

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

MAIANA FERRAZ ANDRADE

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E
ANTINOCICEPTIVA DAS FRAÇÕES DA FOLHA
*DE**Cenostigma cf. macrophyllum*
(LEGUMINOSAE)**

Vitória da Conquista - BA
2015

MAIANA FERRAZ ANDRADE

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E
ANTINOCICEPTIVA DAS FRAÇÕES DA FOLHA DE
Cenostigma cf. macrophyllum
(LEGUMINOSAE)**

Dissertação apresentada ao Instituto Multidisciplinar em Saúde da Universidade Federal da Bahia no Programa de Pós-Graduação em Biociências como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biociências.

Orientadora: Profa. Dra. Regiane Yatsuda
Universidade Federal da Bahia – UFBA

Co-orientadora: Profa. Dra. Mariluze Cruz
Universidade Federal da Bahia – UFBA

Vitória da Conquista - BA

2015

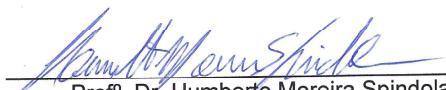
MAIANA FERRAZ ANDRADE

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E
ANTINOCICEPTIVA DAS FRAÇÕES DA FOLHA DE
Cenostigma cf. macrophyllum (LEGUMINOSAE)**

Esta dissertação foi julgada adequada à obtenção do grau de Mestre em
Biotecnologia e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação
em Biotecnologia, Universidade Federal da Bahia.
Vitória da Conquista – BA, 12 de março de 2015.



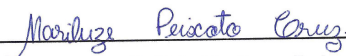
Prof.ª. Dr.ª. Regiane Yatsuda
Universidade Federal da Bahia



Prof. Dr. Humberto Moreira Spindola
Universidade Estadual de Campinas



Prof.ª. Dr.ª. Gilvanéia Silva Santos
Universidade Federal da Bahia



Prof.ª. Dr.ª. Mariluze Peixoto Cruz
Universidade Federal da Bahia

Biblioteca Universitária Campus Anísio Teixeira - UFBA

Andrade, Maiana Ferraz

Avaliação da atividade anti-inflamatória e antinociceptiva das frações da folha de *Cenostigma cf. macrophyllum* (Leguminosae) / Maiana Ferraz Andrade, - 2015. 70 f.

Orientadora: Profa. Dra. Regiane Yatsuda Universidade Federal da Bahia – UFBA

Coorientador: Profa. Dra. Mariluze Peixoto Cruz

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Programa de Pós-Graduação em Biociências, 2015.

1. *Cenostigma cf. macrophyllum*. 2. Anti-inflamatório. 3. Antinociceptiva. I. Yatsuda, Regiane. II. Mariluze Peixoto Cruz. III. Título.

CDU – 615 (43)

Dedico este trabalho a Deus, pelas bênçãos, presença subjetiva constante e generosa
força para execução deste trabalho.

Aos meus pais, **José Andrade Oliveira e Joéssia Ferraz Andrade** pelo estímulo, amor,
paciência e compreensão pelas horas omissas.

A minhas irmãs **Brenda e Rayza** pela companhia, torcida e felicidade em minhas
conquistas.

Ao meu cachorrinho **Fred**, pelo amor fiel e pelo companheirismo deitado
em meus pés em inúmeros momentos de estudo e escrita.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por sua presença infinita em meu caminho e por manter-me sempre determinada em meus sonhos, sem Ele nada seria possível,

A **minha família**, pelo apoio, paciência e compreensão pelos momentos de isolamento necessários algumas vezes nesse processo, **a minha mãe**, sempre me dando exemplos de como as dificuldades podem nos tornar fortes e que a vontade de vencer supera qualquer obstáculo, **ao meu pai**, por algumas vezes enxugar meu pranto, e pelo apoio e amor, importante nos poucos momentos que me senti só. **As minhas irmãs, Rayza**, pelo companheirismo e amadurecimento e a **Brenda**, que me faz sempre querer ser mais, só para poder ser um exemplo pra ela. A meu cachorro **Fred**, que tornou minha vida muito mais feliz e amorosa, com tanto carinho.

A minha orientadora, **Professor Dra. Regiane Yatsuda**, por ser mais que uma orientadora, por ter sido um exemplo de profissional para mim nos anos de pesquisa, extremamente competente, inteligente, dedicada, com ensinamentos, que ultrapassaram a Farmacologia.

A professora doutora **Mariluze Peixoto Cruz**, que sempre se mostrou disponível no auxílio em momentos de dificuldade

A **todos os professores** que fizeram parte do meu crescimento tanto profissional quanto humano, vocês formaram um pilar na minha vida

Aos amigos e colegas do mestrado, **Dessa, Érika, Caçola, Geysinha**, doutoranda **Kelle e Rafa**, pessoas com qualificações além do trabalho laboratorial, prestativas, amigas, generosas. Sem eles minha caminhada não teria sido tão feliz e divertida.

Aos companheiros do grupo de inflamação pelo empenho na construção do trabalho, amizade e crescimento no aprendizado que é, o trabalho em equipe

A todos os colegas e amigos dos demais grupos da pesquisa, obrigada pela parceria e apoio nessa caminhada

Agradeço às Instituições financiadoras, **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq-UNIVERSAL 014/2008; 014/2010)**, **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pelo apoio nesses anos de pesquisa

Ao Programa de Pós-Graduação em Biociências e à Universidade Federal da Bahia pela oportunidade realizar esse mestrado

Enfim, gostaria de agradecer a todos que sempre torceram por mim, que mesmo de longe sempre vibraram com minhas conquistas e felicidades.

"O sonho é uma fonte infinita de inspiração."

Luiz Tambucci

ANDRADE, Maiana Ferraz . Avaliação da atividade anti-inflamatória e antinociceptiva das frações da folha de *Cenostigma cf. macrophyllum* (Leguminosae) 2015. Dissertação (Mestrado) - Instituto Multidisciplinar de Saúde , Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2015

RESUMO

Cenostigma cf. macrophyllum (Leguminosae) popularmente conhecida como "Canela de velho", apresenta um vasto uso na medicina popular. As folhas, flores e cascas do caule são usadas como espasmolíticas e o extrato da folha exibe ação antiulcerogênica, anti-inflamatória, hepatoprotetora e antibacteriana. Este estudo teve como objetivo avaliar as atividades anti-inflamatória e antinociceptiva das frações do extrato etanólico das folhas de *C. cf. macrophyllum* do semiárido da Bahia, coletadas na região da Floresta Nacional Contendas do Sincorá (FLONA), segundo dados etnofarmacológicos da região. O extrato etanólico da folha foi preparado por maceração e foi submetido à extração por partição. Após a evaporação, foram obtidas as quatro frações do extrato bruto com os seguintes rendimentos: 4,23% (hexano), 44,16% (diclorometano), 36,02% (acetato de etila) e 8,28% (butanol) em relação ao peso do extrato bruto da casca 20 g. Para avaliar os parâmetros antinociceptivos e anti-inflamatórios foram utilizados camundongos machos adultos *Balb/c*. O efeito antinociceptivo foi avaliado pelos testes de contorção abdominal induzido por ácido acético 0,6%, pela injeção intraplantar de formalina 1,5% e pelo método de von Frey eletrônico após injeção intraplantar de carragenina (Cg). Para a determinação da atividade anti-inflamatória foram realizados testes de migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal e avaliação da permeabilidade vascular analisada pelo teste de azul de Evans. No teste de contorção abdominal induzida por ácido acético, a fração de butanol (50 mg/Kg) foi a única fração que promoveu uma redução significativa das respostas nociceptivas ($p < 0,05$). No teste da formalina, na fase 1, as frações diclorometano e acetato de etila (50 mg/Kg) foram capazes de reduzir o número de "flinches" induzidos pela formalina ($p < 0,05$) em relação ao veículo e na fase 2 as frações de diclorometano, acetato de etila e butanol (50 mg/Kg) promoveram uma diminuição significativa da nocicepção induzida pela formalina quando comparada com o grupo veículo ($p < 0,05$). As frações não apresentaram redução na formação do edema ($p < 0,05$). Na avaliação da migração de neutrófilos, todas as frações (200 mg/Kg) apresentaram resultados significativos reduzindo a migração de neutrófilos na cavidade peritoneal e na dose 100 mg/Kg, nenhuma fração apresentou resultado significativo frente a redução de neutrófilos na cavidade ($p < 0,05$). Na análise da permeabilidade microvascular, a fração butanol (200 mg/Kg) apresentou uma redução significativa do extravasamento do corante azul de Evans no líquido peritoneal e na dose 100 mg/Kg nenhuma das quatro frações demonstrou uma redução significativa do extravasamento. Na nocicepção mecânica (von Frey), as frações de hexano, diclorometano e butanol (200 mg/kg; s.c.), apresentaram redução da hiperalgesia de forma significativa quando comparada com o grupo veículo ($p < 0,05$), e na dose menor de 100 mg/kg, apenas a fração acetato de etila apresentou resultado significativo. Os resultados permitem considerar que a *C. cf. macrophyllum* é uma fonte natural para a identificação de novos compostos bioativos e agentes terapêuticos. Deste modo, deve-se prosseguir com a pesquisa das propriedades químicas e farmacológicas das frações ativas da folha de *C. cf. macrophyllum* para a elucidação de seu potencial terapêutico, considerando a investigação da composição química e seus mecanismos de ação.

Palavra-chave: *Cenostigma cf. macrophyllum*; Anti-inflamatória; Antinociceptiva; Plantas medicinais; Farmacologia experimental.

ANDRADE, Maiana Ferraz. Evaluation of anti-inflammatory and antinociceptive activity of fractions *Cenostigma cf. macrophyllum* leaves (Leguminosae) 2015. Dissertation (Master) - Multidisciplinary Health Institute, Federal University of Bahia, Vitoria da Conquista, 2015

ABSTRACT

Cenostigma cf. macrophyllum (Leguminosae) popularly known as "Canela de velho," is widely used in folk medicine. The leaves, flowers and stem bark are used as spasmolytic and the leaf extract shows anti-ulcer action, anti-inflammatory, hepatoprotective and antibacterial. This study aimed to evaluate the anti-inflammatory activities and antinociceptive *C. cf. macrophyllum* the semiarid region of Bahia, collected in the region of the National Forest Contendas the Sincorá (National Forest), according to ethnopharmacological data in the region. The ethanol leaf extract was prepared by maceration and was subjected to extraction by partition. After evaporation, the four fractions of the crude extract with the following yields were obtained: 4.23% (hexane), 44.16% (dichloromethane), 36.02% (ethyl acetate) and 8.28% (butanol) relative to the weight of the crude extract of the bark 20 g. To evaluate the antinociceptive and anti-inflammatory parameters used were adult male Balb/c mice. The antinociceptive effect was evaluated by the writhing test induced by acetic acid 0.6% by intraplantar injection of formalin and 1.5% by electronic von Frey method after intraplantar injection of carrageenan (Cg) ($p < 0.05$). To determine anti-inflammatory activity of neutrophil migration, tests were conducted for evaluation of the peritoneal cavity and vascular permeability analyzed by Evans blue test. In the writhing test induced by acetic acid, the fraction of butanol (50 mg/kg) was the only fraction that produced a significant reduction of nociceptive response ($p < 0.05$). In the formalin test, in step 1, the fractions of dichloromethane and ethyl acetate (50 mg/kg) were able to reduce the number of "flinches" induced by formalin ($p < 0.05$) from the vehicle. In phase 2, fractions of dichloromethane, ethyl acetate and butanol (50 mg/kg) significantly promoted reduction of formalin-induced nociception when compared with the vehicle group ($p < 0.05$). In the evaluation of neutrophil migration, all fractions (200 mg/kg) showed significant results reducing the migration of neutrophils into the peritoneal cavity. The dose 100 mg/kg not showed significant result compared to the reduction of neutrophils in the cavity ($p < 0.05$). In the analysis of microvascular permeability, the butanol fraction (200 mg/kg) showed a significant reduction of Evans blue dye extravasation in the peritoneal fluid, and at the dose 100 mg/kg, none of the four fractions showed a significant reduction in the extravasation of the blue dye Evans. In nociceptive mechanics (von Frey), the hexane fraction, butanol and dichloromethane (200 mg/kg, sc) showed significantly reduced hyperalgesia compared with the vehicle group ($p < 0.05$), and at the lower dose 100 mg/kg, only the ethyl acetate fraction showed a significant result. The results support the conclusion that *C. cf. macrophyllum* is a natural source for the identification of novel bioactive compounds and therapeutic agents. Thus, one must proceed with the research of chemical and pharmacological properties of the active fractions of the leaf *C. cf. macrophyllum* to the elucidation of its therapeutic potential, considering the research of chemical composition and their mechanisms of action.

Keywords: *Cenostigma cf. macrophyllum*; Anti-inflammatory; Antinociceptive; Medicinal plants; Experimental Pharmacology.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Efeito das frações de hexano (H), diclorometano (D), acetato de etila (A) e butanol (B) da folha de <i>Cenostigma</i> cf. <i>macrophyllum</i> no teste de contorção abdominal induzida por ácido acético (0,6%) em camundongos.....	42
Figura 2	Efeitos das frações de hexano, diclorometano, acetato de etilae butanol obtidas da folha de <i>Cenostigma</i> cf. <i>macrophyllum</i> na resposta à nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina 1,5 % em camundongos.....	43
Figura 3	Efeitos das frações de hexano (H), diclorometano (D), acetato de etila (A) e butanol (B) obtidas da folha de <i>Cenostigma</i> cf. <i>macrophyllum</i> no edema de pata induzido por formalina 1,5%.....	44
Figura 4	Efeitos das frações de hexano (H), diclorometano (D), acetato de etila (AE) e butanol (B) obtidas da folha de <i>Cenostigma</i> cf. <i>macrophyllum</i> na inibição da nocicepção mecânica pelo teste de Von Frey.....	45
Figura 5	Efeitos das frações de hexano (H), diclorometano (D), acetato de etila (AE) e butanol (B) obtidas da folha de <i>Cenostigma</i> cf. <i>macrophyllum</i> na inibiçãoda nocicepção mecânica pelo teste de Von Frey.....	46
Figura 6	Efeitos das frações de hexano (H), diclorometano (D), acetato de etila (A) e butanol (B) obtidos da folha de <i>Cenostigma</i> cf. <i>macrophyllum</i> sobre a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida por carragenina (Cg).....	47
Figura 7	Efeitos das frações de hexano (H), diclorometano (D), acetato de etila (A) e butanol (B) obtidos da folha de <i>Cenostigma</i> cf. <i>macrophyllum</i> sobre a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida por carragenina (Cg).....	48
Figura 8	Efeitos das frações de hexano (H), diclorometano (D), acetato de etila (A) e butanol (B) obtidos da folha de <i>Cenostigma</i> cf. <i>macrophyllum</i> na permeabilidade vascular, teste de azul de Evans.....	49
Figura 9	Efeitos das frações de hexano (H), diclorometano (D), acetato de etila (A) e butanol (B) obtidos da folha de <i>Cenostigma</i> cf. <i>macrophyllum</i> na permeabilidade vascular, teste de azul de Evans.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Rendimentos do extrato etanólico e de suas respectivas frações de hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol obtidos da folha de <i>Cenostigma cf. macrophyllum</i>	41
----------	--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Acetato de etila
AA	Ácido araquidônico
AINEs	Anti-inflamatório não-esteroidal
ANOVA	Análise de variância
Cg	Carragenina
Bk	Bradicinina
B	Butanol
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
COX	Ciclooxigenase
COX-2	Ciclooxigenase do tipo 2
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CEEA	Comitê de Ética de Experimentação Animal
D	Diclorometano
E.P.M	Erro padrão média
EDTA	Ácido etileno diamino tetra acético
FCN	Fração de <i>C. cf. macrophyllum</i>
FDA	Food and Drug Administration
FLONA	Floresta Nacional Contendas do Sincorá
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
GABA	Gama-aminobutírico
GLU	Glutamato
H	Hexano
H1	Histamina
IASP	Associação Internacional da Dor
i.p.	Intraperitoneal
i.pl.	Intraplantar
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1
IL-1	Interleucina-1
IL-2	Interleucina-2
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
iNOS	Óxido nítrico sintase
LT	Leucotrienos
LTB4	Leucotrieno B4
LTC4	Leucotrieno C4
LTD4	Leucotrieno D4
LTE4	Leucotrieno E4
NaCl	Cloreto de sódio
NaPO ₄	Fosfato de sódio
NO	Óxido nítrico
OD	Densidade óptica
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAF	Fator de Ativação Plaquetária
PAG	Substância Cinzenta Periaquedutal

PG	Prostaglandinas
pg	Picograma
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGI ₂	Prostaciclina
PGH1 e 2	PGHS-1 e PGHS-2
PNPIC	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
PNPMF	Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
pH	Potencial hidrogeniônico
RNS	Espécies reativas de oxigênio
RVM	Medula Rostral Ventromedial
s.c.	Subcutânea
SP	Substância P
SNC	Sistema Nervoso Central
TNF	Fator de necrose tumoral
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa
TX	Tromboxano
UFBA	Universidade Federal da Bahia
UESB	Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia
UNICAMP	Universidade de Campinas
UNIUBE	Universidade de Uberaba
VCAM-1	Molécula Adesão Vascular1
v.o.	Via oral
v/v	Relação entre volume e volume
μ M	Micromol
μ L	Microlitros
μ g	Microgramas
VH	Veículo
5-HT	Serotonina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	16
2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS.....	19
2.1 Uso de produtos naturais e síntese de novas moléculas.....	19
2.2 Biodiversidade brasileira.....	20
2.2.1 <i>Cenostigma</i> cf. <i>macrophyllum</i>	21
2.3 Processo Inflamatório.....	23
2.4 Características gerais da dor.....	29
2.3.1 Nocicepção.....	30
2.3.2 Mecanismos neurais da dor.....	21
2.5 Agentes analgésicos e anti-inflamatórios.....	33
3 JUSTIFICATIVA.....	35
4.OBJETIVOS.....	36
4.1 Objetivo geral.....	36
4.2 Objetivos específicos.....	36
5 MATERIAL E MÉTODOS.....	37
5.1 Coleta e identificação da espécie vegetal.....	37
5.2 Preparo dos extratos e fracionamento.....	37
5.3 Modelos experimentais para a avaliação das atividades antinociceptiva e anti-inflamatória.....	37
5.3.1 Animais.....	37
5.3.2 Teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético.....	38
5.3.3 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina em camundongos.....	38
5.3.4 Teste de Von Frey.....	39
5.3.5 Recrutamento de leucocitos para cavidade abdominal.....	40
5.3.6 Avaliação da permeabilidade vascular.....	40
5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	40
6 RESULTADOS.....	42

7DISCUSSÃO	51
8 CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS	58
ANEXO A.....	69
ANEXO B.....	70

1INTRODUÇÃO

A utilização de espécies vegetais para o tratamento e cura de doenças são relatados desde o início da civilização. Essa prática milenar sobreviveu aos obstáculos no decorrer da história, exercendo importante papel na medicina moderna, pois são fontes de compostos com valiosas atividades biológicas. A observação constante e a experimentação empírica desses recursos por povos ao longo da história produziram um importante saber sobre as propriedades medicinais das plantas (VIERA, 2008).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define planta medicinal como “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semissintéticos” (VEIGA JÚNIOR et al, 2005). Os dados da OMS revelam que cerca de 80% da população mundial já fez uso de algum tipo de erva, objetivando o alívio de dores ou sensações desagradáveis, sendo que 30% possui indicação médica (GACHET et al, 2010). Na China, 30 a 50% dos medicamentos consumidos são de origem vegetal. Nos países da Europa e da América do Norte, 50% da população já fez uso de fitoterápico e 90% das formulações farmacêuticas alemãs contêm componentes de origem vegetal (CARTAXO et al., 2010).

O primeiro, e um dos maiores exemplos do desenvolvimento de fármacos a partir de vegetais é o ácido salicílico, obtido das cascas de espécies de salgueiro (*Salix alba*). Da oxidação da salicina, um constituinte da casca do salgueiro, deriva o ácido salicílico, que teve uso limitado devido intensa irritação gástrica. Mais tarde, a acetilação da molécula originou o ácido acetilsalicílico, registrado como aspirina, um dos fármacos de maior sucesso da história médica farmacêutica. (SEGAL, 2005; RISHTON, 2008).

O isolamento do ácido acetilsalicílico pode ser considerado não apenas como a descoberta de um novo medicamento, porém como o marco de uma área terapêutica inteira. A partir de então, vários outros medicamentos foram desenvolvidos através de modificações na estrutura do ácido acetilsalicílico em busca de fármacos com efeitos terapêuticos semelhantes e com efeitos colaterais menos pronunciados (RISHTON, 2008; CARVALHO, 2011).

Nesse contexto, temos diversos exemplos de medicamentos que foram desenvolvidos de fontes naturais, especialmente de plantas, incluindo entre eles a

morfina (*Papaversomniferum*), a pilocarpina (*Pilocarpus jaborandi*), os digitálicos (*Digitalis purpurea*), a quinina (*Cinchona spp.*), a artemisina (*Artemisia annua*), a atropina (*Atropa belladonna*) e a escopolamina (*Datura stramonium*). Além disso, cerca de 60 a 75% dos medicamentos para tratamento do câncer e de doenças infecciosas que estão disponíveis no mercado ou em fase clínica de desenvolvimento, são derivados de produtos naturais (COSTA et al., 2010).

O mundo natural representa, portanto, um importante patrimônio biológico por ser fonte de diversos recursos terapêuticos. As grandes áreas de biodiversidade são as florestas tropicais, localizadas em países em desenvolvimento como o Brasil, sendo este, o detentor da maior floresta equatorial e tropical úmida do planeta e de um terço da flora mundial. O Brasil dispõe de 22% de todas as espécies de plantas descritas no mundo. No entanto, uma parcela muito pequena de espécies vegetais foi investigada quanto à identificação de princípios ativos naturais (D'ANGELIS; NEGRELLE, 2014).

Para grande parte da população o uso de plantas medicinais é visto como uma alternativa terapêutica à utilização de medicamentos sintéticos, visto o baixo custo e fácil acesso vegetal. Desde a década de 80, vários documentos vêm sendo elaborados para legitimação e institucionalização dessa abordagem. Em 2006, o Ministério da Saúde aprovou a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) que disponibiliza opções terapêuticas e preventivas aos usuários do SUS, que autoriza e reconhece o valor terapêutico das plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos além de afirmar, baseado em levantamento realizado em 2004, que 116 municípios de 22 estados brasileiros fazem uso da fitoterapia (BANDEIRA, 2010; BRASIL, 2006a).

Além da PNPIC, outro documento importante para legitimação do uso das plantas medicinais nos serviços de saúde do SUS foi a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF), também apresentada em 2006 pelo Ministério da Saúde. De modo geral, suas diretrizes objetivaram garantir à população o acesso mais seguro e o uso racional de plantas medicinais e incentivar a pesquisa e o desenvolvimento da produção fitoterápica (BECKER, 2011; BRASIL, 2006b).

Desta forma, nos últimos anos, tem-se evidenciado um crescente aumento no estudo de plantas preconizadas pela medicina popular para validar a sua utilização como fitoterápico seguro e eficaz. É possível constatar o interesse expressivo nesse campo, tanto em âmbito nacional quanto internacional, visado especialmente por indústrias farmacêuticas que realizam a prospecção de novos produtos.

Diante disto, este estudo visa à avaliação da atividade anti-inflamatória e antinociceptiva das frações da folha de *Cenostigma cf. macrophyllum* (LEGUMINOSAE), conhecida popularmente como “Canela de Velho”. A determinação desta planta para estudo provém do levantamento de estudos etnofarmacológicos e etnobotânicos no povoado de Palmeiras, distrito de Contendas do Sincorá, local de ampla utilização terapêutica de plantas medicinais extraídas da Floresta Nacional Contendas do Sincorá (FLONA) (DUARTE, et al, 2004) Com base neste estudo preliminar, as sementes da “Canela de velho” são utilizadas na forma de chá para o tratamento de “paralisia facial”. Em estudo realizado previamente, o extrato bruto da folha da *C. cfmacrophyllum*apresentou importante atividade anti-inflamatória e antinociceptivaem modelo animal *in vivo*(ANDRADE et al, 2012).

2 FUNDAMENTOS TEÓRICOS

2.1 Uso de produtos naturais e síntese de novas moléculas

Durante muitos séculos as plantas medicinais consistiram a base da terapêutica mundial, utilizadas pela população como forma alternativa ou complementar aos medicamentos sintéticos. No Brasil, a manipulação destes recursos apresenta influência da cultura indígena, africana e europeia, e seu leque de dados vem sendo acumulada até os dias de hoje (PAIVA,2013).

O conhecimento tradicional contribui de forma importante no desenvolvimento de drogas e pode ser encarado como uma pré-triagem quanto à propriedade terapêutica. Outra estratégia desse levantamento junto a comunidades é a diminuição do custo e o tempo de desenvolvimento de um novo fitoterápico. No entanto, ainda existe uma grande parcela de conhecimento desprovido de estudos científicos (WALKER, 2010).

Apesar de muitas pesquisas se basearem em levantamento etnofarmacológico nas investigações, parte dos estudos para busca de substâncias bioativas são realizadas ao acaso, procurando-se encontrar substâncias com diferentes atividades através do *screening* maciço, uma vez que há relatos na literatura de propriedades biológicas das plantas diferentes do que a indicada pela medicina popular. Além disso, o processo de descobrimento de fármacos através da síntese orgânica ao acaso, mostrou uma série de problemas. Para se obter, por exemplo, um novo anticonvulsivante por esse método, seria necessário testar aproximadamente 400 mil compostos e, para se obter um novo antiviral, seriam necessários 400 milhões de compostos (KLEIN et al,2009)

A diversidade biológica é um dos fatores fundamentais na pesquisa para obtenção de substâncias com atividades em diferentes alvos biológicos. Os produtos naturais podem ser considerados como uma população de estruturas selecionadas evolutivamente para interagir com uma grande variedade de proteínas e alvos biológicos com propósitos específicos; principalmente pelo fato de que os produtos naturais têm sido reconhecidos como drogas efetivas para uma ampla variedade de indicações terapêuticas (KOEHN; CARTER, 2010)

Nesse aspecto, o interesse em investigar plantas com atividade biológica reside no fato de que as mesmas têm uma vasta aplicação em vários processos patológicos. Apesar do desafio dos pesquisadores para desenvolver a síntese de novos compostos

baseados em produtos naturais de maneira rápida e em grande escala, a gama de pesquisas científicas que estão sendo desenvolvidas juntamente com a grande quantidade de moléculas naturais selecionadas através da evolução, já seriam capazes de assegurar os produtos naturais como fonte de futuros agentes terapêuticos. Além disso, o isolamento contínuo de uma série de novos metabólitos secundários bioativos sugere que foram descobertas apenas uma pequena parte da vasta coleção de ligantes de pequenas moléculas naturais, podendo constituir um importante recurso além da capacidade sintética corrente (PAULA et al, 2012)

2.2 Biodiversidade brasileira

Com o advento da pesquisa científica, muitas substâncias puderam ser isoladas das plantas e serviram de modelos para a produção de fármacos, o que hoje representa proporção substancial do mercado global de medicamentos (YUNES & CECHINEL FILHO, 2001).

O Brasil pode se inserir neste cenário como uma das maiores biodiversidades do mundo, com uma imensa quantidade de produtos para serem explorados. Essa conjuntura favorece a pesquisa e o desenvolvimento de fitoterápicos no país. No Nordeste do Brasil, o bioma Caatinga é o principal ecossistema. É um bioma unicamente brasileiro que está localizado em um domínio de climas semiáridos e que apresenta grande variedade de paisagens e relativa riqueza biológica (IBAMA, 2011).

As plantas medicinais da Caatinga são uma parte integrante da cultura dos seus residentes e as informações sobre essas ervas são passadas de geração em geração (AGRA, 2007), perpetuando o uso medicinal das mesmas. A Caatinga representa a única grande região natural brasileira cujos limites estão inteiramente restritos ao território nacional (AGRA, 2007), o que conseqüentemente, leva à presença de muitas espécies endêmicas, se tornando assim, atraente fonte para a pesquisa de novos compostos terapêuticos.

Mesmo frente a tanta riqueza, a vegetação original de Caatinga já foi alterada e fragmentada pelas atividades humanas num percentual superior a 28%. (FRANÇA, 2008). Mas, ainda existem muitos remanescentes de mata preservada pelo Brasil, como a Floresta Nacional Contendas do Sincorá (FLONA), local da pesquisa desse estudo. A FLONA é uma área com cobertura florestal de espécies predominantemente nativas e tem como objetivo básico o uso múltiplo sustentável dos

recursos florestais e o desenvolvimento de pesquisa científica, com ênfase em métodos para exploração sustentável de florestas nativas. A sede da FLONA de Contendas do Sincorá localiza-se na rodovia BA-026, km 20, em Contendas do Sincorá, no estado da Bahia.

2.2.1 *Cenostigma cf. macrophyllum*

A família Leguminosae é composta pelas subfamílias Caesalpinioideae, Faboideae e Mimosoideae, totalizando aproximadamente 650 gêneros e 18.000 espécies, distribuídas nas regiões tropicais, subtropicais e temperadas do globo. As espécies desta família são particularmente ricas em flavonoides e compostos biossinteticamente relacionados, como rotenoides e isoflavonoides. Alcaloides, terpenoides e esteroides são exemplos de outras classes de substâncias que ocorrem em muitos exemplares da família (ALVES,2012).

O gênero *Cenostigma* sp. da subfamília Caesalpinioideae é formado por quatro espécies denominadas *C. tocantinum*, *C. gardnerianum*, *C. macrophyllum* e *C. sclerophyllum*, as quais apresentam hábitos arbóreos e arbustivos, distribuídas nas formações de mata, cerrado e Caatinga das regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste do Brasil (BRANDÃO,2013).

A *Cenostigma cf. macrophyllum* tem seu nome proveniente do grego, *ceno* = vazio, e *stigma*, aparentemente referindo-se ao estigma em câmaras, crateriforme (não sólido). É conhecida popularmente como caneleiro, inharé (Bahia); canela-de-veado, caneleiro (Ceará); cássia-rodoviária, fava-docampo, faveira, favela, mangiribá (Goiás); caneleira, pau-pretinho, pau-preto (Maranhão); fava de veado, maraximbé (Mato Grosso); canela-de-velho, Caneleiro (Piauí) (SILVA, 2004).

C. macrophyllum pode ser encontrada na região do cerrado e Caatinga baianos uma vez que a família constitui a maior diversidade de espécies nestes biomas (FERNANDES,2013). A planta se apresenta na forma de arbustos de 1-4 m de altura ou árvores medindo entre 5-20 m, tronco com 30-55cm de diâmetro, densa copa chegando a 5 m de largura, preenchida por folhas compostas por folíolos paripinados e flores de cor predominantemente, amarela, com algumas vermelhas ou laranjas, entre as de cor padrão, lembrando a orquídeas, dispostas em inflorescência na forma de rácemo (WARWICK; LEWIS, 2009).

Esta espécie nativa constitui-se em importante fonte de recursos para o homem do sertão, em face de sua disponibilidade em regiões com déficits hídricos frequentes e solos afetados por sais. *C. macrophyllum* é também utilizada como forrageira ou na alimentação dos animais e sua madeira tem diversas utilizações. Sua propagação ocorre predominantemente por sementes, requerendo umidade adequada e alguns dias para sua emergência (RIBEIRO; PELACINI, 2006).

Na medicina popular, as cascas do caule, folhas e flores desta espécie são usadas como espasmolítico. Estudos farmacológicos com o extrato aquoso das folhas indicaram ação antiulcerogênica, enquanto que o extrato etanólico apresentou atividades antimicrobiana, anti-inflamatória e antinociceptiva (SANTOS et al., 2001; COSTA et al., 2002; SILVA et al., 2004), antioxidante relacionado com presença de fenóis totais e antimicrobiana (SOUSA et al., 2007). Em levantamento etnofarmacológico, geralmente as folhas da Canela de Velho (FCM) são indicadas para problemas do trato gastrointestinal. VIANA et al. (2013) em seu estudo, demonstrou atividade gastroprotetora das folhas da espécie. O pesquisador avaliou em roedores o potencial gastroprotetor do extrato hidroalcoólico da *C. macrophyllum* em diferentes modelos de úlceras gástricas como etanol absoluto, HCl/etanol, de isquemia-reperfusão, stress de imobilização e frio e indometacina.

Em um modelo de diabetes mellitus, foi observado uma redução na porcentagem de células inflamatórias e aumento dos números de fibroblastos no grupo tratado por sete dias com uma emulsão da folha da planta em comparação com os outros grupos. A emulsão óleo/água de *C. macrophyllum* também foi capaz de acelerar a cicatrização de feridas cirúrgicas em ratos Wistar com *diabetes mellitus* induzida experimentalmente, promovendo uma redução no tamanho da ferida e no processo inflamatório e aumento do número de fibroblastos e a produção de óxido nítrico (COELHO et al., 2013). A emulsão também conseguiu promover a síntese de colágeno e, conseqüentemente, acelerou o processo de reparo na pele do diabético (COELHO et al., 2013).

Além disso, a bergenina isolada de *C. macrophyllum* mostrou atividade antinociceptiva dose-relacionada, em camundongos, quando avaliada no modelo de contorção induzida por ácido acético (ALVES et al., 2012).

As sementes de *C. cf. macrophyllum* são utilizadas na forma de chá para reverter “paralisia facial” segundo estudo etnofarmacológico realizado em Palmeiras, distrito de Contendas do Sincorá, BA. (DUARTE, et al., 2004). Silva (2015) demonstrou que

extrato bruto e frações do extrato etanólico de *C. cf. macrophyllum* coletada no FLONA, apresentaram atividade bacteriostática e bactericida sobre os *Staphylococcus aureus* resistente a oxacilina e foram capazes de inibir a formação do biofilme dessa bactéria.

2.3 Processo Inflamatório

Desde um simples organismo unicelular como as bactérias, até o mais complexo mamífero como os humanos, possuem mecanismos que respondem a estímulos hostis e apresentam um sistema que busca manter o equilíbrio homeostático do organismo agredido. A resposta deste sistema envolve a fisiologia, bioquímica e imunologia do organismo e é denominada de inflamação (CRUVINEL et al, 2010).

Dessa forma, a inflamação pode ser definida como um conjunto de alterações bioquímicas, fisiológicas e imunológicas em consequência à uma lesão tecidual desencadeada em resposta a diversos fatores tais como: trauma mecânico, privação de oxigênio, nutrientes, alterações imunológicas, genéticas, agentes químicos, microrganismos, temperaturas extremas, radiação ultravioleta (MURPHY, 2010). A principal função da inflamação é eliminar estímulo patogênico para remover o tecido danificado ou reparar os danos com o objetivo de restaurar a homeostase (SOEHNLEIN e LINDBOM, 2010).

Descrições das características clínicas da inflamação foram encontradas em papiros egípcios, datados de aproximadamente 3000 a.C., mas o primeiro autor a listar os quatro sinais cardeais da inflamação foi Celsius, que classificou esses sinais clássicos como: dor, rubor (hiperemia), calor (aumento da temperatura local) e tumor (edema). A estes sinais, Galeno, acrescentou um quinto sinal cardinal, a perda de função da área (MEDZHITOV, 2008). Em 1793, John Hunter, um cirurgião escocês, observou o que é óbvio para os tempos atuais: que a inflamação não é uma doença, mas uma resposta sem especificidade, com objetivos salutares ao hospedeiro (KALESNIKOFF, GALLI, 2008).

A resposta inflamatória é um evento complexo que envolve o reconhecimento do agente/estímulo lesivo, para sua posterior destruição e tentativa de reconstruir e reparar o dano tecidual. Durante o reparo, o tecido lesionado é substituído (regeneração) por células parenquimatosas, com preenchimento no local da lesão por tecido fibroso

(cicatrização) ou, mais comumente, pela combinação dos dois processos (ROBBINS e COTRAN, 2012).

A reação do organismo frente a agentes infecciosos, antígenos e lesões teciduais desencadeia a ativação e à amplificação do sistema imune resultando na ativação de células e na liberação de diversos mediadores responsáveis pelo processo inflamatório. São estas células do sistema imunológico que de forma coletiva desenvolvem a resposta de defesa contra microrganismos infecciosos ou substâncias estranhas. O próprio termo imunidade se refere à proteção. Desta forma, o sistema imune está presente em praticamente todos os tecidos do organismo. A capacidade de circular e realizar trocas entre o sangue, a linfa e os tecidos é de fundamental importância para a geração das respostas imunológicas, inclusive a inflamação (ABBAS et al, 2012).

No entanto, se a destruição do agente agressor e o processo de reparo não ocorrerem de maneira eficiente e sincronizada, a resposta inflamatória pode levar a uma lesão tecidual persistente induzida pelo acúmulo de leucócitos, colágeno entre outras substâncias que podem ser prejudiciais ao organismo (HAESELER, et al., 2006).

O processo inflamatório pode ser dividido em duas fases, levando em consideração sua duração e características patológicas, em inflamação aguda e crônica. A inflamação aguda apresenta curta duração, caracterizada por vasodilatação arteriolar e venular, extravasamento de fluidos ricos em proteínas e migração de células, principalmente neutrófilos (MESQUITA JR et al, 2008). Já a inflamação crônica é caracterizada por predomínio de macrófagos que secretam mediadores inflamatórios que iniciam e mantêm um ciclo de lesão e reparo tecidual, resultando em remodelagem do tecido. Nesse processo crônico, os eventos descritos anteriormente podem originar degeneração tecidual e fibrose, sendo responsáveis pelos sintomas de muitas doenças auto-imunes e pode constituir uma importante causa de rejeição de transplante de órgãos. (WANNMACHER; FERREIRA, 2004)

A resposta inflamatória aguda evolui a partir de uma fase vascular que tem início imediatamente após o dano, aonde as células residentes do tecido são estimuladas e é iniciada uma vasodilatação na área lesada, com aumento do fluxo sanguíneo, aumento da permeabilidade e recrutamento de vasos normalmente hipofuncionantes. A vasodilatação pode ser mediada por histamina, prostaglandinas (PGE₂), prostaciclina (PGI₂) que podem atuar junto com citocinas no aumento da permeabilidade. O aumento imediato da perfusão tecidual e da permeabilidade é mediado por aminas vasoativas, histamina e serotonina, que são liberadas por mastócitos e monócitos minutos após a

agressão. Este aumento da permeabilidade vascular culmina com a saída de um fluido rico em proteínas (exsudato) para o meio extravascular, resultando um acúmulo no local da lesão (edema) (GERALDO; ALFENA, 2008).

A formação do edema é outro sinal precoce e importante na inflamação aguda, que ocorre devido ao fluxo transvascular de fluido rico em proteínas dos compartimentos intravasculares (plasma) para o interstício em decorrência do aumento de permeabilidade vascular de capilares e vênulas, como resultado da liberação de histamina, bradicinina, leucotrienos (LT), fatores do complemento, substância P (SP) e fator de agregação plaquetária (PAF) no sítio inflamatório (SHERWOOD; TOLIVERKINSKY, 2004).

O exsudato formado é constituído de proteínas do plasma e leucócitos, principalmente neutrófilos, e facilita a liberação de outros mediadores que amplificam a resposta inflamatória. Esses mediadores incluem os componentes de quatro cascatas enzimáticas proteolíticas: o sistema de complemento, o sistema de coagulação, o sistema fibrinolítico e o sistema de cininas (RANG et al., 2012).

A ativação do endotélio dos vasos sanguíneos permite a transmigração de neutrófilos. Estes leucócitos oriundos do sangue passam para o tecido inflamado através de um processo que se apresenta em seis eventos: marginação, rolamento, ativação, adesão, diapedese com penetração através da membrana basal, finalizando em transmigração através do endotélio. Estas interações fazem com que os neutrófilos sejam expostos aos fatores quimiotáticos e apresentem os eventos em direção ao sítio inflamatório (CRUVINEL et al, 2010).

A adesão e transmigração de leucócitos são produzidas pela interação de moléculas de adesão de células do endotélio com receptores de quimiocinas e integrinas em leucócitos. Os receptores de aderência envolvidos pertencem a quatro famílias moleculares: selectinas, imunoglobulinas, integrinas e glicoproteínas. As selectinas são lectinas que interagem com açúcares e/ou glicoproteínas responsáveis pela adesão de leucócitos ao endotélio vascular na cascata precoce de eventos que levam aos processos de inflamação. Compreendem a E-selectina que é confinada ao endotélio; a P-selectina presente no endotélio e nas plaquetas; e L-selectina presentes em muitos tipos de leucócitos (LIMA, et al., 2012).

A família das imunoglobulinas compreende a molécula de adesão vascular-1 (VCAM-1), expressa em células endoteliais ativadas por citocinas, como fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) e a molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1), expressa

por uma variedade de células hematopoiéticas e não hematopoiéticas, incluindo células T e B, células dendríticas, macrófagos, fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais. As integrinas constituem o principal grupo de moléculas de adesão (MESQUITA, et al, 2008). No tecido alvo, os neutrófilos são ativados pelo contato direto com patógenos ou por citocinas secretadas pelas células residentes e atuam contra os agentes invasores liberando o conteúdo tóxico de seus grânulos, que incluem espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS), proteinase 3, catepsina G e elastase. Estes efetores altamente potentes não discriminam entre o agente agressor e células do hospedeiro, portanto, danos ao tecido do hospedeiro são inevitáveis (MURI, 2009).

Quando, inicialmente, esses mediadores são liberados no local onde se deflagrou o processo, importantes substâncias são liberadas para manter e amplificar a resposta, citando-se a serotonina, histamina, bradicinina, prostaglandinas (PG), citocinas, óxido nítrico (NO) e PAF. As aminas vasoativas, serotonina e histamina possuem ações semelhantes. Atuam na vasoconstrição inicial, e juntamente com outros mediadores, na vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular. A serotonina é encontrada no epitélio do trato gastrointestinal e é um poderoso agente estimulante das terminações nervosas sensitivas para a dor e prurido, sendo também responsável por produzir rubor (SANTOS, et al, 2011).

No processo inflamatório a histamina é liberada pela degranulação dos mastócitos promovida por diversos estímulos, incluindo a SP, interleucina-1 (IL-1) e fator de crescimento nervoso (NGF). Além disso, desempenha um papel central na hipersensibilidade imediata e nas respostas alérgicas (BRUTON; LAZO; PARKER, 2006). A liberação localizada e sua ação principalmente nos receptores H1 e H2 na microcirculação promove vasodilatação das arteríolas e aumento da permeabilidade vascular, também promove a síntese de PGI₂ e induz a liberação de NO pelo endotélio (JUTEL et al., 2009).

A bradicinina (Bk) é também um importante mediador devido seus efeitos pró-inflamatórios, descrito como ativadora direta dos nociceptores e mediadora hiperalgésica. A Bk liga-se a quatro tipos de receptores conhecidos (Bk1-Bk4), sendo que Bk1 e Bk2 são os mais importantes com relação à dor de natureza inflamatória. A Bk apresenta um potente efeito sobre a permeabilidade vascular, com efeitos semelhantes aos da histamina. (MILLAN, 1999; ARAÚJO, 2007).

As citocinas são um grupo heterogêneo de proteínas de baixo peso molecular, extremamente potentes que regulam a atividade celular, podendo agir no local onde são produzidas, em células próximas ou secretadas para circulação, com efeitos à distância (KRAYCHETE et al., 2006).

As citocinas destacadas no processo inflamatório são as interleucinas (IL-1, IL-2, IL-6 e IL-8) e o fator de necrose tumoral (TNF). A IL-1 e o TNF são liberados por macrófagos durante o processo inflamatório e produzem muitas das respostas pró-inflamatórias, incluindo indução de febre, mobilização e ativação de leucócitos polimorfonucleares, indução das enzimas ciclooxigenase (COX) e lipoxigenase, elevação na expressão de moléculas de adesão, ativação de linfócitos T e B e estimulação da produção de outras citocinas (ABBAS et al., 2012).

O PAF é um potente mediador inflamatório fosfolipídico que aumenta a adesão celular e ativa as células endoteliais, também é capaz de estimular a quimiotaxia de neutrófilos e monócitos, a degranulação e a produção de EROs (COUSSENS; WERB, 2002).

O NO é uma molécula com propriedades tanto protetoras como deletérias, gerado pela enzima NO sintase (NOS) constitutiva (SALLES et al., 1999). O NO antagoniza as contrações da musculatura lisa vascular e inibe a ativação plaquetária. Com ação nas integrinas, o NO modifica a adesividade leucocitária e a diapedese dos neutrófilos (FLORA FILHO; ZILBERSTEIN, 2000).

Os metabólitos do ácido araquidônico (AA) são derivados de fosfolipídios e ácidos graxos liberados das membranas plasmáticas após a agressão. Ocorrem em todos os tecidos e são produzidos principalmente pela atividade de neutrófilos e macrófagos. Uma vez liberado, o AA servirá como substrato para duas vias enzimáticas distintas: a via das COX, que desencadeia a biossíntese das PGs e dos tromboxanos, e a via das lipoxigenases, responsável pela síntese dos leucotrienos. (FITZGERALD; PATRONO, 2001).

A síntese das PGs inicia-se, portanto, com a atividade da ciclooxigenase catalisando a adição do oxigênio molecular ao ácido araquidônico, para formar, inicialmente, o endoperóxido intermediário prostaglandina G₂ (PGG₂). A mesma enzima, por sua atividade peroxidase, catalisa a redução desta prostaglandina para formar a PGH₂. As PGG e PGH apresentam pouca atividade e servem como substrato para a formação de diferentes PGs e tromboxanos ativos, incluindo PGD₂, PGE₂, PGF₂, prostaciclina (PGI₂) e tromboxanos (TX) (CARVALHO et al., 2004;

MONTEIRO et al., 2008). As prostaglandinas da família E e I (PGEs) são potentes vasodilatadoras. A PGI₂ é sintetizada pelo endotélio vascular, controlando a adesão de células ao endotélio e a agregação plaquetária, contribuindo como mecanismo antitrombogênico da parede vascular intacta. Esses efeitos vasodilatadores das prostaglandinas facilitam a restituição epitelial, contribuindo para a circulação de um pH elevado no microambiente mucoide que se forma como um tampão sobre os sítios que sofreram dano epitelial (WALLACE, 2008).

Os leucotrienos são moléculas de sinalização presentes em uma variedade de condições inflamatórias e alérgicas. São divididos em dois grupos: o leucotrieno pró-inflamatório (LTB₄) e leucotrienos espasmogênicos (LTC₄, LTD₄ e LTE₄). Inúmeras evidências experimentais sugerem que os leucotrienos e alguns dos seus metabólitos contribuem para a fisiopatologia da resposta inflamatória através de grande variedade de efeitos, incluindo principalmente a contratilidade da musculatura lisa (LTC₄, LTD₄, LTE₄); agregação, degranulação e quimiotaxia de neutrófilos (LTB₄); aumento na permeabilidade vascular (LTC₄, LTD₄, LTE₄); atividade sobre linfócitos e hiperalgesia (LTB₄) (HAEGGSTRÖM, 2000).

A resposta inflamatória aguda pode resultar na eliminação dos agentes infecciosos, seguido por uma resolução e fase de reparação, que é mediada principalmente por macrófagos residentes ou recrutados dos tecidos. As lipoxinas (mediadores lipídicos) exercem papel importante na resolução da inflamação através da interrupção da produção de prostaglandinas pró-inflamatórias e inibição do recrutamento de neutrófilos e, ao contrário, promovem o recrutamento de monócitos, que removem as células mortas e inicia-se a remodelação do tecido (SERHAN et al, 2008). Além destes mediadores, protectinase resolvinas (uma outra classe de mediadores lipídicos) também contribuem para a resolução da inflamação. Os fatores de crescimento produzidos por macrófagos, também têm um papel crucial na resolução da inflamação, pois estão envolvidos no início de reparo tecidual (ALENCAR; ROCHA; PINHEIRO, 2005)

A inflamação aguda pode finalizar-se com a interrupção de todos os eventos característicos da reação inflamatória e retorno do tecido lesionado à normalidade ou sua substituição por tecido conjuntivo. Se não houver eliminação do patógeno, a reação persiste e adquire novas características. O infiltrado de neutrófilos é substituído por macrófagos e, em caso de infecção, também por células-T. Se o efeito combinado destas células ainda é insuficiente, um estado inflamatório crônico segue e envolve a formação

de granulomas e tecido linfoide terciário. Além do patógeno persistente, a inflamação crônica pode resultar de outras causas de dano tecidual, como resposta autoimune ou corpos estranhos não degradados (MEDZHITOV, 2008). Embora possa suceder a inflamação aguda, a inflamação crônica, com frequência, começa de maneira insidiosa, como resposta de baixo grau, latente e, muitas vezes, assintomática (GERALDO; ALFENA, 2008).

2.4 Características gerais da dor

O desenvolvimento da resposta inflamatória comumente é acompanhado de sensação dolorosa. A dor é um processo fisiológico influenciado por diversos elementos como emoção, cognição, memória e o próprio meio social. Embora haja a divisão da dor em termos anatômicos, fisiológicos e farmacológicos, muitos fatores estão envolvidos na dor e exigem uma abordagem multifatorial para estudar a analgesia (FARQUHAR-SMITH, 2007).

Segundo o conceito da IASP (International Association for the Study of Pain), a dor é definida por “uma experiência sensorial e emocional desagradável, relacionada com lesão tecidual real ou potencial, ou descrita em termos que sugerem tal dano”. Neto et al. (2009) descrevem a dor como uma experiência complexa que envolve não apenas a transdução de estímulo nocivo ambiental, mas também processamento cognitivo e emocional pelo encéfalo. Alguns estudos associam o papel fisiológico da dor como um alarme protetor do organismo

Alguns estudos apontam que em indivíduos saudáveis, a dor serve para propósitos altamente adaptativos relacionados com a sobrevivência. As sensações dolorosas induzem respostas urgentes de seu alívio, provocando comportamentos como massagear (ou lambear) a área lesada, além de raiva, grito e choro (TUFIK, 2004), uma vez que o processo doloroso envolve componentes sensoriais e emocionais. Como animais não são capazes de verbalizar os componentes subjetivos da dor, neles não se avalia dor, mas nocicepção. Sendo assim, termos como dor e analgesia são mais adotados para humanos e nocicepção e antinocicepção para animais (KLAUMANN; WOUK; SILLAS, 2008)

Sob o ponto de vista de duração da ação, a dor pode ser classificada como aguda, transitória (passageira) ou crônica. A dor aguda geralmente está associada com uma lesão tecidual recente, ativação de nociceptores no local da lesão, e pode persistir

por dias ou poucas semanas e desaparece quando ocorre recuperação da lesão. A dor passageira é caracterizada por ativação de nociceptores tanto da pele quanto de outros tecidos e ocorre na ausência de qualquer dano tecidual, tem curta duração e se dissipa em pouco tempo, provavelmente sua função é proteger o indivíduo de um possível dano tecidual. Quando há dano tecidual ou uma doença, temos a dor crônica sendo também mantida por fatores metabólicos envolvidos que não os gerados no início do processo doloroso (BARKSBY et al, 2007).

O tipo de lesão ou mediadores envolvidos também pode dividir a dor como dor neurogênica, dor neuropática ou dor inflamatória. A dor nociceptiva resulta da ativação direta de nociceptores da pele e outros tecidos em resposta a uma lesão tecidual, acompanhada de inflamação (DEL-VECHIO-VIEIRA, 2009). A resposta inflamatória subsequente, gera a sensação de dor e envolve a participação de mediadores inflamatórios no local da lesão. Estes mediadores incluem bradicinina, SP, PGs, fatores de crescimento, NO, citocinas, quimiocinas que podem ser chamados de substâncias algogênicas (LINLEY, 2010).

O reconhecimento da dor como reação sensitiva envolve três mecanismos básicos: transdução, transmissão e modulação. Durante a transdução, ocorre a “transformação” de um estímulo mecânico, térmico ou químico, em uma ativação dos receptores da dor (nociceptores), que então o transmitem na forma de um impulso nervoso por um potencial de ação a diferentes núcleos do tálamo, bem como a diversas áreas do córtex sensorial somático, substância cinzenta periaquedutal, hipotálamo, amígdala e cerebelo (VELOSO, et al, 2012). A transmissão é o conjunto de vias que permitem que o impulso nervoso seja conduzido ao SNC; e modulação, as vias responsáveis pela supressão da dor ativadas pelas próprias vias nociceptivas (BAGGIO, 2010).

2.4.1 Nocicepção

O termo nocicepção foi introduzido por Sherrington (1906) para diferenciar a percepção de estímulos nocivos da sensação de dor, propriamente dita. A nocicepção refere-se às manifestações neurofisiológicas geradas pelo estímulo nocivo e adverte de dano iminente. A sinalização da dor é feita ao longo do eixo periférico por receptores de limiar elevado, e nos centros cerebrais ocorre a discriminação entre estímulos potencialmente prejudiciais de estímulos inócuos (DIB-HAJJ et al, 2010).

Os nociceptores podem responder a uma variedade de estímulos, os quais disparam potenciais de ação em neurônios aferentes primários e conduzem o estímulo ao sistema nervoso central (SNC). As fibras sensoriais que conduzem as sensações sentidas periféricamente podem ser classificadas de acordo com características anatômicas e fisiológicas. As fibras mielinizadas A β são encobertas por grande quantidade de mielina, possuem grande diâmetro e detectam estímulos aplicados à pele, músculos e articulações. A estimulação direta em qualquer frequência dessas fibras, em humanos, conduz rapidamente o estímulo, porém, não produzem sensações descritas como dolorosas (ALMEIDA; ROIZENBLATT; TUFIK, 2004).

As fibras A δ possuem pouca mielina e apresentam diâmetro intermediário. Propagam o sinal de forma mais rápida que a fibra do tipo C e respondem a estímulos nocivos de origem térmica e mecânica (JULIUS; BASBAUM, 2001). Dividem-se em tipo I e tipo II. As fibras do tipo I são mais responsivas ao aquecimento lento e disparam o potencial de ação em temperaturas nocivas em torno de 53 °C, enquanto que as fibras do tipo II disparam em temperaturas em torno de 46 °C (CRAIG, 2003; COUTAUX et al., 2005).

As fibras C não são mielinizadas e apresentam o menor diâmetro. Alguns estudos apontam que são encobertas por uma pequena quantidade de mielina. Respondem a estímulos nocivos de origem térmica, mecânica e química e por isso, são denominados nociceptores polimodais (COUTAUX et al., 2005).

As respostas dos nociceptores periféricos a estímulos ocorre por despolarização destes que desencadeia potenciais de ação, cuja gênese e propagação são dependentes de canais iônicos, como canal de sódio dependente de voltagem (DIB-HAJJ et al, 2010) e receptores ionotrópicos de potencial transitório, como receptor vaniloide de potencial transitório tipo 1 (TRPV1) e canais iônicos ácido-sensíveis (ASICs) (WHITE et al, 2010). Além disso, a atividade dos nociceptores é mediada pela ação de substâncias algôgenicas que são liberadas e/ ou sintetizadas em elevadas concentrações no ambiente tecidual na decorrência de processos inflamatórios. Substâncias endógenas, como ácido araquidônico (AA), neuropeptídeos (SP), cininas (Bk), aminoácidos excitatórios como glutamato, entre outros, são produzidos e liberados pelo tecido lesionado e estimulam os receptores presentes na membrana dos neurônios (COUTO, et al, 2011).

2.4.2 Mecanismos neurais da dor

Os dois sistemas de modulação nociceptivos mais importantes são mediados por receptores N-Metil-D-Aspartato (NMDA) e opioide, distribuídos por toda extensão do sistema nervoso central. Entre os três principais subtipos de receptores opioides, os receptores μ e δ podem inibir ou potencializar eventos mediados pelos receptores NMDA, enquanto o receptor κ antagoniza a atividade mediada por receptores NMDA (RIEDEL e NEECK, 2001).

Classicamente, a transmissão da dor se faz por uma via bem conhecida. As informações geradas, na forma de potencial de ação, são conduzidas por neurônios aferentes primários que fazem sinapse com neurônios de segunda ordem localizados no gânglio da raiz dorsal (DRG) na medula espinhal, mais precisamente nas lâminas I e II (substância gelatinosa), local onde os nociceptores têm seus corpos celulares (WOOLF e SALTER, 2000).

Os neurônios secundários cruzam a medula espinhal para ascender ao longo do trato espinotalâmico, projetando seus axônios ao tálamo. A ativação destes neurônios resulta na resposta reflexa espinhal, assim como na ativação de tratos ascendentes, os quais transmitem informação nociceptiva às estruturas supraespinhais para completar a via nociceptiva. No tálamo ocorre a somatização do estímulo nocivo onde existe o componente emocional da dor. O tálamo e o córtex são regiões finais da projeção das vias de nocicepção. O tálamo informa que existe sensação nociceptiva, e o córtex discrimina o tipo de sensação nociceptiva (YAKSH, 2006).

Os neurotransmissores são fundamentais na sensibilização do corno dorsal. São liberados por terminações axônicas de neurônios nas junções sinápticas, apresentam função excitatória ou inibitória da dor e estão envolvidos na transmissão central e na modulação da informação nociceptiva, como: o glutamato (GLU) e outros aminoácidos excitatórios; neuropeptídeos (SP) e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP); adenosina-trifosfato (ATP); NO; PGs e neurotrofinas (fatores de crescimento); dentre outros (MILLAN, 1999; BEAR et al., 2002).

A SP é encontrada em altas concentrações nas terminações aferentes da medula espinhal, sendo o mediador da primeira sinapse da dor. Atua sinergicamente com o GLU para promover a excitabilidade neuronal no corno dorsal, através de mecanismos que envolvem o aumento da expressão de NO (NESTLER et al., 2001). O GLU é um aminoácido excitatório liberado juntamente com neuropeptídeos dos terminais de aferentes primários. Este funciona como neurotransmissor e gera potenciais excitatórios pós-sinápticos rápidos que são responsáveis pela ativação de neurônios pós-sinápticos

espinotalâmico. Os neuropeptídeos como a SP são capazes de prolongar a ação do GLU (KANDEL et al., 2000).

Por conta de todos os aspectos desagradáveis da dor, algumas vezes até agravando o estado da doença, inúmeros pesquisadores estão envolvidos nos estudos dos mecanismos moduladores desta, no intuito de mapear suas vias, visando modular através de meios farmacológicos ou cirúrgicos (LOESER *et al.*, 2008).

2.5 Agentes analgésicos e anti-inflamatórios

Mesmo sendo o mecanismo de inflamação e nocicepção indispensáveis à homeostase corpórea, o desconforto causado por essa resposta exige, em alguns casos, a intervenção com o uso de medicamentos. Diferentes classes de fármacos são utilizadas para o controle e tratamento da dor e inflamação na terapêutica e exercem seus efeitos por diferentes mecanismos (TITA, et al., 2011).

Em geral, os fármacos analgésicos produzem seus efeitos modulando a liberação de mediadores analgésicos endógenos ou, inibindo a liberação de neurotransmissores alogênicos. Os analgésicos de ação central ou opioides são substâncias naturais, semissintéticas ou sintéticas que agem nas estruturas do SNC, no sentido de promover o alívio da dor, sem provocar perda da consciência (SHARMA; KUMAR, 2011).

A morfina, considerada o protótipo dos opioides, é derivada de uma espécie de papoula chamada *Papaversomniferum* (LE MERRER et al, 2009). Os efeitos biológicos destes são mediados por receptores (μ , δ , κ) expressos no SNC (cérebro e medula espinhal) e na periferia. A ação analgésica se dá pela ativação das vias descendentes, inibindo a transmissão no corno posterior da medula, ou ainda, por inibirem a excitação das terminações sensoriais na periferia (VIEIRA, et al., 2012)

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) estão entre os agentes farmacológicos mais utilizados na prática clínica, sobretudo pelas importantes ações de amplo espectro que incluem ação anti-inflamatória, analgésica e antipirética, além de profilaxia contra doenças cardiovasculares (DOMINGUES, 2013).

Em geral, esses efeitos estão relacionados à inibição da enzima cicloxigenase, que catalisa a transformação de ácido araquidônico em diversos mediadores lipídicos, denominados prostaglandinas e tromboxanos, tendo importante função homeostática na proteção da mucosa gástrica, fisiologia renal, gestação e agregação plaquetária, além de

terem sua produção induzida em condições como inflamação e câncer (ARAUJO, 2007).

Além dos opioides e AINES, fármacos de outras classes farmacológicas são usados como analgésicos entre eles: tramadol, antidepressivos tricíclicos (imipramina e a amitriptilina), os fármacos antiepilépticos (carbamazepina, gabapentina e ocasionalmente a fenitoína), cetamina e a lidocaína, todos particularmente usados para o tratamento da dor neuropática (RANG et al., 2012).

Hoje, a busca por novos compostos analgésicos e terapias anti-inflamatórias tem sido uma prioridade do farmacologista e indústrias farmacêuticas, tendo em vista que ainda não dispomos de um fármaco analgésico e/ou anti-inflamatório ideal, ou seja, que não promovam efeitos colaterais potenciais. Por essa razão, há a contínua necessidade de buscar medidas alternativas para o desenvolvimento de medicamentos para o combate da dor. Nessa perspectiva, os produtos naturais encaixam-se como uma fonte promissora na pesquisa de novas substâncias com maior eficácia e menores efeitos adversos.

3.JUSTIFICATIVA

O consumo de produtos de origem vegetal tem aumentado a cada dia e este hábito pode estar relacionado ao questionamento da população aos perigos do uso irracional dos medicamentos alopáticos, associado a seus custos muitas vezes dispendiosos e procuram substituí-los pelo uso de plantas medicinais (KLEIN, 2009).

No Brasil e em todo mundo, as plantas sempre tiveram um papel importante na terapêutica, porém muitas são empregadas sem comprovação científica de seus reais efeitos e suas vias de ação. Considerando também a necessidade de inovação e carência de novas drogas para o tratamento de doenças que permanecem com terapias algumas vezes inadequadas ou com expressivos efeitos colaterais, além da pressão entre as próprias indústrias, é fundamental a pesquisa em busca de recursos que visam o desenvolvimento de novos medicamentos.

Desta forma, este trabalho avalia as atividades anti-inflamatória e antinociceptiva de *C. cf. macrophyllum*, sendo este um passo essencial para o direcionamento das investigações, e também para o estabelecimento de possíveis relações entre a composição e o efeito biológico apresentado pela planta.

4 OBJETIVOS

4.1. Objetivo Geral

Avaliar o potencial da atividade biológica das frações do extrato da folha da planta *Cenostigma cf. macrophyllum* (LEGUMINOSAE) do Semiárido da Bahia, coletadas na Floresta Nacional Contendas do Sincorá (FLONA), segundo dados etnofarmacológicos da região.

4.2 Objetivos Específicos

- a) Avaliar a atividade anti-inflamatória *in vivo* das frações da folha de *Cenostigma cf. macrophyllum* (Leguminosae) do Semiárido da Bahia, coletadas na Floresta Nacional Contendas do Sincorá
- b) Analisar a atividade antinociceptiva *in vivo* das frações da folha de *Cenostigma cf. macrophyllum* (LEGUMINOSAE) do Semiárido da Bahia, coletadas na Floresta Nacional Contendas do Sincorá

5 METODOLOGIA

5.1 Coleta e Identificação da Espécie Vegetal

Para avaliação dos parâmetros da pesquisa, a espécie analisada foi *Cenostigma cf. macrophyllum* (*Leguminosae*), citada pela população como Canela de Velho. A espécie vegetal foi coletada na Floresta Nacional Contendas do Sincorá (FLONA), uma área com cobertura florestal de espécies predominantemente nativas e tem como objetivo básico o uso múltiplo sustentável dos recursos florestais e a pesquisa científica. A coleta da planta foi consentida pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), sendo (N 12292-1) o registro de consentimento para a manipulação fúngica e microbiológica e (N 13258-1) o registro de autorização para atividade com finalidade científica. A espécie coletada foi fotografada, devidamente localizada (S13°55'13.3" e W041°06'54.0", 371m altitude), catalogada (Voucher 4927, 4961, 4966, 4981) e alocada no Herbário da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, campus de Vitória da Conquista, sob coordenação do Prof. Aivaldo de Oliveira S. Filho. As exsiccatas foram preparadas e a identificação taxonômica foi realizada por comparação no herbário e através de literatura.

5.2 Preparo do Extrato alcoólico e frações dos produtos naturais

O extrato alcoólico de *C. cf. macrophyllum* foi preparado separadamente a partir da folha seca e moída com etanol PA, por maceração com esporádica agitação. Após filtração, o extrato foi concentrado em evaporador rotativo até eliminação do etanol, fornecendo o extrato. O extrato então, foi particionado com solvente de polaridade crescente dando origem as frações de hexano, diclorometano, acetato de etila, e butanol que foram concentradas em evaporador rotativo até eliminação dos solventes. Posteriormente, as frações foram diluídas e testadas farmacologicamente em doses previamente determinadas. (YATSUDA et al., 2005; CELEGHINI; VILEGAS; LANCAS, 2001; DUARTE et al., 2003). As doses avaliadas foram determinadas conforme os resultados obtidos com o extrato bruto (ANDRADE, et al, 2012).

5.3 Modelos experimentais para a avaliação das atividades antinociceptiva e anti-inflamatória

5.3.1 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, a temperatura de 23 ± 2 °C e a umidade relativa de 50 ± 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 (CEE/UNIUBE) de acordo a lei nº 11.704/09, nº do protocolo 173/2009 (ANEXO B). Os camundongos foram homogeneamente distribuídos entre os grupos para os experimentos. 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

5.3.2 Teste das Contorções Abdominais Induzidas por Ácido Acético

O efeito antinociceptivo foi avaliado pelo teste de contorção abdominal induzida por ácido acético 0,6% (0,1 mL/10 g, i.p.), de acordo com procedimentos previamente descritos por Koster, Anderson e Beer (1959) e Vacher, Duchêne-Marullaz, Barrat (1964). Os animais foram tratados com as frações da planta (50 mg/kg, s.c.) ou veículo (etanol 10%, v/v) 30 minutos antes da injeção de ácido acético. Os animais do controle negativo receberam somente solução salina 0,9% (s.c.). 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.

5.3.3 Nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina em camundongos

O modelo de nocicepção induzida pela formalina consiste em duas fases e permite avaliar dois tipos distintos de nocicepção: a de origem neurogênica

(estimulação direta das fibras nociceptivas) e a de origem inflamatória (caracterizada pela liberação de mediadores inflamatórios). O comportamento de nocicepção induzido por formalina foi avaliado como descrito anteriormente (TJÖLSEN et al., 1992). Um volume de 20 μ L de solução de formalina 1% foi injetado i.pl. na superfície ventral da pata direita dos animais pré-tratados 30 min antes com as frações da planta (50 mg/kg, s.c.), veículo (10% etanol, v/v, s.c.). Os camundongos foram observados individualmente durante 30 min após a injeção de formalina e o comportamento da nocicepção foi determinado pelo número de *flinches*, sacudir da pata, mordidas e lambidas, na pata injetada durante o período de tempo de observação. A fase 1 (neurogênica) foi definida como 0-15 min após a injeção, e a fase 2 (inflamatória) foi definida como 15-30 min após a injeção. Após o final do experimento, as patas posteriores foram removidas e pesadas em uma balança analítica. O peso das patas foram comparados no intuito de observar se houve diferença entre o volume deslocado da pata direita e o da pata esquerda com a finalidade de determinar a formação de edema. Os resultados foram expressos em gramas.

5.3.4 Teste de Von Frey

Os filamentos Von Frey (FREY, 1896) é um método para determinar o limiar de nocicepção mecânica. Essa técnica foi modificada em um método eletrônico usado primeiramente em humanos e posteriormente em ratos (MÖLLER et al., 1998). O limiar de nocicepção mecânica foi medido pelo método de Von Frey eletrônico (NAPIMOGA et al., 2007). 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. O teste consistiu em produzir uma pressão na pata do animal com um transdutor de força de mão adaptado com uma ponta (0,8 mm² diâmetro da ponta, eletrônica de Von Frey, Insight Equipamentos©, Brasil). Um espelho inclinado sob a grade proporcionou uma visão clara da pata dos camundongos. 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 foi de 50 g. Os camundongos foram pré-tratados com as frações da planta (100 e 200 mg/kg, s.c.) ou veículo (etanol 10%, v/v) e depois de 30 min, foi injetado carragenina (Cg) (100 μ g/pata, i.pl.) na superfície ventral da pata dos animais. Após três horas o teste Von Frey foi realizado. A intensidade de hipernocicepção foi quantificada como a variação

na pressão (Δ de reação em gramas) obtida subtraindo-se o valor basal observado antes do procedimento experimental (dia 0) do valor de pressão obtido após a administração do estímulo que variaram de acordo com o tratamento (dia 1).

5.3.5 Recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal

O modelo de peritonite induzida por carragenina (cg) é considerado por muitos pesquisadores como um dos modelos mais completos para avaliação da inflamação. (HURLEY et al., 1983). As frações da planta (200 mg/kg, s.c.) foram administradas por via subcutânea 30 minutos antes da administração do estímulo inflamatório, uma injeção i.p. de Cg, 500 μ g/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 (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 são apresentados como o número de neutrófilos por cavidade.

5.3.6 Avaliação da permeabilidade vascular

A permeabilidade vascular foi analisada pelo teste de azul de Evans (THURSTON et al., 2000). Quinze minutos antes da administração das frações da planta, o corante azul de Evans (200 mg/kg) diluído em 50 μ L de solução salina foi injetado por via venosa no plexo ocular. As frações da planta (100 e 200 mg/kg, s.c.) foram administradas por via subcutânea 30 minutos antes do estímulo inflamatório (injeção i.p de Cg, 500 μ g/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©, ThermoScientific, Waltham, MA, EUA).

5.4 Análise estatística

Os resultados obtidos foram expressos em média \pm E.P.M. e foi realizada comparação estatística entre os grupos usando análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias, seguido do teste de Bonferroni, usando o programa GraphPadPrism® versão 5.00. Valores foram considerados significantes quando $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1 Rendimentos do extrato e das frações de *Cenostigma cf. macrophyllum*

O extrato etanólico da folha de *C. cf. macrophyllum* após filtração foi concentrado, obtendo-seo rendimento de 28,63% em relação ao peso da plantaseca (Tabela 1). Posteriormente, no processo de partição seguindo gradiente crescente de polaridade, hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol, os rendimentos obtidos sobre uma amostra de aproximadamente 20 g foram: 4,23% (hexano), 44,16% (diclorometano), 36,02 % (acetato de etila) e 8,28% (butanol) em relação ao extrato bruto da folha. Observa-se que asfrações de diclorometano possuem um maior rendimento do que as demais frações da planta.

Tabela 1 – Rendimentos dos extratos e frações obtidos da folha da *Cenostigma cf. macrophyllum*

Procedimento de Obtenção	Extratos/Fração/Subfração	Rendimento (%)
Maceração	Etanólico	28,63
Partição	Hexano	4,23
	Diclorometano	44,16
	Acetato de etila	36,02
	Butanol	8,28

6.2 Avaliação das atividades antinociceptiva e anti-inflamatória das frações do extrato etanólico da folha de *Cenostigma cf. macrophyllum* (Leguminosae).

A atividade antinociceptiva e anti-inflamatória das frações de hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol obtidos do extrato etanólico da folha de *C. cf. macrophyllum* foram determinadas por meio de diferentes ensaios.

Para avaliar o efeito antinociceptivo das frações da folha, foram realizados inicialmente dois tipos diferentes de testes: nocicepção visceral (ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético) e nocicepção neurogênica e inflamatória (teste da formalina), e posteriormente sobre a hipernocicepção mecânica (teste de Von Frey).

6.2.1 Teste das Contorções Abdominais Induzidas por Ácido Acético

No teste inicial de contorção abdominal induzida por ácido acético (Figura 1), a fração de butanol (50 mg/kg) do extrato etanólico da folha de *C. cf. macrophyllum* apresentou um decréscimo estatisticamente significativo ($p < 0,05$) no número de contorções abdominais quando comparado ao grupo tratado com veículo (etanol 10%, v/v). As demais frações (hexano, diclorometano e acetato de etila) reduziram as contorções, mas não de forma significativa em relação ao grupo veículo ($p > 0,05$).

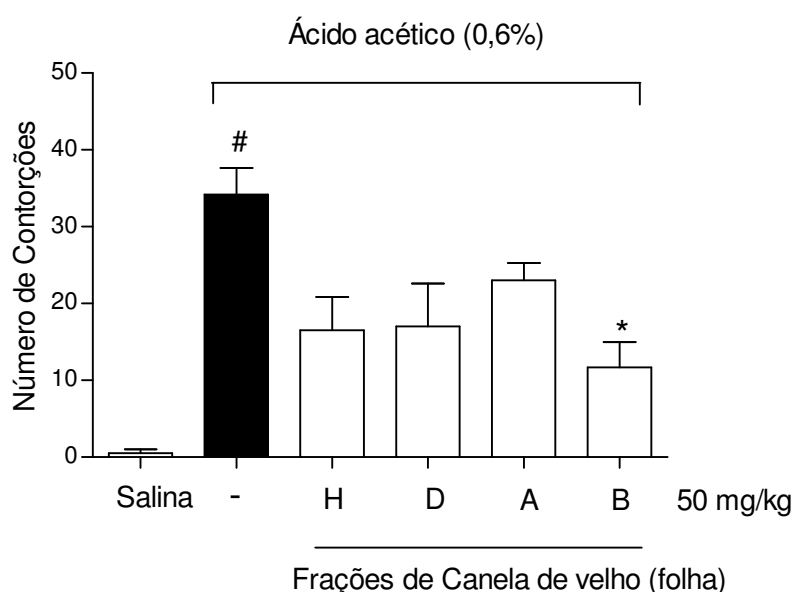


Figura 1 – Efeito das frações de hexano (H), diclorometano (D), acetato de etila (A) e butanol (B) da folha *Cenostigma cf. macrophyllum* no teste de contorção abdominal induzida por ácido acético (0,6%) em camundongos. Os animais foram pré-tratados, de acordo com os grupos, com diferentes frações do extrato (50 mg/kg, s.c.), veículo (VH, etanol 10%, v/v) ou solução salina 0,9 %. Os resultados são apresentados como médias \pm E.P.M. da contorção em camundongos ($n = 6$). A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ quando comparado o grupo dos camundongos tratados com a fração ao grupo veículo. # $p < 0,05$ quando comparado o grupo veículo ao grupo salina.

6.2.2 Nocicepção Induzida pela Injeção Intraplantar de Formalina

A atividade antinociceptiva investigada no teste da formalina (Figura 2), pode ser avaliada em duas fases diferentes de nocicepção, a fase 1, nocicepção neurogênica decorrente nos primeiros 5 minutos do teste, e fase 2, nocicepção inflamatória

apresentada entre os 15 e 30 minutos do início do teste. Na primeira fase, as frações de diclorometano e acetato de etila da folha de *C. cf. macrophyllum* (50 mg/kg) foram capazes de reduzir de forma significativa o número de “flinches” (mordidas e lambidas da pata) induzidas pela formalina quando comparadas ao grupo tratado com veículo ($p > 0,05$) (Figura 2).

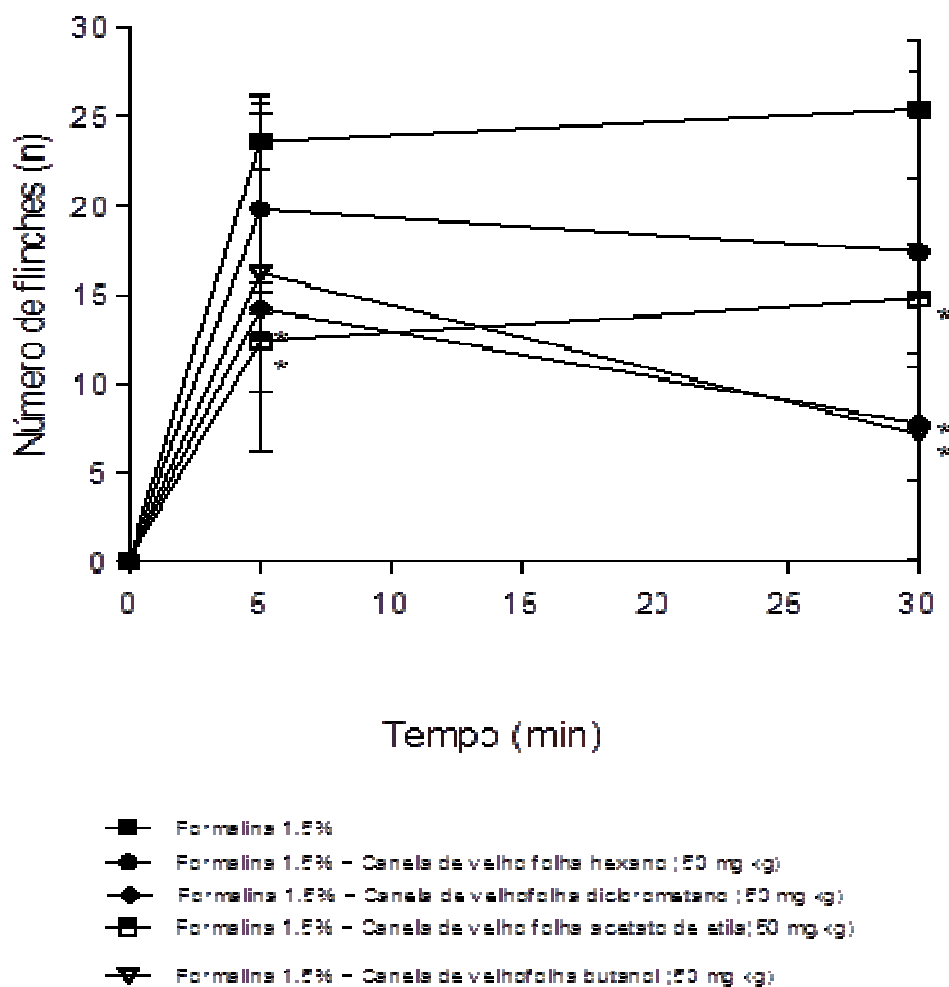


Figura 2 – Efeitos das frações de hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol obtidas da folha de *C. cf. macrophyllum* na resposta à nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina 1,5% em camundongos. Os animais foram pré-tratados por administração subcutânea das frações da planta (50 mg/kg), veículo (etanol 10%, v/v). Os resultados são apresentados como média \pm E.P.M. ($n = 6$) do número de *flinches*, mordidas e lambidas da pata injetada por um período de 30 min. A análise estatística foi realizada por meio do ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo de camundongos tratado com as frações ao veículo.

Na segunda fase da avaliação pela formalina (Figura 2), as frações de diclorometano, acetato de etila e butanol apresentaram redução significativa de nocicepção quando comparada com o grupo veículo ($p < 0,05$). A frações de hexano

não apresentaram resultado inibitório em nenhuma das duas fases deste teste, enquanto a fração de diclorometano e acetato de etila foram capazes de inibir a nocicepção nas duas fases, de origem neurogênica e inflamatória.

Após o experimento de contagem dos “flinches”, as patas posteriores foram removidas e pesadas em uma balança analítica. O edema é um dos parâmetros empregados na avaliação de processos inflamatórios, assim como na atividade de fármacos com propriedades anti-inflamatórias. O peso das patas foi comparado a fim de determinar a formação de edema, naquelas em que houve a injeção intraplantar da formalina. Os resultados foram expressos em gramas (Figura 3). Entretanto, as frações apresentam pequena redução na formação do edema, insuficiente para apresentar diferença estatística do grupo veículo ($p < 0,05$).

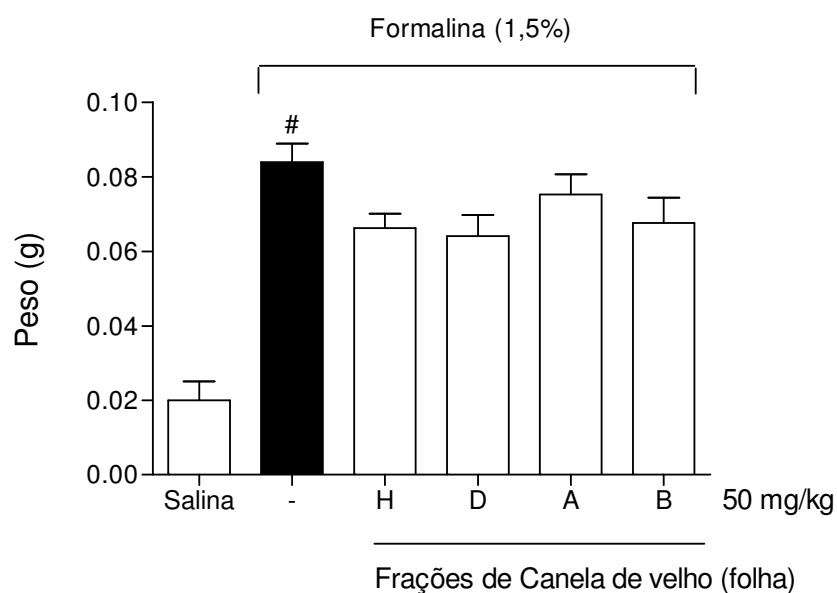


Figura 3 – Efeitos das frações de hexano (H), diclorometano (D), acetato de etila (A) e butanol (B) obtidas da folha de *C. cf. macrophyllum* no edema de pata induzido por formalina 1,5%. Os animais foram pré-tratados por administração das frações (50 mg/kg, s.c.), indometacina (I, 10 mg/kg) ou veículo (VH, etanol 10%, v/v, s.c.). Após a contagem dos *flinches*, os animais ($n = 6$) foram sacrificados e as patas retiradas e pesadas, e o edema da pata calculado pela diferença entre as duas patas em gramas. Os resultados são apresentados como média \pm E.P.M. A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ quando comparado o grupo de camundongos tratados com as frações ao veículo. # $p < 0,05$ quando comparado o grupo veículo ao grupo salina.

6.2.3 Avaliação da Hipernocicepção - Teste de Pressão Crescente na Pata

Na avaliação nociceptiva pelo método de Von Frey (Figura 4), foi observado que as frações de hexano, diclorometano e butanol (200 mg/kg) promoveram significativa reversão da hiperalgesia avaliada no experimento ($p < 0,05$), quando comparados com o grupo veículo. A fração butanol apresentou expressivo resultado na diminuição da sensibilização dos nociceptores das fibras aferentes, diminuindo assim, a resposta a estímulos álgicos que resultariam em hiperalgesia.

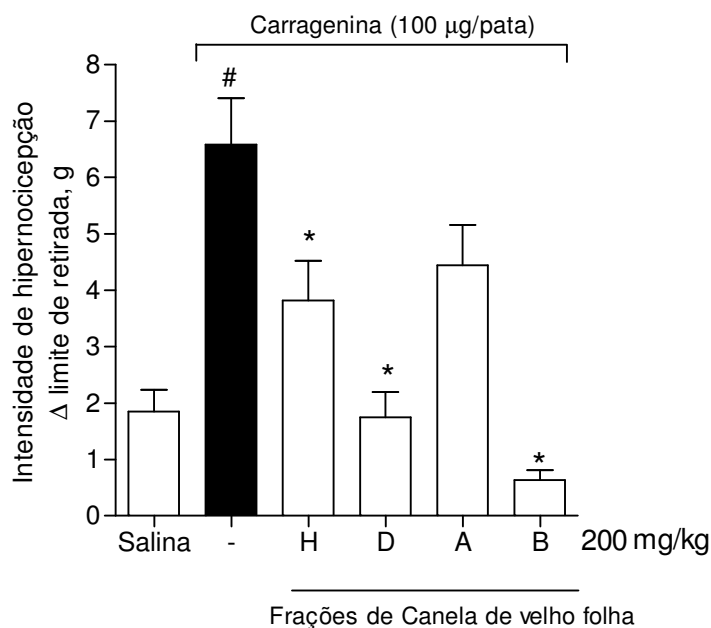


Figura 4 – Efeitos das frações de hexano (H), diclorometano (D), acetato de etila (A) e butanol (B) obtidas da folha de *C. cf. macrophyllum* na inibição da nocicepção mecânica pelo teste de Von Frey. Os camundongos foram tratados com as frações (200 mg/kg, s.c.) ou veículo (VH, etanol 10%, v/v, s.c.), 30 minutos antes da injeção i.pl. de Cg (Cg, 100 mg/pata). As respostas hipenociceptivas foram avaliadas 3 h após estímulo. Os resultados são apresentados como média \pm E.P.M. de seis animais em cada grupo e são representativos de dois experimentos diferentes. A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ quando comparado com grupo veículo. # $p < 0,05$ comparado ao grupo salina

Esse mesmo teste foi realizado em uma dose menor de 100 mg/kg, e apresentou redução da hiperalgesia de forma significativa apenas com a fração acetato de etila (Figura 5) ao ser comparado com o grupo veículo ($p < 0,05$). Ao contrário da dose de 200 mg/kg, onde as três frações de hexano, diclorometano e butanol apresentaram redução da hipernocicepção, somente a fração de acetato de etila a 100 mg/kg apresentou resultado antinociceptivo, o que na dose maior não havia acontecido.

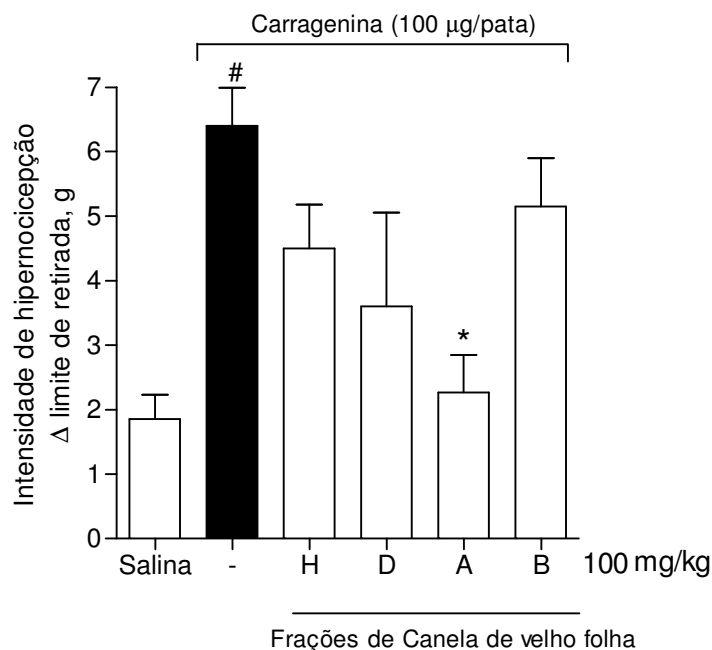


Figura 5 – Efeitos das frações de hexano (H), diclorometano (D), acetato de etila (A) e butanol (B) obtidas da folha de *C. cf. macrophyllum* na inibição da nociceção mecânica pelo teste de Von Frey. Os camundongos foram tratados com as frações (100 mg/kg, s.c.) ou veículo (VH, etanol 10%, v/v, s.c.), 30 minutos antes da injeção i.pl. de Cg (Cg, 100 mg/pata). As respostas hipenociceptivas foram avaliadas 3 h após estímulo. Os resultados são apresentados como média \pm E.P.M. de seis animais em cada grupo e são representativos de dois experimentos diferentes. A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ quando comparado com grupo veículo. # $p < 0,05$ comparado ao grupo salina

6.2.4 Peritonite induzida pela carragenina

A administração intraperitoneal da carragenina nos camundongos objetiva o recrutamento de neutrófilos a fim de se avaliar a atividade anti-inflamatória nos animais. Nesse teste de peritonite induzida em camundongos (Figura 4), todas as quatro frações na dose de 200 mg/kg reduziram de forma significativa, a migração de neutrófilos na cavidade peritoneal comparadas ao grupo tratado com o veículo ($p > 0,05$).

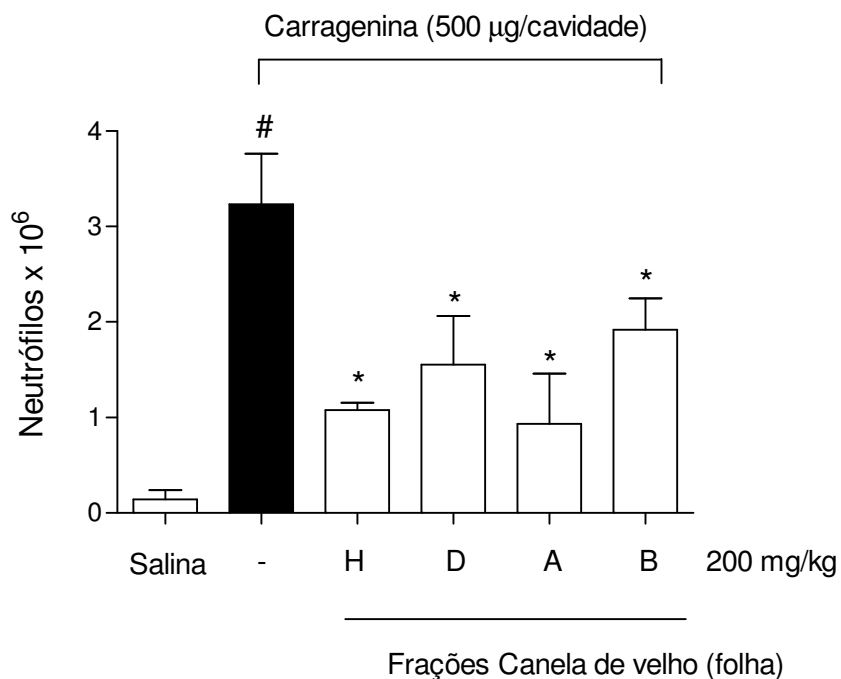


Figura 6 – Efeitos das frações de hexano (H), diclorometano (D), acetato de etila (A) e butanol (B) obtidos da folha de *C. cf. macrophyllum* sobre a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida por carragenina (Cg). Grupos de camundongos (n = 6) foram pré-tratados por via subcutânea com doses das frações (200 mg/kg) ou veículo (VH, etanol 10%, v/v, s.c.), 30 min antes da Cg (500 µg/cavidade) induzir a peritonite. Cada valor representa a média ± E.P.M. A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. * p < 0,05 quando comparado o grupo tratado com fração ao grupo veículo. # p < 0,05 quando comparado o grupo veículo ao grupo salina

Na dose testada de 100 mg/kg, as frações de hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol não apresentaram atividade significativa na redução da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal em relação ao grupo tratado com veículo (p < 0,05).

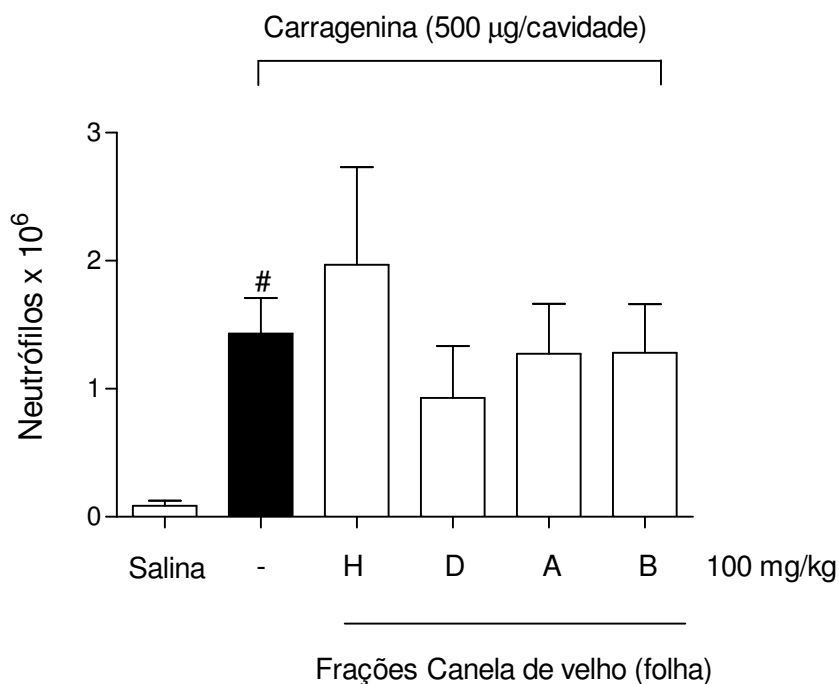


Figura 7 – Efeitos das frações de hexano (H), diclorometano (D), acetato de etila (A) e butanol (B) obtidos da folha de *C. cf. macrophyllum* sobre a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida por carragenina (Cg). Grupos de camundongos (n = 6) foram pré-tratados por via subcutânea com doses das frações (100 mg/kg) ou veículo (VH, etanol 10%, v/v, s.c.), 30 min antes da Cg (500 µg/cavidade) induzir a peritonite. Cada valor representa a média ± E.P.M. A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. * p < 0,05 quando comparado o grupo tratado com fração ao grupo veículo. # p < 0,05 quando comparado o grupo veículo ao grupo salina

6.2.5 Avaliação do Extravasamento Peritoneal – Azul de Evans

Outro método importante a ser avaliado no processo inflamatório é o extravasamento vascular. Entre os grupos pré-tratados com 200 mg/kg das frações de hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol, observa-se que embora as frações de hexano, diclorometano e butanol reduzirem o extravasamento do corante azul de Evans no líquido peritoneal, apenas a fração de butanol apresentou redução significativa em relação ao grupo veículo (p < 0,05). A fração acetato de etila nesse teste não apresentou resultado que sugerisse atividade anti-inflamatória.

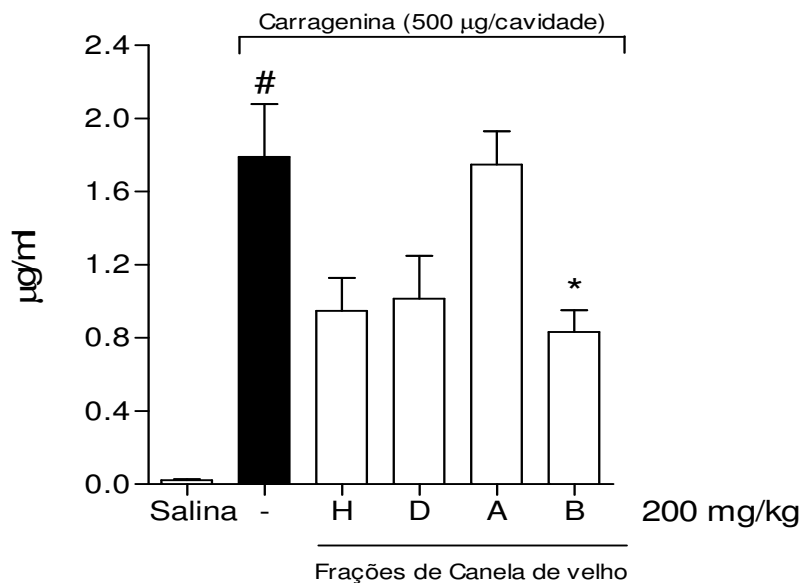


Figura 8 – Efeitos das frações de hexano (H), diclorometano (D), acetato de etila (A) e butanol (B) obtidos da folha de *C. cf. macrophyllum* na permeabilidade vascular, teste de azul de Evans. Os animais foram pré-tratados por administração das frações (200 mg/kg, s.c.) ou veículo (VH, etanol 10%, v/v, s.c.), 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 \pm E.P.M. da concentração de corante azul de Evans (n = 6). A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. # $p < 0,05$ comparado o grupo veículo ao grupo salina.

Na menor dose testada de 100 mg/kg, as frações de hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol não apresentaram atividade antiedematogênica em relação ao grupo tratado com veículo ($p < 0,05$). Apesar da redução de extravasamento de Azul de Evans observada pela fração de hexano, esta não foi suficiente para diferir do grupo veículo ($p < 0,05$).

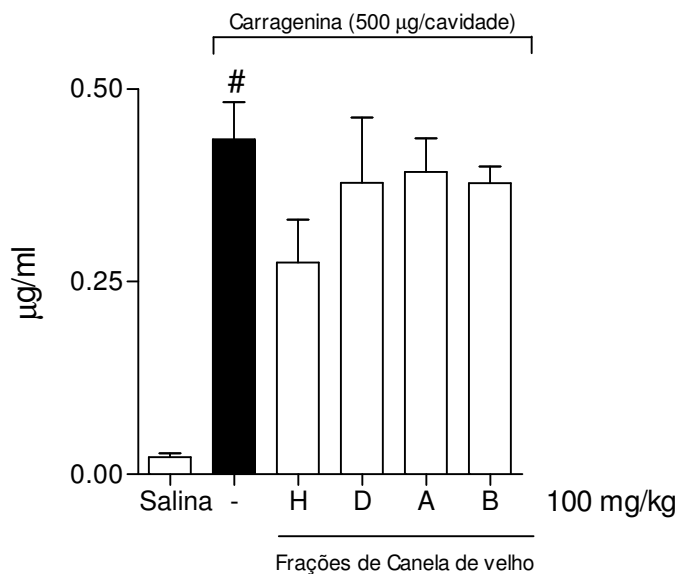


Figura 9 – Efeitos das frações de hexano (H), diclorometano (D), acetato de etila (A) e butanol (B) obtidos da folha de *C. cf. macrophyllum* na permeabilidade vascular, teste de azul de Evans. Os animais foram pré-tratados por administração das frações (100 mg/kg, s.c.) ou veículo (VH, etanol 10%, v/v, s.c.), 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 \pm E.P.M. da concentração de corante azul de Evans (n = 6). A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. # $p < 0,05$ comparado o grupo veículo ao grupo salina.

7 DISCUSSÃO

Na tentativa de aliar o conhecimento cultural com a realidade atual, em todo o mundo vêm sendo realizadas pesquisas científicas, no intuito de verificar a atividade farmacológica ou a eficácia de produtos naturais no tratamento de diversas doenças que acometem o mundo moderno. Quando se trata de fármacos para o tratamento da dor, abre-se uma lacuna no que diz respeito ao regime medicamentoso que pode ser estabelecido, tendo em vista que embora sejam altamente eficazes, os analgésicos geralmente não estão dissociados de efeitos adversos importantes (COUTO, 2011).

Nesse aspecto, hoje temos muitos modelos animais de avaliação das atividades antinociceptiva e anti-inflamatória que são utilizados para avaliar a eficácia de novos fármacos para o tratamento de doenças inflamatórias e dolorosas, bem como estudar seus mecanismos de ação e, de medicamentos já utilizados na terapêutica, mas que não têm o mecanismo de ação farmacológica ainda totalmente esclarecido. Ainda que, na maioria das vezes, pode não se chegar ao mecanismo de ação definitivo da substância ou extrato da planta em estudo, mas esses modelos experimentais são de grande importância e representam o ponto de partida para a caracterização farmacológica de novos compostos capazes de interferir com o curso da dor (SILVA, 2011).

Andrade em 2012, demonstrou que o extrato bruto etanólico da folha de *C. cf. macrophyllum*, foi capaz de minimizar de forma significativa os parâmetros inflamatórios como extravasamento vascular e migração de leucócitos (200 mg/kg) e a dor no modelo de contorção por ácido acético (100 mg/kg), sem apresentar efeito no teste da formalina nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg. A partir dos resultados promissores obtidos com extrato bruto da folha, neste presente trabalho buscou-se investigar as frações bioativas quanto a atividade anti-inflamatória e antinociceptiva, para posteriormente, poder guiar a identificação e isolamento dos compostos bioativos.

A dor não pode ser monitorada em animais, porém ela pode ser estimada por avaliação das respostas de animais a estímulos nociceptivos. Os testes nociceptivos incluem os mais variados estímulos seja elétrico, mecânico, químico, térmico (LE BARS et al, 2001). O primeiro modelo farmacológico empregado foi o teste de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos, que frequentemente é utilizado para a triagem de compostos sintéticos e naturais, com o qual

se objetivou observar a presença de atividade antinociceptiva central e/ou periférica, pois esse método farmacológico possui sensibilidade aos anti-inflamatórios não-esteroidais, assim como aos opioides (FISCHER et al., 2008).

O teste de contorções abdominais é um modelo químico de nocicepção que se baseia na contagem das contorções da parede abdominal seguidas de torção do tronco e extensão dos membros posteriores, como resposta reflexa à irritação peritoneal e à peritonite produzidas pela injeção intraperitoneal de uma solução de ácido acético 0,6% (WHITTLE, 1964)

O ácido acético é um agente flogístico que quando injetado por via intraperitoneal, induz de forma indireta o aparecimento de contorções abdominais, agindo através da liberação de mediadores endógenos que estimularão os neurônios nociceptivos sensíveis (FISCHER et al., 2008). A sensibilização destes nociceptores ocorre através da liberação e/ou produção de mediadores como histamina, serotonina, bradicinina, citocinas, e prostaglandinas.

Deste modo, a nocicepção observada neste modelo tem sido relacionada a mediadores como PGE₂, PGF₂ α e PGI₂, bem como produtos da lipoxigenase (PARVEEN et al., 2007). Este modelo também induz a liberação de TNF- α e IL-1 β , mediadores diretamente ligados aos processos inflamatório e nociceptivo (VERRI et al., 2006), comprovando a relação do modelo com processos inflamatórios e nociceptivos. Além de ser influenciada por esses mediadores inflamatórios, a nocicepção promovida pelo ácido acético também pode ser mediada pela dissociação dos prótons presentes no ácido acético. Os prótons resultantes desta resposta do ácido acético despolarizam neurônios sensoriais diretamente pela ativação de um canal não seletivo catiônico cutâneo, visceral ou outros tipos de fibras C de aferentes periféricos (SOARES et al, 2009).

A partir do modelo de contorções abdominais foi possível demonstrar que a administração subcutânea da fração de butanol da folha de *C.cf. macrophyllum*, produziu uma redução significativa do número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético quando comparado ao grupo de animais pré-tratados com o veículo. Esses resultados sugerem que o efeito causado pela fração de butanol pode estar relacionado à inibição direta ou indireta da liberação de mediadores pró inflamatórios ou até mesmo por uma modulação central da transmissão nociceptiva. Como o teste de contorções abdominais é um modelo relativamente simples e com pouca especificidade (COLLIER

et al., 1968), foi necessário realizar outros ensaios para confirmar e determinar os possíveis mecanismos envolvidos no efeito antinociceptivo das frações do extrato.

O teste da formalina, primeiramente introduzido por Dubuisson e Dennis (1977), é um dos modelos mais bem estabelecidos e empregados experimentalmente para o estudo de mecanismos nociceptivos (CHICHORRO et al, 2004). Este modelo de dor está associado à lesão tecidual, no qual se quantifica a resposta comportamental provocada pela injeção subcutânea de formalina diluída na pata traseira do animal (Martins et al., 2006). A vantagem deste teste sobre outros métodos de nocicepção é a possibilidade de avaliar dois tipos diferentes de dor ao longo de um período prolongado de tempo e, assim, permite o teste de analgésicos com diferentes mecanismos de ação (RANDOLPH, 1997).

A injeção intraplantar de formalina na pata induz uma resposta dividida em duas fases, uma fase curta que pode ser devido à estimulação química direta dos nociceptores, enquanto a segunda fase é dependente dos mecanismos periféricos e inflamatórios. Entre uma fase e outra, tem o período de quiescência (LE BARS, 2001). Nesse teste, as frações de diclorometano e acetato de etila da folha de *C.cf. macrophyllum* foram capazes de reduzir de forma significativa o número de “flinches” (mordidas e lambidas da pata) tanto na primeira quanto na segunda fase, propondo atuação na inibição das substâncias de modulação tanto neurogênica quanto inflamatória. Já a fração de butanol, apresentou resultado apenas na segunda fase, indicando ação sobre os mediadores inflamatórios.

A primeira fase que ocorre nos primeiros 5 min após a injeção de formalina e é também chamada de fase neurogênica. Ela ocorre em função da estimulação química direta dos nociceptores das fibras aferentes do tipo C e, em parte, das fibras do tipo A δ e está associada à liberação de aminoácidos excitatórios, Bk, óxido nítrico e SP, serotonina, histamina e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) (CHEN, et al, 2008). As frações de diclorometano e acetato de etila estão de alguma forma inibindo a ativação direta dos nociceptores, provavelmente pela inibição da liberação desses mediadores excitatórios. Os opioides inibem tanto a primeira quanto a segunda fase (CHICHORRO et al, 2004), assim como foi observado para as frações de diclorometano e acetato de etila.

Já na fase tardia ou fase inflamatória, que ocorre entre 15 e 30 minutos após a injeção de formalina, é uma fase mais duradoura e persistente, causada por inflamação local devido à formação e/ou liberação de mediadores como citocinas, eicosanoides,

cininas, glutamato e óxido nítrico (CHICHORRO et al., 2004; TASSORELLI et al., 2006). Analgésicos opioides também mostram atividade nessa fase, enquanto os AINEs, como a indometacina, mostram atividade apenas na segunda fase (CHICHORRO et al., 2004). Dessa forma, as frações de diclorometano, acetato de etila e butanol, possuem perfil anti-inflamatório além de antinociceptivo, podendo agir na inibição da liberação ou atividade de BK, citocinas, aminas simpatomiméticas e/ou metabólitos do AA (PGs).

O edema também é um dos parâmetros empregados na avaliação de processos inflamatórios, assim como na atividade de fármacos com propriedades anti-inflamatórias. Quando avaliada a atividade anti-edematogênica das frações da folha de *C. cf. macrophyllum* quando estimulado por formalina, nenhuma das frações apresentou resultado significativo. Apesar de não apresentar resultado, não podemos descartar a possível atuação nas prostaglandinas ou em mecanismos periféricos com relação a permeabilidade, visto que alguns estudos apontam que o tempo de avaliação para inibição desse edema pode não ser suficiente (WALLACE, 2008).

O uso de filamentos de von Frey é um método utilizado para avaliar a sensibilidade tecidual ao estímulo mecânico, sendo bastante utilizado clinicamente. Entretanto, tal método passou a ser utilizado também para experimentos laboratoriais, no sentido de avaliar a influência de drogas sobre a sensibilidade nociceptiva em animais. As alterações nos limiares nociceptivos são avaliadas exercendo-se uma pressão linearmente crescente no centro da planta da pata do animal até a produção de uma resposta caracterizada como sacudida (flinches) da pata estimulada (CUNHA et al., 2004).

Os modelos experimentais baseados em testes mecânicos permitem a avaliação do aumento da sensibilidade do nociceptor a estímulos inócuos (alodinia) ou nocivos (hiperalgesia). Porém, além de estímulo de nociceptores de fibras A δ e nociceptores de fibras C, também podem ser ativados mecanorreceptores, resultando em estímulos inespecíficos que nem sempre refletem a neurofisiologia da nocicepção. (LE BARS et al., 2001).

Na avaliação nociceptiva pelo método de von Frey, foi observado que as frações de hexano, diclorometano e butanol promoveram significativa reversão da hiperalgesia em uma dose quatro vezes maior, e ao diminuí-la, a fração de acetato de etila passou a mostrar atividade antinociceptiva e perde-se a atividade das demais frações. Provavelmente, ao aumentar a dose de 100 para 200 mg/kg, a fração de acetato

de etila começou a apresentar efeitos pró-inflamatórios, e ao reduzir as doses de 200 para 100 mg/kg, as frações de hexano, diclorometano e butanol, também reduziu a quantidade de compostos ativos e os seus efeitos.

As frações ativas podem estar agindo por meio da inibição da sensibilização ou ativação dos nociceptores, já que a hipernocicepção inflamatória resulta principalmente da sensibilização dos neurônios aferentes e é detectado um decréscimo do limiar de nocicepção nos camundongos. Essa redução do limiar é induzida pela liberação de mediadores como PGs e aminas simpatomiméticas que sensibilizam os neurônios nociceptivos periféricos (NAKAMURA et al., 1987). A liberação desses mediadores é precedida por uma cascata de citocinas. Esses mediadores ativam vias de segundos mensageiros (cAMP, proteína quinase A e PKC) responsáveis por diminuir o limiar do nociceptor e aumentar a excitabilidade da membrana neuronal. Assim, facilita a ativação do nociceptor e a transmissão do impulso nervoso pelo neurônio primário (CUNHA et al., 2010).

No desenvolvimento da hipernocicepção inflamatória também é importante a migração de neutrófilos para causar os efeitos hiperalgésicos provocados pelas citocinas, que também são importantes para a produção de mediadores hiperalgésicos diretos como a prostaglandinas E2 (PGE2) (CUNHA et al., 2008). O teste de von Frey é também utilizado para avaliar a antinocicepção de anti-inflamatórios periféricos como indometacina, que inibe a síntese de PGs via COX, e de bloqueadores diretos da nocicepção em curso, como a dipirona.

A fim de estender os estudos sobre a ação anti-inflamatória e uma possível relação com a migração de neutrófilos, foi realizado o teste da peritonite induzida por carragenina (Cg). A cg é um agente flogístico, extraído de algas, que induz o processo inflamatório agudo compreendido em três etapas. Na primeira etapa (0-90 minutos) ocorre intensa vasodilatação e aumento da permeabilidade com liberação de histamina e 5-HT. Na segunda etapa (90-150 minutos) há liberação de bradicinina que induz aumento da permeabilidade do endotélio vascular sanguíneo. E, na última etapa (150-360 minutos), há a liberação de prostaglandinas, período caracterizado por intensa migração de leucócitos, principalmente polimorfonucleares. (FERREIRA et al., 2005)

Tanto a histamina quanto a serotonina são caracterizadas pelo aumento da permeabilidade vascular. As prostaglandinas respondem pela máxima resposta vascular durante a terceira fase da inflamação (VINEGAR et al., 1969). Todas as quatro frações da folha de *C. macrophyllum* inibiram a migração de neutrófilos para a cavidade

peritoneal após 4 h da indução com a carragenina, mas com dose maior, igual à utilizada no teste de von Frey.

A inibição da migração dos leucócitos para a cavidade peritoneal pode se dar por dois mecanismos: a inibição da produção de substâncias quimiotáticas e/ou a inibição da expressão de moléculas de adesão (E, P, e L-selectinas), haja vista que os leucócitos necessitam de substâncias quimiotáticas, como os fragmentos peptídicos do sistema complemento (C3a, C4a e C5a), histamina, leucotrienos, prostaglandinas, tromboxano e o PAF que facilitem sua migração para o local onde está ocorrendo a injúria, inflamação, para então, desencadear seus efeitos na tentativa de destruir o agente agressor (SHERWOOD; TOLIVERKINSKY, 2004).

Sabe-se que inflamação aguda provoca alterações no fluxo sanguíneo, no calibre dos vasos e na permeabilidade vascular. O exsudato produzido, quando existe aumento da permeabilidade vascular, contém elevada concentração de proteínas plasmáticas, principalmente albumina (GUYTON, 2011). Quando injetado por via endovenosa, o azul de Evans forma complexos corante-albumina, que extravasa para o espaço intersticial somente quando ocorre o aumento da permeabilidade vascular, ocorrendo também a formação de exsudato, podendo ser determinada por espectrofotometria (MORAES et al, 2003; MORAES et al., 1987; BACCARO et al., 1990; CANOVA, 2002).

A fração de butanol foi a única fração que reduziu o extravasamento vascular, demonstrando a maior concentração de compostos ativos antinociceptivos e anti-inflamatórios com a característica polar e presentes nessa fração, já que foi a única fração que apresentou resultados em todos os testes realizados que envolvem os processos inflamatórios. Esta fração de butanol, só não mostrou atividade antinociceptiva na primeira fase do teste formalina, na dor neurogênica. Deste modo, estes compostos polares podem agir na síntese ou atividade de prostaglandinas, histamina e serotonina, mediadores do aumento da permeabilidade vascular. No entanto as frações menos polares, hexano e diclorometano, também apresentaram importantes atividades antinociceptivas e anti-inflamatórias, devendo também serem estudadas quanto a sua composição química e possíveis mecanismos de ação, principalmente devido a ação tanto na fase neurogênica quanto na fase inflamatória, semelhante a atividade opioide.

8 CONCLUSÃO

A atividade antinociceptiva e anti-inflamatória das frações da folha da espécie *Cenostigma cf. macrophyllum*, popularmente conhecida como canela de velho, permitem considerar esta planta como uma fonte natural para a identificação de novos compostos bioativos e agentes terapêuticos. Deste modo, deve-se prosseguir com a pesquisa das propriedades químicas e farmacológicas das frações ativas da folha de *C. cf. macrophyllum* para a elucidação de seu potencial terapêutico. Além disso, a pesquisa com a canela de velho é de grande relevância tanto para a proposta de um futuro uso farmacêutico, dentro da busca por medicamentos eficazes, seguros, reprodutíveis e estáveis; quanto para as populações que, eventualmente, já fazem uso medicinal desta planta.

REFERENCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. H. I. V. **Imunologia celular e molecular**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012
- AGRA, M.F.; FREITAS, P.F.; FILHO, J.M.B. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Braz J Pharmacog** 17(1): 114-140, 2007.
- ALENCAR, M. M. A.; ROCHA, M. F. G.; PINHEIRO, D. C. S. N. Inflamação e sua modulação por anti-inflamatórios não esteróides: riscos e benefícios. **Ciência Animal**, v.15, n.1, p. 33-41, 2005
- ALMEIDA T.,F, ROIZENBLATT S, TUFIK SAfferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Res**. 2004 Mar 12;1000(1-2):40-56
- ALVES, C. Q. **estudo químico e avaliação biológica de duas espécies Leguminosae: *Diocleavirgatae* *Cenostigma macrophyllum***. 2012. 227 f. Tese (Doutorado em Química Orgânica). Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2012
- ANDRADE, M. F. et al., **Evaluation of anti-inflammatory and antinociceptive activity of the leaf ethanolic extract of *Cenostigmamacrophyllum* (Leguminosae)** Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal da Bahia. Vitória da Conquista, 2012
- ARAÚJO, F. L. O. De. **Estudo dos efeitos antinociceptivos e Antiinflamatórios de (Ometil)-N-benzoil tiramina (riparina I) de *Aniba riparia* (NEES) MEZ (Lauraceae) em camundongos**. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia, Fortaleza, 2007
- BACCARO M.R, MARIANO M, MALUCELLI B.E. Chronically inflamed tissue activates plasma mediators of vascular permeability. **Braz. J MedBiolRes**;23:179-85; 1990.
- BAGGIO, CRISTIANE HATSUKO. **Mecanismos de ação envolvidos na atividade antinociceptiva e anti-inflamatória da (1 3), (1 6) β -glucana isolada do *Pleurotusplumonarius* (Fr.) Quel**. Curitiba, 2010. 120 p. Tese (Doutorado em Farmacologia). Universidade Federal do Paraná.
- BAGHERI, S.M, DASHTI-R,M.H; MORSHEDI A., Antinociceptiveeffectof*Ferula assa-foetida*oleo-gum-resin in mice **Res PharmSci**. 2014
- BANDEIRA, F. P. S. de F. Prefácio. In: ALBUQUERQUE, U. P. de; LUCENA, R. F. de P.; CUNHA, L. V. F. C. da. **Métodos e Técnicas na Pesquisa Etnobiológica e Etnoecológica**. Recife: NUPPEA, 2010.
- BARKSBY, H. E.; LEA, S. R.; PRESHAW, P. M.; TAYLOR, J. J. The expanding family of interleukin-1 cytokines and their role in destructive inflammatory disorders. **British Society for Immunology: Clinical and Experimental Immunology**, vol 149, p.217-225, 2007

BEAR, M.F.; CONNORS, B.W.; PARADISO, M.A. **Neurociências - Desvendando o Sistema Nervoso**. 2ª ed. Porto Alegre: Artmed, 2002.

BECKER, MARIANA MINGHELLI. **Programas de Fitoterapia na Rede Pública de Saúde**. Trabalho de Conclusão de Curso. (Especialista em Saúde Pública). Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2011

BRANDÃO, H N; ALVES, C Q; DAVID, JM, DAVID, JP. Phytochemical study of the polar extracts of *Cenostigmamacrophyllum* Tul. (Leguminosae). **PlantMed** 79 (17) 2013

BRASIL. **Decreto Presidencial no 5813**, de 22 de junho de 2006. Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS. Brasília, 2006b.

BRASIL. **Ministério da saúde**. Portaria no 971 de 3 de maio de 2006. Brasília, 2006a. Brasileira de Química, -. Poços de Caldas – MG, 2002.

BRUTON LL, LAZO JS, PARKER KL 2006. **Goodman & Gilman: as bases farmacológicas da terapêutica**. 11ed. São Paulo: McGraw-Hill-Interamericana do Brasil

CANOVA G.C; TAVEIRA L.A.A; DEZAN JUNIOR E; NISHIYAMA C.K; SPALDING M. Estudo do poder flogógeno de quatro cimentos obturadores de canais radiculares por meio do teste edemogênico. **Rev FacOdontol** Bauru; v. 10, p. 128-33, 2002.

CARTAXO, S. L.; SOUZA, M. M. A.; ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 131, p. 326–342, 2010

CARVALHO, A. M. R. **Estudo da atividade antinociceptiva e antiinflamatória da Riparina II (O-METIL-N-2-HIDROXI-BENZOIL TIRAMINA) em modelos experimentais**. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2011.

CARVALHO, M. M. M. J. **Dor: um estudo multidisciplinar**. 2ª edição. Summus editorial. São Paulo, 1999

CARVALHO, W. A.; CARVALHO, R. D. S.; RIOS-SANTOS, F. Analgésicos Inibidores Específicos da Ciclooxigenase-2: Avanços Terapêuticos*. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 54, n. 3, p. 448- 464, 2004.

CELEGHINI, RENATA M. S., VILEGAS, JANETE H. Y. AND LANÇAS, FERNANDO M. Extraction and Quantitative HPLC Analysis of Coumarin in Hydroalcoholic Extracts of *Mikania glomerata* Spreng: ("guaco") Leaves. **J. Braz. Chem. Soc.**, Dec 2001, vol.12, no.6, p.706-709. ISSN 0103-5053

CHEN, Y.-F.; LI, N.; JIAO, Y.-L.; WEI, P.; ZHANG, Q.-Y.; RAHMAN, K.; ZHENG, H.- C.; QIN, L.-P. Antinociceptive activity of petroleum ether fraction from the MeOH extracts of *Paederia scandens* in mice. **Phytomedicine**, v. 15, p. 427–436, 2008

CHICHORRO JG, LORENZETTI BB, ZAMPRONIO AR. Involvement of bradykinin, cytokines, sympathetic amines and prostaglandins in formalin-induced orofacial nociception in rats. **Br J Pharmacol** 2004;141:1175–84.

COELHO, N.P.M. de.; et al. *Cenostigmamacrophyllum* Tul. on the healing of skin wounds in rats with *Diabetes mellitus*. **Acta Cir. Bras.** 28 (8), 2013.

COLLIER, H. D. J.; DINNEEN, L. C.; JOHNSON, C. A.; SCHNEIDER, C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **Br J Pharmacol Chemother**. 1968 Feb;32(2):295-310

COSTA, A. F. ; SANTOS, F. J. B. ; CHAVES, M. H. . **Isoprenóides e biflavona de *Cenostigma macrophyllum* Tull.** In: 25ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2002, Poços de Caldas - MG. 25ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2002. v. 1. p. 106-10

COSTA, M.A ;K. ISHIDA, V. KAPLUM, E.D. KOSLYK, J.C. DE MELLO, T. UEDA-NAKAMURA, B.P. DIAS-FILHO, C.V. NAKAMURA Safety evaluation of proanthocyanidin polymer-rich fraction obtained from stem bark of *Stryphnodendron adstringens* (BARBATIMAO) for use as a pharmacological agent **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, 58 (2010), pp. 330–335

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and Cancer. **Nature**, v.420, p.19-26, 2002.

COUTAUX, A.; ADAM, F.; WILLER, J.C.; LE BARS, D. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. **Joint Bone Spine**, Paris, v.72, p.359-371, 2005

COUTO VM, VILELA FC, DIAS DF, SANTOS MH, SONCINI R, NASCIMENTO CG, GIUSTI-PAIVA A. Antinociceptive effect of extract of *Emilia sonchifolia* in mice. **J Ethnopharmacol** 134(2): 348 – 353, 2011.

COUTO VM, Vilela FC, Dias DF, Santos MH, Soncini R, Nascimento CG, Giusti-Paiva A. Antinociceptive effect of extract of *Emilia sonchifolia* in mice. **J Ethnopharmacol** 134(2): 348 – 353, 2011.

CRAIG A. D. Pain mechanisms: Labeled lines versus convergence in central processing. **Annu. Rev. Neurosci.**, Phoenix, v.26, p.1-30, 2003.

CRUVINEL, W. de M.; MESQUITA JÚNIOR, D.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S. de; SILVA, N. P. da; ANDRADE, L. E. C. Sistema imunitário – parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Rer. Bras. Reumatologia**, v. 50, n. 4, p. 434-461, 2010.

CUNHA, T. M.; VERRI, W. A. JR.; SCHIVO I. R.; NAPIMOGA, M. H.; PARADA, C. A.; POOLE, S.; TEIXEIRA, M. M.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 83, p. 824-832, 2008.

CUNHA, T.M.; TALBOT, J.; PINTO, L.G.; VIEIRA, S.M.; SOUZA, G.R.; GUERRERO, A.T.; SONEGO, F.; VERRI, W.A. JR; ZAMBONI, D.S.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q.; Caspase-1 is involved in the genesis of inflammatory hypernociception by contributing to peripheral IL-1 β maturation. **Mol Pain**. 4;6:63. 2010.

D'ANGELIS, A.S.R. and NEGRELLE, R.R.B.. *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum: aspectos botânicos, ecológicos, etnobotânicos e farmacológicos. **Rev. bras. plantas med.** 2014, vol.16, n.3, pp. 607-617. ISSN 1516-0572.

DEL-VECHIO-VIEIRA, G.; SOUSA, O. V.; MIRANDA, M. A.; SENNA-VALLE, L.; KAPLAN, M. A. C. Analgesic and Anti-inflammatory Properties of Essential Oil from *Ageratum fastigiatum*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, vol 52, nº 5, p 1115-1121, 2009

DIB-HAJJ, S. D.; CUMMINS, T. R.; BLACK, J. A.; WAXMAN, S. G. Sodium Channels in Normal and Pathological Pain. **Annual Review of Neuroscience**, vol 33, p.325-347, 2010

DOMINGUES, C. – **Reações imunológicas associadas aos anti-inflamatórios não-esteróides** 2013 Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêutica) Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias

DUARTE, J. C.; CRUZ, M. P.; S. FILHO, A. O.; SILVA, F. G.; SANTOS, H. C. R.; SILVA, N. R. A.; MARQUES, L. M.; YATSUDA, R. Estudo etnofarmacológico e etnobotânico das plantas medicinais na região do semi-árido da Bahia. In: XX Internacional Congress of Ethnopharmacology e XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 2008, São Paulo. **XX Internacional Congress of Ethnopharmacology e XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, 2008. p. 03.032 EDUA/IMPA/FAPEAM, 2004.

FARQUHAR-SMITH, W. P. Anatomy, physiology and pharmacology of pain. **Anaesthesia and Intensive Care Medicine-Pain**, vol 9, nº 1, p.3-7, 2007

FERNANDES, H. de B. **Investigação da atividade gastroprotetora do extrato etanólico das folhas de *Parkia platycephala* Benth. e da fração hidroalcoólica extraídas das folhas de *Cenostigma macrophyllum* Tul. Var. *Acuminata* Teles Freire (Leguminosae) em roedores.** 2009. 95 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia). Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2009.

FERREIRA, D. T.; FACCIONE, M. Opiáceos, Opióides de ação analgésica e antagonistas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, Londrina, v. 26, n. 2, p. 125-136, 2005.

FISCHER LG, SANTOS D, SERAFIN C, MALHEIROS A, DELLEMONACHE F, DELLEMONACHE G, CECHINEL-FILHO V, SOUSA MM. Further antinociceptive properties of extracts and phenolic compounds from *Plinia glomerata* (Myrtaceae) leaves. **Biol Pharm Bull** 31(2): 235 – 239, 2008

FITZGERALD GA, PATRONO C Thecoxibs, selective inhibitors of cyclooxygenase-2. **N Engl J Med**. 2001;345(6):433.

FRANÇA, I.S.X. et al. Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v.61, n.2, p. 201-8, 2008

FREY, V. Abhandlungen der Königlich-Sächsische. **Gesellschaft der Wissenschaften** v.23, p. 188, 1896.

GACHET, M.S., J.S. Lecaro, M. Kaiser, R. Brun and H. Navarrete *et al.*, 2010. Assessment of anti-protozoal activity of plants traditionally used in Ecuador in the treatment of leishmaniasis. **J.Ethnopharmacol.**, 128: 184-197

GERALDO, J. M.; ALFENA, R. C. G. Papel da dieta na prevenção e no controle da inflamação crônica - evidências atuais. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 52, n.6, São Paulo, 2008

- HAEGGSTRÖM, J. Z. Structure, Function, and Regulation of Leukotriene A₄ Hydrolase. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 161. P. S25–S31, 2000.
- HAESELER, G.; FOADI, N. A.; AHRENS, J. A.; DENGLER, R. B.; HECKER, H. C.; LEUWER, M. D. Tramadol, fentanyl and sufentanil but not morphine block voltage-operated sodium channels. **Pain**, vol 126, p.234–244, 2006
- HURLEY, J. V. **Endogenous chemical mediators of inflammation: acute inflammation**. 2. ed. London: Churchill Livingstone, p. 102-108, 1983
- JULIUS, D.; BASBAUM, A. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, San Francisco, v. 413, p. 203- 210, 2001.
- JUTEL, M. et al. Histamine, histamine receptors and their role in immune pathology. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 39, n. 12, p. 1786-800, 2009
- KALESNIKOFF J, GALLI SJ. New developments in mast cell biology. **Nat Immunol** 2008; 9:1215-23.
- KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSEL, T. M. **Principles of Neural Science**. New York: McGraw-Hill, p. 73-491, 2000.
- KLAUMANN, P. R.; WOUK, A. F. P. F.; SILLAS, T. Pathophysiology of pain. **Archives of Veterinary Science**. v. 13, n.1, p. 1-12, 2008
- KLEIN K.B, ZELICKSON B, RIOPELLE J.G, OKAMOTO E, BACHELOR E.P, HARRY R.S, PRECIADO J.A. Non-invasive cryolipolysis for subcutaneous fat reduction does not affect serum lipid levels or liver function tests. **Lasers Surg Med** 2009; 42: 785-90, doi: 10.1002/lsm.20850
- KOEHN, BERNAN, F. E. CARTER G. T., New Strategies for Natural Products Lead Generation, in **Burger's Medicinal Chemistry, Drug Discovery and Development**, Vol. 7 (Published Online Sept. 15, 2010)
- KOSTER, R.; ANDERSON, M.; BEER, E. J. Acetic acid for analgesic screening. **Federation proceedings**, v. 18, p. 412-416, 1959.
- KRAYCHETE, D. C.; CALASANS, M. T. A.; VALENTE, C. M. L. Citocinas Próinflamatórias e Dor. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 46, n.3, p. 199-206, 2006.
- LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. W. Animal models of nociception. **Pharmacological Reviews**, vol 53, p.597-652, 2001.
- LE MERRER, J.; BECKER, J. A. J.; BEFORT, K.; KIEFFER, B. L. Reward Processing by the Opioid System in the Brain. **Physiology Reviews**, vol 89, p.1379–1412, 2009.
- LIMA, G. M.; QUINTANS JÚNIOR, L. J.; THOMAZZI, S. M.; ALMEIDA, E. M. S. A.; MELO, M. S.; SERAFINI, M. R.; CAVALCANTI, S. C. H.; GELAIN, D. P.; SANTOS, J. P. A.; BLANK, A. F.; ALVES, P. B.; OLIVEIRA NETA, P. M.; LIMA, J. T.; ROCHA, R. F.; MOREIRA, J. C. F.; ARAÚJO, A. A. S. Phytochemical screening, antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Chrysopogon zizanioides* essential oil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v. 22, n. 2, p. 443-450, 2012.

LINLEY, J. E.; ROSE, K.; OOI, L.; GAMPER, N. Understanding inflammatory pain: ion channels contributing to acute and chronic nociception. **European Journal Physiology**, vol 459, p.657-669, 2010.

LOESER, J. D.; TREEDE, R. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, vol 137, p. 473-477, 2008.

MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M. de; CASTELLANI, D. C.; DIAS, J. E. **Plantas Mediciniais**. Viçosa :Editora UFV, 2000. 220 p

MEDZHITOV R Origin and physiological roles of inflammation **Nature**. 2008 Jul 24;454(7203):428-35. doi: 10.1038/nature07201.

MESQUITA JR, D.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S. de.; SILVA, N. P. da.; ANDRADE, L. E. C.; CRUVIEL, W de M. Aspectos celulares e moleculares da inflamação. **Sinopse de Reumatologia**, São Paulo, p. 66 - 81, 20 ago. 2008

MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in Neurobiology**, v. 57, p. 161-164, 1999.

MÖLLER, K. A.; JOHANSSON, B.; BERGE, O.G. Assessing mechanical allodynia in the rat paw with a new electronic algometer. **JournalNeurosciMethods**. v. 84, n.1-2, p.41-47, 1998.

MONTEIRO, E. C. A.; TRINDADE, J. M. F.; DUARTE, L. B. P.; CHAHADE, W. H. Os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs). **Temas de ReumatologiaClínica**, v. 9, n.2, 2008

MORAES, F.R.; BECHARA, G.H.; MORAES, J.R.E. Effect of alloxan diabetes and adrenalectomy on carrageenin-induced pleurisy in the rat. **Braz..J. Med. Biol. Res.**, v.20(1), p.47-53, 1987.

MORAES, M.O.; BEZERRA, F.A.F.; LOTUFO, L.C.; PESSOA, C.; MORAES, M.E.A. Avaliação clínica da eficácia e segurança de fitoterápicos o Brasil. **Arquivos Brasileiros de Fitomedicina Científica**, São Paulo, vol 1, p.30-38, 2003.

MURI, E. M. F.; SPOSITO, M. M. de M.; METSAVAHT, L. Nonsteroidalantiinflammatorydrugsandtheir local pharmacology. **Acta Fisiatr**. v. 16, n.4, p. 186-190, 2009

MURPHY K, TRAVERS P, WALPORT M (2010). Falhas nos Mecanismos de Defesa do Hospedeiro. In: **Murphy K, Travers P, Walport M. Imunobiologia de Janeway**. 7ª ed. Porto Alegre, RS: Artmed, 495-544p

NAKAMURA, M.; FERREIRA, S.H; A peripheral sympathetic component in inflammatory hyperalgesia. **Eur J Pharmacol**,135:145-153,1987

NAPIMOGA, M. H.; CAVADA, B. S.; ALENCAR, N. M.; MOTA, M. L.; BITTENCOURT, F. S.; ALVES-FILHO, J. C.; GRESPAN, R.; GONÇALVES, R. B.; CLEMENTE-NAPIMOGA, J. T.; DE FREITAS, A.; PARADA, C. A.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. *Lonchocarpussericeus* lectin decreases leukocyte migration and mechanical hypernociception by inhibiting cytokine and chemokines production. **International Immunopharmacology**, v. 7, p. 824-835, 2007.

- NESTLER, E.J.; HYMAN, S.E.; MALENKA, R.C. Pain. In: **Molecular Neuropharmacology - A foundation for clinical neuroscience**. New York: MacGraw-Hill, p. 433-452, 2001.
- NETO, O. A.; COSTA, C. M. de C.; SIQUEIRA, J. T. T. de. **Dor princípios e prática**. Porto Alegre: ArtMed, 2009
- NEWMAN, D.J.; GRAGG, G.M.; SNADER, K.M. Natural products as source of new drugs over a period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, v.66, p.1022-1037, 2003
- NUNES, B. S.; RENSONNET, N. S.; DAL-SECCO, D.; VIEIRA, S. M.; CAVADA, B. S.; TEIXEIRA, E. H.; MOURA, T. R.; TEIXEIRA, C. S.; CLEMENTE-NAPIMOGA, J. T.; CUNHA, F. Q.; NAPIMOGA, M. H. Lectin extracted from *Canavaliagrandifloraseeds* presents potential anti-inflammatory and analgesic effects. **Naunyn-SchmiedArchPharmacol**, v. 379, p. 609-616, 2009.
- PAIVA, DAYANE CARLA COSTA; **Atividade anti-inflamatória e antinociceptiva do extrato hidroalcoólico da entrecasca de Pseudobombaxmarginatum (St. Hill) Rob. proveniente da caatinga potiguar**. Dissertação (Mestrado em Ciências Naturais). Universidade do Estado do Rio Grande do Norte. Programa de Pós-graduação em Ciências Naturais, Mossoró, RN, 2013
- PARVEEN, UPADHYAY, B., ROY, S. AND KUMAR, A. (2007): Traditional use of medicinal plants among the rural communities of Churu District in the Thar Desert, India **Journal of Ethnopharmacology** 113, 387-399.
- PAULA, J.A.M. et al. Phytochemical Analysis and Antimicrobial, Antinociceptive, and Anti-Inflammatory Activities of Two Chemotypes of *Pimentapseudocaryophyllus* (Myrtaceae). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. 2012
- RANDOLPH BC & PETERS MA. Analgesic effectiveness of ketorolac compared to meperidine in the rat formalin test. **AnesthProg**. 44(1): 11 – 16, 1997.
- RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; GARDNER, P. **Farmacologia**. Elsevier, 7ª ed. 2012
- RIBEIRO, R. C., PELACINI, C. R. Influência do manitol e NaCl na germinação de *Sitientibus* **Série Ciências Biológicas**, 6, p. 105-109, 2006
- RIEDEL, W.; NEECK, G. Nociception, pain and antinociception: current concepts. **Zeitschrift für Rheumatologie**, v.60, n. 6, p. 404-415, 2001.
- RISHTON, G. M. Natural Products as a Robust Source of New Drugs and Drug Lead: Past Successes and Present Day Issues. **Am. J. Cardiol.**, v. 101, p. 43D-49D, 2008.
- ROBBINS & COTRAN: **Patologia - Bases Patológicas das Doenças**. 8ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012
- SANTOS, C.A., PASSOS, A.M.P.R., ANDRADE, F.C., CAMARGO, E.A., ESTEVAM, C.S., SANTOS, M.R.V., THOMAZZI, S.M., Antinociceptive and anti-inflammatory effects of Caesalpinia pyramidalis in rodents. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v. 21, n. 3, p.1077-1083, 2011

SANTOS, F. J. B. DOS, COSTA, A. F., COSTA, C. L. S. DA, CHAVES, M. H. **Constituintes químicos da *Cenostigmamacrophyllum* Tul. (Caesalpinaceae)**. CD-ROM da 24^a RASBQ. Poços de Caldas – MG, 2001

SANTOS, S G **Atividade antimicrobiana de *Cenostigma cf. macrophyllum*(leguminosae) contra isolado clínico de *staphylococcus aureus* resistente a antibiótico 2015** Dissertação (Mestrado em Biociências) Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista,2015

SEGAL, A. W. How neutrophils kill microbes. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 23, p. 197–223,2005

SERHAN CN, CHIANG N, VAN DYKE TE. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. **Nature Reviews. Immunology**. 2008;8:349–361

SHARMA, S AND KUMAR, A. (2012) Pharmacognostical studies on medicinal plants of Semi-arid region. **Prime Research on Medicine**.2 (3) : 505-512.

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

SILVA AM. **Avaliação do efeito antinociceptivo orofacial de *Sida cordifolia* (Malvaceae) em roedores**. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde), Universidade Federal de Sergipe, (UFS). São Cristóvão

SILVA, M. F. DA, **Nomes populares das Leguminosas do Brasil**; Manaus:

SILVA, M. F. DA, **Nomes populares das Leguminosas do Brasil**; Manaus: EDUA/IMPA/FAPEAM, 2004.

SMITH, A. Dial 'P' for pain. **Nature Reviews Drug Discovery**, v.1 n.3, p.171, 2002.

SOARES, C. C., MARQUES, T. M., RIGOLIN, G. G., NEIS, E., FRIAÇA, A. M. V., SILVA, A. S., BARRETO, G. S., LOPES, L. Atividade analgésica do extrato da *Pectisjangadensis*(S. Moore). **Rev Bras Farmacogn**, v.19, p.77-81, 2009.

SOEHNLEIN O, LINDBOM L (2010) Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. **Nat RevImmunol** 10: 427–439

SOUSA CMM, ROCHA E SILVA H, VIEIRA JÚNIOR GM, AYRES MC, COSTA CLS, ARAÚJO DS, CAVALCANTE LCD, Barros ED, Araújo PBM, Brandão MS, Chaves MH. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quím Nova**. 2007; 30:351-5.

SOUSA, C.M.M.; et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais.**Quím nova**, 30(2): 351-355, 2007.

TASSORELLI C, GRECO R, WANG D, SANDRINI G, NAPPI G. Prostaglandins, glutamate and nitric oxide synthase mediate nitroglycerin-induced hyperalgesia in the formalin test. **Eur J Pharmacol** 2006;534:103–7.

THURSTON, G.; RUDGE, J. S.; IOFFE, E.; ZHOU, H.; ROSS, L.; CROLL, S. D.; GLAZER, N.; HOLASH, J.; MCDONALD, D. M.; YANCOPOULOS, G. D. Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage. **Nature Medicine**, v. 6, p. 460-463, 2000.

TITA B, ABDEL-HAQ H, VITALONE A, MAZZANTI G, SASO L. Analgesic properties of *Epilobium angustifolium*, evaluated by the hot plate test and the writhing test. **Farmaco** 56(5-7): 341-343, 2011.

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

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

VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. Medicinal plants; safe cure? **Química Nova**, v. 28, p. 519-528, set. 2005.

VELOSO, C. C.; CABRAL, L. D. M.; BITENCOURT, A. D.; FRANQUI, L. S.; SANTACECÍLIA, F. V.; DIAS, D. F.; SONCINI, R.; VILELA, F. C.; GIUSTI-PAIVA, A. Antiinflammatory and antinociceptive effects of the hydroethanolic extract of the flowers of *Pyrostegia venusta* in mice. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v. 22, n. 1, p. 162-168, 2012.

VIEIRA EBM, GARCIA JBS, SILVA AAM, ARAÚJO RLTM, JANSEN RCS. Prevalence, Characteristics, and Factors Associated With Chronic Pain With and Without Neuropathic Characteristics in São Luís, Brazil. **J PainSym Man** 44 (2): 239-251, 2012

VIEIRA, V. M. S. F.; **Etnobotânica de plantas medicinais comercializadas em mercado público do nordeste brasileiro**. Universidade Federal do Ceará, 2008. Disponível em <<http://hdl.handle.net/123456789/4282>> acesso em 01 de setembro de 2014

VINEGAR, R.; SCHREIBER, W.; HUGO, R. Biphasic development of carrageenan edema in rats. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 166, p. 96-103, 1969.

WALKER, C. I. B. **Avaliação do potencial antinociceptivo da *Mirabilis jalapa* L. em camundongos**. Santa Maria, 2010. 104 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Santa Maria.

WALLACE, J. L. Prostaglandins, NSAIDs, and Gastric Mucosal Protection: Why Doesn't the Stomach Digest Itself? **Physiological Reviews**, v. 88, p. 1547-1565, 2008.

WANNMACHER, L. FERREIRA, M.B.C. Febre: mitos que determinam condutas. **Uso Racional de Medicamentos: Temas Selecionados**. Brasília, v.1, n.9, 2004.

WARWICK, M.C.; LEWIS, G.P. A revision of *Cenostigma* (*Leguminosae* – *Caesalpinioideae* – *Caesalpinieae*), a genus endemic to Brazil. **Kew Bulletin** 64: 135-146, 2009.

WHITTLE, B. A. Release of kinin by intraperitoneal injection of chemical agents in mice. **International Journal of Neuropharmacology**, v.3, p. 369-378, 1964.

WOOLF, C. J.; SALTER, M. W. Neuronal Plasticity: Increasing the Gain in Pain. **Science**, vol 288, p.1765 -1768, 2000

YAKSH, T. L. Calcium Channels As Therapeutic Targets in Neuropathic Pain. **The Journal of Pain**, vol 7, nº 1, p.13-30, 2006

YATSUDA, R.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A.; MURATA, R. M.; REHDERB, V. L. G.; MELOB, L. V.; KOO, H. Effects of *Mikania* genus plants on growth and cell adherence of mutans streptococci. **Journal Ethnopharmacology**, v. 97, p. 83-189, 2005.

YUNES, R.A.; PEDROSA, R.C.; CECHINEL-FILHO, V. Fármacos efitorápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v.24, n.1, p.147-52, 2001.

ANEXO A



Figura 1- Árvore adulta e frutos da *Cenostigma cf. macrophyllum*. Disponível em http://pt.plantmed.org/wiki/Caneleiro_%28%C3%A1rvore%29.

Ilustração - *C. macrophyllum*Caule, folhaÁrvore adulta e frutos

ANEXO B



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^a Regiane Yatsuda**, está de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal, adotados pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA/UNIUBE) regido pela lei nº 11.704/09.

CERTIFICATE

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

Atenciosamente,



Prof.ª Joely F. Figueiredo Pittar
Vice-Coordenadora do CEEA-UNIUBE