaridade e identificar quais grupos podem estar relacionados à atividade medicinal da *M. tenuiflora*, uma vez que, o processo de partição visa uma semipurificação das substâncias através de suas polaridades (CECHINEL FILHO e YUNES, 1998).

O primeiro modelo experimental de atividade antinociceptiva utilizado foi o da nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina. Este teste envolve dor de intensidade moderada e contínua gerada pelo tecido lesionado e é considerado um modelo válido e confiável de nocicepção, sensível para várias classes de fármacos analgésicos uma vez que abrange diferentes mecanismos nociceptivos (HUNSKAAR e HOLE, 1987; TJØLSEN, et al., 1992). Como descrito anteriormente, duas fases distintas podem ser identificadas a partir da injeção da formalina. Uma de 0-5 min provocada pela ação direta da formalina nos nociceptores, e outra com duração de 15-30 min, na qual a resposta parece ser uma combinação do componente inflamatório periférico com mudanças funcionais no corno dorsal da medula espinhal iniciadas na primeira fase (TJØLSEN, et al., 1992).

Os resultados obtidos indicam que as frações HEX, AE e BUT na dose de 100 mg/kg possuem atividade analgésica sobre a primeira fase da formalina, podendo ser levantadas algumas hipóteses sobre seus possíveis mecanismos de ação. O extrato etanólico contém uma ampla variedade de compostos que podem agir em diferentes vias para a promoção da antinocicepção. As frações HEX AE e BUT mostraram atividade antinociceptiva na fase neurogênica do teste da formalina, que pode ser correlacionada tanto com os mecanismos opioides quanto com outras vias, apesar de não ter sido positivo o resultado para a via opioide com o extrato etanólico bruto. Como nas frações há uma maior concentração dos compostos ativos do que no extrato bruto, pode ser que as frações tenham compostos com atividade opioide, já que também não foi observado atividade do extrato etanólico nas doses de 50, 100

e 200 mg/kg na fase neurogênica, testado anteriormente por Cruz (2013). Assim, no extrato bruto esses compostos com atividade opioide podem estar presentes em concentrações mais baixas, insuficientes para exibirem resultado positivo na dose de 200 mg/kg. Para comprovar esta hipótese, mais testes devem ser realizados envolvendo a interação entre a naloxona e as frações de HEX, AE e BUT.

Se estes compostos estiverem agindo por mecanismos opioides, são capazes de modular a percepção do estímulo através da interação com seus receptores no sistema nervoso central, sendo efetivos em eliminar a dor associada à fase precoce. Outras possibilidades podem envolver o bloqueio dos receptores de bradicinina ou o antagonismo direto dos receptores TRPA-1, impedindo a ativação dos mesmos pela formalina e consequentemente o disparo das fibras C. Dessa forma, as frações impediriam o aumento da excitação neuronal promovido pela formalina.

Já na segunda fase, todas as frações testadas (HEX, DIC, AE e BUT) foram capazes de reduzir o comportamento nociceptivo, apresentando potencial analgésico sobre a dor de origem inflamatória. Além disso, a ação antinociceptiva exibida pelas frações apresentou desempenho semelhante ao dos fármacos de referência, morfina e indometacina. A morfina é eficiente em reduzir, não apenas a primeira, mas também a segunda fase da nocicepção, visto que, fármacos opioides podem estar envolvidos na modulação das alterações funcionais no corno dorsal da medula espinhal, que parecem ocorrer durante a segunda fase da nocicepção evocada pela formalina (MATHIAZHAGAN, ANAND, PARTHIBAN, 2014), enquanto a indometacina atua especificamente sobre a segunda fase da nocicepção por inibir a formação de prostaglandinas que são parcialmente responsáveis pelo comportamento nociceptivo desta fase (HUNSKAAR e HOLE, 1987).

Além das prostaglandinas, segundo o descrito por Shibata e colaboradores (1989), outros mediadores inflamatórios participam da segunda fase da nocicepção induzida pela formalina, sendo estes mediadores a histamina, a 5-HT e a bradicinina, podendo as frações serem ativas sobre a diminuição da produção ou da ação desses mediadores.

Quando avaliado a formação de edema, verificou-se que a fração AE foi capaz de promover a redução do mesmo. O edema é causado pelo fluxo de fluido rico em proteína do compartimento intravascular para o interstício, como resultado das ações da histamina, da bradicinina, dos leucotrienos, do fator ativador de plaquetas, de neuropeptídeos, como a substância P e da 5-HT atuando nos seus diferentes subtipos de receptor. (DOAK e SAWYNOK, 1997, SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004). Além desses mediadores,

ocorre também participação das prostaglandinas no edema causado pela formalina, já que o emprego da indometacina reduziu a formação do edema de maneira significativa, sendo a ação da fração AE semelhante à exibida pela indometacina.

Dessa forma, os resultados mostraram que as frações HEX, AE e BUT da *M. tenuiflora* na dose de 100 mg/kg possuem atividade sobre a nocicepção neurogênica, mas principalmente sobre a nocicepção inflamatória, uma vez que mostraram na segunda fase do teste da formalina, assim como a fração DIC, desempenho antinociceptivo similar ao da morfina e ao da indometacina, que são as drogas consideradas, até o momento, as mais importantes e utilizadas para o tratamento da dor e da inflamação, mas que por apresentarem vários efeitos adversos (ANGST e CLARK, 2006; ONG, et al, 2007), necessitam de substitutos à altura de sua eficácia para o tratamento da dor. Além disso, a fração AE também foi capaz de reduzir o edema sugerindo uma ação sobre os mediadores inflamatórios envolvidos na formação do edema.

A resposta antinociceptiva das quatro frações da *M. tenuiflora* comparável a da morfina e a da indometacina, no teste da formalina, aponta para um potencial promissor dessa espécie vegetal para desenvolvimento de um novo fitoterápico de ação analgésica, mas novos testes pré-clínicos ainda devem ser realizados, visando conhecer o perfil e intensidade de efeitos adversos para que esse potencial possa ser firmado e direcionado para as etapas seguintes dos estudos necessários para o desenvolvimento de um novo fitoterápico.

Dando continuidade à investigação das propriedades medicinais da *M. tenuiflora*, foi realizado o teste do recrutamento de leucócitos induzido pela carragenina para a cavidade peritoneal, visando avaliar o potencial anti-inflamatório de suas frações. Os leucócitos polimorfonucleares são munidos com um poderoso arsenal de agentes bactericidas que permitem que estas células desempenhem um papel vital na defesa do hospedeiro contra agentes patogênicos invasores. No entanto, estes mesmos agentes podem produzir danos celulares nos tecidos do hospedeiro, quando são ativados durante condições inflamatórias. Assim, respostas descontroladas partindo dos neutrófilos podem exacerbar, e até mesmo causar doenças autoimunes e inflamatórias (KORTHUIS, ANDERSON E GRANGER, 1994; AMULIC, et al., 2012).

Assim, o recrutamento de leucócitos para o sítio inflamatório contribui para o desenvolvimento da lesão tecidual associado às doenças inflamatórias, e a primeira etapa na patogênese dessas condições está relacionada à adesão dos leucócitos às células endoteliais e sua subsequente transmigração. Durante esse processo, estas células liberam uma variedade

de substâncias tais como fatores de crescimento, quimiocinas e citocinas, componentes do complemento, proteases, óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio, que são consideradas algumas das principais fontes de lesão tecidual (CROCKETT-TORABI E WARD, 1996). Desta forma, diminuir a migração de neutrófilos para o local de lesão é uma importante ferramenta pra controlar o desenvolvimento do processo inflamatório.

Cruz (2013) observou atividade anti-inflamatória somente para a fração HEX na dose de 200 mg/kg, e verificou que o extrato etanólico da *M. tenuiflora*, na dose de 100 mg/kg, promove a redução da expressão de ICAM-1 no mesentério de camundongos comparado ao grupo carragenina, analisado através da técnica *Western blot*. Havia uma tendência de redução da migração de neutrófilos para a fração AE com a diminuição da dose, pois não apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao controle. Por isso, foram testadas doses menores das frações, e a fração AE, na dose de 50 mg/kg, apresentou redução da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal. Esse resultado deve ser analisado de forma conjunta com os resultados obtidos por Cruz (2013), uma vez que são resultados complementares entre si. Assim as frações AE e HEX reúnem as moléculas responsáveis pelo perfil anti-inflamatório da *M. tenuiflora*, cujos compostos ativos atuam reduzindo a expressão da ICAM-1 e, portanto reduzindo a taxa de adesão, visto que a ligação da  $\beta$ 2-integrinas LFA-1 à ICAM-1 é essencial para a firme adesão durante processo de transmigração.

Além do controle da migração de leucócitos, o controle da resposta vascular também é relevante nos estados inflamatórios. Nos vasos sanguíneos intactos, o endotélio forma uma barreira cuja permeabilidade é altamente regulada. Em resposta a um estímulo inflamatório, esta barreira se torna menos restritiva, resultando no aumento da permeabilidade a água e macromoléculas, e permitindo que anticorpos e componentes do sistema complemento, tenham acesso aos tecidos lesionados ou infectados. Esse aumento da permeabilidade é mediado pela exposição aguda ou crônica a agente permeabilizantes, particularmente ao fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF, VEGF-A). Contudo, existem muitas situações nas quais a permeabilidade vascular excessiva desempenha um papel significante na lesão tecidual e na falência de órgãos (STEVENS, et al., 2000; STOCKTON, et al., 2007; NAGY, et al., 2008).

No teste de avaliação da permeabilidade vascular – azul de Evans, onde a permeabilidade é definida como a quantidade do complexo de albumina-corante que extravasa para o peritônio, a fração DIC conseguiu limitar o acúmulo de exsudato na cavidade peritoneal. Assim, enquanto as frações AE e HEX da casca da *M. tenuiflora* atuam sobre o

componente celular da inflamação, a fração DIC parece agir sobre o componente vascular, reduzindo a hiperpermeabilidade provocada pela Cg.

Posteriormente foi avaliado a influência das frações da *M. tenuiflora* sobre a hipernocicepção mecânica em camundongos, através da técnica do Von Frey eletrônico. Essa técnica detecta a hipernocicepção inflamatória e permite verificar se a droga em teste é capaz de prevenir seu desenvolvimento (bloqueio da hipernocicepção mediada pela Cg), sendo considerada uma técnica útil para o desenvolvimento de novos analgésicos, assim como para a investigação dos mecanismos inflamatórios da dor (CUNHA, et al., 2004).

A dor inflamatória é caracterizada pelo aumento da resposta ao estímulo mecânico, assim como ao estímulo térmico. Após a injúria tecidual mediadores são gerados a partir da circulação (ex. bradicinina) e dos leucócitos residentes. A resposta inflamatória é amplificada pela migração de leucócitos para o tecido inflamado, assim como pela produção de mediadores inflamatórios, incluindo citocinas, leucotrienos, prostaglandinas, e também pela acidificação do tecido. TNF, IL-6, IL-1 e bradicinina podem atuar com efeitos hiperalgésicos diretos sobre os nociceptores (RITTNER, MACHELSKA, STEIN, 2005).

No modelo de hiperalgésia inflamatória mecânica em camundongo, a resposta estimulada por Cg ocorre a partir da liberação de bradicinina, via ativação do receptor B1 e B2, que estimula a produção de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , que por sua vez estimulam a produção de prostaglandinas. Em camundongos a produção de prostaglandinas pode ainda ser estimulada diretamente pela bradicinina. Adicionalmente, a Cg promove a produção de CXCL1 (correspondente nos camundongos da CXCL8 ou IL-8 nos humanos) que estimula a produção de aminas simpáticas (POOLE, et al., 1999; CUNHA, et al., 2005).

Os resultados obtidos com as frações da *M. tenuiflora* mostram que as frações HEX, AE e BUT promoveram o bloqueio da hipernocicepção mediada pela Cg, mostrando o potencial analgésico dessas frações. A fração DIC, contudo, mostrou atividade pró-algésica no modelo de hiperalgésia inflamatória em contraste com o resultado obtido para a segunda fase do comportamento nociceptivo evocado pela formalina, no qual essa fração reduziu o comportamento nociceptivo estereotipado nos camundongos. Essa diferença de resultado quanto à avaliação do potencial analgésico da fração DIC pode estar relacionada a diferenças nos mecanismos desencadeados pelos dois estímulos algícos, já que a nocicepção na segunda fase da formalina é uma associação de eventos inflamatórios com eventos de sensibilização



central iniciados na primeira fase (TJØLSEN, et al., 1992; MATHIAZHAGAN, ANAND, PARTHIBAN, 2014).

Assim, é possível que no teste da formalina a atividade antinociceptiva da fração DIC esteja ocorrendo principalmente sobre os eventos de sensibilização central, mascarando sua ausência de ação em relação os eventos inflamatórios que sensibilizam os nociceptores periféricos, pois no Von Frey eletrônico, se avalia necessariamente a hipernocicepção inflamatória.

Para as demais frações HEX, AE e BUT, foi verificada uma excelente atividade sobre a hipernocicepção inflamatória, ressaltando seus potenciais como analgésicos, o que é de grande relevância, visto que a dor inflamatória é um componente marcante de muitas doenças crônicas. Estas três frações foram as que apresentaram os melhores resultados nos ensaios realizados, exibindo ação sobre a nocicepção, sobre a hipernocicepção inflamatória e sobre o componente celular da inflamação. Um fator limitante para a continuidade dos estudos é o baixo rendimento da fração HEX (2,44 %), o que dificulta a obtenção de quantidade viável para realização da identificação de compostos bioativos e elucidação do mecanismo de ação. Já as frações AE e BUT apresentam um ótimo rendimento, sendo de 47,19% e 27, 44% respectivamente.

Visando iniciar a compreensão dos mecanismos envolvidos na atividade anti-inflamatória e analgésica do extrato etanólico da casca da *M. tenuiflora*, foram administrados no modelo das contorções abdominais induzidas por ácido acético, os fármacos: naloxona; glibenclamida; metisergida; ondansetrona e atropina, todos, antagonistas de receptores relacionados à nocicepção.

A partir desse ensaio nossos resultados sugeriram que a atividade analgésica do extrato etanólico da casca da *M. tenuiflora* está associada, pelo menos em parte, ao sistema serotoninérgico, visto que o pré-tratamento com a ondansetrona, um antagonista dos receptores 5-HT<sub>3</sub>, reverteu à atividade antinociceptiva apresentada pelo extrato etanólico. As demais vias testadas não apresentaram influência sobre a ação do extrato etanólico. No entanto, como foram realizados testes com o extrato etanólico, não se deve descartar a realização posterior de testes com as subfrações ou compostos ativos, a fim de comparar e confirmar os resultados obtidos previamente.

O estudo da ação da *M. tenuiflora* sobre a via serotoninérgica se torna relevante, dentre outros motivos, devido aos registros na literatura da presença do alcaloide indólico N, N-

dimetiltryptamina (DMT) na casca dessa planta (VEPSÄLÄINEN, et al., 2005, SOUZA *et. al.*, 2008). Esse alcaloide tem ação serotoninérgica, porém a sua ação agonista ou antagonista sobre os subtipos de receptores de 5-HT ainda não está bem esclarecida. Enquanto Deliganis, Pierce e Peroutka (1991) sugeriram que a DMT exibe atividade agonista nos receptores 5-HT<sub>1A</sub> e antagonista nos receptores 5-HT<sub>2</sub>, Smith e colaboradores (1998) sugeriram atividade agonista para os receptores 5-HT<sub>2A</sub> e 5-HT<sub>2c</sub>, o que é mais coerente e atualmente aceito, no que diz respeito a sua ação sobre 5-HT<sub>2</sub>, devido a psicoatividade exibida por esse alcaloide.

Contudo, no presente trabalho, a investigação farmacológica é desenvolvida sobre o extrato da planta rico em diferentes compostos que podem estar atuando em conjunto (efeito sinérgico) ou isoladamente para conferir as propriedades anti-inflamatórias e analgésicas da *M. tenuiflora*. Como a metisergida é um potente antagonista dos receptores 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub> e 5-HT<sub>2C</sub>, é provável que a atividade analgésica da *M. tenuiflora* não esteja relacionada à mesma molécula que lhe confere a psicoatividade. Além disso, o emprego da metisergida causou uma potencialização do efeito do extrato, mas não suficiente para apresentar diferença estatística entre o grupo extrato e extrato mais metisergida, que poderia estar ocorrendo via modulação dos receptores 5-HT<sub>1</sub>.

Assim, testes futuros com antagonistas 5-HT específicos podem gerar maiores esclarecimentos sobre a ação do extrato etanólico da *M. tenuiflora* no sistema serotoninérgico. Contudo, os resultados obtidos até aqui, sugerem que o extrato da *M. tenuiflora* promove sua ação, pelo menos em parte, através da modulação dos receptores 5-HT<sub>3</sub>. É possível que essa modulação esteja ocorrendo sobre os receptores 5-HT<sub>3</sub>, na medula espinhal, visto que estes receptores estão envolvidos na modulação inibitória das vias descendentes, e que a estimulação destes receptores na medula espinhal reduz ambas as fases do comportamento nociceptivo provocado pela formalina (SASAKI, et al., 2001), assim como desempenham papel antinociceptivo na hipernocicepção mecânica (BARDIN, LAVARENNE e ESCHALIER, 2000), ambos, testes sobre os quais os extratos da *M. tenuiflora* demonstraram ótima atividade antinociceptiva.

Embora as demais drogas antagonistas testadas não tenham revelado interferência na atividade antinociceptiva do extrato etanólico da *M. tenuiflora*, pautado nos resultados obtidos com as frações HEX e BUT durante a fase precoce da nocicepção induzida pela formalina, sugere-se que a via opioide não seja totalmente descartada, visto que fármacos opioides são as principais drogas conhecidas como capazes de reverter à primeira fase do teste da formalina.

Assim, é possível que existam compostos com ações opioides no extrato etanólico da casca, cuja atividade só pôde ser acessada mediante o fracionamento do mesmo, e aumento das suas concentrações. Também não pode ser descartada a possibilidade de antagonismo de compostos presentes no extrato etanólico, sendo perdido esse efeito com a separação dos componentes químicos no fracionamento.

Por fim, como uma análise complementar, foi analisado no extrato etanólico da *M. tenuiflora* a presença de alguns grupos químicos com potencial farmacológico. O ensaio fitoquímico qualitativo realizado identificou na casca da *M. tenuiflora*: polifenóis, flavonoides, saponinas e alcaloides. Esses grupos químicos apresentam relevância dentro do objetivo desse estudo. Polifenóis, dentre eles flavonoides, tem sido muito apontados na literatura como moléculas possuidoras de significativa atividade anti-inflamatória (GONZÁLEZ, et al., 2011), assim como saponinas, que dentre várias outras propriedades farmacológicas, exibem atividade anti-inflamatória e analgésica (WANG, et al., 2008), e também os alcaloides de origem natural que já foram protótipos para o desenvolvimento de várias drogas (ELIEZER, BARREIRO E BOLZANI, 2009), apresentando um histórico de extrema relevância no desenvolvimento de analgésicos como descrito por Radulovic e colaboradores (2013).

Desta forma, novos estudos devem ser realizados para buscar o isolamento e a identificação desses agentes farmacológicos, assim como, elucidar esses possíveis mecanismos de ação e de sinergismo.

## 8 CONCLUSÃO

A casca da *M. tenuiflora* demonstrou pronunciada atividade antinociceptiva e anti-inflamatória, sendo que as frações HEX, AE e BUT são as principais responsáveis por essa atividade. A fração DIC também apresentou resposta antinociceptiva e ação sobre o componente vascular da inflamação, mas não apresentou atividade anti-inflamatória e antinociceptiva uniforme em todos os testes. Também foi demonstrado que o sistema serotoninérgico está envolvido no mecanismo de ação da atividade analgésica do extrato etanólico da casca, via modulação dos receptores 5-HT<sub>3</sub>, embora outros receptores 5-HT possam estar envolvidos. Novos experimentos devem ser realizados futuramente para maior esclarecimento do mecanismo de ação do extrato etanólico e de seus compostos bioativos, e também para as frações HEX, AE e BUT que apresentaram provável ação analgésica central. Desta forma, este estudo foi um grande passo em direção à compreensão dos mecanismos de ação e grupos de compostos farmacológicos responsáveis pela atividade analgésica e anti-inflamatória da casca da *M. tenuiflora*, uma planta nativa do semiárido brasileiro, utilizada pela população local para tratamento de feridas, com um forte potencial terapêutico para o tratamento da dor e a inflamação.

## REFERÊNCIAS

- ABRAHAMSEN, B; et al. The cell and molecular basis of mechanical, cold, and inflammatory pain. **Science**. 321(5889): 702-5, 2008.
- AKROUH, A; et al. Molecular biology of K(ATP) channels and implications for health and disease. **IUBMB Life**. 61(10): 971-8, 2009.
- ALBUQUERQUE, U. P; ANDRADE, L. H. C. Uso de recursos vegetais da caatinga: o caso do agreste do estado de Pernambuco (Nordeste do Brasil). **Interciencia**. 27(7): 336-345, 2002.
- ALBUQUERQUE, U. P; et al. Medicinal plants of the caatinga (semi-arid) vegetation of NE Brazil: A quantitative approach. **J Ethnopharmacol** 114(3): 325-354, 2007.
- ALMEIDA, E. R, et al. Central antinociceptive effect of a hydroalcoholic extract of *Dioclea grandiflora* seeds in rodents. **J Ethnopharmacol**. 88(1): 1-4, 2003.
- AMULIC, B; ET AL. Neutrophil Function: From Mechanisms to Disease. **Annu. Rev. Immunol**. 30: 459-489, 2012.
- ANDRADE, C. M. F; et al. Evaluation of anti-inflammatory and antinociceptive activity of *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir. (Jurema Preta) collected in semi-arid region of Bahia. 1-18, 2012. Unpublished.
- ANGST, M. S; CLARK, J. D. Opioid-induced hyperalgesia: a qualitative systematic review. **Anesthesiology**. 104(3): 570-87, 2006.
- ANTÓN, R; et al. Pharmacognosy of *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret. **J Ethnopharmacol**. 38(2-3): 153-7, 1993.
- AOKI, T; NARUMIYA, S. Prostaglandins and chronic inflammation. **Trends Pharmacol Sci**. 33(6): 304-11, 2012.
- BARDIN, L; LAVARENNE, J; ESCHALIER, A. Serotonin receptor subtypes involved in the spinal antinociceptive effect of 5-HT in rats. **Pain**. 86(1-2): 11-8, 2000.
- BARNES, N. M, SHARP, T. A review of central 5-HT receptors and their function. **Neuropharmacology**. 38(8): 1083–152, 1999.
- BARNES, P. J. Glucocorticosteroids: current and future directions. **Br J Pharmacol**. 163(1): 29-43, 2011.
- BARTOLINI, A; MANNELLI, L. D. C; GHELARDINI, C. Analgesic and Antineuropathic Drugs Acting Through Central Cholinergic Mechanisms. **Recent Pat CNS Drug Discov**. 6(2): 119–140, 2011.
- BASBAUM, A. I; et al. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**. 139(2): 267-84, 2009.

BASBAUM, A. I; FIELDS, H, L. Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. **Annu Rev Neurosci.** 7: 309-38, 1984.

BAUTISTA, D. M; et al. TRPA1 mediates the inflammatory actions of environmental irritants and proalgesic agents. **Cell.** 124(6): 1269-82, 2006.

BAUTISTA, D. M; PELLEGRINO, M; TSUNOZAKI, M. TRPA1: A gatekeeper for inflammation. **Annu Rev Physiol.** 75: 181-200, 2013.

BEG, S; et al. Systematic review of herbals as potential anti-inflammatory agents: Recent advances, current clinical status and future perspectives. **Pharmacogn Rev.** 5(10): 120–137, 2011.

BELL, T. J; et al. Cell-specific alternative splicing increases calcium channel current density in the pain pathway. **Neuron.** 41(1): 127-38, 2004.

BENYAMIN, R; et al. Opioid complications and side effects. **Pain Physician.** 11(2): S105-20, 2008.

BERKENKOPF, J. W; WEICHMAN, B. M. Production of prostacyclin in mice following intraperitoneal injection of acetic acid, phenylbenzoquinone and zymosan: its role in the writhing response. **Prostaglandins.** 36(5): 693-709, 1988.

BITENCOURT, M. A. Neutralizing effects of *Mimosa tenuiflora* extracts against inflammation caused by *Tityus serrulatus* scorpion venom. **Biomed Res Int.** 2014: 378235, 2014

BORTHAKUR, A; et al. Prolongation of Carrageenan-induced Inflammation in Human Colonic Epithelial Cells by Activation of an NF $\kappa$ B – BCL10 Loop. **Biochim Biophys Acta.** 1822(8): 1300–1307, 2012.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa nº 5, de 11 de dezembro de 2008. Lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado. Disponível em: < <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/fitoterapicos/index.htm>>. Acesso em: 11 de maio de 2015.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Biodiversidade brasileira: Avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade nos biomas brasileiros. Secretaria de biodiversidade e florestas, Brasília, DF: 2002. 404 p. Disponível em: < [http://www.biodiversidade.rs.gov.br/arquivos/BiodiversidadeBrasileira\\_MMA.pdf](http://www.biodiversidade.rs.gov.br/arquivos/BiodiversidadeBrasileira_MMA.pdf)>. Acesso em: 11 de maio de 2015.

BRISKIN, D. P. Medicinal plants and phytomedicines. Linking plant biochemistry and physiology to human health. **Plant Physiol.** 124(2): 507–514, 2000

BROSSI, A. The Alkaloids: Chemistry and Physiology, Volume 32, Academic Press Inc, EUA. 454 pp., 1988.

CALIXTO, J. B, et al. Biological activity of plant extracts: novel analgesic drugs. **Expert Opin Emerg Drugs.** 6(2): 261-79, 2001.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Braz J Med Biol Res.** 33(2): 179-89, 2000.

CALIXTO, J. B; et al. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. **Planta Med.** 70(2): 93-103, 2004.

CAMARGO-RICALDE, S.L. Descripción, distribución, anatomía, composición química y usos de *Mimosa tenuiflora* (Fabaceae-Mimosoideae) em México. **Rev. Biol. Trop.** 48(4): 1-23, 2000.

CECHINEL FILHO, V; YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Quím. Nova.** 21(1): 99-105, 1998.

CHEN, G. Y; NUÑEZ, G. Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. **Nat Rev Immunol.** 10(12): 826-37, 2010.

CHEN, Y. P; CHEN, S. R; PAN, H. L. Systemic morphine inhibits dorsal horn projection neurons through spinal cholinergic system independent of descending pathways. **J Pharmacol Exp Ther.** 314(2): 611-7, 2005.

CHOI, J; et al. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of the saponin and sapogenins obtained from the stem of *Akebia quinata*. **J Med Food.** 8(1): 78-85, 2005.

CHOI, S; et al. Attenuated pain responses in mice lacking Ca(V)<sub>3.2</sub> T-type channels. **Genes Brain Behav.** 6(5): 425-31, 2007.

CLARDY, J.; WALSH, C. Lessons from natural molecules. **Nature.** 432(7019): 829-837, 2004.

CORRÊA, M. F. P; MELO, G. O. de; COSTA, S. S. Substâncias de origem vegetal potencialmente úteis na terapia da asma. **Rev. bras. farmacogn.** 18(0): 785-797, 2008.

CORREA, C. R; CALIXTO, J. B. Evidence for participation of B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> kinin receptors in formalin-induced nociceptive response in the mouse. **Br J Pharmacol.** 110(1): 193-198, 1993.

COSTA-NETO CM; et al. Participation of kallikrein-kinin system in different pathologies. **Int Immunopharmacol.** 8(2): 135-42, 2008.

COSTIGAN, M; SCHOLZ, J; WOOLF, C. J. Neuropathic Pain: A Maladaptive Response of the Nervous System to Damage. **Annu Rev Neurosci.** 32: 1-32, 2009.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoides: Potenciais Agentes Terapêuticos para o Processo Inflamatório. **Rev. Virtual Quim.** 1(3): 241-256, 2009.

COUTURE, R; et al. Kinin receptors in pain and inflammation. **Eur J Pharmacol.** 429(1-3): 161-76, 2001.

CROCKETT-TORABI, E; WARD, P. A. The role of leukocytes in tissue injury. **Eur J Anaesthesiol.** 13(3): 235-46, 1996.

CRUVINEL, W. de M; et al. Sistema imunitário: Parte I. Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Rev. Bras. Reumatol.** 50(4): 434-447, 2010.

CRUZ, M. P. **Isolamento e identificação de compostos bioativos de *mimosa hostilis* Benth.** 2013. 2014 f. Tese (Doutorado) - Universidade Federal da Bahia, Instituto de Química, Salvador, 2013.

CUNHA, F. Q; et al. The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. **Br J Pharmacol.** 107(3): 660–664, 1992.

CUNHA, T. M; et al. An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. **Braz J Med Biol Res.** 37(3): 401-7, 2004.

CUNHA, T. M; et al. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 102(5): 1755-60, 2005.

DELIGANIS, A. V; PIERCE, P.A; PEROUTKA, S. J. Differential interactions of dimethyltryptamine (DMT) with 5-HT1A and 5-HT2 receptors. **Biochem Pharmacol.** 41(11): 1739-44, 1991 Jun 1.

DI ROSA, M; SORRENTINO, L. Some pharmacodynamic properties of carrageenin in the rat. **Br J Pharmacol.** 38(1): 214-20, 1970.

DOAK, G. J; SAWYNOK, J. Formalin-induced nociceptive behavior and edema: involvement of multiple peripheral 5-hydroxytryptamine receptor subtypes. **Neuroscience.** 80(3): 939-49, 1997.

DRAY, A. Inflammatory mediators of pain. **Br. J. Anaesth.** 75(2): 125–131, 1995.

DU, X; GAMPER, N. Potassium channels in peripheral pain pathways: expression, function and therapeutic potential. **Curr Neuropharmacol.** 11(6): 621-40, 2013.

Du, X; WANG, C; ZHANG, H. Activation of ATP-sensitive potassium channels antagonize nociceptive behavior and hyperexcitability of DRG neurons from rats. **Mol Pain.** 7: 35, 2011

DUARTE, J. C; et al. Estudo etnofarmacológico e etnobotânico das plantas medicinais na região do semi-árido da Bahia. In: XX Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil e X International Congress o Ethnopharmacology, 2008, São Paulo. **Anais ...** São Paulo, 2008. 1 CD-ROM.

DUBIN, A. E.; PATAPOUTIAN, A. Nociceptors: the sensors of the pain pathway. **J Clin Invest.** 120(11): 3760-72, 2010.

EIDE, P. K; HOLE, K. The role of 5-hydroxytryptamine (5-HT) receptor subtypes and plasticity in the 5-HT systems in the regulation of nociceptive sensitivity. **Cephalalgia.** 13(2): 75-85, 1993.

EISENACH, J. C. Muscarinic-mediated analgesia. **Life Sci.** 64(6-7): 549-54, 1999.



- EKOR, M. The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. **Front Pharmacol.** 4: 177, 2013.
- ELIEZER J. BARREIRO, E. J; BOLZANI, V. da S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármaco. **Quim. Nova.** 32(3): 679-688, 2009.
- FABRICANT, D. S; FARNSWORTH, N. R. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. **Environ Health Perspect.** 109(1): 69–75, 2001.
- FERNANDES, V. J; et al. Link between chronic inflammation and human papillomavirus-induced carcinogenesis (Review). **Oncol Lett.** 9(3): 1015-1026, 2015.
- FERREIRA, J; et al. The use of kinin B1 and B2 receptor knockout mice and selective antagonists to characterize the nociceptive responses caused by kinins at the spinal level. **Neuropharmacology.** 43(7): 1188-97, 2002.
- FERREIRA, J. The role of kinin B1 receptors in the nociception produced by peripheral protein kinase C activation in mice. **Neuropharmacology.** 54: 597–604, 2008.
- FUNK, C. D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. **Science.** 294(5548): 1871-5, 2001.
- GHELARDINI, C; et al. Central cholinergic antinociception induced by 5HT4 agonists: BIMU 1 and BIMU 8. **Life Sci.** 58(25): 2297-309, 1996.
- GIORDANO, J; SCHULTEA, T. Serotonin 5-HT(3) receptor mediation of pain and anti-nociception: implications for clinical therapeutics. **Pain Physician.** 7(1): 141-7. 2004.
- GOEIJ, M. de; et al. Systemic Inflammation Decreases Pain Threshold in Humans In Vivo. **PLoS One.** 8(12): e84159, 2013.
- GOLIAS, Ch; et al. The kinin system - bradykinin: biological effects and clinical implications. Multiple role of the kinin system – bradykinin. **Hippokratia.** 11(3): 124–128, 2007.
- GONZÁLEZ, R; et al. Effects of flavonoids and other polyphenols on inflammation. **Crit Rev Food Sci Nutr.** 51(4): 331-62, 2011.
- GRANADOS-SOTO, V; et al. The role of peripheral 5-HT1A, 5-HT1B, 5-HT1D, 5-HT1E and 5-HT1F serotonergic receptors in the reduction of nociception in rats. **Neuroscience.** 165(2): 561–8, 2010.
- GRANGEIRO, N. M. G. C; et al. Enzimas Ciclooxygenases 1 e 2: Inflamação e GastroCardio proteção. **Rev. Eletr. Pesq. Med.** 2(3): 13-20, 2008.
- HANNON, J; HOYER, D. Molecular biology of 5-HT receptors. **Behav Brain Res.** 195(1): 198-213, 2008.
- HOLDEN, J. E; JEONG, Y; FORREST, J. M. The endogenous opioid system and clinical pain management. **AACN Clin Issues.** 16(3): 291-301, 2005.

- HOYER, D; et al. International Union of Pharmacology classification of receptors for 5-hydroxytryptamine (serotonin). **Pharmacol Rev.** 46(2): 157–203, 1994.
- HOYER, D; HANNON, J. P; MARTIN, G. R. Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. **Pharmacol Biochem Behav.** 71(4): 533-54, 2002.
- HUNSKAAR, S, HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain.** 30(1): 103-14, 1987.
- HUNTER, D. J; MCDOUGALL, J. J; KEEFE, F. J. The symptoms of OA and the genesis of pain. **Rheum Dis Clin North Am.** 34(3): 623–643, 2008.
- HUSSAIN, M. S; et al. Current approaches toward production of secondary plant metabolites. *J Pharm Bioallied Sci.* 4(1): 10–20, 2012.
- HYLDEN, J. L; WILCOX, G. L. Intrathecal serotonin in mice: analgesia and inhibition of a spinal action of substance P. **Life Sci.** 33(8): 789-95, 1983.
- IASP- International Association for the Atudy of Pain. Disponível em < <http://www.iasp-pain.org/>. Acesso em 23 mar. 2015.
- IKEDA, Y; et al. Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanoids in the acid-induced writhing responses of mice. **Life Sci.** 69(24): 2911-9, 2001.
- IM, H-J, et al. Alteration of sensory neurons and spinal response to an experimental osteoarthritis pain model. *Arthritis Rheum.* 62(10): 2995-3005, 2010.
- JEONG, H. J; MITCHELL, V. A; VAUGHAN, C. W. Role of 5-HT(1) receptor subtypes in the modulation of pain and synaptic transmission in rat spinal superficial dorsal horn. **Br J Pharmacol.** 165(6): 1956-65, 2012.
- JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature.** 413(6852): 203-10, 2001.
- JÜRGENSEN, S; et al. Involvement of 5-HT<sub>2</sub> receptors in the antinociceptive effect of *Uncaria tomentosa*. **Pharmacol Biochem Behav.** 81(3): 466-77, 2005.
- KOLACZKOWSKA, E; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nat Rev Immunol.** 13(3): 159-75, 2013.
- KONO, H; ROCK, K. L. How dying cells alert the immune system to danger. **Nat Rev Immunol.** 8(4): 279–289, 2008.
- KORTHUIS, R. J; ANDERSON, D. C; GRANGER, D. N. Role of neutrophil-endothelial cell adhesion in inflammatory disorders. **J Crit Care.** 9(1): 47-71, 1994.
- KUWANO, T; et al. Cyclooxygenase 2 is a key enzyme for inflammatory cytokine-induced angiogenesis. **FASEB J.** 18(2): 300-10, 2004.
- LAMMOGLIA-ORDIALES, L; et al. A randomised comparative trial on the use of a hydrogel with tepescohuite extract (*Mimosa tenuiflora* cortexextract-2G) in the treatment of venous leg ulcers. **Int Wound J.** 9(4): 412-8, 2012.

- LAMONT, L. A.; TRANQUILLI, W. J.; GRIMM, K. A. Physiology of pain. **Vet. Clin. North Am Small Anim Pract.** 30(4): 703–728, 2000.
- LESNIAK, A; LIPKOWSKI, A, W. Opioid peptides in peripheral pain control. **Acta Neurobiol Exp.** 71: 129–138, 2011.
- LEY, K; et al. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. **Nat Rev Immunol.** 7(9): 678-89, 2007.
- LIN, S. Y. et al. Serotonin Receptor 5-HT<sub>2B</sub> Mediates Serotonin-Induced Mechanical Hyperalgesia. **J Neurosci.** 31(4): 1410-8, 2011.
- LOYD, D, R; MORGAN, M. M; MURPHY, A. Z. Morphine preferentially activates the periaqueductal gray-rostral ventromedial medullary pathway in the male rat: a potential mechanism for sex differences in antinociception. **Neuroscience.** 147(2): 456-68, 2007.
- LYNCH, M. E; WATSON, C. P. N. The pharmacotherapy of chronic pain: A review. **Pain Res Manag.** 11(1): 11–38, 2006.
- MACPHERSON, L. J, et al. An ion channel essential for sensing chemical damage. **J Neurosci.** 27(42): 11412-5, 2007.
- MATHIAZHAGAN, S; ANAND, S; PARTHIBAN, R. Analgesic Effect of Caryophyllus aromaticus by Formalin Test in Albino Rats. **GJP.** 8(2): 120-127, 2014.
- MCDONALD, B; et al. Intravascular danger signals guide neutrophils to sites of sterile inflammation. **Science.** 330(6002): 362-6, 2010.
- MCDONALD, J; LAMBERT, D. G. Opioid receptors. **Contin Educ Anaesth Care Pain.** 5(1): 22-25, 2005
- MCLEAN, P.G; AHLUWALIA, A; PERRETTI, M. Association between kinin B1 receptor expression and leukocyte trafficking across mouse mesenteric postcapillary venules. **J. Exp. Med.** 192(3): 367–380, 2000.
- MCNAMARA, C. R; et al. TRPA1 mediates formalin-induced pain. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 104(33): 13525-13530, 2007.
- MEDZHITOV, R. Recognition of microorganisms and activation of the immune response. **Nature.** 449(7164): 819-26, 2007.
- MOREAU, M. E; et al. The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets. **J. Pharmacol. Sci.** 99(1): 6-38, 2005.
- MORI, S.A; et al. **Manual de Manejo de Herbário Fanerogâmico.** 2<sup>a</sup> ed. Ilhéus, Centro de Pesquisas do Cacau, 1989.
- MUDO, G; BELLUARDO, N; FUXE, K. Nicotinic receptor agonists as neuroprotective/neurotrophic drugs. Progress in molecular mechanisms. **J Neural Transm.** 114(1): 135-47. 2007.

NAGY, J. A; et al. Vascular permeability, vascular hyperpermeability and angiogenesis. **Angiogenesis**. 11(2): 109-19, 2008.

NASCIMENTO, E. B. Jr; et al. Peripheral 5-HT1B and 5-HT2A receptors mediate the nociceptive response induced by 5-hydroxytryptamine in mice. **Pharmacol Biochem Behav**. 99(4): 598-603, 2011.

NASSAR, M. A; et al. Nociceptor-specific gene deletion reveals a major role for Nav1.7 (PN1) in acute and inflammatory pain. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 101(34): 12706-12711. 2004.

NICHOLS, C. G. KATP channels as molecular sensors of cellular metabolism. **Nature**. 440(7083): 471–476, 2006.

NUNES F. P. B. **Caracterização do efeito anti-inflamatório da crotoxina sobre a migração celular induzida pela carragenina**. 2012. 95 f. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

NUNES, B. S; et al. Lectin extracted from *Canavalia grandiflora* seeds presents potential anti-inflammatory and analgesic effects. **Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol**. 379(6): 609-16, 2009.

OBARA, I; HUNT, S. P. Axonal Protein Synthesis and the Regulation of Primary Afferent Function. **Dev Neurobiol**. 74(3): 269–278, 2014.

OCAÑA, M. Potassium channels and pain: present realities and future opportunities. **Eur J Pharmacol**. 500(1-3): 203-19, 2004.

OLIVEIRA, R. R. B; et al. Antinociceptive effect of the ethanolic extract of *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. Sm., Fabaceae, in rodents. **Rev. bras. farmacogn**. 19(3): 672-676, 2009.

OLIVEIRA, M. R; et al. Estudo das condições de cultivo da algaroba e jurema preta e determinação do poder calorífico. **Ciênc. & Tecnol**. 7(14): 93-104, 1999.

ONG, C.K. S; et al. An Evidence-Based Update on Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. **Clin Med Res**. 5(1): 19–34, 2007.

OSSIPOV, M. H; DUSSOR, G. O; PORRECA, F. Central modulation of pain. **J Clin Invest**. 120(11): 3779-87, 2010.

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

PETHÖ G, DEROW A; REEH, P. W. Bradykinin-induced nociceptor sensitization to heat is mediated cyclooxygenase products in isolated rat skin. **Eur J Neurosci**. 14(2): 210–218, 2001.

PETHÖ, G; REEH, P. W. Sensory and signaling mechanisms of bradykinin, eicosanoids, platelet-activating factor, and nitric oxide in peripheral nociceptors. **Physiol Rev**. 92(4): 1699-775, 2012.

PETRI, B; BIXEL, M. G. Molecular events during leukocyte diapedesis. **FEBS J.** 273(19): 4399-407, 2006.

PETROVSKA, B. B. Historical review of medicinal plants' usage. **Pharmacogn Rev.** 6(11): 1–5, 2012.

PHILLIPSON, M; et al. Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. **J Exp Med.** 203(12): 2569-75, 2006.

POOLE, S; et al. Bradykinin B1 and B2 receptors, tumour necrosis factor alpha and inflammatory hyperalgesia. **Br J Pharmacol.** 126(3): 649-56, 1999.

RADULOVIC, N. S; et al. The last decade of antinociceptive alkaloids: structure, synthesis, mechanism of action and prospect. *Curr Top Med Chem.* 13(17): 2134-70, 2013.

RANKIN, J. A. Biological mediators of acute inflammation. **AACN Clin Issues.** 15(1): 3-17, 2004.

REGO, E. A. **Avaliação da actividade anti-inflamatória de plantas dos Açores.** 2012. 119 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade dos Açores, Ponta Delgada, 2012.

RICCIOTTI, E; FITZGERALD, G. A. Prostaglandins and Inflammation. **Arterioscler Thromb Vasc Biol.** 31(5): 986–1000, 2011

RICHARDSON, J. D; VASKO, M. R. Cellular mechanisms of neurogenic inflammation. **Pharmacol Exp Ther.** 302(3): 839-45, 2002.

RIOS, E. R; et al. TRP and ASIC channels mediate the antinociceptive effect of citronellyl acetate. **Chem Biol Interact.** 203(3): 573-579, 2013.

RITTNER, H. L; MACHELSKA, H; STEIN, C. Leukocytes in the regulation of pain and analgesia. **J Leukoc Biol.** 78(6): 1215-22, 2005.

RIVERA-ARCE, E, et al. Pharmacognostical studies of the plant drug *Mimosae tenuiflorae* cortex. **J Ethnopharmacol.** 113(3): 400-8, 2007a.

RIVERA-ARCE, E. Therapeutic effectiveness of a *Mimosa tenuiflora* cortex extract in venous leg ulceration treatment. **J Ethnopharmacol.** 109(3): 523-8, 2007b.

RODRIGUES, R. R. V; AMADOR, M. B. M. Estudo das Utilizações da Jurema Preta (*Mimosa Tenuiflora*) no Espaço Agrário de São João – PE na Perspectiva Sistêmica. **Rev. Diálogos.** 2(11): 127-144, 2014.

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio dos cerrados na região do Alto Rio Grande - Minas Gerais. **Rev. Bras. Pl. Med.** 9(2): 17-35, 2007.

ROSA, A. C; FANTOZZI, R. The role of histamine in neurogenic inflammation. **Br J Pharmacol.** 170(1): 38–45, 2013.

SADIK, C. D; KIM, N. D; LUSTER, A. D. Neutrophils cascading their way to inflammation. **Trends Immunol.** 32(10): 452–460, 2011.

SASAKI, M; et al. Effects of 5-HT<sub>2</sub> and 5-HT<sub>3</sub> receptors on the modulation of nociceptive transmission in rat spinal cord according to the formalin test. **Eur J Pharmacol.** 424(1): 45-52, 2001.

SCHAIBLE, H-G. Mechanisms of pain in arthritis. **Arthritis Res Ther.** 6(3): 41, 2004.

SCHAIBLE, H-G.; EBERSBERGER, A.; NATURA, G. Update on peripheral mechanisms of pain: beyond prostaglandins and cytokines. **Arthritis. Res. Ther.** 13(2): 210, 2011.

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

SCHELLER, J; et al. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. **Biochim Biophys Acta.** 1813(5): 878-888, 2011.

SCHMIDT, R; et al. Novel classes of responsive and unresponsive C nociceptors in human skin. **J Neurosci.** 15(1): 333–341, 1995.

SHARMA, J. N; AL-BANOON, A. The Role of Inflammatory Mediator Bradykinin in Cardiovascular and Renal Diseases. **Sci Reports.** 1(2): 142-147, 2012.

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

SHIBATA, M; et al. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. **Pain.** 38(3): 347-52, 1989.

SIGAL, A. et al. The LFA-1 integrin supports rolling adhesions on ICAM-1 under physiological shear flow in a permissive cellular environment. **J. Immunol.** 165(1): 442–452, 2000.

SILBERSTEIN, S. D. Methysergide. **Cephalalgia.** 18(7):421-35, 1998.

SILVA, M. I. G. et al . Bioactivity and potential therapeutic benefits of some medicinal plants from the Caatinga (semi-arid) vegetation of Northeast Brazil: a review of the literature. **Rev. bras. farmacogn.** 22(1): 193-207, 2012. .

SMITH, R. L; et al. Agonist properties of N,N-dimethyltryptamine at serotonin 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> receptors. **Pharmacol Biochem Behav.** 61(3): 323-30, 1998.

SOEHNLEIN, O; LINDBOM, L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. **Nat Rev Immunol.** 10(6): 427-39, 2010.

SOMMER C. Serotonin in pain and analgesia: actions in the periphery. **Mol Neurobiol.** 30(2): 117-25, 2004.

SONG, Z; MEYERSON, B. A; LINDEROTH, B. Spinal 5-HT receptors that contribute to the pain-relieving effects of spinal cord stimulation in a rat model of neuropathy. **Pain.** 152(7): 1666-73, 2011.

- SOUZA, R. S. O.; SOUZA, R. S. O.; ALBUQUERQUE, U. P.; MONTEIRO, J. M.; AMORIM, E. L. C. Jurema Preta (*Mimosa tenuiflora* [Willd.] Poir.): a review of its traditional use, phytochemistry and pharmacology. **Braz. arch. biol. technol.** 51(5): 937-947, 2008.
- STEVENS, T; et al. Mechanisms regulating endothelial cell barrier function. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.** 279(3): L419-22, 2000.
- STOCKTON, R; et al. Induction of vascular permeability: beta PIX and GIT1 scaffold the activation of extracellular signal-regulated kinase by PAK. **Mol Biol Cell.** 18(6): 2346-55, 2007.
- TABAS, I; GLASS, C. K. Anti-inflammatory therapy in chronic disease: challenges and opportunities. *Science.* 339(6116): 166-72, 2013.
- TAGER, A. M; LUSTER, A. D. BLT1 and BLT2: the leukotriene B4 receptors. **Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids.** 69(2-3): 123-134, 2003.
- TASLEEM, et al. Analgesic and anti-inflammatory activities of *Piper nigrum* L. **Asian Pac J Trop Med.** 7(1): 461-468, 2014.
- THURSTON, G; et al. Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage. **Nat. Med.** 6(4): 460-463, 2000
- TJØLSEN, A; et al. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain.** 51(1): 5-17, 1992.
- TODOROVIC, S. M; JEVTOVIC-TODOROVIC, V. The role of T-type calcium channels in peripheral and central pain processing. **CNS Neurol. Disord. Drug Targets.** 5(6): 639-53, 2006.
- TORRES, R. C; INSUELA, D. B. R; CARVALHO, V. de F. Mecanismos celulares e moleculares da ação antiinflamatória dos glicocorticoides. **Corpus et Scientia.** 8(2): 36-51, 2012.
- VAUGHAN, C. W; et al. How opioids inhibit GABA-mediated neurotransmission. **Nature.** 390(6660): 611-4, 1997.
- VEERESHAM, C. Natural products derived from plants as a source of drugs. **J Adv Pharm Technol Res.** 3(4): 200-201, 2012.
- VEPSÄLÄINEN, J. J; ET AL. Isolation and characterization of yuremamine, a new phytoindole. **Planta Med.** 71(11): 1053-7, 2005.
- VERMA, V.; SHEIKH, Z.; AHMED, A. S. Nociception and role of immune system in pain. **Acta Neuro. Belg.** 2014. Disponível em < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25547878>>. Acesso em 23 mar. 2015. Epub 30-Dec-2014.
- WAGNER, H.; BLADT, S. Plant drug analysis: a Thin Layer Chromatography Atlas. 1ª edição, Berlin: **Springer**, p. 216-217, 2001.
- WALSTAB, J; RAPPOLD, G; NIESLER, B. 5-HT(3) receptors: role in disease and target of drugs. **Pharmacol Ther.** 128(1): 146-69, 2010.

WANG, J. R; et al. In vivo anti-inflammatory and analgesic activities of a purified saponin fraction derived from the root of *Ilex pubescens*. **Biol Pharm Bull.** 31(4): 643-50, 2008.

WEISS, U. Inflammation. **Nature.** 454(7203): 427, 2008.

WESSEL, F; et al. Leukocyte extravasation and vascular permeability are each controlled in vivo by different tyrosine residues of VE-cadherin. **Nat Immunol.** 15(3): 223-30, 2014.

WOOLF, C. J. What is this thing called pain? **J Clin Invest.** 120(11): 3742–3744, 2010.

WOOLF, C. J; SALTER, M. W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. **Science.** 288(5472): 1765-9, 2000.

XIE, D. J; et al. Identification of 5-HT receptor subtypes enhancing inhibitory transmission in the rat spinal dorsal horn in vitro. **Mol Pain.** 8(58), 2012.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Quím. Nova.** 24(1): 147-152, 2001.

ZAMPONI, G. W; et al. Role of voltage-gated calcium channels in ascending pain pathways. **Brain Res Rev.** 60(1): 84–89, 2009.

ZIPPEL, J; DETERS, A; HENSEL, A. Arabinogalactans from *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poiret bark as active principles for wound-healing properties: specific enhancement of dermal fibroblast activity and minor influence on HaCaT keratinocytes. **J Ethnopharmacol.** 124(3): 391-6, 2009.



## **ANEXO A - Reveladores para cromatografia em CCD**

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

O reagente foi preparado pela adição cuidadosa de 5 mL de anidrido acético e 5 mL de ácido sulfúrico a 50 mL de etanol, enquanto se arrefece em gelo. O reagente foi preparado na altura do ensaio, devido à sua instabilidade.

### **Reagente de Wagner (BROSSI, 1988)**

O reagente foi preparado pela dissolução de 1 g de iodo e 10 g de iodeto de potássio em 50 mL de água destilada e pela adição de 2 mL de ácido acético glacial. O volume foi completo até 100 mL com água destilada.

**ANEXO B – Aprovação do Comitê de Ética de Experimentação Animal da Universidade de Uberaba (CEEA/UNIUBE)**



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 **Prof<sup>a</sup> 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 activit of compounds isolated from medicinal plants of the semi-arid of Bahia**", under the supervision of **Prof<sup>a</sup> 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. Joely F. Figueiredo Bittar*  
Vice-Coordenadora do CEEA-UNIUBE