



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E
PÓS-GRADUAÇÃO
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA,
INOVAÇÃO E TECNOLOGIA
PARA A AMAZÔNIA - CITA



AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DOS
EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS DA *Calycophyllum spruceanum* (Benth.) Hook. f. ex
K. Schum.

ANA PAULA AZEVEDO BARROS DA SILVA

RIO BRANCO
2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E
PÓS-GRADUAÇÃO
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA,
INOVAÇÃO E TECNOLOGIA
PARA A AMAZÔNIA - CITA



**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DOS
EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS DA *Calycophyllum spruceanum* (Benth.) Hook. f. ex
K. Schum.**

ANA PAULA AZEVEDO BARROS DA SILVA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência, Inovação e Tecnologia para a Amazônia da Universidade Federal do Acre como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências. Área de Concentração: Ciência e Inovação Tecnológica.

Orientador _____

Prof. Dr. Renildo Moura da Cunha.

Co-orientadora _____

Profa. Dra. Ana Maria Sampaio Assereuy.

Rio Branco – Acre

Novembro 2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ACRE
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA, INOVAÇÃO E TECNOLOGIA
PARA A AMAZÔNIA – CITA

ANA PAULA AZEVEDO BARROS DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DOS
EXTRATOS HIDROALCOÓLICOS DA *Calycophyllum spruceanum* (Benth.) Hook. f. ex
K. Schum.**

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 20/11/2015

Prof. Dr. Renildo Moura da Cunha
(Orientador – CCBN/UFAC)

Prof. Dr. Nilberto Robson Falcão do Nascimento
(Membro – ISCB/UECE)

Prof. Dr. Quintino Moura Dias Júnior
(Membro – Fiocruz/RO)

À Deus, por mais essa vitória. Aos meus pais Francisco José Felipe Barros e Almerinda Azevedo Barros, pelo ensinamento de toda uma vida. Ao meu irmão Anderson Felipe Azevedo Barros, pelo apoio e em especial ao meu amor, Lucas Lee, pelo apoio e incentivo.

Dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Ao Deus da minha vida, Senhor da minha casa, dono do meu coração que a cada dia me surpreende com seu amor e misericórdia. Todas as páginas deste trabalho não seriam suficientes para expressar minha gratidão por todos os benefícios que me tem feito. Bendito seja o Seu nome, para todo o sempre.

Ao meu orientador, Professor Renildo Moura da Cunha, pela paciência, amizade que se construiu ao longo dos anos e por todos os ensinamentos que servirão para minha vida profissional e também pessoal.

À Universidade Estadual do Ceará, através do Instituto Superior de Ciências Biomédicas, na pessoa do Professor Nilberto Robson Falcão do Nascimento e da Professora Cláudia Ferreiras Santos, que sempre me acolheram e abriram as portas que propiciaram a realização de experimentos. Vocês são pessoas pelas quais tenho imenso carinho. Obrigada!

À minha co-orientadora, Professora Ana Maria Sampaio Assereuy, do laboratório de Fisiofarmacologia da Inflamação do Instituto Superior de Ciências Biomédicas, por tão gentilmente me receber em seu laboratório e pela importante contribuição a este trabalho.

À MSc. Renata Moraes do laboratório de Fisiofarmacologia da Inflamação, pela ajuda na realização e análise dos experimentos lá realizados.

Ao Professor Krishnamurti de Moraes Carvalho do laboratório de Farmacologia Molecular e Toxinologia do Instituto Superior de Ciências Biomédicas que também me recebeu em seu laboratório e contribuiu para a realização dos experimentos deste trabalho.

Às alunas do laboratório de Farmacologia Molecular e Toxinologia: Nyanne, Priscila e Tamara e à, então pós-graduanda, Aline Oliveira Vitor, pela companhia e ajuda prestada.

À minha família: meus pais, Felipe e Almerinda, pelo amor, apoio, exemplo e todas as outras coisas que contribuíram para que eu chegasse até aqui e ao meu irmão Anderson, pelo companheirismo, pela ajuda nos experimentos e demais atividades do laboratório. Agradeço a vocês, por me ouvirem e participarem de cada êxito obtido nessa caminhada.

À minha segunda família: meus sogros Oliveira e Albaniza e minhas cunhadas Sandréia e Abigail, por permitir que compartilhasse minhas aflições, pelas longas conversas e boas risadas.

Ao meu esposo, que acompanhou de perto todas as fases desta caminhada e me ouviu, aconselhou e apoiou em tudo. Agradeço pela paciência, por suportar a distância quando foi necessária e por cuidar de mim.

À minha avó, minha Maíinha, pelo exemplo de vida, pelas orações e pelo carinho.

À minha Nala Sheeva (manolo), pela companhia e seu olhar cheio de amor nas muitas noites acordadas.

A toda a minha família e amigos que acreditaram, apoiaram, estando presentes ou não; aos que oraram e intercederam por mim para que eu conseguisse mais esta vitória.

Aos colegas e professores do laboratório de pesquisa em Fisiofarmacologia da Universidade Federal do Acre, pela contribuição direta e indireta para trabalho, em especial à Roberta pela ajuda na finalização dos extratos e ao Professor Rafael Ramón Rodrigues Treto, pela amizade e por seus conselhos.

Aos primeiros e eternos “fofatos” do laboratório de pesquisa em Fisiofarmacologia, André, Anna Lídyá, Carol e Pedro pela amizade, ajuda na elaboração dos extratos e nos experimentos e por tantos momentos de descontração; e os recém-chegados, Nadyne e Natieli pelo apoio nas atividades do laboratório.

A todos os professores do Mestrado em Ciência Inovação e Tecnologia para a Amazônia, pelos ensinamentos.

Ao secretário do mestrado, Márcio pelo serviço prestado durante esse período.

À Unidade de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Acre, pelo preparo do material vegetal, em especial ao seu Oliveira, por ter sido sempre prestativo.

À FUNTAC pela elaboração dos extratos.

Ao Professor Delano Aníbal pela ajuda prestada relativa aos extratos.

Aos animais que doaram suas vidas em prol da ciência.

Ao CNPq e FAPAC pelo apoio financeiro.

RESUMO

A *Calycophyllum spruceanum* (Benth.) Hook. f. ex K. Schum., conhecida popularmente no Brasil como “mulateiro” ou “pau-mulato”, é utilizada tradicionalmente para o tratamento de inúmeras doenças. No presente estudo foram avaliadas a toxicidade aguda e as atividades antinociceptiva e anti-inflamatória do extrato hidroalcoólico da casca (EHCS_C) e das folhas (EHCS_F) em camundongos Swiss albinos. EHCS_C ou EHCS_F foram administrados via oral nas doses de 60 e 120 mg/kg e avaliados em testes comportamentais de nocicepção induzida por estímulos térmicos (placa quente e imersão da cauda), químicos (contorções abdominais induzidas por ácido acético, teste da formalina) ou mecânico (Von Frey). EHCS_C ou EHCS_F também foram avaliados em modelos de edema de pata induzido por formalina, carragenina e prostaglandina E₂. Como resultado, o EHCS_C reduziu em 72% o número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, em 49% o tempo de lambidas das patas na segunda fase (inflamatória) do teste da formalina e em 58% a hipernocicepção induzida por carragenina (teste de Von Frey). O EHCS_C também inibiu o edema de pata induzido por formalina (37%), carragenina (65%) e PGE₂ (97%). Entretanto, o EHCS_F inibiu somente as contorções induzidas pelo ácido acético (63%) e o edema de pata induzido por formalina (30%). Ambos extratos embora tenham inibido a nocicepção térmica, não alteraram a primeira fase do teste da formalina (neurogênica). O EHCS_C e o EHCS_F na dose de 2000mg/kg não apresentaram toxicidade aguda e não alteraram o desempenho motor no teste do Rota Rod. Em conclusão, EHCS_C e EHCS_F apresentaram efeito antinociceptivo e anti-inflamatório sem provocar interferência na coordenação motora dos animais.

Palavras-chave: nocicepção, inflamação, produtos naturais, *Calycophyllum spruceanum*

ABSTRACT

Calycophyllum spruceanum (Benth.) Hook. f.ex K. Schum., popularly known in Brasil as “mulateiro” or “pau-mulato”, has been traditionally used for the treatment of inumerous diseases. In the present study the hidroalcoholic extract of *C. spruceanum* barks (EHCS_C) and leaves (EHCS_F) was evaluated for the acute toxicity, along with the antiinflammatory and antinociceptive activities in Swiss mice. EHCS_C or EHCS_F was injected *per oral* at 60 and 120 mg/kg and evaluated in behavioural nociceptive tests induced by thermal (hot plate and tail flick), chemical (acetic acid abdominal contortions and formalin test) or mechanical (Von Frey) stimuli. EHCS_C or EHCS_F was also evaluated in the model of paw edema elicited by formalin, carrageenan and prostaglandin E₂. EHCS_C reduced by 72% the number of abdominal constrictions, by 49% the leaking time in the second phase (inflammatory) of formalin test, and by 58% the frequency of paw withdrawal induced by carrageenan (vonFrey test). In addition EHCS_C inhibited the paw edema induced by formalin (37%), carrageenan (65%) and PGE₂ (97%). However, EHCS_F inhibited only the constrictions elicited by acetic acid (63%) and the paw edema induced by formalin (30%). Both EHCS_C and EHCS_F, although had inhibited thermal nociception, did not alter the formalin first phase (neurogenic). EHCS_C and EHCS_F at 2000 mg/kg did not cause acute toxicity or alter the motor performance in the Rota rod test. In conclusion, EHCS_C and EHCS_F present antinociceptive and antiinflammatory effect, without causing interference in the animal motor coordination.

Key-words: nociception, inflammation, natural product, *Calycophyllum spruceanum*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	<i>Calycophyllum spruceanum</i> (Benth) Hook. f. ex. K. Schum	20
Figura 2.	Camundongos Swiss albinos	24
Figura 3.	Material vegetal em percolador para obtenção do extrato.....	25
Figura 4.	Evaporador rotativo a vácuo utilizado para extração do solvente	26
Figura 5.	Aparelho Rota Rod para camundongos	31
Figura 6.	Placa quente	32
Figura 7.	Banho-maria	33
Figura 8.	Caixa de observação para teste da formalina.....	34
Figura 9	Analgesímetro digital.....	35
Figura 10.	Pletismômetro digital.....	36

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1. Rendimento dos extratos hidroalcoólicos obtidos da casca e das folhas de *Calycophyllum spruceanum*38
- Tabela 2. Massa inicial e final e evolução ponderal dos camundongos tratados com as doses de 2000 mg/kg e 5000mg/kg na toxicidade aguda41

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1. Parâmetros comportamentais observados nas três primeiras horas do teste de toxicidade aguda.....28
- Quadro 2. Parâmetros comportamentais observados nas 72 horas e 15 dias após o teste de toxicidade aguda 29
- Quadro 3. Alterações comportamentais observadas em camundongos decorrentes da administração de doses únicas do extrato da casca de *Calycophyllum spruceanum*.....39
- Quadro 4. Alterações comportamentais observadas em camundongos decorrentes da administração. de doses únicas do extrato da folha de *Calycophyllum spruceanum* 40

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1:** Efeito dos extratos de *C. spruceanum* (2000 mg/kg) sobre a permanência dos animais no aparelho Rota Rod durante o período de avaliação dos parâmetros comportamentais no teste de toxicidade..... 42
- Gráfico 2:** Efeito dos extratos de *C. spruceanum* (5000 mg/kg) sobre a permanência dos animais no aparelho Rota Rod durante o período de avaliação dos parâmetros comportamentais no teste de toxicidade..... 43
- Gráfico 3:** Efeito dos extratos de *C. spruceanum* sobre a permanência dos animais no aparelho Rota Rod 44
- Gráfico 4:** Efeito da administração v.o do EHCS_C sobre a nocicepção causada pela placa aquecida a 50 °C. 45
- Gráfico 5:** O EHCS_F inibe a nocicepção em patas de camundongos causada pela placa aquecida a 50 °C aos 120 e 240 min da administração v.o..... 46
- Gráfico 6:** O EHCS_C não inibe a nocicepção térmica no teste de retirada da cauda em camundongos..... 47
- Gráfico 7:** Efeito antinociceptivo do EHCS_F sobre a nocicepção causada pela imersão da cauda em banho-maria (50 °C) antes e após a administração..... 47
- Gráfico 8:** O EHCS_C apresenta efeito antinociceptivo no teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético..... 48
- Gráfico 9:** Efeito antinociceptivo do EHCS_F sobre as contorções abdominais induzidas por ácido acético 48
- Gráfico 10:** Efeito antinociceptivo do EHCS_C no teste da formalina..... 50
- Gráfico 11:** Efeito antinociceptivo do EHCS_F no teste da formalina..... 51
- Gráfico 12:** Efeito inibitório do EHCS_C sobre a hipernocicepção induzida pela carragenina no teste de Von Frey 52
- Gráfico 13:** Efeito inibitório do EHCS_C sobre o edema de pata induzido por formalina na pata direita traseira..... 54
- Gráfico 14:** O EHCS_F inibiu o edema de pata induzido por da formalina na pata posterior direita 54
- Gráfico 15:** O EHCS_C inibe o curso temporal do edema de pata induzido pela carragenina. 55
- Gráfico 16:** O EHCS_C inibe o edema de pata induzido por carragenina e PGE2 56

LISTA DE ABREVIATURAS

μL – Microlitros

AA – Ácido araquidônico

ASC – Área sob a curva

CE – Células enterocromafins

Cg – Carragenina

CONCEA – Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal

COX – Ciclooxigenase

DBCA – Diretriz Brasileira Para o Cuidado e a Utilização de Animais Para Fins Científicos e Didáticos

E.P.M. – Erro padrão da média

EHCS_C – Extrato hidroalcoólico da casca de *Calycophyllum spruceanum*

EHCS_F – Extrato hidroalcoólico da folha de *Calycophyllum spruceanum*

eNOS – Óxido nítrico sintase endotelial (sigla em inglês)

g – Gramas

GHS – Sistema Harmonizado Globalmente para a Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos (sigla em inglês)

h – Horas

HR1 – Receptor histaminérgico 1

HR2 – Receptor histaminérgico 2

IASP – Associação Internacional para o Estudo da Dor (sigla em inglês)

IL – Interleucina

iNOS – Óxido nítrico sintase induzível (sigla em inglês)

mg/kg – Miligrama por quilograma

min – Minutos

mm – Milímetros

nNOS ou BNOS – Óxido nítrico sintase neuronal (sigla em inglês)

NO – Óxido nítrico (sigla em inglês)

NOS – Óxido nítrico sintase (sigla em inglês)

OECD – Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento (sigla em inglês)

OMS – Organização Mundial de Saúde

PAF – Fator de agregação plaquetária (sigla em inglês)

PGE₂ – Prostaglandina E₂

PGF₂α – Prostaglandina F₂ alfa

PGI₂ – Prostaciclina

s – Segundos

SG – Substância Gelatinosa

SNC – Sistema Nervoso Central

SNP – Sistema Nervoso Periférico

SP – Substância-P

TNF-α – Fator de Necrose Tumoral alfa (sigla em inglês)

UTAL – Laboratório da Unidade de Tecnologia de Alimentos

v.o. – Via oral

VR-1 – Receptor vanilóide

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	5
2.1 Dor	5
2.1.1 Tipos de dor	5
2.1.2 Nociceptores	7
2.2 Inflamação	10
2.3 Família Rubiaceae	15
2.3.1 Uso popular das Rubiáceas	16
2.3.2 Estudos realizados com espécies pertencentes à família Rubiaceae	18
2.3.3 O Gênero <i>Calycophyllum</i> A. DC.	19
2.3.3.1 <i>Calycophyllum spruceanum</i> (Benth.) Hook. f. ex K. Schum.	20
2.3.3.2 Composição Química	22
3. OBJETIVOS	23
3.1 Objetivo Geral	23
3.2 Objetivos específicos	23
4. MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 Animais	24
4.2 Obtenção dos extratos	24
4.2.1 Coleta e Identificação	24
4.2.2 Secagem e Trituração e Extração	25
4.3 Drogas e soluções	26
5. Investigação da atividade farmacológica	27
5.1. Avaliação preliminar do extrato	27
5.1.1 Teste de toxicidade aguda	27
5.1.2 Teste do Rota Rod	30
5.2 Avaliação da atividade antinociceptiva	31
5.2.1 Teste da placa quente	31
5.2.2 Teste de imersão da cauda	32
5.2.3 Contorções abdominais induzidas por ácido acético	33
5.2.4 Teste de nocicepção induzida por formalina	33
5.2.5 Teste de hipernocicepção mecânica (von Frey)	34
5.3 Avaliação do efeito anti-inflamatório no modelo de edema de pata	35

5.3.1 Edema de pata induzido por formalina.....	35
5.3.2 Edema de pata induzido por carragenina.....	35
5.3.2 Edema de pata induzido por prostaglandina E2	36
6. ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
7. RESULTADOS E DISCUSSÃO	38
7.1 Rendimento dos extratos.....	38
7.2 Ausência de toxicidade dos extratos da casca e folha de <i>Calycophyllum spruceanum</i> em doses inferiores a 5000 mg/kg.....	38
7.2.1 Toxicidade aguda.....	38
7.2.2 EHCS _C e EHCS _F não causam interferência no desempenho motor de camundongos no teste do Rota Rod.....	41
7.3 Atividade antinociceptiva do EHCS	45
7.3.1 Efeito do EHCS _C e EHCS _F sobre a nocicepção térmica no teste da placa quente	45
7.3.2 Efeito do EHCS _C e EHCS _F sobre a nocicepção térmica no teste de imersão da cauda ..	46
7.3.3 Efeito inibitório do EHCS _C e EHCS _F sobre as contorções abdominais induzidas por ácido acético	48
7.3.4 Efeito do EHCS _C e do EHCS _F sobre a nocicepção induzida por formalina.....	49
7.3.5 EHCS _C inibe a hipernocicepção induzida por carragenina no teste de Von Frey	52
7.4 Avaliação da atividade anti-inflamatória do EHCS.....	53
7.4.1 EHCS _C e do EHCS _F sobre o edema de pata induzido pela formalina	53
7.4.2 Efeito inibitório do EHCS _C sobre o edema de pata induzida por carragenina	53
7.4.3 O EHCS _C inibe o edema de pata induzido por prostaglandina E2	55
8. CONCLUSÕES.....	64
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

1. INTRODUÇÃO

O uso de plantas com a finalidade de tratar doenças é hábito muito antigo e ainda praticado, principalmente por comunidades tradicionais que ocupam florestas tropicais de países em desenvolvimento devido ao fácil acesso e a grande diversidade destes ambientes em contraponto ao alto custo, difícil acesso e efeitos colaterais dos medicamentos alopáticos.

Há vários registros históricos relacionados ao uso das plantas para tratamento de doenças. Podemos citar o “*Ebers Papyrus*”, manuscrito egípcio datado de 1.500 a.C., o qual contém 811 prescrições e 700 drogas. O primeiro texto Chinês sobre plantas medicinais é de 500 a.C. e relata nomes de plantas para tratamento de doenças, além de doses e indicações de uso. Algumas dessas plantas são conhecidas e ainda são utilizadas, como Ginseng (*Panax spp.*), *Ephedra spp.*, *Cassia spp.* e *Rheum palmatum L.*, inclusive como fontes de princípios ativos para indústrias farmacêuticas (DUARTE, 2006).

A procura pelos princípios ativos presentes nas plantas medicinais, se iniciou no século XIX, quando em 1806 o pioneiro Friedrich Serturmer isolou o alcalóide morfina da papoula (*Papaver somniferum*). Mais a diante, a partir desta mesma espécie foram isoladas a codeína (antitussígeno), em 1824 por Pierre-Jean Robiquet e a papaverina (espanolítico, vasodilatador) em 1848, por George Fraz Merck. Esses acontecimentos marcaram o início de uma busca constante por outros medicamentos originados de plantas (CALIXTO; SIQUEIRA JR., 2008).

Essa busca levou a outras importantes descobertas como da cafeína obtida da *Coffea arábica* por Runge em 1820, da atropina (antagonista muscarínico) isolada da *Atropa beladonna* por Heinrich F. G. Mein em 1831, entre outros. Porém a descoberta mais marcante foi da salicina (analgésico e antitérmico) por Rafaele Piria em 1829 a partir da planta *Salix alba*. A partir da modificação estrutural da salicina, originou-se o ácido salicílico em 1839, utilizado no tratamento da artrite reumatóide e a partir dele, Felix Hoffman sintetizou o ácido acetil salicílico em 1897 (CALIXTO; SIQUEIRA JR., 2008)

No Brasil, as primeiras menções sobre plantas medicinais datam do século XVI, quando o naturalista Gabriel Soares de Sousa cita várias plantas como o camará (*Chromolaena laevigata*, *Lantana camara*), a embaúba (*Cecropia hololeuca*, *C. palmata*, *C. adenopus*, *C. cinerea*), o jaborandi (*Pilocarpus jaborandi*), o maracujá (*Passiflora sp.*) e a copaíba (*Co paifera spp.*). Segundo ele, todas essas plantas eram usadas pelos índios para

curar feridas, chagas ou apostemas. Entretanto, somente no século XVII, o médico Guilherme Piso testou empiricamente, muitas plantas medicinais que ele encontrou, sendo ele o autor do primeiro tratado de medicina tropical intitulado “*De Medicina Brasiliensis*”, de 1648 onde ele descreve com detalhes as doenças então existentes no Brasil e como tratá-las (ALVES, 2013).

A Amazônia brasileira dispõe de um admirável potencial de plantas com propriedades terapêuticas e o tratamento de doenças por meio de plantas medicinais ou de seus princípios ativos originou-se, em sua maior parte, a partir de conhecimentos etnofarmacológicos (USTULIN *et al.*, 2009). O uso destas plantas pela população é herança de tribos indígenas da região, que disseminaram as suas tradições (DINIZ *et al.*, 2013) e comunidades quilombolas originadas no movimento de resistência dos negros escravos no final do século XVIII e início do século XIX (OLIVEIRA *et al.*, 2011a), que ainda mantêm contato com a natureza, gerando um vasto conhecimento de plantas medicinais. A grande biodiversidade da Amazônia, juntamente com o conhecimento tradicional dos povos da floresta adquirido por centenas de anos e transmitido através dos tempos, representa uma fonte potencial para a descoberta de novos agentes terapêuticos (OLIVEIRA *et al.*, 2011b) e novos medicamentos utilizados atualmente no tratamento de diversas enfermidades (OLGUIN *et al.*, 2007).

Os medicamentos fitoterápicos são amplamente utilizados, principalmente no tratamento de doenças crônicas e muitas vezes o seu uso é associado a diversos fármacos. Entretanto, essas associações podem causar possíveis interações farmacocinéticas e/ou farmacodinâmicas entre ambos e podem alterar tanto a eficácia quanto a segurança desses fármacos. Em virtude disso são alvo de estudos (ALEXANDRE *et al.*, 2008).

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), 80% da população de países em desenvolvimento utiliza-se de práticas tradicionais na atenção primária à saúde e, desse total, 85% faz uso de plantas medicinais ou de algum preparo originado destas (RAMOS *et al.*, 2005; ROSA *et al.*, 2011). Como exemplo temos as “garrafadas”, preparações popularmente conhecidas no Norte do país (ALEXANDRE *et al.*, 2008). Desde então, a OMS tem se posicionado quanto à necessidade da valorização do uso de plantas medicinais no âmbito sanitário e na atenção básica à saúde (ROSA *et al.*, 2011).

O interesse crescente em produtos naturais para o tratamento de enfermidades por parte da população se dá, principalmente, pela crença de que estes produtos são isentos de efeitos colaterais e são eficazes em casos onde a medicina tradicional não atendeu ao esperado, o que nem sempre é confirmado cientificamente (SOUSA *et al.*, 2008);

CARVALHO *et al.*, 2008). Como consequência, o interesse acadêmico pelo estudo de espécies vegetais e seu uso tradicional em diferentes partes do mundo também tem crescido (CHEIKHYOUSSEF *et al.*, 2011), visando o uso dos princípios ativos como protótipo para o desenvolvimento de novos fármacos, sejam eles sintéticos, quimicamente modificados, e até mesmo adjuvantes e fitofármacos (USTULLIN *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2011b e NEIVA *et al.*, 2014).

Para a validação do uso de plantas no tratamento de doenças, os estudos, etnobotânicos, etnofarmacológicos químicos, farmacológicos e toxicológicos são de grande importância, pois fornecem resultados importantes na pesquisa de novos produtos ativos de origem vegetal contribuindo na seleção de espécies de plantas a serem avaliadas (PONTE, 2009; NEIVA *et al.*, 2014).

Estima-se que cerca de 20 a 22% do número total de espécies de plantas superiores do mundo é encontrado no Brasil (CALIXTO; SIQUEIRA JR., 2008). Isso significa um grande valor econômico em várias atividades e um grande potencial na indústria de medicamentos, haja vista que muitos destes têm origem direta ou indireta de produtos naturais (CALIXTO, 2003). Por isso, investimentos em pesquisa na área de produtos naturais e sintéticos bioativos objetivando a introdução de novas substâncias ativas a partir de fontes alternativas tais como as plantas medicinais, tornam-se cada vez mais justificados, pois concorrem para a maior oferta e melhor acesso aos medicamentos.

Através dos produtos naturais, foi possível a compreensão de diversos fenômenos fisiológicos complexos, bem como a identificação, isolamento e reprodução de substâncias e estruturas. Através disto, a indústria farmacêutica pode desenvolver drogas mais seletivas e eficazes no tratamento de doenças (CALIXTO, 2003).

A dor é um incômodo vivenciado pelo homem ao longo da história. Em virtude disso, vem progressivamente procurando compreender suas causas e como tratá-la (PEDROSO; CELICH, 2006). A dor é um mecanismo de proteção do organismo onde o SNC sinaliza um processo agressivo que coloca em risco a sua integridade física, induzindo um comportamento de precaução e, conseqüentemente, limita os possíveis danos. É também um sintoma clinicamente importante na detecção e avaliação de doenças (VITOR *et al.*, 2008). À medida que se conhece mais e melhor a dimensão do fenômeno da dor, percebe-se que merece cada vez mais atenção, dedicação e investimentos (DIAS, 2011).

A inflamação é definida como uma resposta do organismo, especificamente dos tecidos vascularizados, aos estímulos lesivos. Sua manifestação envolve diversos eventos de natureza vascular e celular, que obedece a um padrão semelhante. Entretanto, podem ocorrer pequenas variações dependendo do agente lesivo, das características do tecido ou órgão afetado e da existência de estados patológicos (ROCHA & SILVA, 1978). Existem evidências de que a inflamação está envolvida no desenvolvimento de muitas doenças, incluindo obesidade, arterosclerose, doença arterial coronariana e de outras doenças graves e debilitantes como o câncer (GOMES *et al.*, 2010; RIDKER, *et al.*, 1997; GRIVENNIKOV; GRETEN; KARIN, 2010; MANSOURI *et al.*, 2015).

Considerando que a inflamação e dor são comuns a muitas doenças, justifica-se o interesse crescente na busca de novas substâncias possivelmente originada de plantas, com ação anti-inflamatória, analgésica e menos efeitos colaterais, haja vista que medicamentos como anti-inflamatórios não esteroidais (AINE) e opiáceos, classicamente utilizado nestas condições, podem causar algumas reações adversas tais como transtornos gastrointestinais, danos renais, depressão e eventual dependência (SHOJAI *et al.*, 2015). Em virtude disso, nesse estudo utilizou-se o extrato da *Calycophyllum spruceanum*, uma espécie vegetal comumente utilizada na Amazônia principalmente como anti-inflamatória, antioxidante, analgésica e no combate a rugas, com objetivo de avaliar suas possíveis atividades anti-inflamatória e antinociceptiva.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Dor

A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) define a dor como “uma experiência emocional e sensorial desagradável associada com uma lesão tecidual real ou potencial ou descrita em termos de tal lesão”. Portanto, a dor, é um mecanismo de alerta sobre a ocorrência de estímulos nocivos ambientais ou provenientes do próprio organismo, com função protetora, levando a reações reflexas e comportamentos a fim de interromper a exposição ao estímulo nódico (químico e físico como, por exemplo, forças mecânicas intensas, temperaturas intensas, isquemia e exposição a determinados agentes químicos) e por este meio, finalizar o processo doloroso e minimizar seus danos (LENT, 2005; ALMEIDA *et al.*, 2004).

Na língua portuguesa a palavra “dor” vem do latim: *dolore*, que significa sofrimento. Já na língua inglesa, “pain”, se origina do grego: *poiné*, que significa pena (FEIN, 2011). A dor, além de ser uma experiência complexa e subjetiva, inclui um forte componente cognitivo e emocional ou afetivo (JULIUS; BASBAUM, 2001; SANDKUHLER, 2009).

A dor é uma das principais causas do sofrimento humano, pois pode causar incapacidade, levando a repercussões psicossociais e econômicas, comprometendo a qualidade de vida e tornando-a um problema de saúde pública (BOTTEGA; FONTANA, 2010). Em serviços de emergência, a dor representa 44% dos motivos de busca por atendimento (KOSINSKI, 2014), podendo chegar até 50% das queixas em clínicas-gerais e dentre os motivos diversos que levam pacientes a buscar os consultórios brasileiros, está presente em mais de 70% (ROCHA *et al.*, 2007). A presença da dor torna transtornos depressivos e de ansiedade ainda maiores (GERRITS *et al.*, 2012). Embora seja consequência fisiopatológica de diversas morbidades e de suas repercussões, na maioria das vezes se caracteriza como uma função, representando, em muitos casos, o único sintoma para o diagnóstico de várias doenças (OLIVEIRA *et al.*, 2009).

2.1.1 Tipos de dor

A dor propriamente dita envolve a percepção de um estímulo aversivo, podendo incorporar componentes sensoriais com influências pessoais e ambientais importantes

(ALMEIDA *et al.*, 2004; D'AMOUR; SMITH, 1941). Então, a percepção da dor depende de fatores fisiológicos e psicológicos e envolve, além da transdução do estímulo nocivo (nocicepção), um processamento cognitivo e emocional pelo encéfalo (LE MOS; AMBIEL, 2010). Existem casos raros de pessoas insensíveis à dor e por isso não acionam comportamentos de proteção adequadas contra essas condições, o que pode ser fatal (LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001; BASBAUM *et al.*, 2009). Isso demonstra que a dor é uma modalidade sensorial complexa essencial à sobrevivência.

A dor nociceptiva se refere ao mecanismo pelo qual estímulos nocivos, detectados por fibras nervosas periféricas chamadas nociceptores, são transmitidos ao longo de uma cadeia de neurônios, para o córtex cerebral (BASBAUM *et al.*, 2009; KLAUMANN; WOUK; SILLAS, 2008). Por isso, em modelos experimentais com animais utiliza-se o termo nocicepção em referência às respostas aos estímulos dolorosos e lesivos, tendo em vista que animais não expressam os componentes subjetivos da dor e não é possível saber com exatidão qual é a sensação real experimentada pelo animal. Entretanto, eles exibem respostas comportamentais, motoras e fisiológicas semelhantes às observadas em seres humanos. Portanto, não se avalia dor, e sim nocicepção, através da observação comportamental e escalas de respostas nociceptivas estabelecidas de acordo com as diferentes intensidades de determinado estímulo nocivo (D'AMOUR; SMITH, 1941). Assim, para estudos em humanos usam-se os termos como dor e analgesia e enquanto que para estudos pré-clínicos, envolvendo animais de laboratório os termos nocicepção e antinocicepção são mais adequados (KANDEL *et al.*, 2003; SILVA *et al.*, 2013).

Também podemos classificar a dor, quanto ao tempo de duração, como aguda ou crônica. A dor aguda está relacionada a uma lesão tecidual ou estímulo capaz de causar uma lesão que induz a ativação local de nociceptores. É pontual, delimitada e rápida desaparecendo com o fim do processo patológico ou até mesmo antes do restabelecimento do tecido lesado (MILLAN, 2002). Entretanto, devido à prolongada ativação de várias vias neuronais a dor aguda pode se modificar e tornar-se crônica (SALLUM; GARCIA; SANCHES, 2012). A dor crônica é recorrente e perdura por longo período de tempo, mesmo após a de cura da lesão ou injúria, e está associada com maior lesão tecidual em decorrência de processos patológicos crônicos como inflamações ou neuropatologias (APKARIAN *et al.*, 2009).

A intensificação da dor induzida por um estímulo originalmente doloroso é chamada de hiperalgesia. Já a resposta nociceptiva para estímulos não nocivos é chamada de alodínia. Ambas são consideradas formas de manifestações nociceptivas onde a primeira consiste no aumento da dor como resposta a um estímulo nocivo, e a segunda como dor devido a um estímulo inócuo (ALMEIDA *et al.*, 2004).

A dor pode ser ainda classificada de acordo com o tipo de lesão assim sendo: nociceptiva quando ocorre por estimulação dos nociceptores; neurogênica quando ocorre lesão ao tecido neural; neuropática decorrente de uma lesão primária ou por disfunção do SNC e/ou SNP provocada por compressão, transecção, infiltração, isquemia, injúria metabólica de corpos celulares de neurônios ou uma combinação desses fatores (BENEDITO, 2009); psicogênica quando ocorre por fatores psicológicos; e inflamatória quando relacionada à lesão tecidual, na qual ocorre alterações funcionais de neurônios no sistema nervoso central (SNC) em decorrência da ativação ou sensibilização dos nociceptores por mediadores inflamatórios, tais como aminas, cininas, prostanóides, e citocinas (SCHOLZ e WOOLF, 2002). Tanto a dor inflamatória quanto a nociceptiva apresenta função fisiológica, protetora e adaptativa. Já a dor neuropática ou neurogênica não possuem função fisiológica protetora e são acompanhadas por intensa dor espontânea, sendo as dores de tratamento mais difícil. (MILLAN, 1999; SCHOLZ e WOOLF, 2002; ZEILHOFER, 2007). Na dor psicogênica há predominância de fatores psicológicos na origem da sensação dolorosa e pode ser observada em quadros de depressão e na ansiedade generalizada (FURST, 1999; MERSKEY, 1986; WHO, 2012).

2.1.2. Nociceptores

Os nociceptores são receptores sensoriais especializados que detectam estímulo nocivo térmico, mecânico ou químico que é transformado em estímulo elétrico e transmitido ao sistema nervoso central (MILLAN, 2002; SILVA *et al.*, 2013; ALVES NETO, 2010; FEIN, 2011). Os nociceptores diferem dos demais receptores sensoriais, por não responderem a estímulos de média e baixa intensidade e sim àqueles que, por sua elevada intensidade, são capazes de lesionar os tecidos (PAZO, 2004). Outra característica própria dos nociceptores é que estão associados a terminações nervosas livres e se encontram dispersos por todo o corpo (pele, músculos, articulações e órgãos internos), diferente dos receptores visuais, olfativos,

por exemplo, os quais estão localizados em estruturas anatômicas particulares. (JULIUS; BASBAUM, 2001).

Existem nociceptores que podem ser sensíveis a um estímulo específico, enquanto outros são sensíveis a vários tipos de estímulos, sendo divididos em quatro classes: a) mecânicos: que respondem a estímulos mecânicos de pressão intensa; b) térmicos: que respondem às temperaturas acima de 45°C, ou inferiores a 5°C; c) os nociceptores polimodais: os quais além de responderem a estímulos nocivos mecânicos e térmicos respondem também a estímulos químicos; d) os nociceptores silenciosos os quais são ativados por estímulos químicos, mediadores inflamatórios e somente depois de serem ativados respondem a estímulos mecânicos e térmicos (FEIN, 2011).

A transmissão dos estímulos nocivos ocorre por fibras aferentes primárias que variam acordo com sua estrutura, diâmetro e velocidade de condução. De acordo com essas características as fibras podem ser diferenciadas em três tipos: fibras A β , fibras A δ e fibras C. As fibras A β são altamente mielinizadas e de grandes em diâmetro (6 a 12 μm) o que lhes permite, conduzir potenciais de ação rapidamente. São elas as responsáveis por transmitir a informação tátil. As fibras A δ são pouco mielinizadas e de diâmetro menor (1 a 5 μm) tornando-as de condução mais lentas em relação às fibras A β . Elas respondem a estímulos térmicos e são divididas em duas classes principais, sendo as do tipo I, fibras com receptores de limiar alto, que respondem a estímulos mecânicos de alta intensidade e a estímulos térmicos ou químicos de baixa intensidade. As do tipo II apresentam receptores que são estimulados por altas temperaturas (45-53°C) e alguns receptores para frio intenso (-15°C) (WILLIS; WESTLUND, 1997; ALMEIDA *et al.*, 2004). As Fibras C são amielinizadas e de diâmetro menor (0,2 a 1,5 μm), responsáveis pela condução lenta dos estímulos dolorosos. Conjuntamente, as fibras A δ e C são denominadas de nociceptores polimodais, respondendo igualmente a estímulos mecânicos, térmicos ou químicos (BASBAUM *et al.*, 2009; HUCHO; LEVINE, 2007; LEMOS; AMBIEL, 2010). Estas fibras apresentam mecanociceptores de baixo limiar, receptores termossensíveis e receptores específicos para substâncias como, serotonina, prostaglandinas, substância P e histamina. (MENSE, 1983; MILLAN, 1999; MARCHAND, 2008).

Após a estimulação dos nociceptores é gerado um potencial de ação o qual é transferido da fibra nervosa do sistema nervoso periférico (SNP) para o sistema nervoso central (SNC) (JULIUS; BASBAUM, 2001; GRIFFIS *et al.*, 2006; ALVES NETO, 2010). As

fibras aferentes primárias penetram perpendicularmente no corno dorsal da medula espinhal. Essas fibras terminam nas lâminas superficiais ou estendem-se até lâminas mais profundas, sendo as fibras C nas lâminas I e II e as fibras A δ na lâmina I bem como na lâmina V (BASBAUM *et al.*, 2009). Os neurônios de segunda ordem (de projeção) estão localizados predominantemente nas lâminas superficiais do corno dorsal (substância gelatinosa) onde ocorrem sinapses entre as fibras primárias e secundárias, mediadas pela liberação de neurotransmissores, como o glutamato, além de outros mediadores, como substância P (SP) que modulam a transmissão na medula. (DOUBELL; MANNION; WOOLF, 1999; BASBAUM; JESSEL, 2003; D`MELLO e DICKENSON, 2008). Na substância gelatinosa (SG) os interneurônios excitatórios e inibitórios participam da transmissão da informação nociceptiva para os neurônios que se projetam para o cérebro e modulam esta informação transmitindo para outros neurônios do próprio corno dorsal (CALVINO E GRILO, 2006).

As fibras de segunda ordem cruzam a medula espinhal e ascendem ao trato espinotalâmico, transmitindo informações ao tálamo, onde fibras terciárias projetam-se para o córtex somatossensorial e o sistema límbico, este último está envolvido com os aspectos cognitivos emocionais relacionados à dor (ALMEIDA *et al.*, 2004; CALVINO E GRILO, 2006; AGUGGIA, 2003). O SNC modula a transmissão da informação sensorial, através de mecanismos que podem controlar a transmissão da informação nociceptiva para os centros supra-espinhais diminuindo a intensidade ou inibindo a transmissão da dor (BASBAUM; JESSEL, 2003).

A ação modulatória do corno dorsal é explicada por um mecanismo de controle chamado de “teoria do portão”. De acordo com esta teoria, o aumento da atividade de interneurônios inibitórios localizados na SG em decorrência da ativação das fibras de maior diâmetro (A α e A β), fecha o portão bloqueando a transmissão do impulso doloroso para estruturas supraespinhais; por outro lado, a “abertura do portão”, se dá pela ativação de fibras de menor diâmetro (A δ e C), através da inibição da ativação dos interneurônios inibitórios facilitando a transmissão dos impulsos nociceptivos para estruturas supraespinhais. (LE BARS; DICKENSON; BESSON *et al.*, 1979; BASBAUM *et al.*, 2009).

O processo de inibição da dor ocorre pela estimulação de vários locais como a substância cinzenta periaquedutal (SCPV) e o bulbo raquidiano ventromedial rostral (BRVMR), que inclui o núcleo magno da rafe (NMR) sendo esta uma das estruturas chaves na via de analgesia descendente. A SCPV recebe sinais do tálamo, hipotálamo, córtex e

conexões colaterais do trato espinotalâmico e está ligada ao NMR. Deste, partem vias descendentes para o corno dorsal da medula espinhal. A estimulação da SCPV induz neurônios do BRVMR a liberarem neurotransmissores, como serotonina e encefalina, os quais vão inibir as respostas nociceptivas dos neurônios do corno dorsal, diminuindo a resposta a dor (BASBAUM; JESSEL, 2000). No processo de modulação há participação de um grande número de mediadores, incluindo aminoácidos inibitórios, como o ácido gama-amino-butírico (GABA), a glicina, assim como a noradrenalina e a acetilcolina.

2.2 Inflamação.

A inflamação é uma resposta de defesa do organismo, mais especificamente dos tecidos vascularizados a lesões causadas por trauma mecânico, químico, térmico, contra patógenos invasores e infecções (SALEEM, *et al.*, 2011). Durante a inflamação aguda ocorrem fenômenos celulares e vasculares que levam ao surgimento dos sinais clássicos da inflamação: vermelhidão, edema, dor, calor e perda da função do tecido na área afetada (CRUVINEL *et al.*, 2010). Celsius (século I d.C.) listou quatro sinais cardinais da inflamação, manifestados pelo aumento no fluxo sanguíneo devido a dilatação dos pequenos vasos causando rubor (vermelhidão), a permeabilidade vascular aumentada é responsável pelo edema, que leva ao aumento na temperatura local (calor), bem como a passagem de células do sangue circulante para o tecido (SILVA; LEME, 2006) e dor local, devido a ação direta de mediadores químicos inflamatórios sobre nociceptores ou devido a compressão dos nociceptores em decorrência do edema tecidual (BERTOLINI *et al.*, 2005). A perda de função do tecido, quinto sinal cardinal, foi adicionada posteriormente por Virchow (MEDZHITOV, 2010). Anos depois, através de análise microscópica foi revelada a base fisiológica dos sinais da inflamação, onde foram verificados vasodilatação, extravasamento de plasma, e migração de leucócitos dos vasos sanguíneos para o tecido circundante (MEDZHITOV, 2010).

A inflamação, assim como outras respostas de defesa, são geralmente benéficas ao organismo, pois buscam impedir a proliferação e sobrevivência dos patógenos invasores, promovendo reparo e recuperação do tecido, conservando a energia do organismo. Entretanto, se esse processo não for corretamente ordenado, pode prolongar-se resultando em uma inflamação crônica a qual é altamente prejudicial ao organismo (ROCHA & SILVA, 1978; LIMA *et al.*, 2007).

De acordo com a duração e características da reação inflamatória pode-se dividir a resposta inflamatória em aguda e crônica. A aguda inicia rapidamente e é relativamente de curta duração, podendo levar horas ou dias. As principais características são a vasodilatação, exsudação de fluido rico em proteínas plasmáticas formando edema, migração de células (neutrófilos) para o local lesado, podendo ocorrer ativação da cascata de coagulação (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004). Já a inflamação crônica tem longa duração (semanas, meses e até anos) e é caracterizada por infiltrado de linfócitos e macrófagos, destruição do tecido (necrose), além da proliferação vascular e fibrose.

A resposta inflamatória aguda tem início logo após a ocorrência da lesão, quando há liberação de vários mediadores químicos que sensibilizam e estimulam os nociceptores locais da dor causando um aumento da sensibilidade no local lesionado (hiperalgesia primária) e em tecidos adjacentes à área lesionada (hiperalgesia secundária) (CASTRO; LEAL; SAKATA, 2013).

Embora possa haver variações, de acordo com o agente lesivo e a área afetada, o processo fisiopatológico da inflamação é semelhante. O agente inflamatório age sobre os tecidos induzindo a liberação de mediadores químicos vasoativos (citocinas, histamina, proteases e icosanoídes) por mastócitos (COUSSENS; WERB, 2002; CIRINO *et al.*, 2003) e outras células, tais como monócitos, macrófagos, neutrófilos, linfócitos e células endoteliais. Ao serem liberados no plasma, os mediadores promovem a vasodilatação e o aumento da permeabilidade resultando no extravasamento de líquido plasmático para o espaço extravascular (NATHAN, 2002; PEREIRA *et al.*, 2006).

Dentre os principais mediadores responsáveis pela vasodilatação estão histamina, serotonina, a bradicinina, fator de agregação plaquetária (PAF), citocinas, prostaglandinas E (PGE), prostaciclina I₂ (PGI₂) e óxido nítrico (NO) (COUSSENS; WERB, 2002; HEDQVIST *et al.*, 2000; MESQUITA JÚNIOR *et al.*, 2008). Com a vasodilatação e perda de líquido para o meio extravascular ocorre hemoconcentração local, ficando assim, um sangue mais viscoso e lento (estase) levando à marginalização dos leucócitos, que passam a circular junto ao endotélio. As células circulantes colidem mais frequentemente com as células endoteliais as quais, ativadas por citocinas inflamatórias como a Interleucina-1 (IL-1), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e quimiocinas liberadas por macrófagos residentes, expressam moléculas de superfície (selectinas e ligantes de integrinas) que colaboram para a maior aderência dos leucócitos, e eventual migração destes para os tecidos (MESQUITA JÚNIOR *et*

al., 2008; CRUVINEL *et al.*, 2010). Durante a inflamação, há a produção de citocinas tanto pró-inflamatórias quanto anti-inflamatórias e a magnitude da resposta inflamatória depende do equilíbrio de ambas (VERRI *et al.*, 2006).

Com a ativação do endotélio, ocorre a migração leucocitária. Nesta fase os leucócitos (inicialmente os neutrófilos) realizam rolamento e adesão mediados por selectinas e integrinas, bem como a migração através do endotélio (diapedese) para o tecido, promovida pelas quimiocinas. A migração dos neutrófilos ao sítio inflamatório é direcionada por um gradiente quimiotático crescente. No tecido, as células buscam remover o patógeno através de sua capacidade fagocitária, permitindo o reparo da lesão. Na inflamação aguda as principais células são os neutrófilos e os macrófagos (NATHAN, 2002; PEREIRA *et al.*, 2006; MESQUITA JÚNIOR *et al.*, 2008).

Conforme visto anteriormente, tanto a resposta dolorosa quanto a inflamatória envolve mediadores químicos que exercem efeitos funcionais importantes, os quais podem ser de origem plasmática ou celular. Estes mediadores podem ser pré-formados ou sintetizados nas células ativadas, em resposta a um estímulo (BALBINO; PEREIRA; CURI, 2005).

A histamina é uma amina vasoativa pré-formada principalmente por mastócitos residentes no tecido, porém pode ser também formada no sangue, por plaquetas e basófilos. É o mediador dos primeiros eventos da inflamação aguda. Participa dos mecanismos causadores da vasodilatação, permeabilidade vascular e está fortemente associada à produção da sensação de prurido por estimular as terminações nervosas sensitivas. A histamina exerce seus efeitos ao se ligar com receptores específicos, denominados receptores histaminérgicos, sendo o HR1 e HR2 os receptores responsáveis pela maioria das ações inflamatórias induzidas pela histamina, (DEUTSCH *et al.*, 2011; JUTEL *et al.*, 2009; BORK, 2014) além de possuir importante papel na modulação da dor (MOBARAKEH *et al.*, 2006).

A serotonina (5-HT), um neurotransmissor bem caracterizado no sistema nervoso central, desempenha um papel crucial em várias funções fisiológicas. É sintetizada predominantemente em células enterocromafins (CE) no epitélio do trato gastrintestinal bem como SNC pelos núcleos da região reticular do tronco cerebral (NMR e NRD) (SHAJIB, KHAN, 2014). A 5-HT possui ações semelhantes às da histamina, desempenhando papel importante na vasodilatação e permeabilidade vascular o que contribui para a formação do

edema. Produz rubor e é também responsável pelo estímulo das terminações nervosas sensitivas para dor e prurido (DEUTSCH *et al.*, 2011; KATZUNG, 2005).

A bradicinina é um mediador inflamatório com papel importante na vasodilatação, formação de edema e síntese de prostaglandinas hiperemia e elevação da temperatura local. Estes eventos quando associados à liberação de substâncias quimiotáticas induzem a migração de leucócitos para o tecido lesionado. As ações da bradicinina são mediadas através da ativação de dois tipos de receptores (B1 e B2). Estudos sugerem que a bradicinina, através dos receptores B1 e B2, está envolvida nas vias de sinalização da dor, especialmente na dor de origem inflamatória sendo que o receptor B1 também está envolvido no aumento da exsudação e da permeabilidade vascular (PESQUERO *et al.*, 2000; OKUSE, 2007; MESQUITA JÚNIOR *et al.*, 2008).

As citocinas são mediadores essenciais da resposta inflamatória, que favorecem a cicatrização apropriada da lesão. Os estímulos inflamatórios ou lesões teciduais induzem células residentes, incluindo macrófagos e mastócitos à liberação em cascata de citocinas, que acabará por desencadear a liberação de mediadores responsáveis pela dor inflamatória e neuropática. Dentre as consideradas pro-inflamatórias, são vistas como as mais importantes as interleucinas (IL-1 β e IL-6) e fator de necrose tumoral alfa (TNF α), devido aos seus papéis na fisiopatologia de muitas doenças inflamatórias (VERRI *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2011c). A IL-1 β produz inflamação sistêmica estimulando a formação de PGE2 no hipotálamo anterior, causando febre. Também produz substância-P (SP), óxido nítrico NO (ativando a enzima óxido nítrico sintase-NOS) e moléculas de adesão endotelial. A IL-6 promove maturação macrófagos e neutrófilos e ativação de neutrófilos, também causa febre. O TNF α , é produzido principalmente por monócitos, macrófagos e linfócitos-T, estando presente também nos neurônios e células da glia, e exerce potentes efeitos pró-inflamatórios, pois é potente indutor da liberação de outras citocinas, aumenta a permeabilidade vascular e, facilita a migração de células inflamatórias para os locais de inflamação pela indução da expressão de moléculas de adesão pelas células endoteliais (OLIVEIRA *et al.*, 2011c; EL ALWANI *et al.*, 2006).

O óxido nítrico NO é um gás solúvel produzido por células endoteliais, macrófagos e neurônios específicos (HEHN, 2011). Trata-se de um potente vasodilator, relaxante da musculatura lisa, redutor de agregação plaquetária e antimicrobiano em altas concentrações. É sintetizado a partir de L-arginina pela NOS geralmente após estímulos inflamatórios ou

imunológicos. Foram identificadas pelo menos três isoformas: As isoformas constitutivas (iNOS), NOS neuronal (nNOS) e NOS endotelial (eNOS), que funcionam, respectivamente, como neurotransmissor e vasodilatador e produzem pequenas quantidades de NO. A isoforma indutível (iNOS) produz grandes quantidades de NO e é expressa durante a inflamação (REUTER *et al.*,2010).

A substância P é um neuropeptídeo importante no processo inflamatório. Atua em receptores específicos (NK1), causando aumento do fluxo sanguíneo, vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, extravasamento plasmático e degranulação de mastócitos. Também está envolvida na transmissão do estímulo nociceptivo (MESQUITA JÚNIOR *et al.*, 2008).

As Prostaglandinas (PGs) são autacóides lipídicos que pertencem à família de eicosanóides derivados do ácido araquidônico (AA). O AA é liberado dos fosfolipídios da membrana, e é metabolizado basicamente por duas vias, a da lipooxigenase que conduz à formação dos leucotrienos e lipoxinas, e a via da ciclooxigenase (COX) que promove a formação dos tromboxanos e prostaglandinas. Existem três isoformas de COX – Uma é constitutiva (COX-1) e desempenha papel de anti-agregante sistêmico e regulador da perfusão renal e protetor da mucosa gástrica. A outra (COX-2) é indutível por citocinas e fatores de crescimento. Em tecidos inflamatórios se encontra em grandes quantidades. Já a COX-3 é uma variante da COX-1(LEGLER *et al.*, 2010; RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011).

Existem quatro principais prostaglandinas bioativas geradas *in vivo*: prostaglandina E₂ (PGE₂), prostaciclina (PGI₂), prostaglandina D₂ (PGD₂) e prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}), sendo a PGE₂ é o mais abundante dos eicosanóides. Além de outros prostanóides, a PGE₂ tem numerosas funções: regulação da temperatura corporal e atividade sono-vigília, respostas hiperalgésicas; através de sua atividade vasodilatadora, participa na implantação embrionária e modulação da hemodinâmica no rim; contração e relaxamento das células musculares lisas no parto, no controle da pressão sanguínea e na motilidade gastrointestinal. Na inflamação, a PGE₂ está envolvida nos processos de rubor, edema e dor. Também são importantes na nocicepção, pois atua em neurônios sensoriais periféricos e centrais locais no interior da medula espinal e do cérebro. A PGE₂ atua localmente através da ligação de receptores específicos (EP1-EP4), localizados na superfície celular. Estes receptores são acoplados a proteínas G (VANEGAS E SCHAIBLE, 2001). Cada receptor possui características fisiológicas distintas e importantes, sendo que o receptor EP1 está envolvido na

hiperalgesia e o receptor EP3, atua na resposta da dor inflamatória em baixas doses de PGE₂ (LEGLER *et al.*, 2010; RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011). Essa atuação da PGE₂ no processo nociceptivo se dá por sua ligação a receptores EP2 ativando a adenil ciclase, via proteína G estimulatória, causando aumento na excitabilidade, liberação aumentada de neurotransmissores (aminoácidos excitatórios, substância P, CGRP e NO), redução do limiar nociceptivo e redução na inibição mediada por glicina no corno dorsal da medula espinhal (CARVALHO; LEMÔNICA, 1998; AHMADI *et al.*, 2002).

2.3 Família Rubiaceae

A família Rubiaceae, pertencente à ordem Gentianales, foi descrita em 1789 por Antoine Laurent de Jussieu e possui esse nome devido à tinta vermelha produzida pelas raízes de suas plantas que eram utilizadas para tingir tecidos (PEREIRA, 2007). É considerada a quarta família mais representativa em número de espécies entre as Angiospermas, superada apenas pelas Orchidaceae, Asteraceae e Fabaceae (MABBERLEY, 1997). A família inclui 611 gêneros e aproximadamente 13.100 espécies (GOVAERTS *et al.*, 2007). É composta por plantas de hábito variado desde ervas perenes e anuais, arbustos, subarbustos, árvores de grande e médio porte até lianas, sendo que a maioria das espécies são árvores de pequeno porte ou arbustos (BARROSO, 1991) e de raras epífitas como, por exemplo, as do gênero *Hillia* Jacq. (TAYLOR *et al.*, 2007). A família é de fácil reconhecimento em campo devido as suas folhas simples, geralmente oposto-cruzadas, de margem inteira e venação peninérvia, com pequenas domácias na axila abaxial das nervuras laterais (TAYLOR *et al.*, 2007), estípulas interpeciolares, flores isostêmones, corolas na maioria das vezes gamopétalas, estames epipétalos e ovário geralmente ínfero (DELPRETE, 2010). Os frutos são geralmente bagas ou cápsulas e as sementes às vezes aladas (STEHMANN, 2008).

A distribuição é cosmopolita, sendo mais frequente nas regiões tropicais e subtropicais, ocorrendo também nas regiões temperadas e frias da Europa e norte do Canadá (DELPRETE; JARDIM, 2012). De acordo com estudos filogenéticos recentes, divide-se a família em apenas três subfamílias: Cinchonoideae, Ixoroideae e Rubioideae, com respectivamente, 9, 15 e 18 tribos (LENS *et al.*, 2000; JANSEN *et al.*, 2002; BREMER, 2009). Foram registrados no Brasil 124 gêneros e 1.395 espécies (BARBOSA *et al.*, 2014), devido a essa grande variedade é considerada uma das principais famílias da flora brasileira, ocupando o 5º lugar em número de espécies (FORZZA *et al.*, 2010). Alguns dos gêneros da

família Rubiaceae, o qual está incluído o gênero *Calycophyllum*, faz parte das espécies pioneiras mais conhecidas dos trópicos (GOMEZ-POMPA; VÁZQUEZ-YANES 1995), destacando-se como um importante elemento em quase todas as formações vegetacionais.

A família Rubiaceae é de importância para a sociedade, pois nela estão inseridas plantas de elevado valor econômico, apresentando espécies ornamentais (dos gêneros *Asperula* L. f., *Galium* L., *Gardenia* L., *Hamelia* Jacq., *Houstonia* L., *Ixora* L., *Mussaenda* L., *Nertera* Banks & Solander, *Pentas* Benth., *Randia* L., *Rondeletia* L., *Serissa* Comm. ex Juss., *Warszewiczia* Klotzsch), sendo alguns destes gêneros encontrados na flora brasileira (SOUZA; LORENZI, 2012). Para a produção de madeira, são poucas as espécies que atingem tamanho adequado à finalidade, destacando-se os gêneros *Sarcomphalus* P. Browne, *Mitragyna* Korth, *Morinda* L., *Pausinystalia* Pierre, *Capirona* Spruce, *Calycophyllum* DC. e *Chimarrhis* Jacq. (MENDOZA *et al.*, 2004). Dentre as espécies alimentícias o café (*Coffea arabica* L.), principal espécie de interesse econômico, é uma das bebidas mais consumidas em todo o mundo e contém várias substâncias farmacologicamente ativas, como a cafeína. Na alimentação humana também confere grande interesse o jenipapo (*Genipa americana* L.), que possui frutos comestíveis e é utilizado na fabricação de doces, vinhos e licores (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002; MENDOZA; RAMÍREZ; JIMÉNEZ, 2004). A família Rubiaceae também apresenta grande importância na área terapêutica e na medicina popular, sendo utilizada para fabricação de fitofármacos e fitoterápicos medicinais (SOUZA; LORENZI, 2012). As rubiáceas incluem gêneros de interesse farmacológico, como *Cinchona* e *Cephaelis*, conhecidas como quineira, das quais se extrai o alcalóide quinino, empregado no tratamento da malária. O mulateiro ou “pau-mulato” (*Calycophyllum spruceanum*), objeto de estudo deste trabalho é outra espécie conhecida pelo seu potencial medicinal como antioxidante, anti-inflamatório, entre outros (SOUZA; LORENZI, 2008; CASINO, 2010).

2.3.1 Uso popular das rubiáceas

Estudo recente constatou uso medicinal popular de 40 espécies para diversos tipos de problemas relacionados à saúde humana, sendo que o uso pode ser da raiz às folhas (SOUZA *et al.*, 2013). As espécies conhecidas popularmente como jenipapo-bravo (*Tocoyena guianensis* K. Schum.), jenipapo-do-mato *Tocoyena sellowiana* (C ham. & Schltld.) K. Schum., são utilizadas para o tratamento de contusões e luxações e a espécie jenipapinho (*Tocoyena formosa* (C ham. & Schltld.) K. Schum.) para tosse, torção, cistite, reumatismo,

problemas renais, cardíacos e fígado. As espécies ipecacuanha-do-campo (*Richardia grandiflora* (C ham. & Schl.) Schult. & Schult) para bronquite, catarro, diarreia e dentição, vermífuga e a poaia branca (*Richardia brasiliensis*) utilizada como expectorante, emética, diaforética, vermífuga e para o tratamento de hemorroidas. A vassourinha-de-botão (*Borreria verticillata* (L.) G. Meyer) é utilizada para cólica menstrual, tosse, hemorróida, vermes, corrimento vaginal, impotência, coceira e lesões de pele. A espécie conhecida como cipó-cruz, caninana ou cainco (*Chiococca alba* (L.) Hitchc.) é utilizada para tratar doenças venéreas, indigestão, reumatismo, diurético, purgativo, febrífuga, mordida de cobra, cicatrizante, abortivo, leucorréia e micoses. A espécie conhecida como quina-quina ou quina verdadeira (*Cinchona calisaya* Wedd.) é usada para tratar debilidade física, anemia, distúrbios gastrointestinais, febres, malária e fadiga geral. O café (*Coffea arabica* L.), nesse caso, utilizado a semente ou a folha, servem para a má circulação, como estimulante, tônico, relaxante, vertigem, doenças do aparelho respiratório. As espécies *Guettarda angélica* Mull. Arg. e *Guettarda angélica* Mull. Arg., ambas conhecidas popularmente como angélica-brava ou angélica-do-mato são utilizadas para cólica menstrual, constipação e febre. A espécie falsa-erva-de-rato ou Amélia (*Hamelia patens* Jacq.), é utilizada no tratamento de brotoejas, acnes, queimaduras, coceiras, cortes, micoses, picadas de insetos, problemas menstruais e dores de parto. A *Morinda citrifolia*, conhecido popularmente como noni, é utilizada no tratamento de alergia, artrite, asma, infecções bacterianas, câncer, diabetes, hipertensão, distúrbios menstruais, musculares, obesidade, úlceras gástricas, dores de cabeça, inibição sexual, insônia, depressão, estresse, problemas respiratórios. As espécies roxinha (*Psychotria coccínea* Poit. ex. DC) e maria-da-mata (*Psychotria colorata* (Willd. ex R. & S.) Müll. Arg.) servem para inchaços, dores no fígado e nos rins (SOUZA *et al.*, 2013).

A espécie *Posoqueria latifolia* é usada na medicina popular como anti-séptica e cicatrizante de feridas (FENNER *et al.*, 2006). *Posoqueria acutifolia* Mart. encontrada na mata atlântica, é usada popularmente como antimicrobiano, cicatrizante e antiinflamatório (SOARES JÚNIOR *et al.*, 2005). Outras espécies como o Jenipapo (*Genipa americana*), Ipeca (*Psychotria ipecacuanha*), e Vassourinha-de-botão (*Borreria verticillata* G.F.W. Meyer) possuem em geral indicações fitoterápicas para o combate a infecções hepáticas, anemias, asma, diarreia, má digestão, úlceras, amigdalites, doenças venéreas, inflamações, amebíase, entre outras (REIS *et al.*, 2003).

No estado de Sergipe, o chá da entrecasca de *Coutarea hexandra* Shum é popularmente utilizado no combate à dor e à inflamação (LUCENA, 2006). A *Uncaria*

tomentosa, conhecida como “unha-de-gato”, é utilizada no tratamento de impurezas da pele, doenças venéreas e inflamações urinárias (REVILLA, 2001). A espécie *Mitragyna ciliata* é utilizada na medicina tradicional para o tratamento de inflamação, hipertensão, dor de cabeça, reumatismo, gonorreia e doenças bronco-pulmonar (DONGMO, 2003).

2.3.2 Estudos realizados com espécies pertencentes à família Rubiaceae

Efeitos antiinflamatórios e antinociceptivos central e periférico já foram demonstrados para o extrato metanólico dos galhos de *Posoqueria acutifolia* (SOUSA *et al.*, 2007). Tais efeitos também já haviam sido detectados para outras espécies da família Rubiaceae: O extrato aquoso da *Coutarea hexandra*, apresentou efeitos antiinflamatório e antinociceptivo (LUCENA, 2006), bem como a entrecasca de *Uncaria tomentosa* e *Mytragyna ciliata*. Porém, o perfil da resposta farmacológica destas plantas apresenta aspectos diversos do observado em *C. hexandra*. A entrecasca da *Uncaria tomentosa* apresenta eficácia em ambas às fases do teste da formalina e a entrecasca da *Mytragyna ciliata* é eficaz em reduzir o edema de pata induzido por carragenina de 30 minutos a duas horas após a administração do agente flogístico (DONGMO, 2003; JÜRGENSEN *et al.*, 2005).

Foram identificadas substâncias antiinflamatórias (beta-sitosterol, estigmasterol, campesterol e diversos glicosídeos entre eles os quinóvicos) nos extratos obtidos da casca de *U. tomentosa* (AGUILAR, 2002), tendo sido sugerido que a atividade anti-inflamatória da planta seja resultado da combinação de compostos que trabalham sinergicamente (HEITZMAN *et al.*, 2005).

Em estudo com extratos, frações e substâncias puras de três espécies do gênero *Alibertia* foi verificada ação antifúngica (SILVA, 2007). Para o extrato metanólico das folhas de espécie *Guettarda platypoda* D.C. conhecida como Angélica e Angélica do mato foi demonstrada atividade antimicrobiana sobre *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus coagulase* negativo, *Staphylococcus saprophyticus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (ARAÚJO; MELO, 2010). Para a espécie *Psychotria prunifolia* demonstrou-se atividade citotóxica em células tumorais (PIRES *et al.*, 2011). MORAES e colaboradores (2010) em estudo com extrato bruto e frações da espécie *Amaioua guianensis* demonstraram a atividade antifúngica desta espécie sobre os isolados de *Cryptococcus neoformans*.

As espécies popularmente conhecidas por quina, tais como: *Deianirae rubescens*, *Strychnos pseudoquinae*, *Remijia ferruginea*, também são utilizadas tradicionalmente para o tratamento de febre e malária, porém, em estudo realizado para se avaliar a atividade antimalárica dessas espécies, apenas a *R. ferruginea* demonstrou eficácia farmacológica reduzindo a incidência do parasita e até mesmo levando-o à morte (ANDRADE-NETO *et al.*, 2003).

Em estudo realizado com glicosídeos iridóides, um componente ativo isolado da erva chinesa tradicional (*Paederia scandens* (Lour.) MERRILL), demonstrou-se efeito analgésico sobre a dor neuropática (LIU, *et al.*, 2012), bem como efeito anti-inflamatório (WENJING *et al.*, 2012).

A espécie *Hintonia standleyana* Bullock, conhecido popularmente no México como copalchi, quina amarela ou falsa quina, é usada a partir do chá da casca para tratar diabetes e sintomas associados à malária (DÉCIGA-CAMPOS, 2006). Em estudo realizado com ratos diabéticos o extrato da casca de *H. standleyana* causou diminuição significativa nos níveis de glicose no sangue (GUERRERO-ANALCO *et al.*, 2005).

As raízes da *Nauclea latifolia* Smith, popularmente conhecido como Koumkouma, é usada empiricamente pelos camaroneses para o tratamento da dor neuropática, dor de cabeça, dor inflamatória e como anticonvulsivo. Em estudo realizado para análise dos efeitos antinociceptivos do extrato da raiz de *N. latifolia*, demonstrou-se eficácia no tratamento da dor neuropática (TAÏWE *et al.*, 2014).

2.3.3 O Gênero *Calycophyllum* A. DC.

O gênero *Calycophyllum* A. DC. está inserido na subfamília Ixoroideae e tribo Condamineae, reunindo cerca de 20 binômios. Tratam-se de árvores de porte médio a grande, sendo consideradas endêmicas da América tropical e, na flora brasileira, da região Amazônica. Embora pouco variável, a morfologia do gênero permite a distinção de espécies mediante características de folhas e flores (BREMER, 2009). Este gênero já foi registrado na literatura por possuir inúmeros compostos metabólitos secundário, tais como alcalóides, iridóides, triterpenos e antraquinonas que demonstram atividades antioxidantes importantes. (CARDOSO *et al.*, 2008).

2.3.3.1 *Calycophyllum spruceanum* (Benth.) Hook. f. ex K. Schum.

A *Calycophyllum spruceanum* (Benth.) Hook. f. ex K. Schum., conhecida principalmente no Brasil como “mulateiro” ou “pau-mulato”, é uma espécie arbórea de grande porte da Amazônia, podendo atingir de 15 a 35 metros de altura e 4 a 5 metros de diâmetro de copa colunar. As folhas são grandes e semi-caducas. A floração produz flores brancas entre os meses de maio a junho. O tronco é retilíneo com a casca lisa e brilhante da cor bronzeada (figura1).



Figura1: *Calycophyllum spruceanum* (Benth.) Hook. f. ex K. Schum. Foto: Ana Paula A.B.S.

A *C. spruceanum* é muito utilizada tradicionalmente para o tratamento de inúmeras doenças humanas, como: micoses, viroses, diversas infecções, câncer e doenças da pele, isto em toda a Amazônia, incluindo o Brasil, Peru, Bolívia e Colômbia (ZULETA *et al.*, 2003). Segundo CASSINO (2010) a *C. spruceanum* é utilizada por comunidades tradicionais para o tratamento de dores na coluna, problemas de próstata e rins, infecção urinária, inflamação,

colesterol alto, problemas da tireoide, envelhecimento da pele, problemas do aparelho reprodutor feminino e frieza no corpo. Algumas tribos indígenas utilizam o chá feito com a casca molhando seus corpos após o banho, pois acreditam que isto ajuda a combater o envelhecimento, alguns tipos de parasitas e infecções fúngicas (TAYLOR, 2005). Segundo LINO *et al.*, (2009), a *C. spruceanum* possui grande quantidade de taninos que causam um efeito adstringente, possui também quantidades expressivas de fenóis e ácidos orgânicos que demonstram atividade antifúngica, antibacteriana, inseticida e antioxidante.

Em estudo realizado para verificar as atividades antioxidantes de sete espécies de plantas amazônicas, das quais estava inclusa a *C. spruceanum*, observou-se que os extratos aquoso e etanólico da casca desta espécie apresentaram maior atividade antioxidante e também um maior teor de compostos fenólicos em relação as demais espécies estudadas. Além disso, o extrato também demonstrou atividade antifúngica (VARGAS, 2008). Segundo CAI e colaboradores (2004), em estudo com 112 espécies de plantas medicinais usadas no tratamento e prevenção do câncer pela população chinesa foi verificado que a atividade antioxidante é fortemente evidenciada, principalmente em plantas que apresentam maior predominância de compostos fenólicos. Isso vem a corroborar com o resultado obtido no estudo realizado por Vargas (2008). Além da atividade antioxidante, o extrato aquoso e etanólico da casca apresentaram atividade fotoprotetora (LINO *et al.*, 2009).

Os extratos hidroalcoólicos da casca e das folhas apresentam um excelente potencial para uso dermatológico, principalmente na atividade fotoprotetora, podendo ser utilizados como possíveis filtros solares naturais isolados e/ou incorporados em emulsão, ou como potencializador de outras formulações (MELO, 2015). Estudos realizados com seco-iridóides isoladas de extrato etanólico de *C. spruceanum* apresentaram atividade anti-tripomastigota *in vitro* (ZULETA *et al.*, 2003).

Na Amazônia brasileira o uso do mulateiro vai além da utilização terapêutica tradicional, sendo utilizado frequentemente como espécies ornamentais e de exploração madeireira. No estuário amazônico, o mulateiro é uma das principais espécies utilizadas para produção de madeira. A *C. spruceanum* está entre as quatro espécies mais extraídas pelos ribeirinhos das várzeas do Estado do Amapá (QUEIROZ; MACHADO, 2007) e a de maior extração nos anos de 2011 e 2012 por cerca de 81% dos habitantes da reserva extrativista do Alto Juruá, município de Marechal Thaumaturgo – Acre (BARROS *et al.*, 2015).

2.3.3.2 Composição Química

Em recente estudo foi verificado através de prospecção fotoquímica preliminar do extrato bruto da casca da *C. spruceanum*, a presença de taninos catéquicos, flavonóides, alcaloides, depsídeos e depsidonas. No extrato bruto das folhas revelou-se a presença de taninos catéquicos, depsídeos e depsidonas, derivados da cumarina e alcaloides (MELO, 2015).

As flores contêm 22 constituintes (%): α -felandreno (3,0); Acetato de hexila (5,2); *p*-cimeno (6,7); Limoneno (2,6); (E)- β -Ocimeno (1,1); *cis*-Óxido de linalol (furanóide) (11,4); *Trans*-Óxido de linalol (furanóide) (6,0); Linalol (7,9); Nonanal (0,9); n.i. (5,3); n.i. (1,4); hexanoato de butila (2,9); α -Terpineol (1,3); 2-Metilbutanoato de hexila (1,2); *p*-Anisaldeído (11,0); Safrol (2,5); Hexanoato de hexila (2,2); β -cariofileno (0,8); n.i. (2,3); n.i. (1,2); (E,E)- α -farneseno (21,8); Dilapiol (1,4) (ZOGHBI *et al.*, 2000).

Considerando o uso etnofarmacológico e as informações aqui apresentadas obtidas através de pesquisas já realizadas com a espécie, este estudo pretende avaliar os possíveis efeitos analgésico, anti-inflamatório dos extratos da *Calycophyllum spruceanum* (Benth.) Hook. f. ex K. Schum. e com isso incorporar informações científicas ao conhecimento empírico sobre a espécie, com base em comprovações de suas atividades farmacológicas e das suas propriedades curativas.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a toxicidade, os efeitos e mecanismos antinociceptivo e anti-inflamatório dos extratos hidroalcoólicos das cascas e folhas de *Calycophyllum spruceanum* em modelos experimentais em camundongos.

3.2 Objetivos específicos:

- Avaliar a toxicidade sistêmica dos extratos através do estudo da toxicidade aguda;
- Avaliar a atividade dos extratos sobre o desempenho motor, utilizando o teste do Rota Rod;
- Avaliar a atividade dos extratos em modelos comportamentais de nocicepção;
- Avaliar o efeito antiinflamatório dos extratos em modelos de edema de pata;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss albinos (Figura 2), manipulados de acordo com os padrões estabelecidos pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual do Ceará (UECE-Nº 6975375.2014) e pelo Comitê de Ética no Uso de animais da Universidade Federal do Acre (UFAC-Registro nº 32/2014). Os animais foram mantidos sob temperatura controlada ($22 \pm 1^\circ\text{C}$) em ciclo claro-escuro de 12 horas e com livre acesso à comida e água, exceto durante as sessões de teste.

Antes da realização de cada protocolo experimental, os animais foram aclimatizados no laboratório para adaptação, por um período de pelo menos 1 hora. Todos os procedimentos usados no presente estudo foram conduzidos de acordo com as orientações éticas do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal – CONCEA, seguindo a Diretriz Brasileira Para o Cuidado e a Utilização de Animais Para Fins Científicos e Didáticos - DBCA dos Princípios éticos de experimentação animal, a fim de minimizar o sofrimento dos animais e usar somente o número necessário de animais para obterem-se resultados confiáveis.



Figura 2 - Camundongos Swiss albinos. Foto: Ana Paula A.B.S.

4.2 Obtenção dos extratos

4.2.1 Coleta e Identificação

O material botânico (folhas e casca de *Calycophyllum spruceanum*) foi coletado em área particular no município de Bujari - AC situada na BR 364 km 52. Após coleta, exemplares da planta foram identificados e depositados no Herbário da UFAC sob o número 20307.

4.2.2 Secagem e Trituração e Extração

O material vegetal fresco (casca e folhas) foi seco em estufa a 45 °C e posteriormente triturado em moinho tipo lâmina, no Laboratório da Unidade de Tecnologia de Alimentos da UFAC. Foi realizada a pesagem do material antes e após cada procedimento precedente à extração. Também foi feita a pesagem do extrato depois de liofilizado.

Os extratos hidroalcoólicos da casca e da folha de *Calycophyllum spruceanum*, casca (EHCS_C) e (EHCS_F), respectivamente foram elaborados através do método de percolação (Figura 3), no qual o material foi imerso em solvente extrator hidroalcoólico a 70% (setenta por cento), com volume suficiente para cobrir o material vegetal, em recipiente fechado por 72 (setenta e duas) horas à temperatura ambiente. A cada 24 horas realizou-se a filtragem do extrato e novamente acrescido solvente ao material vegetal.

O filtrado foi concentrado em evaporador rotativo (Figura 4) a 45°C, sendo ao final da evaporação liofilizado e mantido sob refrigeração. Calculou-se o rendimento total dos extratos, de acordo com a fórmula: $Re = (P_{ext} / P_{folhas}) \times 100$. (RODRIGUES *et al.*, 2011). Onde: **Re** = Rendimento total do extrato (%); **P_{ext}** = Peso do extrato seco (g); **P folhas** (ou P casca) = Peso das folhas (ou casca) frescas (g).

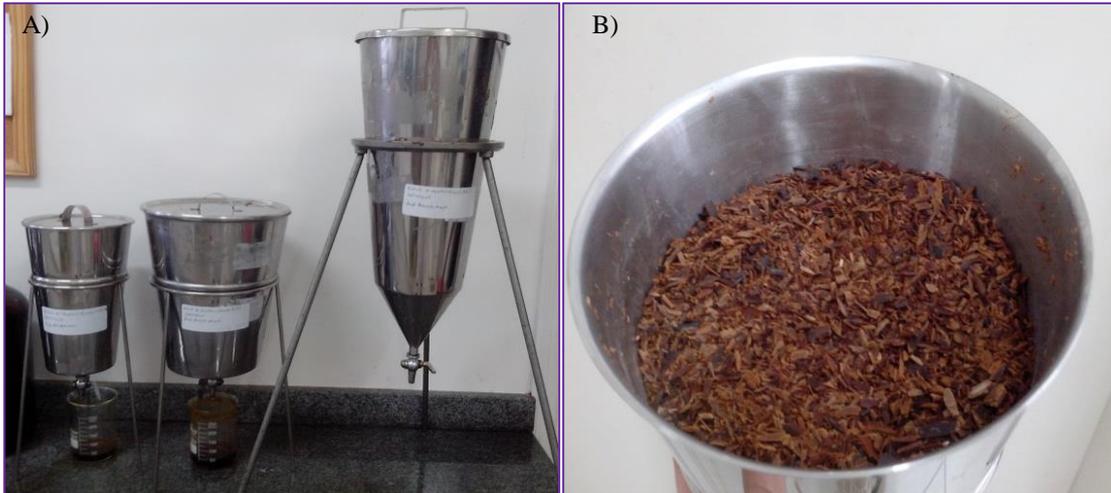


Figura 3: Material vegetal em percolador para obtenção do extrato. A) Percoladores. B) Percolador com material vegetal. Foto: Ana Paula A.B.S.

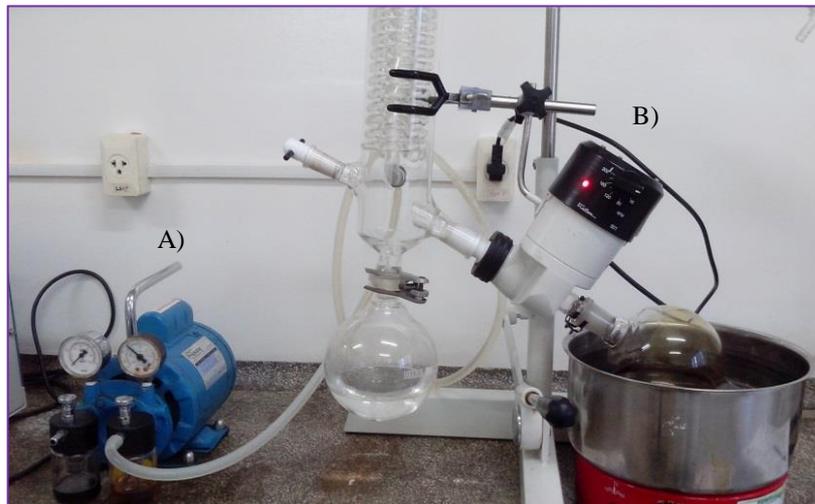


Figura 4: Evaporador rotativo a vácuo utilizado para extração do solvente hidroalcoólico. A) Bomba a vácuo. B) evaporador rotativo Foto: Ana Paula A.B.S.

4.3 Drogas e soluções

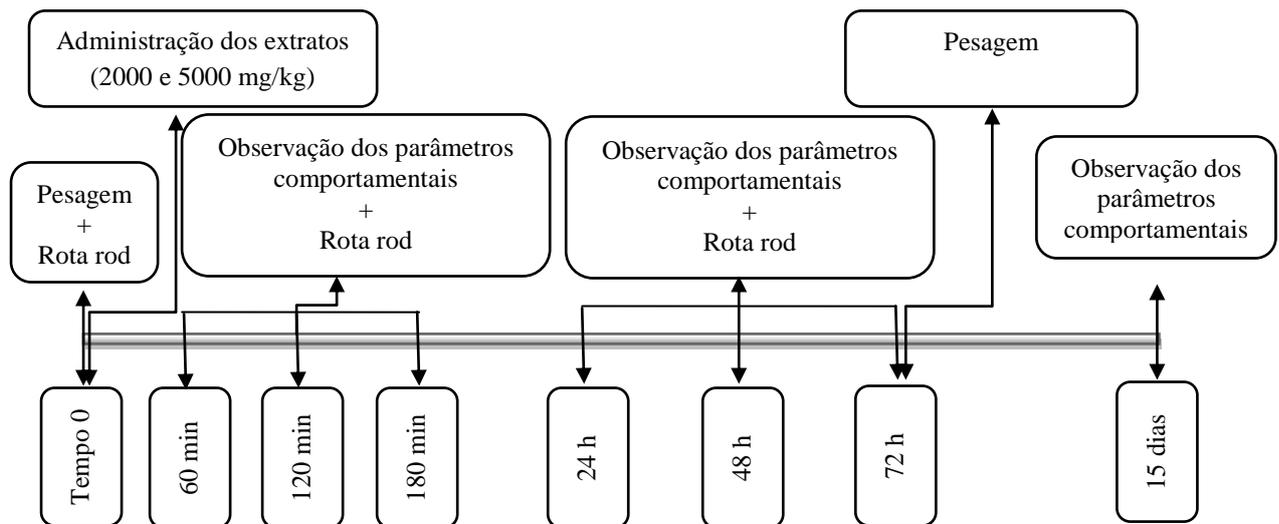
Para a realização dos experimentos foram utilizadas as seguintes drogas: ácido acético, carragenina, formalina, prostaglandina E2, (todos da Sigma-Aldrich®). As soluções de ácido acético, formalina, carragenina, prostaglandina, foram preparadas em solução salina estéril (NaCl 0.9%). As soluções do EHCS foram preparadas em água destilada e administradas por via oral (v.o.) através de sonda orogástrica, obedecendo a relação: 0,1 ml/10 g de massa corporal.

5. Investigação da atividade farmacológica

5.1. Avaliação preliminar do extrato

5.1.1 Teste de toxicidade aguda

A toxicidade dos extratos foi previamente avaliada com o objetivo de viabilizar a realização dos ensaios farmacológicos pelo uso de doses seguras. A determinação da toxicidade foi realizada seguindo as diretrizes da OECD (*Organization for Economic Cooperation and Development*), *Guideline 423* (VALADARES, 2006; OECD, 2001). Neste teste, camundongos foram deixados em jejum 12 h antes da administração dos extratos e foram distribuídos aleatoriamente em 5 grupos ($n = 5$). A presença ou ausência de mortalidade decorrente do tratamento com o extrato, nos grupos tratados na etapa anterior determinou a necessidade de testes subsequentes, com dose igual ou superior à anterior, de acordo com a OEDC (2001). Foi administrada a dose de 2000 mg/kg e na ausência de letalidade ou toxicidade, foi administrada a dose de 5000 mg/kg. O grupo controle recebeu água destilada. Os animais foram observados a cada 60 min durante 3 h. Após as três horas de observação, os animais voltaram a receber ração e água e foram observados a cada 24 h durante 3 dias e no 15º dia. Adicionalmente, os animais eram submetidos ao aparelho Rota Rod. Foi registrado o peso dos animais antes e 72 horas após os tratamentos a fim de verificar possível alteração na massa corporal. O procedimento experimental está esquematicamente representado abaixo:



Foram observados os parâmetros comportamentais descritos por ALMEIDA *et al.*, 1999, sendo adotada a seguinte nomenclatura: (0) sem efeito/sem alterações comportamentais, (-) efeito diminuído, (+) efeito presente, (++) e efeito intenso (Quadros 1 e 2).

Quadro 1 – Parâmetros comportamentais observados nas três primeiras horas do teste de toxicidade aguda.
 FONTE: Adaptado de ALMEIDA *et al.*,1999.

ATIVIDADE FARMACOLÓGICA	Quantificação dos efeitos			
	(0) sem efeito, (-) efeito diminuído, (+) efeito presente, (++) efeito intenso.			
	Tempo 0	1h	2h	3h
1– SNC				
a – Estimulante				
Hiperatividade				
Iritabilidade				
Agressividade				
Tremores				
Convulsões				
Piloereção				
Movimento intenso das vibrissas				
Outras _____				
b – Depressora				
Ptose palpebral				
Sedação				
Ataxia				
Reflexo do endireitamento				
Analgesia				
Resposta ao toque diminuído				
Perda do reflexo corneal				
c – Outros comportamentos				
Ambulação				
Limpeza				
Levantar				
Escalar				
Vocalizar				
Sacudir a cabeça				
Contorções abdominais				
Abdução das patas do trem posterior				
2 - SN AUTÔNOMO				
Diarréia				
Constipação				
Defecação				
Respiração forçada				
Lacrimajamento				
Micção				
Salivação				
Cianose				
Força para agarrar				
3 – MORTE				

Quadro 2 – Parâmetros comportamentais observados nas 72 horas e 15 dias após o teste de toxicidade aguda.
 FONTE: Adaptado de ALMEIDA *et al.*,1999.

ATIVIDADE FARMACOLÓGICA	Quantificação dos efeitos			
	(0) sem efeito, (-) efeito diminuído, (+) efeito presente, (++) efeito intenso.			
	24h	48h	72h	15 dias
1– SNC				
a – Estimulante				
Hiperatividade				
Irritabilidade				
Agressividade				
Tremores				
Convulsões				
Piloereção				
Movimento intenso das vibrissas				
Outras _____				
b – Depressora				
Ptose palpebral				
Sedação				
Ataxia				
Reflexo do endireitamento				
Analgesia				
Resposta ao toque diminuído				
Perda do reflexo corneal				
c – Outros comportamentos				
Ambulação				
Limpeza				
Levantar				
Escalar				
Vocalizar				
Sacudir a cabeça				
Contorções abdominais				
Abdução das patas do trem posterior				
2 - SN AUTÔNOMO				
Diarréia				
Constipação				
Defecação				
Respiração forçada				
Lacrimejamento				
Micção				
Salivação				
Cianose				
Força para agarrar				
3 – MORTE				

5.1.2 Teste do Rota Rod

Considerando que quase todos os testes realizados neste estudo envolvem uma resposta motora (lamber/levantar a pata, saltar, contorções), é importante verificar se há interferência do extrato sobre o desempenho motor dos animais, pois substâncias que promovem relaxamento muscular ou sedação, levando à incoordenação motora, produzindo efeito analgésico falso-positivo. Para descartar a interferência do efeito do extrato em áreas responsáveis pela motricidade os animais foram submetidos ao teste do Rota Rod (figura 5).

Neste estudo, foi utilizado o Rota Rod para camundongos (modelo EFF 412) (Insight equipamentos[®]). O aparelho, medindo 45 cm de altura, 54 cm de largura e 35 cm de comprimento, consiste em uma barra giratória com aceleração progressiva em 5 faixas máximas de r.p.m., quatro compartimentos com sistema de cronometragem de permanência do animal na barra, detecção de queda do animal através de impacto e contagem de quedas do animal.

Os animais tratados e os animais controle foram submetidos ao teste em duas sessões de 60 s de duração, com no máximo duas reconduções à barra, sendo registrado o tempo de permanência em segundos (DUNHAM & MIYA, 1957). No teste de toxicidade aguda os animais foram colocados na barra giratória uma hora antes do tratamento (tempo zero), após 60, 120 e 180 min e a cada 24 horas, por três dias.

Com a finalidade de descartar alteração motora ou sedação decorrente da administração dos extratos, após a determinação das doses a serem utilizadas nos experimentos o teste do Rota Rod foi realizado novamente. Os animais pré-selecionados 24 h antes do teste foram submetidos ao aparelho nos tempos 0 e 60 min após o tratamento com os extratos, nas doses de 60 mg/kg e 120 mg/kg. O procedimento experimental está esquematicamente representado abaixo:

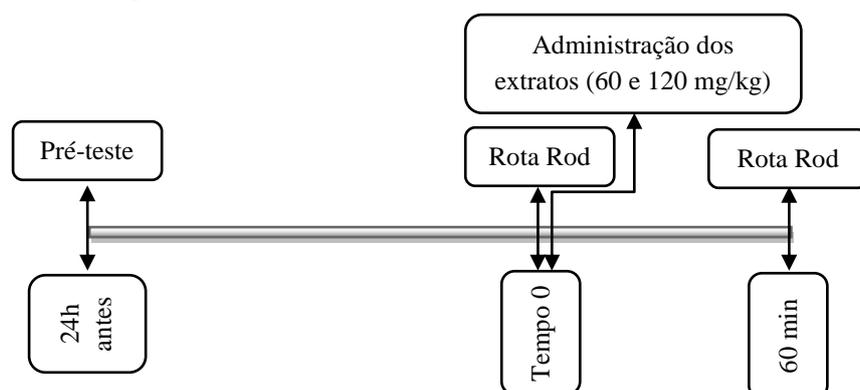




Figura 5: Aparelho Rota Rod para camundongos. Foto: Ana Paula A.B.S

5.2 Avaliação da atividade antinociceptiva.

Antes da realização dos testes, os extratos eram solubilizados em água destilada. Nos grupos experimentais os animais receberam o EHCS_C e o EHCS_F nas doses de 60 e 120 mg/Kg por via oral (v.o.) na proporção de 0,1 ml/10 g de massa corporal, 1 h antes do estímulo nocivo de natureza térmica, química e mecânica. Os animais controle foram tratados com o mesmo volume de solução salina.

5.2.1 Teste da placa quente

Modelo experimental que avalia o limiar de resposta comportamental desencadeada pela exposição à temperatura nociva. A resposta é caracterizada pelo comportamento de levantar ou lambe as patas, considerado indicativo de efeito nociceptivo (WOOLFE e MACDONALD, 1944). Este modelo é utilizado para avaliação de drogas analgésicas de ação no sistema nervoso central (GUPTA *et al.*, 2005).

Foi utilizado o modelo EFF 361 da Insight equipamentos[®] (figura 6) constituído de placa aquecedora com faixa de temperatura que vai da ambiente à 70° C, cronômetro, controle remoto com fio que permite a medida precisa do tempo de resposta do animal ao estímulo térmico e caixa de acrílico com aproximadamente 280 mm acoplada à placa, para isolamento do animal durante a observação.



Figura 6: Placa quente. Foto: Ana Paula A.B.S.

Os animais foram pré-selecionados 24 h antes do teste, sendo considerados aptos aqueles que permaneceram sobre a placa aquecida (50°C) em um intervalo de 8 a 16 segundos. Após as 24 h, os animais foram novamente submetidos ao aparelho antes do tratamento (tempo zero) e nos tempos 60, 120, 180 e 240 após a administração do extrato e registrado o tempo de permanência dos animais sobre a placa. O tempo máximo permitido de permanência dos animais no aparelho foi de 25 s, para não causar danos teciduais aos animais, sendo considerado como índice total de analgesia.

5.2.2 Teste de imersão da cauda

Este modelo de nocicepção térmica permite avaliar o reflexo nociceptivo medular, sendo as drogas analgésicas opióides eficazes na inibição desse estímulo. O terço distal da cauda dos camundongos foi imerso em banho-maria (50°C ± 1°C), sendo observada a latência de retirada da cauda (D'AMOUR; SMITH, 1941). Foi utilizado o Banho-maria KACIL[®] (Figura 7), que consiste em uma cuba em aço inoxidável com dimensões internas de aproximadamente, 300x240x150mm e aquecedor que opera na faixa de temperatura ambiente até 70°C, com resolução de 0,1°C. Possui controle eletrônico de temperatura e indicador digital para a temperatura do banho.

Neste teste, foi realizada uma medida basal prévia, com um tempo de corte de 10 segundos. O tempo de permanência foi registrado, em segundos, antes (tempo zero) e 60, 120 e 180 minutos após o tratamento com os extratos.



Figura7: Banho-maria. Foto: Ana Paula A.B.S.

5.2.3 Contorções abdominais induzidas por ácido acético (*Writhing test*)

O teste das contorções abdominais permite avaliar a atividade antinociceptiva de várias substâncias que atuam tanto em nível central quanto periférico. A resposta nociceptiva foi induzida pela injeção intraperitoneal de ácido acético (0,8%) diluído em solução salina (0,9%). 10 minutos após a injeção do ácido acético, as contorções foram contadas durante 20 min. A atividade analgésica foi determinada tomando-se como base a inibição do número das contorções abdominais dos animais pré-tratados com o extrato, comparados com o número das contorções abdominais dos animais controle (KOSTER *et al.*, 1959).

5.2.4 Teste de nocicepção induzida por formalina

O teste da formalina consiste na injeção intraplantar de formalina (20 µl de uma solução 2,5% v/v) na pata direita traseira do camundongo e registrado o tempo, transcorrido em segundos, que o animal passa lambendo a pata durante as fases inicial (0-5 min) e tardia, chamada fase inflamatória (15-30 min). A fase inicial se dá devido a estimulação química direta dos nociceptores. A fase tardia é desencadeada por uma combinação de estímulos que incluem inflamação nos tecidos periféricos e mecanismos de sensibilização espinhal e central (HUNSKAAR & HOLE, 1987). Na realização do teste, devido a grande sensibilidade das respostas na segunda fase (tardia), deve-se assegurar a ausência de fatores que possam interferir na resposta, possivelmente confundindo os resultados do teste, como exemplo, a temperatura ambiente ou fatores que influenciam no fluxo sanguíneo do tecido periférico e

consequentemente, na inflamação periférica (TJØLSEN et. al., 1992). Logo após a aplicação da formalina, os animais foram colocados, individualmente em caixas triangulares em ângulo de 45°, com os lados e altura medindo 25 cm cada, sendo dois lados formados por espelho e um de vidro transparente, possibilitando ao observador um maior campo de visão (Figura 8).



Figura 8: Caixa de observação para teste da formalina. Foto: Ana Paula A.B.S.

5.2.5 Teste de hipernociceção mecânica (von Frey)

Este modelo é utilizado para quantificar a hipernociceção produzida por mediadores químicos específicos (CUNHA *et al.*, 2004), avaliada como a resposta de retirada da pata frente ao estímulo mecânico. Para tanto, foi utilizado analgesímetro (Insight equipamentos®) composto por braço transdutor de força com capacidade de 0,1 a 1000 gramas com ponteira de polipropileno descartável e um amplificador que registra e informa através de mostrador digital LCD o valor, em gramas (g) da força aplicada (Figura 9). Os camundongos foram colocados, individualmente, em caixas de acrílico com assoalho de rede de malha não maleável, sendo aplicada no centro da planta da pata posterior do animal uma força com aumento gradual a fim de eliciar um reflexo de flexão seguido de um movimento de retirada, sendo considerada a remoção total da pata da tela de apoio como resposta de retirada. A resposta de retirada da pata foi avaliada dispendo-se os camundongos sobre o assoalho imediatamente antes (tempo zero), 60 e 180 minutos após a injeção do estímulo carragenina 50 µl (300 µg/pata).



Figura 9: Analgesímetro digital. Foto: Foto: Ana Paula A.B.S.

5.3 Avaliação do efeito anti-inflamatório no modelo de edema de pata

5.3.1 Edema de pata induzido por formalina

Os animais que receberam formalina (20 μ l de solução de 2,5% v/v) na pata posterior direita no teste de nocicepção foram eutanasiados após o teste e as patas foram cortadas na junção tíbio-tarsal e pesadas em balança semi-analítica para quantificação do edema. O edema foi calculado como a diferença do peso, expresso em gramas (g), da pata tratada com a formalina e da pata controle (não tratada) (BEIRITH *et al.*, 1998).

5.3.2 Edema de pata induzido por carragenina

O Método de WINTER *et al.* (1962), foi utilizado para a determinação de edema de pata, induzido pela carragenina. O edema foi avaliado por meio de um pletismômetro (PanLab® modelo LE 7500) (Figura 10). Este aparelho possui um sistema com duas cubas comunicantes, onde uma contém transdutor capaz de detectar com precisão, quantidades mínimas de líquido deslocado em decorrência da introdução da pata de animais experimentais na segunda cuba. O aparelho também dispõe de um pedal para memorizar valores os quais podem ser visualizados em um display.

Neste modelo foi utilizado o EHCS_C. O volume das patas foi registrado antes (tempo zero) e a cada 60 min após a injeção do agente edematogênico carragenina 50µl (300µg/pata) até a quinta hora e foi expresso como a diferença de volume entre as patas nos diversos tempos avaliados e o tempo zero. A integral das áreas sob a curva (ASC) dose resposta da carragenina foi calculada utilizando-se o método do trapézio e expressas em unidades arbitrárias (LANDUCCI *et al.*, 1995).



Figura 10: Pletismômetro digital. Foto: Ana Paula A.B.S.

5.3.3 Edema de pata induzido por prostaglandina E₂

Com o objetivo de verificar a participação de prostaglandina no efeito anti-inflamatório do EHCS, os animais receberam o EHCS_C v.o., na melhor dose inibitória no teste da carragenina (120 mg/kg), uma hora antes da indução do edema de pata por prostaglandina E₂ (30 nmol/pata; 50µl). O Volume foi mensurado em aparelho pleitsmômetro, antes (tempo zero) e a cada hora, até a terceira hora após a injeção do estímulo lesivo (PONTE, 2009).

6. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os valores foram expressos como média \pm erro padrão da média (e.p.m.). As diferenças estatísticas com respectivos graus de significância foram dados pela análise de variância (ANOVA) “one-way” ou “two-way”, seguida do teste *Tukey*. As análises estatísticas aplicadas aos dados obtidos neste estudo foram realizadas pelo programa GraphPad Prism versão 5.0.

7. RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 Rendimento dos extratos

Conforme descrito anteriormente, o estudo foi realizado com o extrato hidroalcoólico da casca (EHCS_C) e das folhas (EHCS_F) da *Calycophyllum spruceanum*. O rendimento de extração foi determinado após o processo de liofilização. O EHCS_F apresentou rendimento maior que o EHCS_C, conforme demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1. Rendimento dos extratos hidroalcoólicos obtidos da casca e das folhas de *Calycophyllum spruceanum*

Material	Massa material fresco (g)	Massa dos extratos liofilizados (g)	Rendimento m/m %
EHCS _C	6590	268,65	4,07
EHCS _F	1105	83,35	7,54

7.2 Ausência de toxicidade dos extratos da casca e folha de *Calycophyllum spruceanum* em doses inferiores a 5000 mg/kg.

7.2.1 Toxicidade aguda

Pode-se observar que tanto o EHCS_C quanto o EHCS_F em ambas as doses administradas v.o., não foram letais em nenhum grupo tratado.

O grupo tratado com o EHCS_C na dose de 2000 mg/kg não apresentou alterações comportamentais decorrentes do tratamento (Quadro 3). Nos dias subsequentes, até o décimo quinto dia, o grupo permaneceu sem alterações comportamentais.

Em virtude de não ter ocorrido morte em decorrência da administração do EHCS_C na dose de 2000 mg/kg, foi avaliada a dose de 5000 mg/kg. Nesta dose o grupo tratado com o EHCS_C não apresentou alterações comportamentais até a terceira hora, porém após 48 horas um animal do grupo apresentou diminuição da força para agarrar e esse comportamento permaneceu até 72 h. Ao 15º dia, todo o grupo demonstrou comportamento dentro da normalidade (Quadro 3).

Quadro 3. Alterações comportamentais observadas em camundongos, após administração do EHCS_C em doses únicas. [-] Efeito diminuído, (+) Efeito presente, (++) Efeito intenso]. *comportamento apresentado por somente um animal do grupo.

DOSE	TEMPO	MUDANÇAS OBSERVADAS
EHCS_C – 2000 mg/Kg	Tempo zero	Sem alterações comportamentais.
	60 min	Sem alterações comportamentais.
	120 min	Sem alterações comportamentais.
	180 min	Sem alterações comportamentais.
	24 h	Sem alterações comportamentais.
	48 h	Sem alterações comportamentais.
	72 h	Sem alterações comportamentais.
	15 dias	Sem alterações comportamentais.
EHCS_C – 5000 mg/Kg	Tempo zero	Sem alterações comportamentais.
	60 min	Sem alterações comportamentais.
	120 min	Sem alterações comportamentais.
	180 min	Sem alterações comportamentais.
	24 h	Sem alterações comportamentais.
	48 h	(-) Força para agarrar*
	72 h	(-) Força para agarrar*
	15 dias	Sem alterações comportamentais.

O Quadro 4 mostra o resultado referente à avaliação do EHCS_F. O grupo tratado com a dose 2000 mg/kg não apresentou alterações comportamentais decorrentes do tratamento. Os parâmetros comportamentais permaneceram dentro da normalidade durante as primeiras três horas de observação. O mesmo foi observado durante todo o período de avaliação (24, 48 e 72 horas) e após 15 dias, os animais permaneceram com comportamento normal. Nenhum dos animais tratados, em nenhum na dose relatadas foi a óbito durante o período de observação.

Também foi avaliada a dose de 5000 mg/kg do EHCS_F. Durante a segunda e a terceira hora os animais apresentaram ataxia, diminuição da resposta ao toque e na força para agarrar. No dia seguinte apenas um animal persistiu com diminuição na força para agarrar. Até o décimo quinto dia nenhum dos animais foi a óbito. Adicionalmente, foi verificado o peso dos animais tratados com todas as doses avaliadas, antes do tratamento e após 72h. Os dados não foram diferentes em relação ao tratamento ($F_{6,28} = 0,9746$; $p = 0,4605$) (Tabela 2).

Quadro 4. Alterações comportamentais observadas em camundongos após administração do EHCS_F em doses únicas. [(0) Sem efeito, (-) Efeito diminuído, (+) Efeito presente, (++) Efeito intenso]. *comportamento apresentado por somente um animal do grupo.

DOSE	TEMPO	MUDANÇAS OBSERVADAS
EHCS_F – 2000 mg/Kg	Tempo zero	Sem alterações comportamentais.
	60 min	Sem alterações comportamentais.
	120 min	Sem alterações comportamentais.
	180 min	Sem alterações comportamentais.
	24 h	Sem alterações comportamentais.
	48 h	Sem alterações comportamentais.
	72 h	Sem alterações comportamentais.
	15 dias	Sem alterações comportamentais.
EHCS_F – 5000 mg/Kg	Tempo zero	Sem alterações comportamentais.
	60 min	Sem alterações comportamentais.
	120 min	Ataxia; Resposta ao toque diminuído; (-) Força para agarrar*.
	180 min	Ataxia; Resposta ao toque diminuído; (-) Força para agarrar*.
	24 h	(-) Força para agarrar*.
	48 h	(-) Força para agarrar*.
	72 h	(-) Força para agarrar*.
	15 dias	(-) Força para agarrar*.

Tabela 2. Evolução ponderal dos camundongos tratados com EHCS_C ou EHCS_F nas doses de 2000 mg/kg e 5000mg/kg na toxicidade aguda.

Massa corpórea (g)			Evolução ponderal (%)
	Inicial	Final	
Controle	37,58±0,61	37,37±1,9	-0.56
EHCS_C (2000 mg/kg)	36,22±1,2	35,59±1,6	-1.74
EHCS_F (2000 mg/kg)	35,54±0,36	33,53±1,03	-5.66
EHCS_C (5000 mg/kg)	37,50±1,6	36,94±1,4	-1,49
EHCS_F (5000 mg/kg)	40,32±2,8	40,31±2,8	-0,025

Os valores estão expressos como Média da média ±E.P.M.

7.2.2 EHCS_C e EHCS_F não causam interferência no desempenho motor de camundongos no teste do Rota Rod.

Os resultados deste teste mostram que o EHCS_C e o EHCS_F na dose de 2000 mg/kg não promoveu alteração no desempenho motor dos animais comparados ao grupo controle. Não houve diferença significativa quanto ao tratamento ($F_{2,12}=0,4301$; $p=0,6601$), quanto ao tempo ($F_{3,36}=4,690$; $p=0,073$), nem quanto a interação tratamento *versus* tempo ($F_{6,36}=0,5570$; $p=0,7613$) tanto nas três primeiras horas, como durante 72 horas posteriores à administração (Tratamento: $F_{2,12}=0,8364$; $p=0,4570$; Tempo: $F_{4,24}=0,8371$; $p=0,4452$; Interação tratamento *versus* tempo: $F_{4,24}=1,007$; $p=0,4234$) (gráfico 1).

Os dados do gráfico 2 foram significativamente diferentes quanto ao tempo ($F_{3,36}=3,616$; $P=0,0222$) mas não mostraram significativa diferença quanto ao tratamento ($F_{2,12}=2,635$; $p=0,1126$) nem quanto a interação tratamento x tempo ($F_{6,36}=0,6473$; $p=0,6918$) nas três primeiras horas e nem durante as 72 horas de observação (Tempo: $F_{4,24}=1,284$; $p=0,2953$; Tratamento: $F_{2,12}=0,678$; $p=0,5258$; Interação tratamento *versus* tempo: $F_{4,24}=1,039$; $p=0,4077$). Embora os animais tratados com o EHCS_F na dose de 5000 mg/kg tenham demonstrado alterações comportamentais dentre as três primeiras horas da avaliação do extrato, o efeito do extrato não comprometeu o desempenho motor de forma significativa quando comparados ao grupo controle.

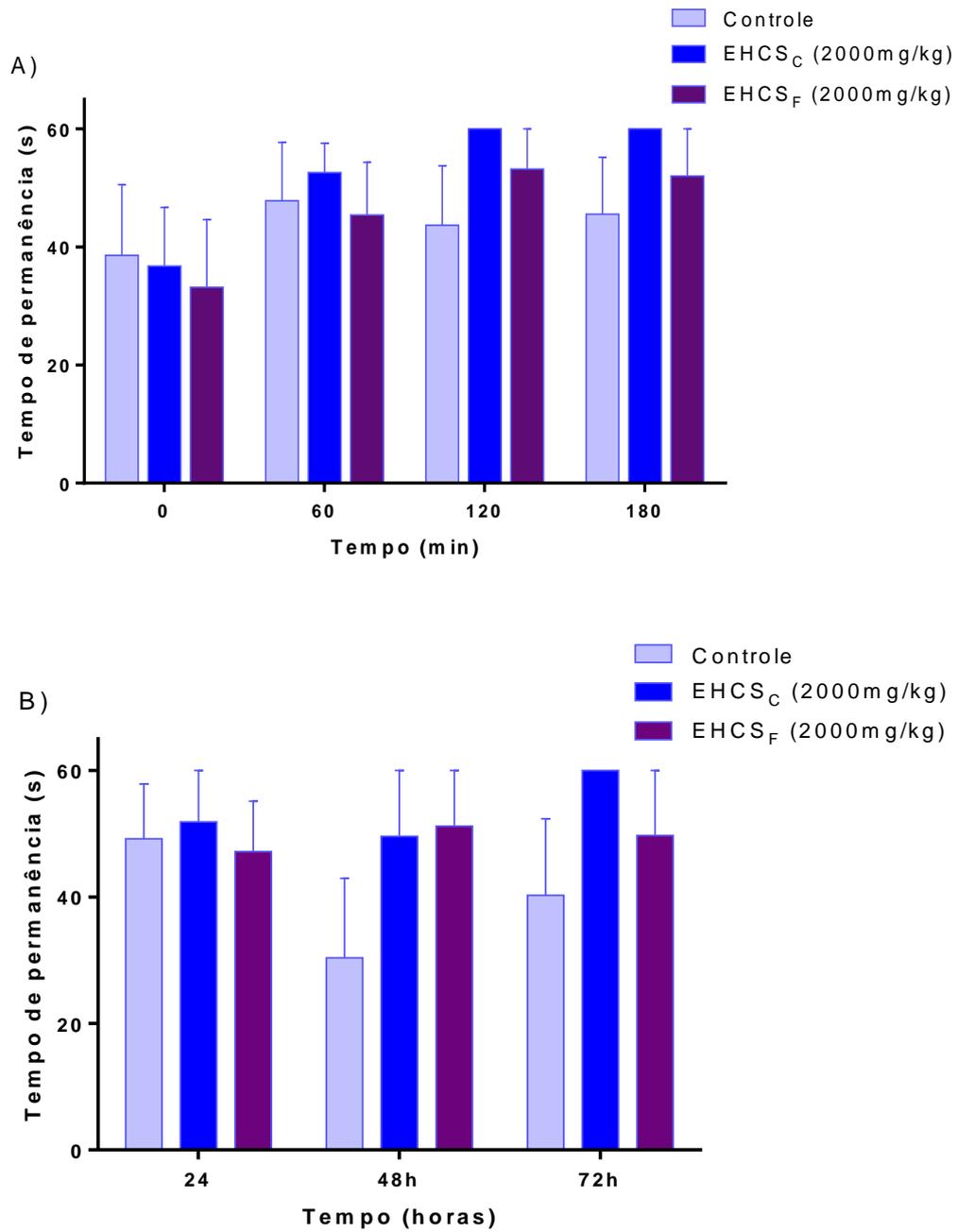


Gráfico1: Efeito dos extratos de *C. spruceanum* (2000 mg/kg) sobre a permanência dos animais no aparelho Rota Rod durante o período de avaliação dos parâmetros comportamentais no teste de toxicidade: A) durante as três primeiras horas após o tratamento; B) durante as 72 horas de observação. Média \pm E.P.M.

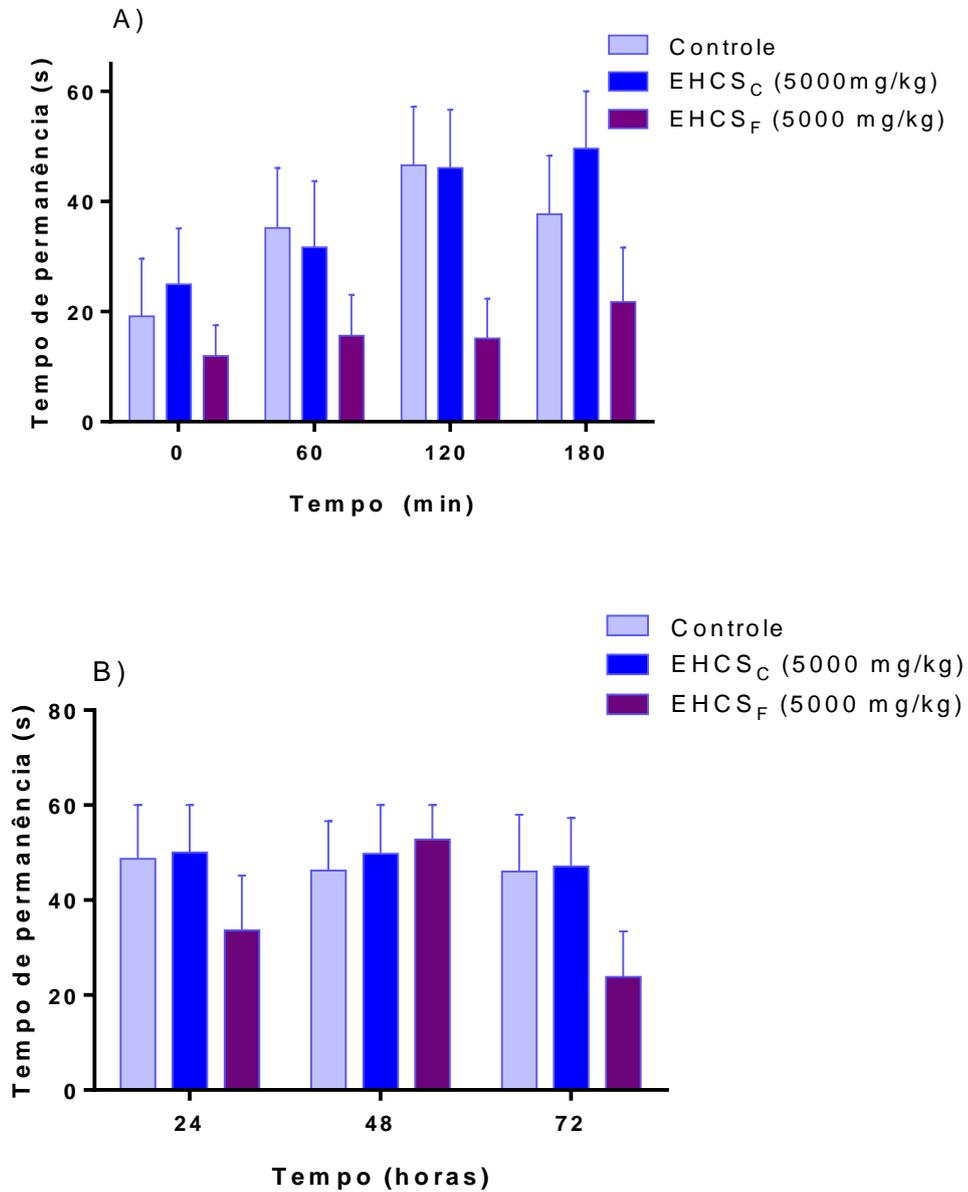


Gráfico 2: Efeito dos extratos de *C. spruceanum* (5000 mg/kg) sobre a permanência dos animais no aparelho Rota Rod durante o período de avaliação dos parâmetros comportamentais no teste de toxicidade: A) durante as três primeiras horas após o tratamento; B) durante as 72 horas de observação. Médias \pm E.P.M.

Para eliminar qualquer possíveis efeitos sedativos do EHCS, o teste do Rota Rod também foi realizado nas doses utilizadas nos testes que avaliam os efeitos antinociceptivo e antiinflamatório (60 e 120 mg/kg). O gráfico 3 nos mostra que, na dose de 60 mg/kg não houve diferença significativa quanto ao tempo $F_{1,10} = 1,148$; $p = 0,3091$, quanto ao tratamento $F_{2,10} = 1,210$; $p = 0,3382$ e quanto a interação tempo *versus* tratamento $F_{2,10} = 1,778$; $p = 0,2185$. O mesmo foi observado na dose de 120 mg/kg (tempo $F_{1,15} = 2,147$; $p = 0,1635$; tratamento $F_{2,15} = 0,6939$; $p = 0,5150$ e interação tempo *versus* tratamento $F_{2,15} = 0,6706$; $p = 0,5261$.) A colocação dos animais ao aparelho foi feita antes e uma hora após a administração dos extratos.

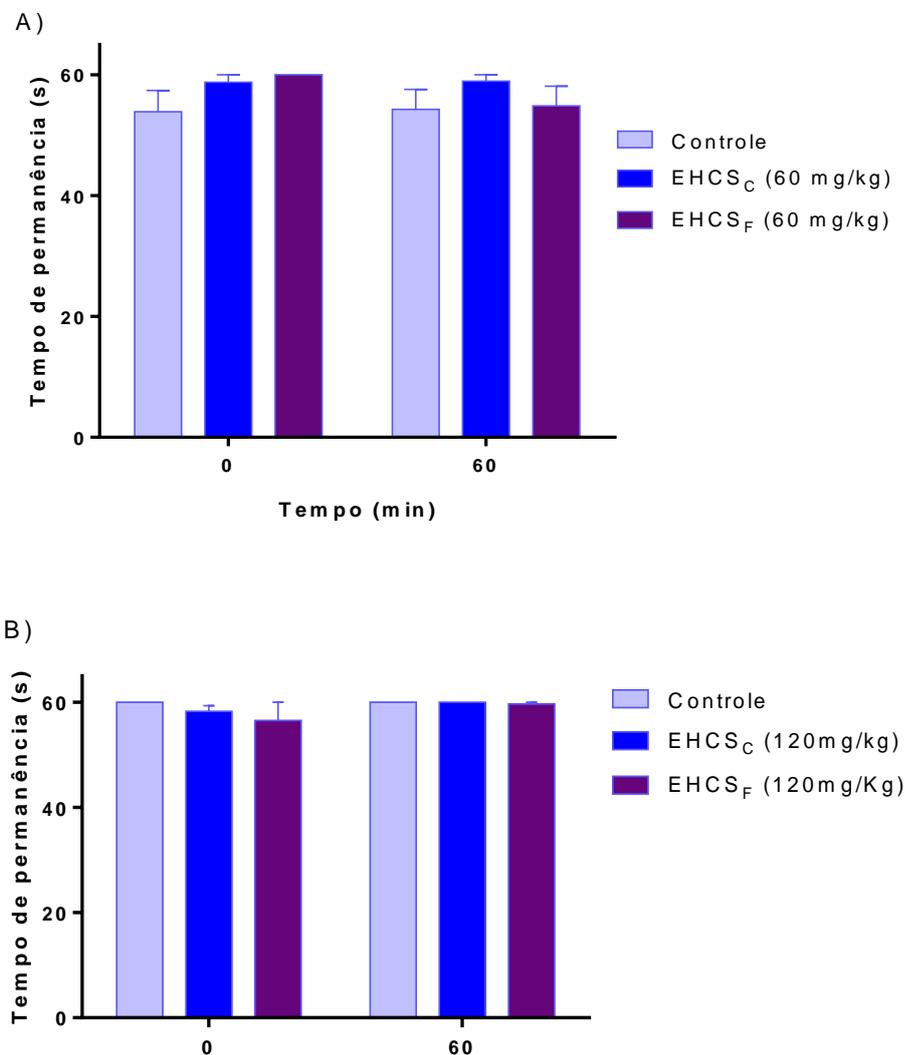


Gráfico 3: Efeito dos extratos de *C. spruceanum* sobre a permanência dos animais no aparelho Rota Rod. **A)** EHCS_C e EHCS_F (60 mg/kg) antes e 60 min após o tratamento; **B)** EHCS_C e EHCS_F (120 mg/kg) antes e 60 minutos após o tratamento. Média \pm E.P.M.

7.3 Atividade antinociceptiva do EHCS

7.3.1 Efeito do EHCS_C e EHCS_F sobre a nocicepção térmica no teste da placa quente.

O EHCS_C na dose de 60 mg/kg promoveu aumento do tempo de permanência dos camundongos na placa aquecida a 50 °C de $10,37 \pm 0,99$ s (tempo zero) para $15,60 \pm 1,29$ s 180 min após o tratamento. Nesse tempo o extrato também aumentou o tempo de permanência dos animais na placa (32%) em relação ao grupo controle ($10,64 \pm 1,41$ s) (gráfico 4). Os dados também nos mostram que houve diferença significativa quanto ao tempo $F_{4,68} = 3,376$; $p = 0,0140$ Entretanto o tratamento e a interação tempo *versus* tratamento não demonstraram diferença significativa ($F_{2,17} = 2,022$; $p = 0,1630$; $F_{8,68} = 0,9567$; $p = 0,4770$, respectivamente)

O grupo tratado com EHCS_F, na dose de 60 mg/kg, demonstrou maior tolerância ao estímulo térmico da placa quente nos tempos 120 min e 240 min. Aos 120 min, o aumento foi de $10,7 \pm 1,37$ s (controle), para $15,30 \pm 1,86$ s (30%) e aos 240 min de $9,32 \pm 1,24$ s (controle) para $15,30 \pm 1,45$ s (39%). Nesta dose alterou o tempo de permanência dos animais na placa aquecida de $9,37 \pm 1,25$ (tempo zero) para $15,30 \pm 1,86$ aos 120 min e para $15,29 \pm 1,45$ aos 240 min (Gráfico 5). Os dados foram diferentes quanto ao tratamento ($F_{2,17} = 3,864$; $p = 0,0414$), tempo ($F_{4,68} = 4,097$; $p = 0,0049$) mas não quanto a interação tratamento x tempo ($F_{8,68} = 1,451$; $p = 0,1918$).

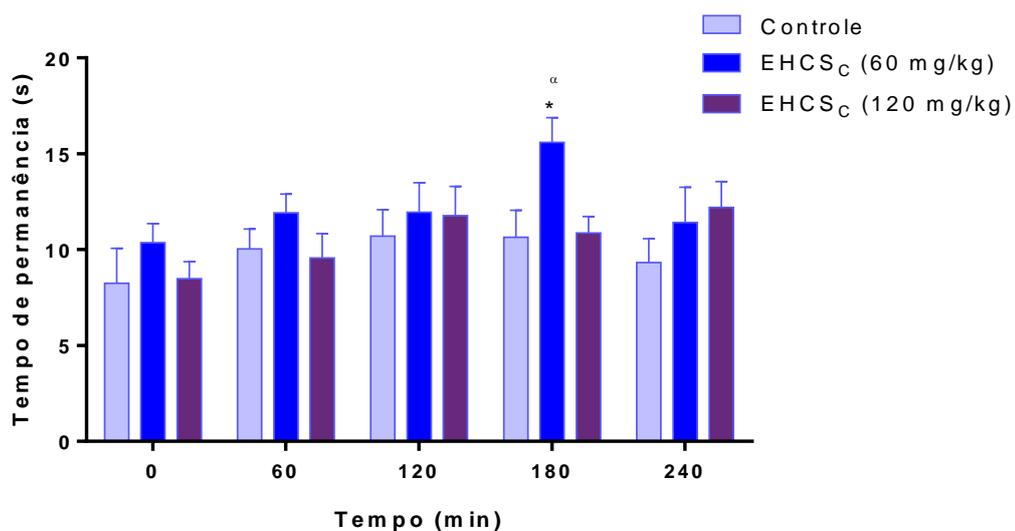


Gráfico 4: Efeito da administração v.o do EHCS_C sobre a nocicepção causada pela placa aquecida a 50 °C. Média ± E.P.M. * $p < 0,05$ em relação ao controle (salina); $\alpha p < 0,05$ em relação ao tempo zero.

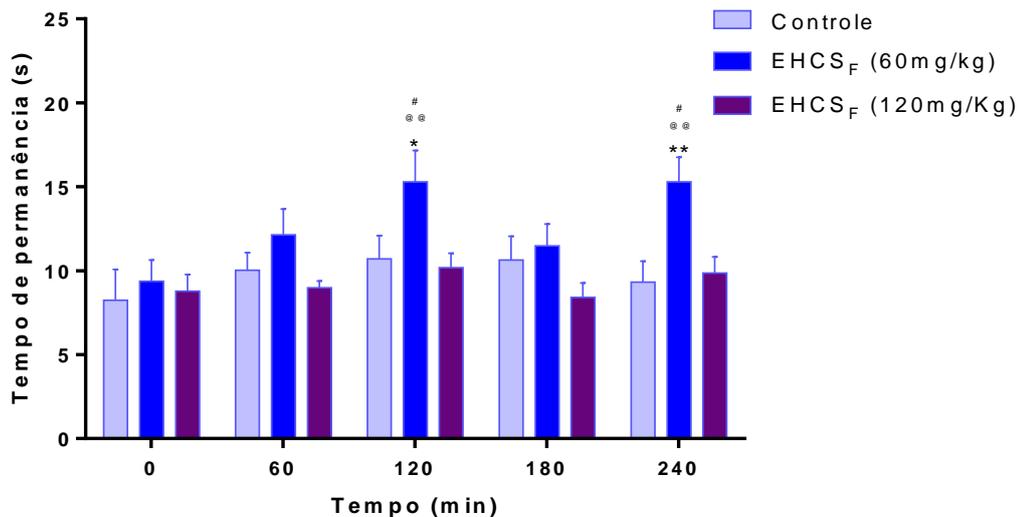


Gráfico 5: O EHCS_F inibe a nocicepção em patas de camundongos causada pela placa aquecida a 50 °C aos 120 e 240 min da administração v.o. Média ± E.P.M. (n= 6). *p<0,05 em relação ao controle (salina); ^αp<0,05 em relação ao tempo zero; # p<0,05 entre tratamentos.

7.3.2 Efeito do EHCS_C e EHCS_F sobre a nocicepção térmica no teste de imersão da cauda.

O Tratamento oral com o EHCS_C nas doses de nas doses de 60 mg/kg e 120 mg/kg, não alterou o tempo de retirada da cauda dos animais da água aquecida (50 °C) em nenhum dos tempos avaliados. Os dados são diferentes quanto ao tempo ($F_{3, 51} = 2,772$; $p = 0,0508$) mas não são significativamente diferentes quanto ao tratamento ($F_{2, 17} = 1,308$; $p = 0,2963$) e quanto a interação tratamento *versus* tempo ($F_{6, 51} = 1,814$; $p = 0,1149$) (Gráfico 6). Entretanto, o EHCS_F na dose de 60 mg/kg aumentou o tempo de latência de retirada da cauda aos 60 min de $6,83 \pm 1,12$ s (controle) para $12,70 \pm 1,86$ s. No tempo de 180 min, somente na dose de 120mg/kg o EHCS_F aumentou (49%) o tempo de retirada da cauda dos animais ($12,79 \pm 2,5$ s) em relação ao controle $6,50 \pm 1,31$ s. Os dados são diferentes quanto a interação tratamento x tempo ($F_{6, 51} = 3,114$; $p = 0,0112$), mas não significativamente diferentes quanto ao tratamento ($F_{2, 17} = 0,8966$; $p = 0,4264$) e quanto ao tempo ($F_{3, 51} = 1,277$; $p = 0,2920$) (Gráfico 7).

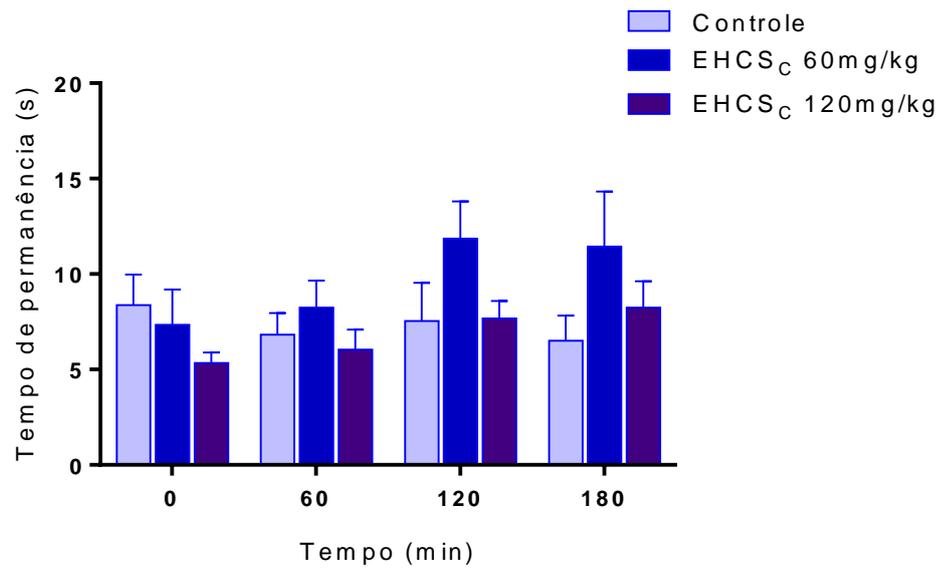


Gráfico 6: O EHCS_C não inibe a nocicepção térmica no teste de retirada da cauda em camundongos. As caudas foram imersas em banho-maria (50 °C) antes e após (60, 120 e 180 min) a administração. Média ± E.P.M.

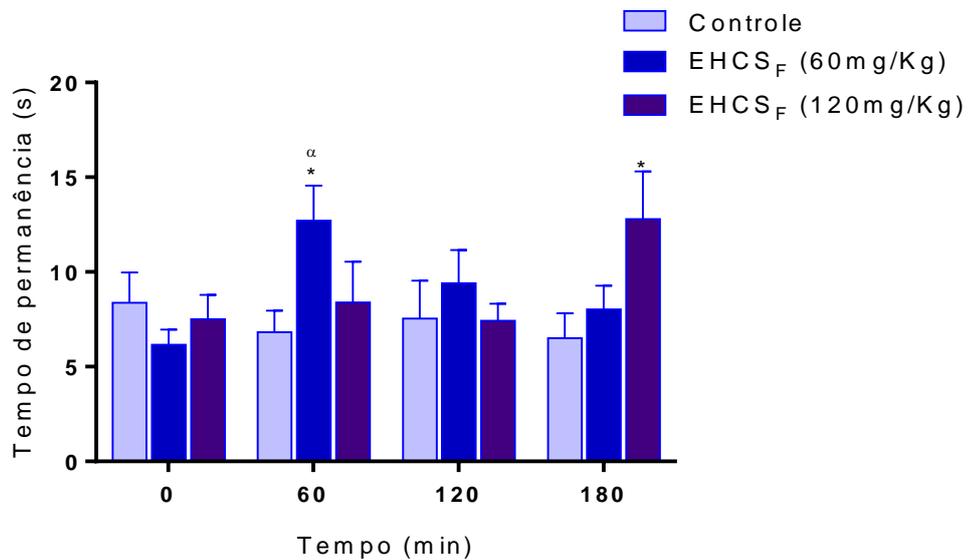


Gráfico 7: Efeito antinociceptivo do EHCS_F sobre a nocicepção causada pela imersão da cauda em banho-maria (50 °C) antes e após a administração. Média ± E.P.M.

7.3.3 Efeito inibitório do EHCS_C e EHCS_F sobre as contorções abdominais induzidas por ácido acético.

O EHCS_C inibiu em 72% as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético apenas na dose de 120 mg/kg (Gráfico 8). Os dados foram significativamente diferentes quanto ao tratamento ($F_{2, 16} = 9,074$; $p = 0,0023$). O EHCS_F inibiu as contorções nas doses de 60 mg/kg (63%) e 120mg/kg (47%) (Gráfico 9). Os dados foram significativamente diferentes quanto ao tratamento ($F_{2, 16} = 9,523$; $p = 0,0019$).

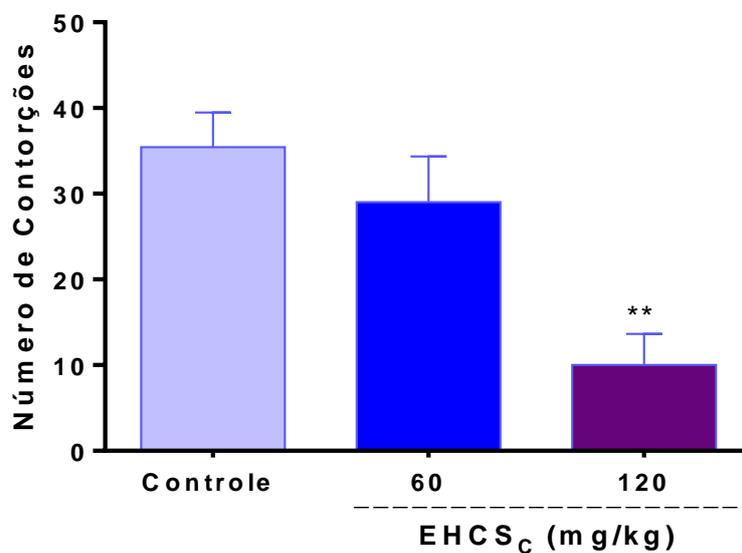


Gráfico 8: O EHCS_C apresenta efeito antinociceptivo no teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético. Média. ± E.P.M.* $p < 0,05$, em relação ao grupo controle.

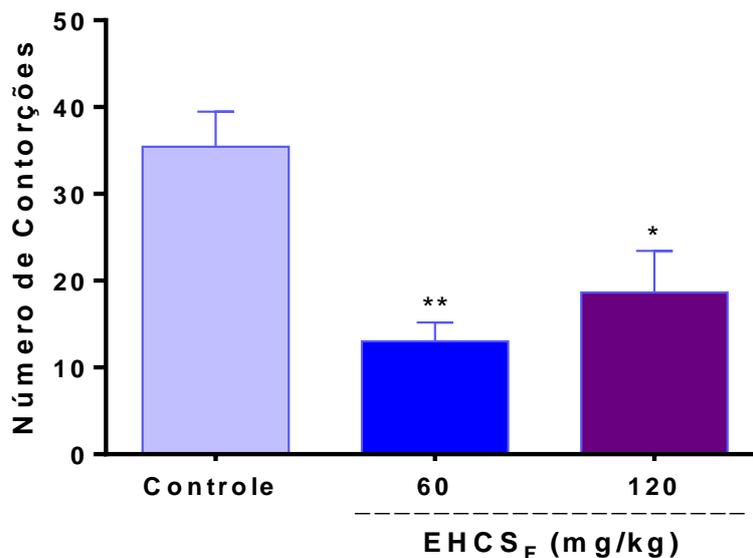


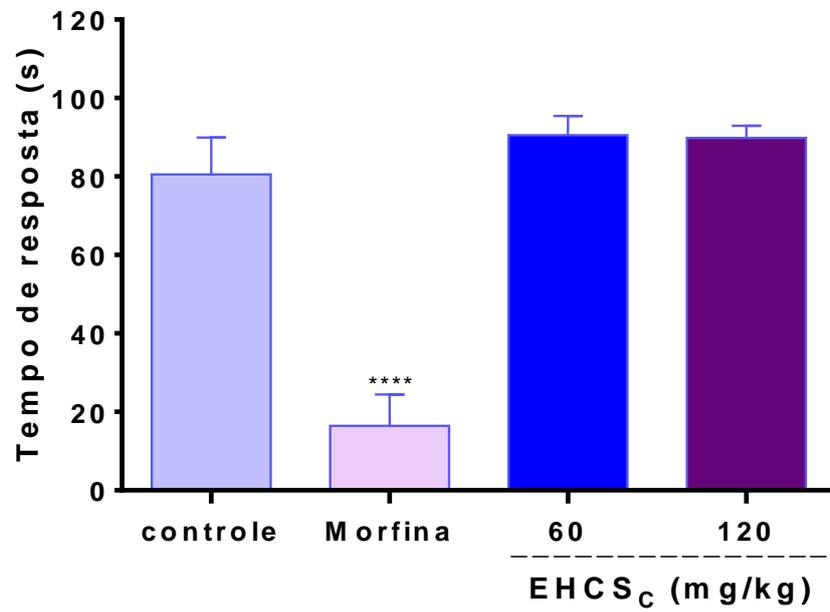
Gráfico 9: Efeito antinociceptivo do EHCS_F sobre as contorções abdominais induzidas por ácido acético. Média. ± E.P.M.* $p < 0,05$ em relação ao grupo controle.. ** $p < 0,01$ em relação ao grupo controle.

7.3.4 Efeito do EHCS_C e do EHCS_F sobre a nocicepção induzida por formalina

O EHCS_C nas doses de 60 e 120mg/kg não alterou o tempo de lambida da pata dos animais na primeira fase do teste da formalina (Gráfico 10A). Entretanto, na segunda fase, o EHCS_C reduziu o tempo de lambida de $241,8 \pm 23,83s$ (controle) para $160,8 \pm 8,08$ e $123,2 \pm 22,02s$ respectivamente (Gráfico 10B). Os dados da primeira fase são significativamente diferentes quanto ao tratamento ($F_{3, 20} = 39,25$; $p < 0,0001$), porém isso se deve ao efeito inibitório da morfina, pois sem tais dados não há diferença quanto ao tratamento ($F_{2,14}=0,8222$; $p=0,4596$).

Já os dados da segunda fase são realmente diferentes, pois mesmo desconsiderando o efeito da morfina, ainda sugerem ação inibitória do EHCS_C ($F_{2,14}=9,900$; $p=0,0021$). O EHCS_F nas mesmas doses não alterou o comportamento de lambida das patas em nenhuma das fases do teste (quanto ao tratamento, $F_{2, 14} = 1,914$; $p = 0,1841$) (Gráfico 11 A e B). A morfina, usada como controle antinociceptivo apresentou efeito inibitório, reduzindo o tempo de resposta em ambas as fases do teste da formalina.

A) Primeira fase



B) Segunda fase

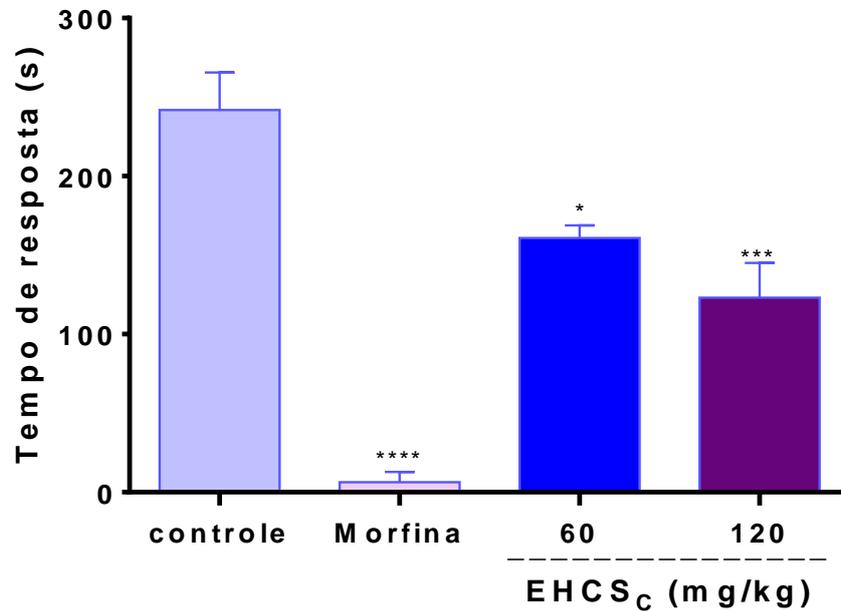
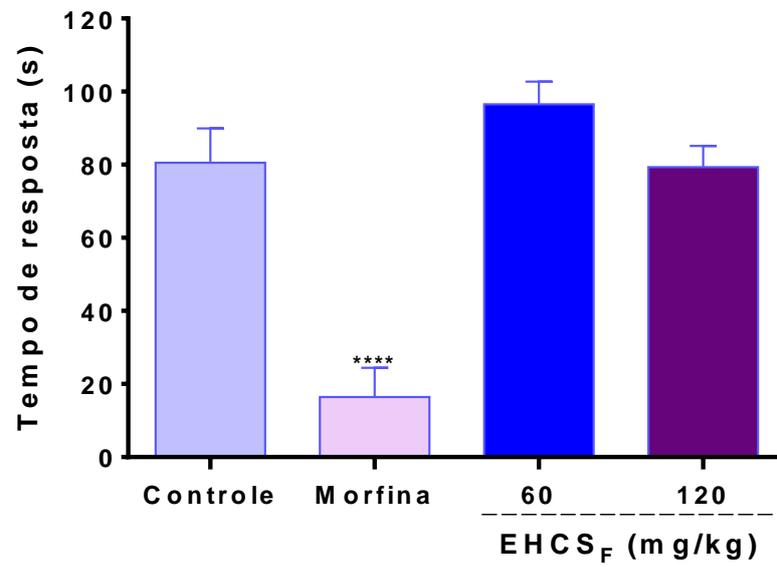


Gráfico 10: Efeito antinociceptivo do EHCS_C no teste da formalina. Média ± E.P.M. * p<0,05, em relação ao grupo controle. A) primeira fase do teste. B) segunda fase do teste.

A) Primeira fase



B) Segunda fase

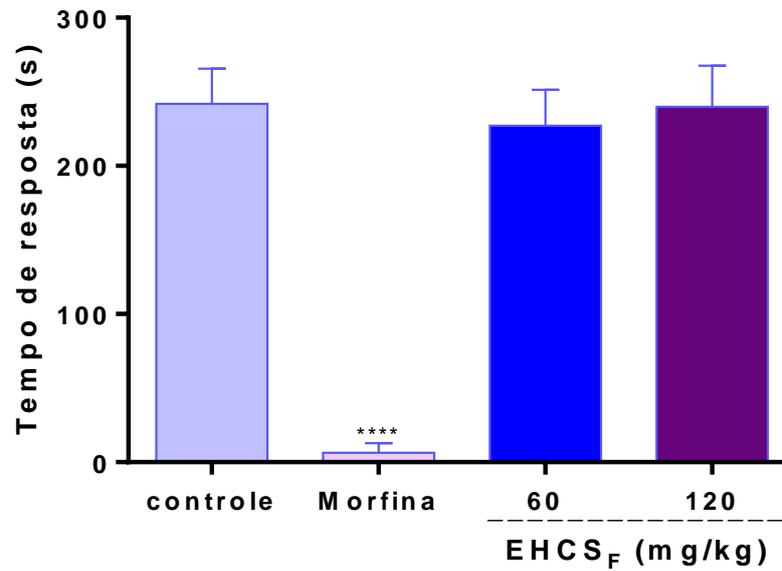


Gráfico 11: Efeito antinociceptivo do EHCS_F no teste da formalina. Média ± E.P.M. * p<0,05, em relação ao grupo controle. A) primeira fase do teste. B) segunda fase do teste.

7.3.5 EHCS_C inibe a hipernociceção induzida por carragenina no teste de Von Frey

Neste modelo foi avaliado o aumento da sensibilidade do nociceptor ao estímulo hipernociceptivo. A carragenina reduziu o limiar nociceptivo em resposta a estimulação mecânica aos 60 min ($4,0 \pm 0,65\text{g}$) e 180 min ($2,7 \pm 0,41\text{g}$) em relação a salina ($7,87 \pm 0,39\text{g}$ e $9,62 \pm 0,62\text{g}$ respectivamente). O EHCS_C na dose de 120 mg/kg, inibiu o efeito anti-hipernociceptivo induzido pela Carragenina em 58% ($6,50 \pm 0,92\text{ g}$ *versus* $2,7 \pm 0,41\text{g}$) aos 180 min. Os dados da figura foram significativamente diferentes quanto ao tratamento ($F_{3,84}=19,31$; $p<0,0001$), quanto ao tempo ($F_{2,84}=51,93$; $P<0,0001$) e tiveram significativa interação tratamento versus tempo ($F_{6,84}=10,77$; $p<0,0001$) (Gráfico 12).

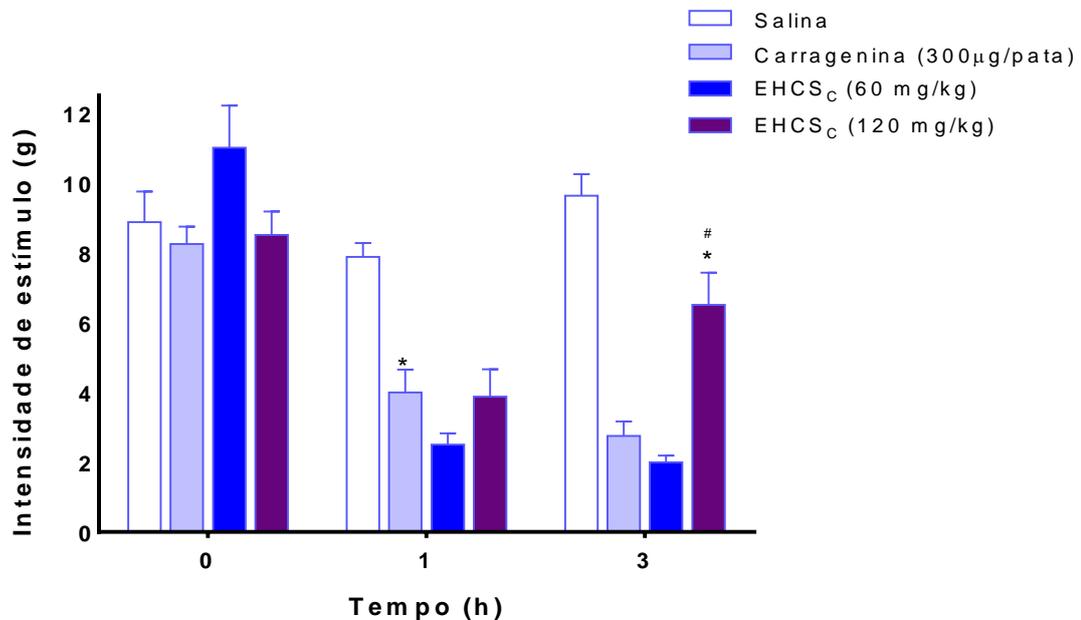


Gráfico 12: Efeito inibitório do EHCS_C sobre a hipernociceção induzida pela carragenina no teste de Von Frey. O grupo controle recebeu salina na pata direita traseira. Média \pm E.P.M. * $p<0,05$ em relação a salina # $p<0,05$ em relação a carragenina.

7.4 Avaliação da atividade anti-inflamatória do EHCS.

7.4.1 EHCS_C e do EHCS_F sobre o edema de pata induzido pela formalina

O edema de pata induzido por formalina (de $0,090 \pm 0,006$ g) foi inibido em 36% pelo EHCS_C na dose de 60 mg/kg ($0,058 \pm 0,005$ g) e em 37% na dose de 120 mg/kg (Gráfico 13). Os dados forma diferentes quanto ao tratamento ($F_{2, 21} = 12,73$ $P = 0,0002$). O edema de pata induzido por formalina também foi inibido pelo EHCS_F em 27 % na dose de 60 mg/Kg e em 30% na dose de 120 mg/Kg, demonstrando diferença em relação o tratamento ($F_{2, 17} = 8,778$; $p = 0,0024$ (Gráfico 14).

7.4.2 Efeito inibitório do EHCS_C sobre o edema de pata induzida por carragenina.

O EHCS_C demonstrou efeito mais expressivo na segunda fase do teste de nocicepção e no modelo de edema de pata induzido por formalina, como também no teste de contorções abdominais. Em virtude disso, foi adotado para o modelo de edema de pata induzido por carragenina.

O edema de pata produzido pela carragenina não foi alterado pelo EHCS_C na dose de 60 mg/kg. Entretanto na dose de 120 mg/kg aos 60 min o EHCS_C, inibiu o edema em 38% de $112,5 \pm 9,2$ μ L, (controle) para $70,0 \pm 5,3$ μ L. No tempo 180 min a inibição do edema induzido pela carragenina foi de 150 ± 10 μ L no grupo controle para $52,5 \pm 6,47$ μ L (65%) (Gráfico 15 A). Esta dose foi escolhida para o edema induzido pelo mediador por prostaglandina E2. Os valores da área sob a curva (ASC) estão expressos no gráfico 15B. Os dados são diferentes quanto ao tratamento ($F_{3, 28} = 108,9$; $p < 0,0001$), quanto ao tempo ($F_{5, 140} = 167,8$; $p < 0,0001$) e tiveram significativa interação tratamento x tempo ($F_{15, 140} = 31,50$; $p < 0,0001$).

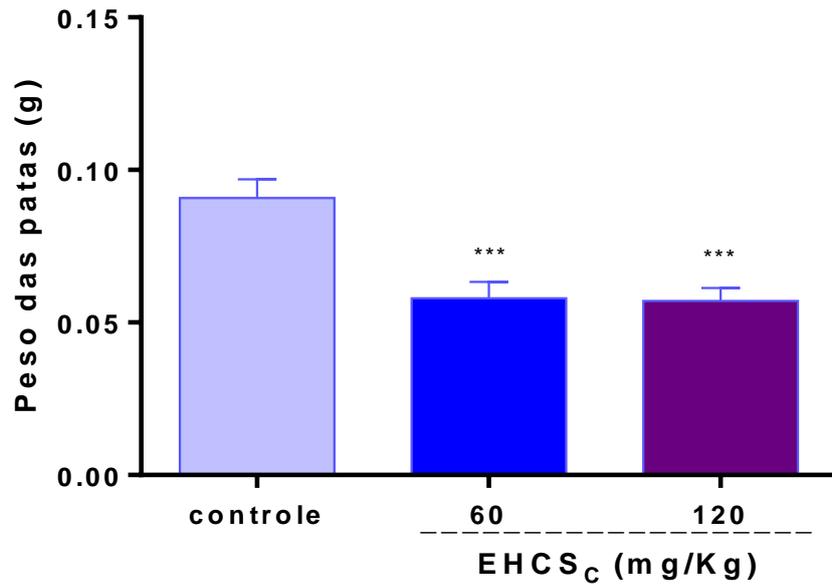


Gráfico 13: Efeito inibitório do EHCS_C sobre o edema de pata induzido por formalina na pata direita traseira. Média \pm E.P.M. da diferença de peso entre a pata direita (formalina) e a esquerda (controle). *** $p < 0,001$ em relação ao controle.

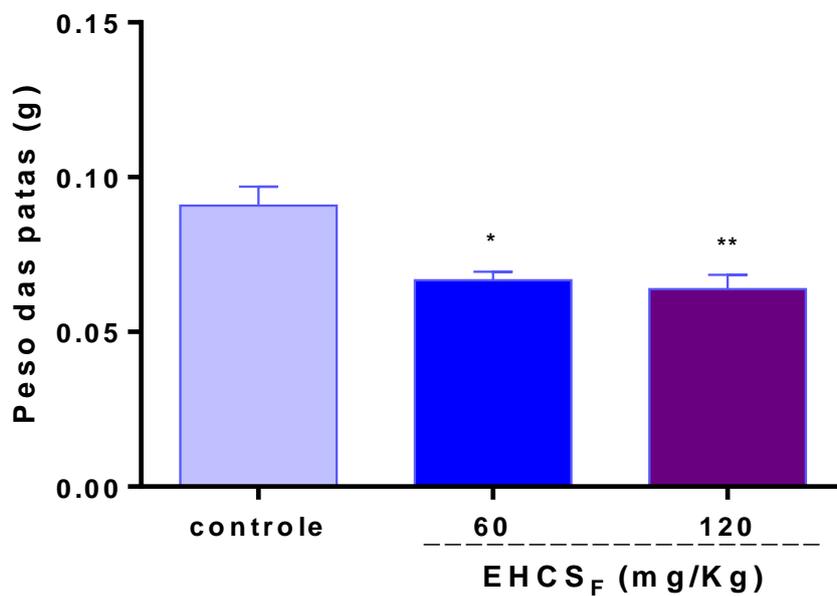


Gráfico 14: O EHCS_F inibiu o edema de pata induzido por da formalina na pata posterior direita. Média \pm E.P.M. da diferença de peso entre a pata direita (formalina) e a esquerda (controle). * $p < 0,05$, em relação ao controle.

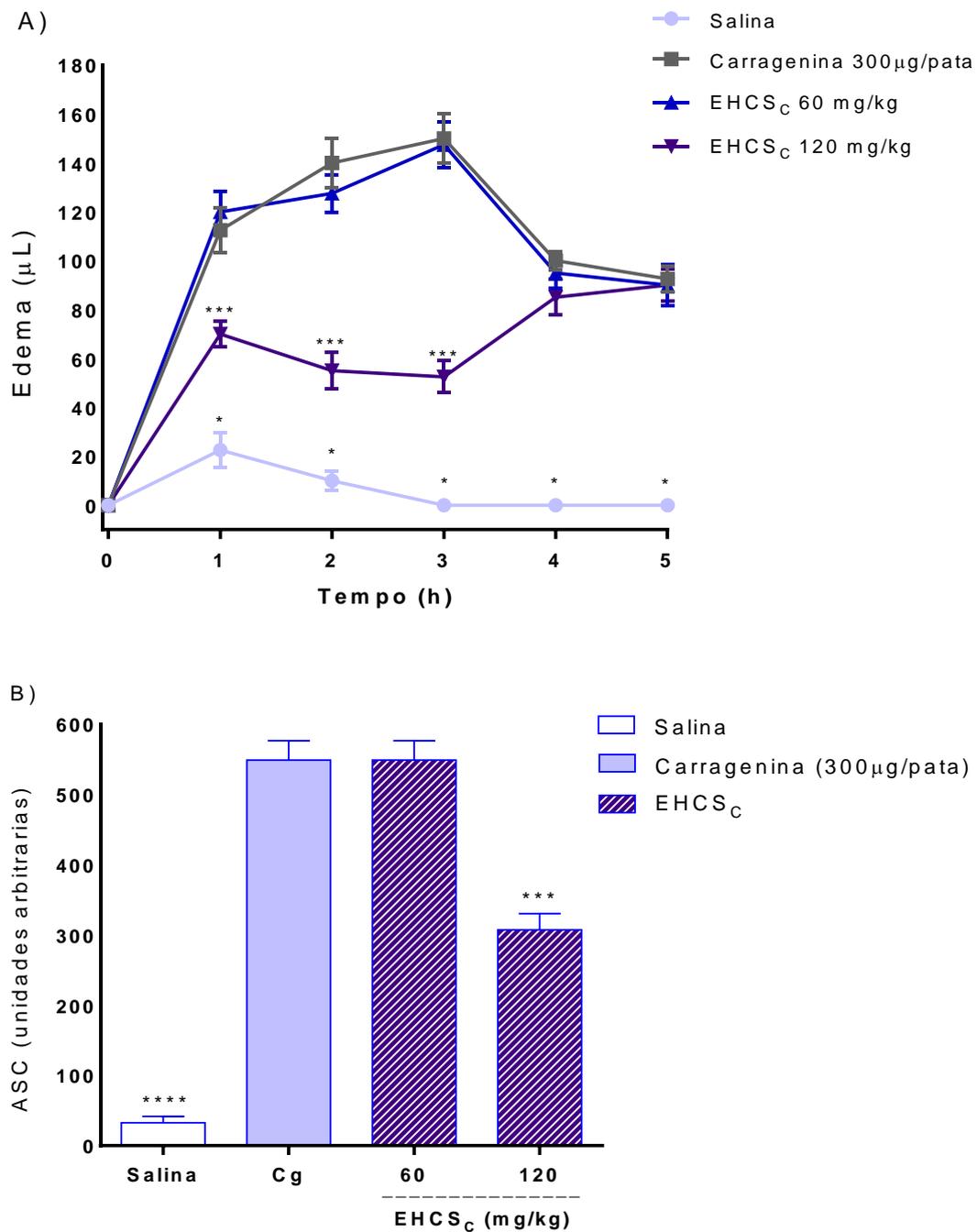


Gráfico 15: A) O EHCS_C inibe o curso temporal do edema de pata induzido pela carragenina. O grupo controle recebeu salina na pata direita traseira. Média \pm E.P.M. *** $p < 0,001$ em relação à carragenina. B) ASC: Valores da área sob a curva obtidos com a regra trapezoidal e expressos em unidades arbitrárias.

7.4.3 O EHCS_C inibe o edema de pata induzido por prostaglandina E2

Confirmando o resultado demonstrado anteriormente, o EHCS_C na dose de 120 mg/kg inibiu o edema induzido pela carragenina aos 120 e 180 min de $140 \pm 10 \mu\text{l}$ e $150 \pm 10 \mu\text{l}$ (Cg) para $40 \pm 3,7 \mu\text{l}$ (71%) e $67,5 \pm 3,05 \mu\text{l}$ (55%), respectivamente. O EHCS_C também inibiu o

edema induzido pela prostaglandina aos 60 min (56%) de $95 \pm 9,5 \mu\text{l}$ no grupo PGE2 para $42,59 \pm 5,9 \mu\text{l}$, bem como aos 120 (80%) e 180 min (97%). Os dados do Gráfico 16A são diferentes quanto ao tratamento ($F_{4, 31} = 90,03$; $p < 0,0001$), quanto ao tempo ($F_{3, 93} = 155,2$; $p < 0,0001$) e tiveram significativa interação tratamento x tempo ($F_{12, 93} = 30,88$; $p < 0,0001$). As áreas sob a curva estão expressas no Gráfico 16B.

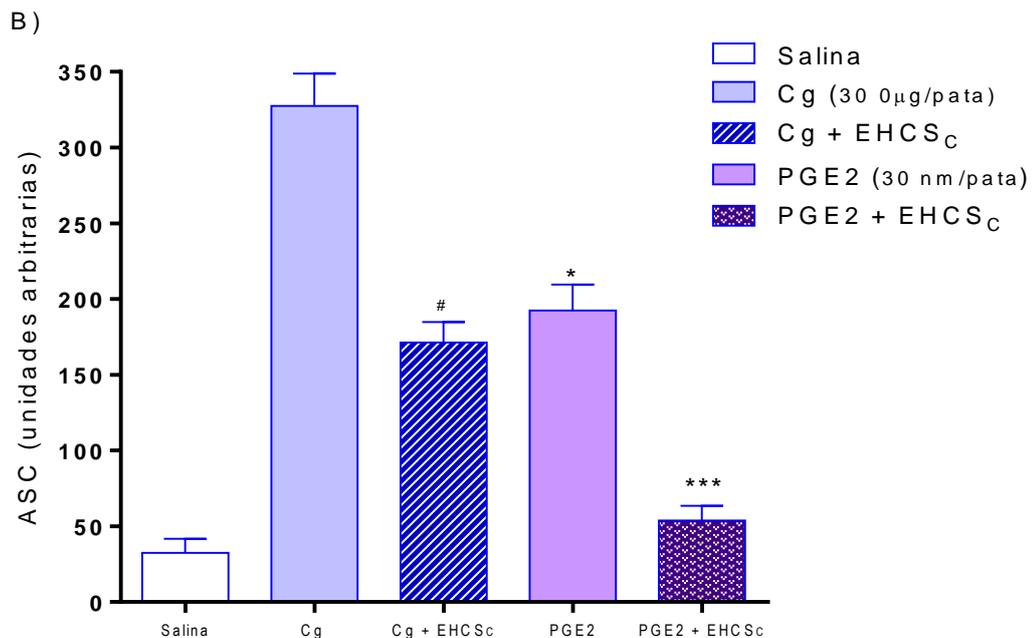
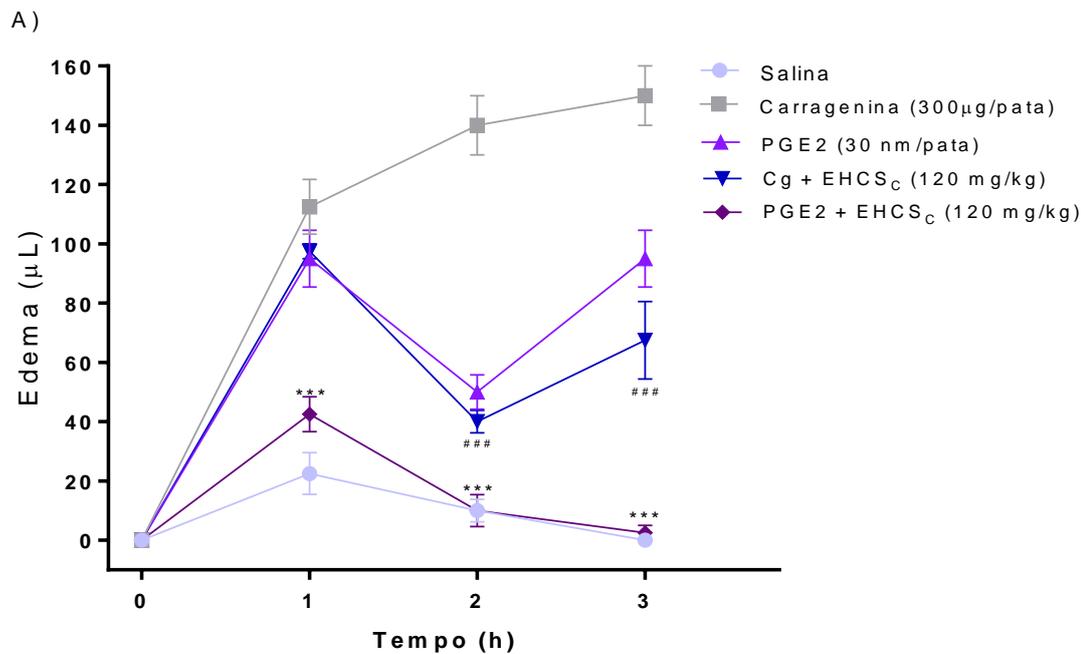


Gráfico 16: A) O EHCS_C inibe o edema de pata induzido por carragenina e PGE2. Média \pm E.P.M *** $p < 0,001$. B) ASC: Valores da área sob a curva, obtidos com a regra trapezoidal e expressa em unidades arbitrárias. Valores de média \pm e.p.m. ** $p < 0,01$.

A espécie *Calycophyllum spruceanum*, assim como outras espécies da família Rubiaceae, tem sido muito utilizada pela população no tratamento de vários males, principalmente no tratamento de inflamações diversas, isso nos levou ao interesse de verificar esta possível atividade anti-inflamatória, além de um possível efeito antinociceptivo e o estudo da toxicidade do extrato hidroalcoólico. Os resultados obtidos neste estudo demonstram pela primeira vez a ausência de toxicidade aguda do extrato hidroalcoólico obtido a partir das folhas e da casca da *Calycophyllum spruceanum*.

Até o presente momento não foram relatados estudos que avaliem os possíveis efeitos tóxicos da *C. spruceanum*, embora esta espécie seja utilizada popularmente em diversos tratamentos. A importância da avaliação da toxicidade de extratos vegetais está em averiguar possíveis danos ao organismo causados pelo seu uso. É importante também para classificar substâncias de forma apropriada, conforme estabelecido pela legislação, de acordo com o seu possível grau de letalidade ou toxicidade. Embora acredite-se que o uso de produtos naturais não causa efeitos colaterais, o consumo em excesso ou de forma inadequada pode causar consequências graves. Objetivou-se avaliar, através de ensaio da toxicidade aguda em camundongos, possíveis efeitos tóxicos dos extratos, estabelecendo doses seguras a serem adotadas nos testes subsequentes, administradas por via oral, evitando o uso de doses tóxicas que poderiam demonstrar efeitos que não resultantes da real ação do EHCS.

Os resultados da avaliação da toxicidade mostraram que o extrato hidroalcoólico da casca e das folhas de *Calycophyllum spruceanum* Pode ser então considerado de baixa toxicidade, de acordo com o método de classes preconizado pela Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento número 423 e, segundo o GHS, na classe 5, haja vista que a dose capaz de causar morte nos animais é maior que 5000 mg/kg (OECD, 2001).

A ataxia é, Segundo a National Ataxia Foundation, um sintoma de várias condições diversas que afetam o sistema nervoso. Esta perda de coordenação pode ser causada por um número de diferentes condições neurológicas. A ataxia descreve um distúrbio de movimento e está relacionada quase sempre a doenças cerebelares ou às suas conexões com o tronco encefálico (NAF, 2014). A ambulação é o ato normal de movimento exibido pelo animal (ALMEIDA *et al.*, 1999). A diminuição da ambulação é considerada o meio comumente utilizado para verificar se uma substância apresenta efeito depressor do sistema nervoso central. A demora de reação do camundongo em resposta a um toque também pode indicar efeito depressor do SNC em animais (ALMEIDA, 2006). Embora ataxia, diminuição da ambulação e diminuição da resposta ao toque sejam parâmetros utilizados como indicativos

de sugestivo efeito depressor no sistema nervoso central, receia-se utilizar somente estes como forma de classificar uma substância. Alguns dessas respostas são recuperáveis, sugerindo que o efeito não é um resultado do efeito tóxico (SOUZA *et al.*, 2007). Drogas de ação analgésica exercem função depressora sobre o SNC podendo causar diminuição da coordenação motora, influenciando na expressão do comportamento nociceptivo (SOJA *et al.*, 2002). Relaxantes musculares esqueléticos, ansiolíticos, sedativos e hipnóticos também diminuem a atividade do SNC causando incoordenação motora no teste do Rota Rod. (PULTRINI; GALINDO; COSTA, 2006).

Além da alteração comportamental, o peso corporal dos animais é outro parâmetro adotado na avaliação da toxicidade de uma substância, pois a manifestação da toxicidade pode se expressar na redução no consumo de água e ração (PIRES JÚNIOR *et al.*, 2012) ocasionando perda de peso dos animais. Em relação ao peso não houve diferença significativa entre o grupo controle e os animais tratados nas diferentes doses dos extratos comparados ao controle (tabela 2) enfatizando a baixa toxicidade do EHCS.

Os animais tratados com o EHCS_C e EHCS_F tanto na dose de 2000 mg/kg quanto na dose de 5000 mg/kg não apresentaram alteração significativa no equilíbrio sobre a barra giratória, quando comparados ao grupo controle nas três primeiras horas de observação e nos dias seguintes (gráficos 1 e 2). O mesmo resultado foi observado ao testar as doses 60 mg/kg e 120 mg/kg, utilizadas nos experimentos (gráfico 3), indicando que o tratamento com o EHCS_C e com EHCS_F não interferiu na coordenação motora, descartando assim um efeito relaxante muscular ou mesmo uma neurotoxicidade, que é comum a algumas drogas com perfil depressor do SNC.

O teste da placa quente é um modelo experimental específico onde se utiliza o estímulo nociceptivo térmico. Este teste é utilizado para a detecção de substâncias analgésicas que atuam via central. A resposta ao estímulo se dá pelo estímulo direto dos nociceptores e depende da integração supra-espinhal (LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001). Este estímulo se dá após a ativação dos receptores vanilóides, especificamente os receptores do tipo VR-1, e do tipo VRL-1, responsáveis pela resposta em decorrência do aumento da temperatura que possuem limiar de ativação em 43°C e 52°C, respectivamente. Estes últimos são os mais importantes na avaliação da resposta a estímulos térmicos nocivos (JULIUS & BASBAUM, 2001; BENEDITO, 2009). Os resultados demonstrados nos gráficos 4 e 5 sugerem que o EHCS_C e o EHCS_F possuem uma ação central relacionada aos reflexos espinhais, pois aumentou o tempo de latência em resposta ao estímulo térmico. Porém,

embora tenha uma diferença em relação ao tempo, os resultados da casca não foram diferentes quanto aos tratamentos. Já os dados referentes ao EHCS_F foram diferentes em relação ao tratamento e ao tempo indicando que houve uma ação inibitória por parte do extrato sobre a nocicepção no teste da placa quente.

O teste de imersão da cauda é também um método de nocicepção térmica, o qual é sensível para identificar a atividade de substâncias, cujos mecanismos sejam semelhantes aos promovidos pelos analgésicos opióides (OLIVEIRA *et al.*, 2008). Em virtude disso, substâncias com ação analgésicas fraca podem não atuar de maneira significativa neste teste. A imersão da cauda de um animal em água quente aumenta a sua temperatura muito rapidamente, provocando um movimento reflexo brusco da cauda (LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001). Neste estudo, o EHCS_C não alterou o tempo de latência de resposta no teste da imersão da cauda em nenhuma das doses administradas e em nenhum dos tempos avaliados. O EHCS_F pareceu aumentar a latência em resposta ao calor, em ambas as doses administradas. O calor é mais seletivo em estímulos de receptores cutâneos, há um consenso entre pesquisadores que este teste é verdadeiramente eficaz apenas em revelar a atividade de analgésicos opióides e não de agonistas parciais de opióides (LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001), podendo ocorrer uma ativação assíncrona de neurônios periféricos e centrais propenso a variações interindividuais. Portanto, a diferença demonstrada aqui pode ser em decorrência da grande variabilidade de efeito intra-grupo neste modelo.

O teste de contorções abdominais é um modelo de nocicepção química, sensível e abrangente utilizado para a investigação de substâncias com atividade antinociceptiva, principalmente de origem periférica (AHMED *et al.*, 2011), mas também pode ser usado para avaliar aquelas que atuam a nível central (DERAEDT *et al.*, 1980; LE BARS; GOZARIU; CADDEN *et al.*, 2001). A resposta à injeção intraperitoneal de ácido acético, se caracteriza pela contração da musculatura do abdômen, seguida de rotação do abdômen, alongamento do corpo e pela extensão de uma ou ambas as patas traseiras (KOSTER *et al.*, 1959). As contorções se dão em resposta reflexa à injúria peritoneal e peritonite causada pela injeção intraperitoneal de ácido acético (WHITTLE, 1964) tais contrações involuntárias mostram semelhança com certas dores viscerais conhecidas, podendo ser motivo de interesse no estudo de drogas que inibam essas contrações (LE BARS; GOZARIU; CADDEN *et al.*, 2001). Embora o teste das contorções abdominais apresente pouca especificidade, possui a vantagem de ser um modelo sensível, permitindo a detecção de efeitos antinociceptivos de compostos e doses que aparentemente não atuam em outros métodos, como teste de retirada da

cauda (BENTLEY *et al.*, 1981). A injeção de ácido acético intraperitonealmente causa uma dor ligada à ação de mediadores, tais como a bradicinina, histamina e óxido nítrico (ABDOLLAHI, KARIMPOUR e MONSEF-ESFEHANI, 2003; WHITTLE, 1964) assim como prostaglandinas e algumas citocinas, tais como IL-1 β , TNF- α e IL- 8 (DE LIMA *et al.*, 2009; IKEDA *et al.*, 2001). Analgésicos de ação periférica tais como o ibuprofeno, a aspirina e indometacina são capazes de inibir as contorções induzidas por ácido acético em camundongos (GENE *et al.*, 1998). Neste modelo o EHCS_C e o EHCS_F reduziram o número de contorções abdominais em ambas as doses (gráficos 8 e 9) sugerindo que possuem ação periférica. Foram verificados níveis elevados de PGE2 e PGF2 α , em fluidos peritoneais de animais que receberam injeção de ácido acético (DERAEDT *et al.*, 1980; VERMA *et al.*, 2005).

O teste da formalina é um método de nocicepção química que oferece respostas mais específicas comparada ao teste de contorções abdominais (SHIBATA *et al.*, 1989) onde a dor gerada é visceral, difusa e mal definida, geralmente em decorrência da baixa densidade de inervação sensitiva (SIKANDAR & DICKENSON, 2012). Por isso é necessária a realização de testes mais específicos, como o teste da formalina, e então podemos avaliar os resultados do teste de contorções abdominais em conjunto com os resultados de outros testes. A dor induzida neste modelo é considerada a que mais se aproxima da dor clínica (ROSLAND *et al.*, 1990). Neste método de avaliação comportamental onde podemos avaliar agentes antinociceptivos e anti-inflamatórios em duas fases distintas (HUNSKAAR & HOLE, 1987). Na primeira fase, conhecida como neurogênica ou aguda, há o estímulo direto de nociceptores periféricos, a ativação das fibras aferentes primárias do tipo C e, em parte, das fibras do tipo A δ (AMARAL *et al.*, 2007) e liberação de aminoácidos excitatórios, óxido nítrico, substância P e bradicinina (SHIBATA *et al.*, 1989). Ela ocorre nos cinco primeiros minutos, onde ocorre um intenso processo doloroso o qual pode ser atenuado por analgésicos que atuam no SNC. A segunda fase, conhecida como inflamatória ou tardia, ocorre 15 e 30 minutos após a injeção de formalina e se caracteriza como uma reação inflamatória no tecido periférico e está relacionada com a liberação de mediadores inflamatórios como histamina, serotonina, prostaglandina e bradicinina (SHIBATA *et al.* 1989). EHCS_C demonstrou efeito significativo na segunda fase do teste diminuindo a dor de origem inflamatória, sugerindo a ação do extrato sobre mediadores químicos (gráfico 10). Já o EHCS_F, embora tenha manifestado efeito inibitório na dor visceral no teste das contorções abdominais, não apresentou efeito antinociceptivo em nenhuma das fases observadas no teste da formalina (gráfico 11). Esse

fato pode ser em decorrência de que a nocicepção na fase tardia se dá, além do processo inflamatório periférico, pela ocorrência de alterações no corno dorsal induzidas pela fase inicial (SHIBATA *et al.*, 1989). Além de que a dor causada neste teste é mais pontual devido a maior inervação sensitiva.

Testes mecânicos, como o Von Frey nos permite avaliar o aumento da sensibilidade tecidual provocada por agentes inflamatórios, onde há não somente a ativação dos mecanorreceptores, mas também sensibilidade dos nociceptores (fibras A δ e fibras C) (LE BARS; GOZARIU; CADDEN *et al.*, 2001) em decorrência de um processo inflamatório ligado à hipernocicepção, fazendo com que esse modelo seja útil para avaliar atividade anti-hipernociceptiva de diferentes substâncias (HENRIQUES *et al.*, 1987)

A carragenina tem sido amplamente utilizada para verificar ação de substâncias sobre a hiperalgesia inflamatória em camundongos e ratos (LEVINE; REICHLING, 2000). A injeção de carragenina provoca uma lesão tecidual na qual há o envolvimento de diversos mediadores químicos como óxido nítrico, serotonina e histamina que podem atuar em combinação ou em um determinado momento do processo inflamatório, produzindo alterações que resultam na alodínia ou hiperalgesia (COUTAUX *et al.*, 2005; MORRIS, 2003). Existem dois fenômenos em que pode ser dividida a hipernocicepção após a lesão cutânea: a hipernocicepção primária, caracterizada por aumento da sensibilização por estímulos mecânicos e térmicos e a hipernocicepção secundária, caracterizada por aumento da sensibilização a estímulo mecânico único. A primeira ocorre no local da lesão e a segunda ocorre fora do local da lesão. A Hiperálgesia nos processos inflamatórios corresponde a hiperálgesia primária (TREEDE *et al.*, 1992). Neste teste verificamos o efeito anti-hipernociceptivo do EHCS_C sugerindo que essa atividade está relacionada a mediadores inflamatórios inferindo possível atividade anti-inflamatória.

Diante do efeito antinociceptivo periférico do EHCS_C e do EHCS_F demonstrado nos testes das de contorções abdominais induzidas por ácido acético, formalina (segunda fase) e Von Frey, foi sugerido um efeito anti-inflamatório para esses extratos.

Conforme descrito anteriormente, a fase tardia do teste da formalina envolve a liberação de mediadores inflamatórios que levam a formação de edema. Estudos demonstraram que as cininas aparentemente exibem função importante na modulação da formação do edema de pata induzido pela formalina (CORRÊA *et al.*, 1996). Neste modelo, o EHCS_C e o EHCS_F foram capazes de inibir o edema causado pela injeção de formalina,

sugerindo provável redução nos níveis de mediadores, principalmente das cininas. Isso confirma o efeito anti-inflamatório atribuído à espécie pela medicina popular, principalmente à casca que é a mais utilizada para este fim.

Outro agente flogístico utilizado neste estudo para verificar a atividade anti-inflamatória foi a carragenina que, ao ser injetada na pata do animal, induz uma resposta inflamatória caracterizada por exsudato rico em proteínas com grande número de neutrófilos, macrófagos, eosinófilos e, predominantemente, linfócitos (ROCHA; FERREIRA, 1986) e também aumento significativo nos níveis de diversos mediadores inflamatórios (ZHANG, B. *et al.*, 2007). O aumento no edema de pata é bifásico e tempo-dependente, sendo que a primeira fase da resposta inflamatória induzida por carragenina se dá imediatamente após a injeção e tem duração de aproximadamente uma hora. Esta fase está relacionada à liberação de histamina e serotonina. A segunda fase ocorre após uma hora e é mediada pela liberação de prostaglandinas e bradicinina. A continuidade entre as duas fases é mediada por cininas (DI ROSA *et al.*, 1971; MALEKI *et al.*, 2005). Além dos mediadores de fase tardia, o edema de pata induzido por carragenina também é mediado por citocinas como TNF- α , IL-1 e IL-6 (ROCHA *et al.*, 2006; JAMUNA *et al.*, 2015). Há, ainda, uma liberação periférica de NO em ambas as fases (OMOTE *et al.*, 2001). O efeito do EHSC_C no modelo de edema de pata confirmou a atividade anti-inflamatória sugerida na segunda fase do teste da formalina, pois inibiu o edema induzido pela carragenina a partir da primeira hora indicando, que o mecanismo de ação do extrato pode envolver as vias da serotonina e/ou histamina. O EHSC_C demonstrou sua ação máxima na terceira hora após a injeção de carragenina indicando, provavelmente, que o extrato atua principalmente pelas vias da bradicinina e/ou prostaglandinas (gráfico 15).

Para esclarecer melhor o efeito do EHSC_C na segunda fase do edema de pata induzido por carragenina, induziu-se o edema de pata pelo mediador prostaglandina E2 que participa nessa fase do edema por carragenina. APGE 2 é um prostanóide e a sua ligação com seus receptores específicos acarreta efeitos fisiopatológicos, como eritema e aumentos do fluxo sanguíneo local, sensibilização de nociceptores e aumento da temperatura corporal. Com o aumento da produção de prostaglandinas há por consequência aumento na resposta inflamatória (SCHIFFLER *et al.*, 2015; HILÁRIO *et al.*, 2006). Não é possível afirmar se o efeito antiedematogênico do EHSC_C no modelo de prostaglandina E2 ocorre em virtude de antagonismo de quais receptores do subtipo EP. Também não é possível determinar se suas ações são referentes à modulação periférica local ou ação central, entretanto, foi possível

mostrar que, embora parcialmente, o efeito antiedematogênico do EHCS_C na segunda fase do modelo de edema induzido por carragenina, tenha ocorrido com o envolvimento da via de ativação de prostaglandinas. Faz-se necessária uma investigação mais aprofundada para elucidar tais mecanismos de ação do EHCS_C.

8. CONCLUSÕES

O EHCS_C e o EHCS_F apresentam baixa toxicidade aguda após administração oral na dose de 5000 mg/kg e não alteram o desempenho motor dos animais submetido ao teste do Rota Rod, excluindo-se a possibilidade de efeitos depressores do SNC.

O EHCS_C apresenta atividade antinociceptiva em modelos de nocicepção térmica, química e mecânica, enquanto que o EHCS_F foi eficaz apenas contra estímulos químicos e térmicos.

Além do efeito antinociceptivo, o EHCS_C apresenta efeito anti-inflamatório que envolve a participação de prostaglandinas.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDOLLAHI, M.; KARIMPOUR, H.; MONSEF-ESFEHANI, H. R. Antinociceptive effects of *Teucrium polium* L. total extract and essential oil in mouse writhing test. **Pharmacological Research**, v. 48, n. 1, p. 31-35, 2003.
- AGUGGIA, M. Neurophysiology of pain. **Neurological Sciences**, v. 24, n. 2, p. 57-60, 2003.
- AGUILAR, J. L.; ROJAS, P.; Marcelo, A.; PLAZA, A.; BAUER, R.; REININGER, E.; KLAAS, C. A.; MERFORT, I. Anti-inflammatory activity of two different extracts of *Uncaria tomentosa* (Rubiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, n. 2, p. 271-276, 2002.
- AHMADI, S.; LIPPROSS, S.; NEUHUBER, W.L.; ZEILHOFER, H.U. PGE(2) selectively blocks inhibitory glycinergic neurotransmission onto rat superficial dorsal horn neurons. **Nat. Neurosci.**, v.5, n.1, p 34-40, 2002.
- AHMED, S. SULTANA, M.; HASAN, M. M. U.; AZHAR, I. Analgesic and Antiemetic Activity of *Cleome Viscosa* L. **Pakistan Journal of Botany**, v. 43, p. 119-122, 2011.
- ALEXANDRE, R. F.; BAGATINI, F.; SIMÕES, C. M. Interações entre fármacos e medicamentos fitoterápicos à base de ginkgo ou ginseng. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 1, p. 117-126, 2008.
- ALMEIDA, R. N.; FALCÃO, A. C. G. M.; DINIZ, R. T.; JÚNIOR, L. J. Q.; POLARI, R. M. P.; FILHO, J. M. B.; AGRA, M. F.; DUARTE, J. C.; FERREIRA, C. D.; ANTONIOLLI, A. R.; ARAÚJO, C. C. Metodologia para avaliação de plantas com atividade no sistema nervoso central e alguns dados experimentais. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 80, p. 72-76, 1999.
- ALMEIDA, R. N.; OLIVEIRA, T. M. L. Triagem farmacológica comportamental. In: **Psicofarmacologia: fundamentos práticos**, 1ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. cap. 11, 131-137 p.
- ALVES, L. F. Produção de Fitoterápicos no Brasil: História, Problemas e Perspectivas. **Revista Virtual de Química**, v. 5, n.3, p. 450-513, 2013.
- ALVES NETO, O. **DOR: Princípios e prática**. 1. ed. Porto Alegre: Arttmed, 2010.
- AMARAL, J. F. DO.; SILVA, M. I. G.; NETO, M. R. A; NETO, P. F. T.; MOURA, B. A.; MELO, C. T. V.; ARAÚJO, F. L. O; DE SOUSA, D. P.; VASCONCELOS, P. F.; VASCONCELOS, S. M. ;SOUSA, F. C. F. Antinociceptive effect of the monoterpene R-(-)-limonene in mice. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, p.1217-1220, 2007.
- ANDRADE-NETO V. F; BRANDÃO M. G. L; STEHMANN JR; OLIVEIRA L. A; KRETTLI A. U. Antimalarial activity of *Cinchona*-like plants used totre at fever and malaria. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 87, p. 253-256, 2003.
- APKARIAN, A. V.; BALIKI, M. N.; GEHA, P. Y. Towards a theory of chronic pain. **Progress in Neurobiology**, v. 87, n. 2, p. 81-97, 2009.

ARAÚJO, F. W. C.; MELO, S. J. Estudo fitoquímico e avaliação de atividades farmacológicas das folhas da espécie *Guettarda platypoda* d.c. (Rubiaceae). **Anais do XVIII Congresso de Iniciação Científica e III Congresso de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação da UFPE**. 2010.

BALBINO, C. A.; PEREIRA, L. M.; CURI, R. Mecanismos envolvidos na cicatrização: uma revisão. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 41, n. 1, p. 27-51, 2005.

BARBOSA, M. R.; ZAPPI, D.; TAYLOR, C.; CABRAL, E.; JARDIM, J. G.; PEREIRA, M. S.; CALIÓ, M. F.; PESSOA, M. C. R.; SALAS, R.; SOUZA, E. B.; DI MAIO, F. R.; MACIAS, L.; ANUNCIACÃO, E. A.; GERMANO, F. P.; OLIVEIRA, J. A.; BRUNIERA, C. P.; GOMES, M.; TONI, K.; FIRENS, M. *Rubiaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB210>>. Acesso em: 08 SET. 2015.

BARROS, Q. S.; MARTINS, B. C.; OLIVEIRA, E. K. B.; NAGY, A. C. G.; SILVA, A. C. A. Estudo da viabilidade do manejo florestal comunitário madeireiro na reserva extrativista do alto jurua-Acre. **Enciclopédia biosfera**, v.11, n. 21, p. 1042-1058, 2015.

BARROSO, G.M. **Sistemática das Angiospermas do Brasil**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1991, v. 3, 326 p;

BASBAUM, A.; JESSEL, T. M. The perception of pain. In: KANDEL; SCHWARTZ; JESSEL. **Principles of Neural Science**, 4ª Ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, p. 472-491, 2000.

BASBAUM, A. I.; JESSELL, T. M. **A percepção da dor**. IN: KANDEL, E. R.C.; CHWARTZ, J. H.; JESSEN, T. M. Princípios da neurociência. Barueri, SP: Manole, p. 472-491, 2003.

BASBAUM, A. I.; BAUTISTA, D. M.; SCHERRER, G.; JULIUS, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v. 139, n. 2, p. 267-84, 2009.

BEIRITH A.; SANTOS, A. R. S.; RODRIGUES, A. L. S.; CRECZYNSKI-PASA, T.B.; CALIXTO, J. B. Spinal and supraspinal antinociceptive action of dipyron in formalin, capsaicin and glutamate tests. Study of the mechanism of action. **European Journal of Pharmacology**, v. 345, p. 233-245, 1998.

BENEDITO, R., B. **Efeito antinociceptivo do monoterpeno (s)-(-)-álcool perílico em camundongos**. João Pessoa. 2009, 83f. Dissertação (Mestrado em produtos naturais e sintéticos bioativos, Farmacologia) – Universidade Federal da Paraíba, 2009.

BENTLEY, G. A., NEWTON, S. H.; STARR, J. Evidence for an action of morphine and the enkephalins on sensory nerve endings in the mouse peritoneum. **British Journal of Pharmacology**, v. 73, p. 325-332, 1981.

BERTOLINI, G. R. F.; ALBUQUERQUE, C. E.; MENON, T.; DASSOLER K. P. Efeitos do ultra-som terapêutico em edema traumático agudo em patas de ratos. **Revista Uningá**. n. 3, p. 27-35, 2005.

- BOTTEGA, F. H.; FONTANA, R. T. A dor como quinto sinal vital: utilização da escala de avaliação por enfermeiros de um hospital geral. **Texto Contexto Enfermagem**, v. 19, n. 2, p. 283-290, 2010.
- BORK, K. Angioedema. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, v. 34, p. 23-31, 2014.
- BREMER, B. A. Review of molecular phylogenetic studies of Rubiaceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 96, p. 4-26, 2009.
- CAI, Y.; LUO, Q.; SUN, M.; CORKE, H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. **Life Science**, v. 74, p. 2157-2184, 2004.
- CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Ciência e Cultura**, v. 55 n. 3, p. 37-39, 2003.
- CALIXTO, J. B.; SIQUEIRA JR., J. M. Desenvolvimento de Medicamentos no Brasil: Desafios. **Gazeta Médica da Bahia**, v.78, p.98-106, 2008.
- CALVINO, B.; GRILO, R. M. Central pain control. **Joint Bone Spine**, v. 73, p. 10-16, 2006.
- CARDOSO, C. L.; SILVA, D. H. S.; YOUNG, M. C. M.; GAMBOA, I. C.; BOLZANI, V. S. Indole monoterpene alkaloids from *Chimarrhis turbinata* DC Prodr.: A contribution to the chemotaxonomic studies of the Rubiaceae family. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n 1, p. 26-29, 2008.
- CARVALHO, A. C. B.; BALBINO, E. E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J. P. S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 314-319, 2008.
- CARVALHO, W. A.; LEMÔNICA, L. Mecanismos centrais de transmissão e de modulação da dor. Atualização terapêutica. **Revista Brasileira de Anestesiologia**. v. 48, n. 3, p 221-240, 1998.
- CASSINO, M. F. **Estudo etnobotânico de plantas medicinais em comunidades de várzea do rio Solimões, Amazonas e aspectos farmacognósticos de *Justicia pectoralis* Jacq. forma *mutuquinha* (Acanthaceae)**. Manaus, 2010. 135f. Dissertação (Mestrado em Botânica) - Instituto nacional de pesquisas da Amazônia.
- CASTRO, R. J. A.; LEAL, P. C.; SAKATA, R. K. Tratamento da dor em queimados. **Revista Brasileira de Anestesiologia**. v. 63, n 1, p. 149-158, 2013.
- CHEIKHYOUSSEF, A.; SHAPI, M.; MATENGU, K.; ASHEKELLE, H. M. Ethnobotanical study of indigenous knowledge on medical plant use by traditional healers in Oshikoto region, Namibia. **Journal of Ethnobiology and Etnomedicine**, v. 7, n.10, p. 1-11, 2011.
- CIRINO, C.; FIORUCCI, S.; SESSA, W. C. Endothelial nitric oxide synthase: the cinderella of inflammation? **Trends in Pharmacol Sci.**, v. 24, p. 91-95, 2003.

CORRÊA, C. R.; KYLE, D. J.; CHAKRAVERTY, S.; CALIXTO, J. B. Antinociceptive profile of the pseudopeptide B2 bradykinin receptor antagonist NPC 18688 in mice. **British Journal of Pharmacology**, v. 117, p. 552-558, 1996.

COUSSENS, L. M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 860-867, 2002.

COUTAUX, A.; ADAM, F.; WILLER, J-C.; LE BARS, D. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. **Joint Bone Spine**, v. 72, n. 5, p. 359-371, 2005.

CRUVINEL, W. de M.; MESQUITA JUNIOR, 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. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 50, n. 4, p. 434-461, 2010.

CUNHA, T. M.; VERRI JUNIOR, W. A.; VIVANCOS, G. G.; MOREIRA, I. F.; REIS, S.; PARADA, C. A.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. M. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, p. 401-407, 2004.

D'AMOUR, F. E.; SMITH, D. L. A method for determining loss of pain sensation. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 72, n. 1, p. 74-79, 1941.

DÉCIGA-CAMPOS, M. Antinociceptive activity of 3-O-β-D-glucopyranosyl-23,24-dihydrocucurbitacin F from *Hintonia standleyana* (Rubiaceae). **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 83, n. 2, p. 342-348, 2006.

DE LIMA, A. B., SANTANA, M. B.; CARDOSO, A. S.; SILVA, J. K. R. DA, MAIA, J. G. S.; CARLOS J. C. T.; D, SOUSA, P. J. C. Antinociceptive activity of 1-nitro-2-phenylethane, the main component of Aniba canelilla essential oil. **Phytomedicine**, v. 16, p. 555-559, 2009.

DELPRETE, P. G. **Rubiaceae - Parte 1: Introdução, Gêneros A-H. In: RIZZO, J. A. (coord.). Flora dos Estados de Goiás e Tocantins. Goiânia: IRD/UFG, Universidade Federal de Goiás, 2010, v. 40, 580p.**

DELPRETE, P. G.; JARDIM, J. G. Systematics, taxonomy and floristics of Brazilian Rubiaceae: An overview about the current status and future challenges. **Rodriguésia**, v. 61, n. 1, p. 101-128, 2012.

DELPRETE, P. G.; PERSSON, C. *Alibertia*. In: STEYERMARK, J. S.; BERRY, P. E.; HOLST, B. K. (Eds.): Flora of the Venezuelan Guayana. **Missouri Botanical Garden Press**, v. 8, p. 497-848, 2004.

DIAS, I. M. G. P. **Dor no Idoso: Satisfação com o Tratamento**. Viseu. 2011, 187f. Dissertação (I Mestrado em Enfermagem de Reabilitação) - Instituto Superior Politécnico de Viseu, 2011.

DINIZ, V. W. B.; FILHO, H. A. D.; MULLER, R. C. S.; FERNADES, K. G. Classificação multivariada de ervas medicinais da região amazônica e suas infusões de acordo com sua composição mineral. **Química Nova**, v. 36, n. 2, p. 257-261, 2013.

DI ROSA, M.; GIROUD, J. P.; WILLOUGHBY, D. A. Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **The Journal of Pathology**, v. 104, n. 1, p. 15-29, 1971.

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2. ed. São Paulo: UNESP, 2002. 604 p.

D'MELLO, R.; DICKENSON, A. H. Spinal cord mechanisms of pain. **British Journal of Anaesthesia**, v. 101, p. 8-16, 2008.

DERAEDT, R. JOUQUEY S, DELEVALLE F, FLAHAUT M. Release of prostaglandins E and F in an algogenic reaction and its inhibition. **European Journal Pharmacology**, v. 61, p. 17-24, 1980.

DEUTSCH, F.; ASHMAWI, H. A.; PALMEIRA, C. C. A.; POSSO, I. P. Efeito analgésico de antagonistas do receptor da histamina H₂ em modelo de dor provocada por formalina em ratos. Analgesic effect of hystamine H₂ receptor antagonists in formalin-induced pain model in rats. **Revista Dor**, v.12, n. 3, p. 240-4, 2011.

DOERSCHULCK, C. M.; MIZGERD, J. P.; KUBO, H.; QIN, L.; KUMASAKA, T. Adhesion molecules and cellular biomechanical changes in acute lung injury. **Chest**, v.116, p. 37-43, 1999.

DONGMO, A. B.; KAMANYI, A.; DZIKOUK, G.; CHUNGAG-ANYE, N. B.; TAN, P. V.; NGUELEFACK, T.; NOLE, T.; BOPELET, M.; WAGNER, H. Anti-inflammatory and analgesic properties of the stem bark extract of *Mitragyna ciliata* (Rubiaceae) Aubre'v. & Pellegr. **Journal of Ethnopharmacology**, v.84 p.17-21, 2003.

EL ALWANI, M. E.; WU, B. X.; OBEID, L. M.; HANNUN, Y. A. Bioactive sphingolipids in the modulation of the inflammatory response. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 112, p. 171–183, 2006.

FEIN, A. **Nociceptores: As células que sentem dor**. 1ª ed. Ribeirão Preto – SP: Dor On Line; 2011.

FENNER, R.; BETTI A. H.; MENTZ, L. A.; RATES, S. M. K. Plantas utilizadas na medicina popular com potencial atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, p.369-394, 2006.

FORZZA, R. C.; LEITMAN, P. M.; COSTA, A. F.; CARVALHO, J. R. A. A.; PEIXOTO, A. L.; WALTER, B. M. T.; BICUDO, C.; ZAPPI, D.; COSTA, D. P.; LLERAS, E.; MARTINELLI, G.; LIMA, H. C.; PRADO, J.; STEHMANN, J. R.; BAUMGRATZ, J. F. A.; PIRANI, J. R.; SYLVESTRE, L.; MAIA, L. C.; LOHMANN, L. G.; QUEIROZ, L. P.; SILVEIRA, M.; COELHO, M. N.; MAMEDE, M. C.; BASTOS, M. N. C.; MORIM, M. P.; BARBOSA, M. R.; MENEZES, M.; HOPKINS, M.; SECCO, R.; CAVALCANTI, T. B. & SOUZA, V. C. **Lista de espécies da flora do Brasil**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, v. 1 e 2, 2010, 1699 p.

FURST, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. **Brain Research Bulletin**, v. 48, p. 129-141, 1999.

GERRITS, M. M. J. G.; VOGELZANGS, N.; OPPEN, P.; MARWIJK, H. W. J.; HORST, H.; PENNINX, B. W. J. H. Impact of pain on the course of depressive and anxiety disorders. **Pain**, v. 153, p. 429-436, 2012.

GOMES, F.; TELO D. F.; SOUZA H. P.; NICOLAU J. C.; HALPERN A., SERRANO JR C. V. Obesidade e doença arterial coronariana: papel da inflamação vascular. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 94, n. 2, p. 273-279, 2010.

GÓMEZ-POMPA, A.; VÁZQUEZ-YANES, C. **Estudios sobre la regeneración de selvas en regiones calido-húmedas de México. In: GÓMEZ-POMPA, A.; DEL AMO, S. (Ed.). Investigaciones sobre La regeneracion de selvas altas em Veracruz.** 1. ed. México: Allambra, 1995, v.2, 25p.

GOVAERTS, R.; FRODIN, D.G.; RUHSAM, M.; BRIDSON, D.M. & DAVIS, A.P. **World checklist & bibliography of Rubiaceae.** The Trustees of the Royal Botanic Gardens, Kew. 2007.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, Inflammation, and Cancer. **Cell**, v. 140, p. 883–899, 2010.

GRIFFIS, C. A.; COMPTON, P.; DOERING, L. The effect of pain on leucocyte cellular adhesion molecules. **Biological Research for Nursing**, v. 7, p. 297 - 312, 2006.

GUERRERO-ANALCO, J. A.; HERSCH-MARTÍNEZ, P.; PEDRAZA-CHAVERRI, J.; NAVARRETE, A.; MATA, R. Antihyperglycemic effect of constituents from *Hintonia standleyana* in streptozotocin-induced diabetic rats. **Planta Medica**, v. 71, n.12, p. 1099-1105, 2005.

GUPTA, M.; MAZUMDER, U. K.; KUMAR, R.; GOMATHI, P.; RAJAESHWAR, Y.; KAKOTI, B. B.; TAMIL SELVEN, V. Anti nflammatory, analgesic and antipyretic effects of metanol extract from *Bauhinia racemosa* stem bark in animal models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, p. 267-273, 2005.

HILÁRIO, M. O.; TERRERI, M.T.; LEN, C. A. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: cyclooxygenase 2 inhibitors. **Jornal de Pediatria**, v. 82, n.5, p. 206-212, 2006.

HEDQVIST, P.; GAUTAM, N.; LINDBOM, L. Interactions between leukotrienes and other inflammatory mediators/modulators in the microvasculature. **American Journal of respiratory and critical care medicine**, v. 161, p. 117-119, 2000.

HEHN, F. J. Elementos básicos da inflamação. **Temas de Reumatologia Clínica**, v. 12, n. 4, 2011.

HEITZMAN, M. E.; NETO, C.C., WINIARZ, E.; VAISBERG, A. J.; HAMMOND, G. B. Ethnobotany, phytochemistry and pharmacology of *Uncaria* (Rubiaceae). **Revista Phytochemistry**, v. 66, p. 5-29, 2005.

HENRIQUES, M. G.; SILVA, P. M.; MARTINS, M. A.; FLORES, C. A.; CUNHA, F. Q.; ASSREUY-FILHO, J.; CORDEIRO, R. S. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 20, n. 2, p. 243-249, 1987.

HUCHO, T.; LEVINE, J. D. Signaling pathways in sensitization: Toward a nociceptor cell biology. **Neuron**, v. 55, n. 3, p. 365-376, 2007.

HUNSKAAR, S., FASMER, O. B., HOLE, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, p. 69-76, 1985.

HUNSKAAR, S, HOLE, K. The formalin test in mice - dissociation between inflammatory and noninflammatory pain. **Pain**, v. 30, n. 1, p. 103-114, 1987.

IKEDA, Y.; UENO, A.; NARABA, H.; OH-ISHI, S. Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanooids in the acid-induced writhing responses of mice. **Life Sciences**, v. 69, n. 24, p. 2911-2919, 2001.

JAMUNA, S.; KARTHIKA, K.; PAULSAMY, S.; THENMOZHI, K.; KATHIRAVAN, S.; VENKATESH, R. Confertin and scopoletin from leaf and root extracts of *Hypochaeris radicata* have anti-inflammatory and antioxidant activities. **Industrial Crops and Products**, v. 70, p. 221-230, 2015.

JANSEN, S.; ROBBRECHT, E.; BEECKMAN, H.; SMETS, E. A survey of the systematic wood of the Rubiaceae. **IAWA Journal**, v. 23, n. 1, p. 1-67, 2002.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I.; Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, n. 6852, p. 203-210, 2001.

JURGENSEN, S.; DAIBO, S.; ANGERS,P.; SANTOS, A. R.S.; Ribeiro-do-Valle, R. M. Involvement of 5-HT₂ receptors in the antinociceptive effect of *Uncaria tomentosa*. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 81, n. 13, p. 466-477, 2005.

JUTEL, M.; AKDIS, M.; AKDIS, C. A. Histamine, histamine receptors and their role in immune pathology. **Clinical & Experimental Allergy**, v. 39, p.1786–1800, 2009.

KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSEL, T. M. **Princípios de Neurociência**. São Paulo: Manole, 2003.

KLAUMANN, P. R.; WOUK, A. F. P. F.; SILLAS, T. Patofisiologia da dor. **Archives of Veterinary Science**, v. 13, n.1, p.1-12, 2008.

KOSINSKI, S.; BRYJA, M.; WOJTASZOWICZ, R.; GÓRKA, A. Incidence, characteristics and management of pain in one operational area of medical emergency teams. **Anaesthesiology Intensive Therapy**, v. 46, p. 83-87, 2014.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; De BEER, E. J. Acetic Acid for Analgesic Screening. **Federation Proceedings**, v. 18, p. 412-4, 1959.

LANDUCCI, E. C. T.; ANTUNES, E.; DONATO, J. L.; FARO, R.; HYSLOP, S.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; CIRINO, T.; NUCCI, G. Inhibition of carrageenin-

induced rat paw oedema by crotafotin, a polypeptide complexed with phospholipase A₂, **British Journal of Pharmacology**, v. 114, p. 578-583, 1995.

LE BARS, D.; DICKENSON, A. H.; BESSON, J. M. Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC). I. Effects on dorsal horn convergent neurons in the rat. **Pain**, v. 6, p. 283-304, 1979.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. W. Animal Models of Nociception. **Pharmacological Reviews**, v. 53, n. 4, p. 597-652, 2001.

LEGLER, D. F.; BRUCKNER, M.; ALLMEN, E. U. V.; KRAUSE, P. Prostaglandin E₂ at new glance: Novel insights in functional diversity offer therapeutic chances. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 42, n. 2, p. 198-201, 2010.

LE MOS, S.; AMBIEL, C. R. Dor em pediatria: fisiopatologia, avaliação e tratamento. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 3, n. 3, p. 371-378, 2010.

LENS, F.; JANSEN, S.; ROBBRECHT, E.; SMETS, E. Wood anatomy of the Vanguerieae (Ixoroidea-Rubiaceae), with special emphasis on some geofrutices. **IAWA Journal**, v. 21, n. 4, p. 443-455, 2000.

LINO, T. S. S.; LIMA, E. S.; PEREIRA, M. M.; VASCONCELLOS, M. C. Efeito antioxidante e fotoprotetor de extratos aquosos e etanólicos da casca do *Calycophyllum spruceanum*. **61a Reunião Anual da SBPC. Manaus, AM, Brasil, 2009.**

LUCENA, J. E. X.; BISPO, M. D.; NUNES, R. S.; CAVALCANTI, C. H. S.; SILVA, F. T.; MARÇAL, R. M.; ANTONIOLLI, Â. R. Efeito antinociceptivo e antiinflamatório do extrato aquoso da entrecasca de *Coutarea hexandra* Schum. (Rubiaceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 16, n.1, p. 67-72, 2006.

LIU, M.; ZHOU, L.; CHEN, Z.; HU, C. Analgesic effect of iridoid glycosides from *Paederia scandens* (LOUR.) MERRILL (Rubiaceae) on spared nerve injury rat model of neuropathic pain. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v.102, n. 13, p 465–470, 2012.

LEVINE, J. D.; REICHLING, D. B. Peripheral mechanisms of inflammatory pain. Em: Wall, P. D.; MELZAK, R. (eds.) Textbook of pain. Fourth edition, London: Churchill Livingstone. 2000, 59-84 p.

LIMA, R. R.; COSTA, A. M. R.; SOUZA, R. D. de; GOMES-LEAL, W. Inflamação em doenças neurodegenerativas. **Revista Paraense de Medicina**. v. 21, n. 2, p. 29-43, 2007.

MALEKI, N.; NAYEBI, A. M.; GARJANI, A. Effects of central and peripheral depletion of serotonergic system on carrageenan-induced paw oedema. **International Immunopharmacology**, v. 5, p. 1723-1730, 2005.

MANSOURI, M.T.; HEMMATI, A.A; NAGHIZADEH, B.; MARD, S.A.; REZAIE, A.; GHORBANZADEH, B. A. Study of the mechanisms underlying the anti-inflammatory effect of ellagic acid in carrageenan-induced paw edema in rats. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 47, n. 3, p. 292-298, 2015.

MARQUEZ, J. O. Bases de anatomia e fisiopatologia. **Dor, Diagnóstico & Tratamento**, v. 1, p. 3-10, 2004.

- MABBERLEY, D. J. **The plant-book: A portable dictionary of the vascular plants.** Cambridge: Cambridge University Press, 1997. 858 p;
- MARCHAND, S. The physiology of pain mechanisms: from the periphery to the brain. **Rheumatic Diseases Clinics of North America**, v. 34, n. 2, p. 285–309, 2008.
- MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: New Adventures of an Old Flame, **Cell**, v.140; n.6, p. 771-776, 2010.
- MELO, N. C. **Avaliação da atividade protetora solar *in vitro* das espécies pau-mulato (*Calycophyllum spruceanum* (Benth.) Hook. f. ex K. Schum) e ipê-amarelo (*Tabebuia aurea* (Silva Manso) Benth. & Hook. f. ex S. Moore).** Macapá, 2015. 90f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal do Amapá.
- MENDOZA, H.; RAMÍREZ, P. B. R.; JIMENÉZ, L. C. **Rubiaceae de Colombia: Guía Ilustrada de Géneros.** Bogotá, Colombia: Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt. 2004. 351 p.
- MERSKY, Y. H. Classification of chronic pain. Descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. Prepared by the International Association for the Study of Pain, Subcommittee on Taxonomy. **Pain Supplement**, v. 3, p.1-226, 1986.
- MESQUITA JUNIOR, D.; ARAÚJO, J. A. P.; CATELAN, T. T. T.; SOUZA, A. W. S. DE; SILVA, N. P. DA; ANDRADE, L. E. C.; Cruvinel, W. de M. Aspectos celulares e moleculares da inflamação **Sinopse de Reumatologia**. a. 10, n. 3, 2008.
- MENSE, S. Basic neurobiology mechanisms of pain and analgesia. **American Journal of Medicine**, v. 75, p. 4-14, 1983.
- MILLAN, M.J. The induction of pain: an integrative review. **Program in Neurobiology**, v. 57, p. 1-164, 1999.
- MILLAN, M.J. Descending control of pain. **Progress in Neurobiology**, v. 66, p. 355-474, 2002.
- MOBARAKEH, J. I.; TAKAHASHI, K.; SAKURADA, S.; KURAMASU, A.; YANAI, K. Enhanced antinociceptive effects of morphine in histamine H2 receptor gene knockout mice. **Neuropharmacology**, v. 51, p. 612-622, 2006.
- MORAES, A. P.; OLIVEIRA, P. L.; OLIVEIRA, C. M. A. CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO FITOQUÍMICO DE *Amaioua guianensis* (Rubiaceae). **Anais da 62ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência-(SBPC)**. Natal-Rio Grande do Norte 2010.
- MORRIS, C. J. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse in: Winyard, pg and Willoughby, da. **Methods in Molecular Biology, Inflammation Protocols.** Humana Press Inc., Totowa, NJ, vol. 225, p.115-121, 2003.
- NATHAN, C. Points of control in inflammation. **Nature**, v. 420, p. 846-852, 2002.

NEIVA, V. A.; RIBEIRO, M. N. S.; NASCIMENTO, F. R. F.; CARTÁGENES, M. S. S.; COUTINHO-MORAES, D. F.; AMARAL, F. M. M. Plant species used in giardiasis treatment: ethnopharmacology and in vitro evaluation of anti-Giardia activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 24, n. 2, p. 215-224, 2014.

N.A.F. Frequently asked questions about...Ataxia. **National Ataxia Foundation (FAQ)**, Minneapolis, 2014, 2p.

NEGUS, S.S.; VANDERAH, T.W.; BRANDT, M.R.; BILSKY, E.J.; BECERRA, L.; BORSOOK, D. Preclinical assessment of candidate analgesic drugs: recent advances and future challenges. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics** . v. 319, n.2, p.507-514, 2006.

OECD (Organization for economic co-operation and development) 2001. *Guideline for Testing of Chemicals: Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method*. Guideline:423. Disponível em <http://iccvam.niehs.nih.gov/SuppDocs/FedDocs/OECD/OECD_GL423.pdf>. Acesso em janeiro de 2015.

OKUSE, K. Pain signalling pathways: From cytokines to ion channels. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 490-496, 2007.(localizar artigo)

OLGUIN, C. F. A.; CUNHA, M. B.; BOSCO, C. B. D.; SCHNEIDER, M. B.; BOCARDI, J. M. B. Plantas medicinais: Estudo etnobotânico dos distritos de Toledo e produção de material didático para o ensino de ciências. **Acta Scientiarum Human and Social Sciences**, v. 29, n. 2, p. 205- 209, 2007.

OLIVEIRA, D. R.; COSTA, A. L. M. A.; LEITÃO, G. G.; CASTRO, N. G.; SANTOS, J. P.; LEITÃO, S. G. Ethnopharmacology Study of Saracuramirá (*Ampelozizyphus amazonicus* Ducke) in the “Quilombola” communities of Oriximiná, Pará state, Brazil. **Acta Amazônica**, v. 41, n. 3, p. 383-392, 2011a.

OLIVEIRA, D. R.; LEITÃO, G. G.; COELHO, T. S.; SILVA, P. E. A.; LOURENÇO, M. C. S.; ARQMO; LEITÃO, S. G. Ethnopharmacological *versus* random plant selection methods for the evaluation of the antimycobacterial activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 21, n. 5, p. 793-806, 2011b.

OLIVEIRA, F. S.; DE SOUSA, D. P.; ALMEIDA, R. N. Antinociceptive effect of hydroxydihydrocarvone. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, n. 4, p. 588-591, 2008.

OLIVEIRA, R. R. B.; GÓIS, R. M. O.; SIQUEIRA, J. S.; ALMEIDA, J. R. G. S.; LIMA, J. T.; NUNES, X. P.; OLIVEIRA, V. R.; SIQUEIRA, J. S.; QUINTANS-JUNIOR, L. J. Antinociceptive effect of the ethanolic extract of *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. Sm., Fabaceae, in rodents. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 3, p. 672-676, 2009.

OMOTE, K.; HAZAMA, K; KAWAMATA, T; KAWAMATA, M; NAKAYAMA, Y; TORIYABE, M.; NAMIKA, A. Peripheral nitric oxide in carrageenan-induced inflammation. **Brain Research**, v. 912, p. 171-175, 2001.

PEDROSO, R. A.; CELICH, K.L.S. Dor: quinto sinal vital, um desafio para o cuidar em enfermagem. **Texto contexto enferm**, v. 15, n. 2, p. 270-6, 2006.

PEREIRA, F. O.; FRODE, T. S.; MEDEIROS, Y. S. Evaluation of tumour necrosis factor alpha, interleukin-2 soluble receptor, nitric oxide metabolites, and lipids as inflammatory markers in type 2 diabetes mellitus. **Mediators of Inflammation**, v. 2006, p. 1-7, 2006.

PEREIRA, G. F. **A Família Rubiaceae Juss. na vegetação ripária de um trecho do Alto Rio Paraná, Brasil, com ênfase na Tribo Spermaceae**. Maringá, 2007. 68f. Dissertação (Programa de Mestrado em Ecologia de Ambientes Aquáticos Continentais do Departamento de Biologia). Universidade Estadual de Maringá.

PONTE, E. L. Da. **Efeito anti - inflamatório do óleo essencial de *Croton zehntneri* pax et hofmm e do anetol**. Fortaleza, 2009. 91f. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual do Ceará, Centro de Ciências da Saúde.

PESQUERO, J. B.; ARAUJO, R. C.; HEPPENSTALL, P. A.; STUCKY, C. L.; SILVA, J. A.; WALTHER, T. Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B1 receptors. **Procediments of Natural Acaemic Science**, v. 97, p. 8140.8145, 2000.

PIRES-JÚNIOR, H. B.; BORGES, L. M. F.; SOUSA, L. A. D.; CUNHA, L. C.; LINO JÚNIOR, R. S.; MELO, D. F. A.; PEREIRA, M. E. Avaliação da Toxicidade aguda do Extrato Hexânico de Frutosde *Melia azedarach* (*Miliaceae*) em camundongos. **Revista Ciência Animal Brasileira**, v. 13, n. 4, 2012.

PIRES, W. C.; MELLO, F. M. S.; BATISTA, M. P.; PEREIRA, F. C.; LIMA, ALINY PEREIRA; VILANOVA-COSTA, C. A. S. T.; KATO, L.; SILVEIRA-LACERDA, E. P. Estudo da atividade citotóxica do extrato bruto etanólico de *Psychotria prunifolia* (Rubiaceae) em células tumorais e normais *in vitro*. **Revista de Biologia Neotropical**, v.8, n.1, p. 15-23, 2011.

PORTILLO, A., VILLA, R. Atividade antifúngica de plantas paraguaias usadas na medicina tradicional. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 88, p. 93-98, 2001.

PULTRINI, A. M.; GALINDO, L. A.; COSTA, M. Effects of the essential oil from *Citrus aurantium* L. in experimental anxiety models in mice. **Life Sciences**, v. 78, p. 1720-1721, 2006.

QUEIROZ, A. L. de; MACHADO, S. A. Potencial de utilização madeireira de espécies florestais de várzea no município de Mazagão no Estado do Amapá. **Floresta**, v. 37, n. 2, p. 293-302, 2007

RAMOS, S. J.; FERNANDES, L. A.; MARQUES, C. C. L.; SILVA, D. D.; PALMEIRA, C. M.; MARTINS, E. R. Produção de matéria seca e óleo essencial de menta sob diferentes doses de fósforo. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8; n.1, p. 9-12, 2005.

REIS, L. R. S.; LAMEIRA, O. A.; PAIVA, J. S.; REIS, Y. N. R. S. Avaliação de plantas da família Rubiaceae existentes no horto de plantas medicinais da Embrapa Amazônia oriental. **Anais do Congresso nacional de botânica, 54. Reunião amazônica de botânica, 3**, Belém-Pará. 2003.

REUTER, S.; GUPTA, S. C.; CHATURVEDI, M. M.; AGGARWAL, B. B. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked? **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, n. 11, p. 1603–1616, 2010.

REVILLA, J.; **Plantas da Amazônia**: oportunidades econômicas e sustentáveis. Manaus: SEBRAE/ AM; INPA, 2001.

RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G. A. Prostaglandins and Inflammation. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v.31, n.5, p. 986–1000, 2011.

RIDKER, P. M.; CUSHMAN, M.; STAMPFER, M. J.; TRACY, R. P.; HENNEKENS, C. H. Inflammation, Aspirin, and the Risk of Cardiovascular Disease in Apparently Healthy Men. **New England Journal of Medicine**, v. 336, n. 14, p. 973-979, 1997.

ROCHA, A. P. C.; Kraychete, D. C.; Lemonica, L.; Carvalho, L. R.; Barros, G. A. M.; Garcia, J. B. S.; Sakata, R. K. Dor: Aspectos Atuais da sensibilização periférica e central. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v 57, n. 1, p. 94-105, 2007.

ROCHA & SILVA, M.A. A brief survey of history of inflammation. **Agents Actions**, v. 8, n. 1, p. 45-49, 1978.

ROCHA, N. P.; FERREIRA, S. H. Restoration by levamisole of endotoxin-inhibited neutrophil migration, oedema and increased vascular permeability induced by carrageenin. **European Journal of Pharmacology**, v. 122, p. 87-92, 1986.

RODRIGUES, T.S.; GUIMARÃES, S. F.; RODRIGUES-DAS-DÔRES, R. G.; GABRIEL, J.V. Métodos de secagem e rendimento dos extratos de folhas de *Plectranthus barbatus* (boldo-da-terra) e *P. ornatus* (boldo-miúdo). **Revista Brasileira de plantas medicinais**, v.13, n.spe, p. 587-590, 2011.

ROSA, C.; CÂMARA, S. G.; BÉRIA, J. U. Representações e intenção de uso da fitoterapia na atenção básica à saúde. **Ciências & Saúde Coletiva**, v.16, n. 1, p. 311-318, 2011.

ROSLAND, J. H.; TJØSLESEN, A.; MAEHLE, B.; HOLE, K. The formalin test in mice: effect of formalin concentration. **Pain**, v. 42, p. 235-242, 1990.

SAITO, H.; LAI, J.; ROGERS, C. M.; DOERSCHUCK, C. M. Mechanical properties of rat bone marrow and circulating neutrophils and their response to inflammatory mediators. **Blood**, v. 99, p. 2207-2213, 2002.

SALEEM, T.S.M.; BASHA, S.D.; MAHESH, G.; RANI, P.V.; KUMAR, N.S.; CHETTY, C.M. Analgesic, anti-pyretic and anti-inflammatory activity of dietary sesame oil in experimental animal models. **Pharmacologia**, v. 2, n. 6, p. 172-177, 2011.

SALLUM, A. M. C.; GARCIA, D. M.; SANCHES, M. Acute and chronic pain: a narrative review of the literature. **Acta Paulista de Enfermagem.**, São Paulo , v. 25, p. 150-154, 2012.

SANDKÜHLER, J. Models and mechanisms of hyperalgesia and allodynia. **Physiological Reviews**, v. 89, n. 2, p. 707-758, 2009.

SCHIFFLER, M. A.; CHANDRASEKHAR, S.; FISHER, M. J.; HARVEY, A.; KUKLISH, S. L.; WANG, X.S.; WARSHAWSKY, A. M.; YORK, J.S.; YU, X. P. Discovery and characterization of a potent and selective EP4 receptor antagonist. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 25, n. 16, p. 3176-3178, 2015.

SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. Can we conquer pain? **Nature Neuroscience**, v. 5 Suppl, p. 1062-1067, 2002.

SHAJIB, M. S.; KHAN, W. I. The role of serotonin and its receptors in activation of immune responses and inflammation. **Acta Physiologica**, v. 213, p. 561-574, 2014.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best practice & research. Clinical anaesthesiology**, v. 18, n. 3, p. 385-405, 2004.

SHIBATA, M.; OHBUBO, T.; TAKAHASHI, H.; INOKI, R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. **Pain**, v. 38, p. 347-352, 1989.

SHOJAII, A.; MOTAGHINEJAD, M.; NOROUZI, S.; MOTEVALIAN, M. Evaluation of Anti-inflammatory and Analgesic Activity of the Extract and Fractions of *Astragalus hamosus* in Animal Models. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**. v.14, n. 1, p 263-269, 2015.

SIKANDAR, S.; H DICKENSON, A. Visceral Pain – the Ins and Outs, the Ups and Downs. **Curr Opin Support Palliat Care**, v. 6, n. 1, p. 17-26. 2012.

SILVA, J. C., LIMA-SARAIVA, S. R. G., OLIVEIRA-JÚNIOR, R. G., & ALMEIDA, J. Modelos experimentais para avaliação da atividade antinociceptiva de produtos naturais: uma revisão. **Brazilian Journal of Pharmacy**, v. 94, p18-23, 2013.

SILVA, M. R.; LEME, J. G. Chemical mediators of the acute inflammatory reaction. In:_____ International series of Monographs in Pure and Applied Biology. **Modern Trends in Physiological Sciences**, v. 37, p. 1-47, 2006.

SILVA, V. C. **Estudo químico e biológico de espécies de Rubiaceae**. Araraquara, 2007. 330f. Tese (doutorado em química do Instituto de Química) - Universidade Estadual Paulista.

SILVEIRA, P.F.; BANDEIRA, M.A.M; ARRAIS, P.S.D. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18(4): 618-626. 2008.

SOARES JÚNIOR, D. T.; CAMPOS A. C.; DUTRA R. C.; BARBOSA N. R.; SOUSA O. V. **Efeito do extrato metanólico de *Posoqueria acutifolia* Mart. (Rubiaceae) sobre o edema de pata e a migração leucocitária induzida em ratos**. XIV Congresso Paulista de Farmacêuticos e VI Seminário Internacional de Farmacêuticos. São Paulo: Conselho Regional de Farmácia de São Paulo; 2005. p. 88-9.

SOUSA, F. C. F.; MELO, C. T. V.; CITÓ, M. C. O.; FÉLIX, F. H. C.; VASCONCELOS, S. M. M.; FONTELES, M. M. F.; FILHO, J. M. B.; VIANA, G. S. B. Plantas medicinais e seus constituintes bioativos: Uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 642-654. 2008.

SOUSA, O. V.; DEL-VECHIO-VIEIRA, G.; ALMEIDA, B. H.; MIRANDA, M. A.; FILGUEIRAS, R. C.; CAMPOS, A. C.; SILVÉRIO, M. S.; Efeitos farmacológicos e toxicológicos do extrato de *Posoqueria acutifolia* Mart. (Rubiaceae) em roedores. **Revista de Ciências Farmacêutica Básica e Aplicada**, v. 28, n.1, p.51-56, 2007.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrativo para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II**. Editora Plantarum: Nova Odessa, 2008. 703 p.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática. Guia Ilustrado para identificação das Famílias de Angiospermas da Flora Brasileira baseado em APG III**. 2. ed, São Paulo: Editora Plantarum. 2012. 569-588 p.

SOUZA, R. K. D; MENDONÇA, A. C. A. M; DA SILVA, M. A. P. Aspectos etnobotânicos, fitoquímicos e farmacológicos de espécies de Rubiaceae no Brasil. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v.18, n.1, p. 140-156, 2013.

STEHMANN, J. R. (Coord.). **Endemismos de Plantas Vasculares na Mata Atlântica: Rubiaceae**. Minas Gerais: Universidade Federal de Minas Gerais, 2008;

TAÏWE, G. S.; BUM, E. N.; TALLA, E.; DIMO, T.; DAWE, A.; SINNIGER, V.; BONAZ, B.; BOUMENDJEL, A.; DE WAARD, M. *Nauclea latifolia* Smith (Rubiaceae) exerts antinociceptive effects in neuropathic pain induced by chronic constriction injury of the sciatic nerve. **Journal of Ethnopharmacology**, v.151, n. 1, p.445-451, 2014.

TAYLOR, C. M.; CAMPOS, M. T. V. A.; ZAPPI, D. Flora da Reserva Ducke, Amazonas, Brasil: Rubiaceae. **Rodriguésia**, v. 58, n. 3, p.549-616, 2007.

TAYLOR, L. **The healing Power of rainforest herbs: a guide to understanding and using herbal medicinal**. Paperback, November, 2005. Disponível em: http://rain-tree.com/mulaterio.htm#.VPFCTaNv_fo. Acesso em: 06 out. 2014.

TJØLSEN, 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.

TREEDE, R. D.; MEYE, R. A.; RAJA, S.N.; CAMPBELL, J. N.. Peripheral and central mechanisms of cutaneous hyperalgesia. **Progress in Neurobiology**, v. 38, n. 4, p. 397-421, 1992.

USTULIN, M.; FIGUEIREDO, B. B.; TREMEA, C.; POTT, A.; POTT, V. J.; BUENO, N. R.; CASTILHO, R. O. Plantas medicinais comercializadas no mercado municipal de Campo Grande-MS. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 3, p. 805-813, 2009.

VARGAS, F. S. **Estudo comparativo entre técnicas para avaliação de atividades antioxidantes de espécies de plantas da Amazônia**. Manaus, 2008. 103f. Dissertação (Mestrado em Patologia Tropical) - Universidade Federal do Amazonas.

VERMA, P. R.; JOHARAPURKAR, A. A.; VIVEKANAND A. C.; ASNANI, A. J. Antinociceptive activity of alcoholic extract of *Hemidesmus indicus* R.Br. in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 102, p. 298–301, 2005.

VERRI, W. A.; CUNHA, T. M.; PARADA, C. A.; POOLE, S.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: Targets for analgesic drug development? **Pharmacology & Therapeutics**, v. 112, p.116–138, 2006.

VANEGAS, H. E. SCHAIBLE, H.G. Prostaglandins and cyclooxygenases in the spinal cord. **Prog. Neurobiol.**, 64(4): 327-363, 2001.

VITOR, A. O.; DA PONTE, E. L.; SOARES, P. M.; CARVALHO, K. D. M.; RODRIGUES, M. E. de S.; PATROCÍNIO, M. C. A.; LIMA, R. C. de S.; DE VASCONCELOS, S. M. M. Psicofisiologia da dor: uma revisão bibliográfica. **Revista Eletrônica de Comunicação, Informação & Inovação em Saúde**, v. 2, n. 1, p.87-96, 2008.

WENJING, Z.; MINGQUN, P.; LIU-YI, D.; XUEIYNG, H.; SHUANGMIAO, W.; LANLAN, Z. Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of iridoid glycosides from *Paederia scandens* (LOUR.) MERRILL (Rubiaceae) on uric acid nephropathy rats. **Life Sciences**, v. 91, n. 11, p. 369-376, 2012.

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

WHO. Guidelines on the pharmacological treatment of persisting pain in children with medical illnesses. **World Health Organization**, p. 1-167. 2012.

WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS G. W. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. **Proceedings of The Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 111, p. 544-547, 1962.

WILLIS, W. D.; WESTLUND, K. N. Neuroanatomy of the pain system that modulate pain. **Journal of Clinical Neurophysiology**, v. 14, p. 2-31, 1997.

WOOLFE, G.; MACDONALD, A. D. The evaluation of the analgesic action of pethidinehydroclorie . **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 80, p. 300-307,1944.

VALADARES, M. C. **Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “era do teste dl50”**. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 93-98, 2006.

ZHANG, B.; LI, J-B.; ZHANG, D-M.; DING, Y.; DU, G-H. Analgesic and Anti-inflammatory Activities of a Fraction Rich in Gaultherin Isolated from *Gaultheria yunnanensis* (FRANCH.) REHDER. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n.3, p. 465-469, 2007.

ZEILHOFER, H. U. Prostanoids in nociception and pain. **Biochemical Pharmacology**, v. 73, p. 165-174, 2007.

ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. S. **Aroma de flores na Amazônia**. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi, 2000. 240p.

ZULETA, L. M. C.; CAVALHEIRO, A. J.; SILVA, D. H. S.; FURLANA, M.; YOUNG, M. C. M.; ALBUQUERQUE, S.; CASTRO-GAMBOA, I.; BOLZANI, V. S. Seco-Iridoids from *Calycophyllum spruceanum* (Rubiaceae). **Phytochemistry**, v. 64, n. 2, p. 549-553, 2003.