



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA E

QUÍMICA MEDICINAL

Análise fitoquímica e farmacológica da
Tibouchina granulosa.

CAROLINA CARVALHO GUILHON

RIO DE JANEIRO

2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

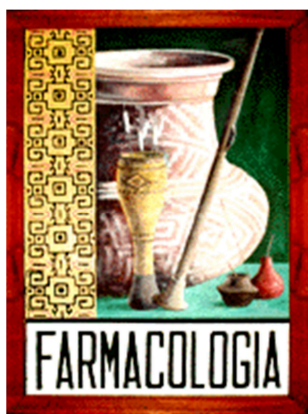
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA E

QUÍMICA MEDICINAL

Análise fitoquímica e farmacológica da *Tibouchina granulosa.*

CAROLINA CARVALHO GUILHON



Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Farmacologia e Química Medicinal), do Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, visando à obtenção do grau de mestre em Ciências Biológicas (Farmacologia e Química Medicinal).

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Dias Fernandes

Co-orientador: Prof. Dr. Fabio Boylan

RIO DE JANEIRO

Março de 2015

Análise fitoquímica e farmacológica da *Tibouchina granulosa*.

Carolina Carvalho Guilhon

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Dias Fernandes

Co-orientador: Prof. Dr. Fabio Boylan

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal, Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Farmacologia).

Aprovada por:

Prof. Dr. Paulo de Assis Melo

Prof. Dra. Cláudia Lúcia Martins da Silva

Profa. Dra. Claudia Moraes de Rezende

Profa. Dra. Maria Eline Matheus (Revisora)

Profa. Dra. Patrícia Dias Fernandes (Orientadora)

RIO DE JANEIRO
Março de 2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Guilhon, Carolina Carvalho

Análise fitoquímica e farmacológica da *Tibouchina granulosa*./ Carolina Carvalho Guilhon. – Rio de Janeiro: UFRJ, ICB – PPGFQM, 2015.

xvii, 106 f.:il; 31 cm

Orientadora: Patrícia Dias Fernandes

Co-orientador: Fabio Boylan

Dissertação (Mestrado), UFRJ, ICB, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal, 2015.

Referências Bibliográficas: f 91

1. *T. granulosa*
2. Dor
3. Inflamação
4. Atividade anti-inflamatória.
5. Atividade antinociceptiva. I. Fernandes, Patrícia Dias. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Biomédicas, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai e minha mãe, que estiveram sempre ao meu lado. Meus exemplos de força, bondade e sabedoria, que me apoiaram em todos os momentos para chegar até aqui. Sem a confiança e o apoio de vocês eu nada seria. Muito obrigada.

Às minhas irmãs e meus lindos sobrinhos, sempre ao meu redor, torcendo e apoiando. Vocês me aconselham e me estimulam para que eu continue crescendo e amadurecendo.

À professora Patricia Dias, a quem palavras nunca serão suficientes para agradecer. Além de acreditar no meu trabalho, foi a maior incentivadora para que tudo fosse possível. Muito obrigada, espero que eu consiga retribuir tudo o que você fez e tem feito por mim com o meu trabalho.

Ao professor Fabio Boylan, por ter me recebido e guiado em seu laboratório no Trinity College Dublin. Uma parte do trabalho só foi possível graças a sua paciência e atenção.

Aos alunos do laboratório de Farmacologia da Dor e Inflamação que compartilham do dia a dia comigo: Fabiana, Andrea, Natália, Thaís, Gabriella, Larissa (que me acompanha desde a época de iniciação científica), Jorge, Patricia, Thais, Milena, Thayná. Obrigada pela companhia, ajuda e pelo ótimo ambiente de trabalho.

Ao técnico e grande amigo Alan, que não poupou esforços para ajudar na realização deste e de outros trabalhos. Espero que a nossa parceria seja eterna. Muito obrigada.

Às amigas de fora do laboratório que estão sempre me apoiando. Não importa se perto ou longe, sei que sempre poderei contar com vocês.

Aos professores Paulo Melo, Cláudia Martins e Claudia Rezende pela participação na Banca Examinadora.

À professora Eline Matheus pelas contribuições, paciência e atenção durante a revisão deste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal, por terem contribuído para a minha formação.

À todos os funcionários da Farmacologia.

Ao instituto Vital Brazil pela doação dos animais.

Às Agências de Fomento (CAPES, CNPq e FAPERJ) pelo apoio financeiro concedido como bolsa de pesquisa ou auxílio financeiro ao Laboratório.

RESUMO

Análise fitoquímica e farmacológica da *Tibouchina granulosa*.

Carolina Carvalho Guilhon

Orientadora: Dra. Patrícia Dias Fernandes.

Co-orientador: Dr. Fabio Boylan.

Resumo da dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal, Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Tibouchina granulosa pertence à família Melastomataceae e é vastamente distribuída em regiões de mata atlântica no Brasil. *T. granulosa* é popularmente conhecida como ‘quaresmeira’ e é comumente usada como planta ornamental. Algumas espécies do gênero são usadas na medicina veterinária, observações pessoais indicam que o chá das folhas apresenta efeito cicatrizante, no entanto, não há comprovação científica que suporte tal aplicação.

As metodologias aplicadas para este trabalho incluíram a preparação de secções anatômicas e as suas descrições; extração, isolamento e purificação de substâncias e elucidação estrutural das mesmas; quantificação do composto isolado e composição fitoquímica através de cromatografias e, por fim, ensaios farmacológicos do extrato etanólico e das frações em hexano, diclorometano e acetato de etila, provenientes das folhas de *Tibouchina granulosa*.

Os resultados da análise anatômica estão alinhados com as principais características dos vegetais pertencentes a família Melastomataceae.

As análises fitoquímicas da fração em acetato de etila das folhas de *Tibouchina granulosa* levaram ao isolamento e identificação da hispidulina-7-O- β -D-glicosídeo, isolada através de coluna cromatográfica com sílica gel, este flavonoide foi então quantificado através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) na fração em acetato de etila. A técnica de cromatografia gasosa com fase gasosa acoplada a espectroscopia de massas resultou na identificação de α e β amirina e γ -sitosterol na fração em hexano e estigmasterol na fração em diclorometano.

O extrato etanólico provenientes das folhas de *T. granulosa* e todas as frações foram testadas para avaliar os seus potenciais anti-inflamatórios, através do teste da formalina e do modelo da BAS (incluindo quantificação de citocinas, óxido nítrico e proteínas), e suas atividades antinociceptivas através do teste da placa quente e pelos modelos da lambadura de pata induzida por capsaicina e glutamato.

O extrato etanólico e as frações apresentaram potencial efeito anti-inflamatório e atividade antinociceptiva, além disso, a análise fitoquímica confirma que a composição química das folhas pode ser responsável por essas atividades.

Palavras-chave: 1. *T. granulosa* 2. Dor 3. Inflamação 4. Atividade antinociceptiva. 5. Atividade anti-inflamatória

**Rio de Janeiro
Março de 2015**

ABSTRACT

Tibouchina granulosa belongs to the Melastomataceae family which is widely distributed in atlantic forest regions in Brazil. *T. granulosa* is popularly known as 'quaresmeira' and is commonly used as an ornamental plant. Some species of the genus are used in popular vet medicine, personal observations indicate that teas from the leaves present a significant wound healing effect, however, there are no scientific data that support these applications.

The methodology designed for this study included the preparation of anatomic sections and their description, extraction, isolation and purification of substances, structural elucidation, chromatography, and pharmacological assays based on the crude ethanol extract and the hexane, dichloromethane and ethyl acetate fractions of *Tibouchina granulosa* leaves.

The results of the anatomical study are aligned with the main characteristics for plants belonging to the Melastomataceae family.

The phytochemical analysis of the ethyl acetate fraction of *Tibouchina granulosa* leaves led to the isolation and identification of hispidulin-7-O- β -D-glucoside, isolated from the column chromatography using silica, this flavonoid was then quantified using high performance liquid chromatography (HPLC) in ethyl acetate fraction. The gas chromatography/ mass spectrometry technique led to the identification of α and β amirin and γ -sitosterol in the hexane fraction and stigmaterol in the dichloromethane fraction.

Ethanol extract of the leaves of *T. granulosa* and all the fractions were assayed for their anti-inflammatory potential, using formalin test and SAP (including quantification of cytokines, nitric oxide and proteins), and antinociceptive activity by displaying the hot plate test and capsaicin and glutamate-induced foot licking models.

The ethanol extract and the fractions presented anti-inflammatory potential and antinociceptive activity, and the phytochemical analysis confirm that the chemical composition of the leaves could be responsible for their activity.

Keywords: 1. *T. granulosa* 2. Pain 3. Inflammation 4. Antinociceptive activity. 5. Anti-inflammatory activity.

SUMÁRIO

Lista de Figuras -----	xiii
Lista de Tabelas -----	xiii
Lista de Esquemas -----	xiii
Lista de Gráficos -----	xiv
Lista de Conjuntos -----	xiv
Lista de Abreviaturas -----	xv

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Produtos Naturais	2
1.2. <i>Tibouchina granulosa</i> , do uso popular à experimentação	3
1.2.1. Compostos de interesse encontrados na <i>T. granulosa</i>	4
1.3. Dor e nocicepção	8
1.3.1. Envolvimento dos sistemas opioide e vaniloide na dor	11
1.3.2 Glutamato	12
1.4. Inflamação	13
1.4.1. Mediadores do processo inflamatório	14
1.4.2. Eventos vasculares – Permeabilidade vascular e exsudação	17
1.4.3. Eventos celulares	18
1.4.4. Envolvimento do oxido nítrico (NO) na inflamação	21
1.4.5. Citocinas	22
1.4.6. Finalização do processo inflamatório	23
2. OBJETIVOS	24
2.1. Objetivo geral	25
2.2. Objetivos específicos	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1. Material Vegetal	27
3.2. Materiais sintéticos	28
3.3. Preparo dos reagentes e soluções	30
3.4. Animais	32
3.5. Estudos Fitoquímicos com a <i>Tibouchina granulosa</i>	33
3.5.1. Cromatografia em coluna em sílica	33
3.5.2. Placas de Cromatografia em Camada Delgada	34

3.5.3. Análise das amostras por Ressonância Magnética Nuclear -----	34
3.5.4. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) -----	35
3.5.5. Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM) -----	36
3.5.6. Anatomia Vegetal -----	37
3.6. Estudos farmacológicos da <i>Tibouchina granulosa</i> -----	37
3.6.1. Modelo da placa quente -----	37
3.6.2. Modelo da lambedura de pata induzida pela capsaicina -----	39
3.6.3. Modelo da lambedura de pata induzida por glutamato -----	39
3.6.4. Modelo da lambedura de pata induzida pela formalina -----	40
3.6.5. Modelo da migração celular induzida por carragenina (Bolsa de ar subcutânea) -----	41
3.6.6. Quantificação de citocinas e proteínas -----	43
3.6.7. Quantificação de nitrato -----	44
3.6.8. Análise Estatística -----	45
4. RESULTADOS -----	46
4.1. Resultados em fitoquímica -----	47
4.1.1. Isolamento do flavonoide hispidulina por cromatografia em coluna---	47
4.1.2. Elucidação estrutural do composto X por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) -----	48
4.1.3. Dosagem de hispidulina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) -----	53
4.1.4. Investigação da composição das frações em hexano, diclorometano e acetato de etila utilizando cromatografia com fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) -----	55
4.1.5. Anatomia Vegetal -----	59
4.2. Resultados em farmacologia -----	61
4.2.1. Efeito do EE e suas frações no modelo da placa quente -----	61
4.2.2. Efeito do EE e suas frações no modelo de nocicepção induzida pela	

injeção intraplantar de capsaicina -----	64
4.2.3. Efeito do EE e suas frações no modelo de nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato -----	65
4.2.4. Efeito do EE e suas frações no modelo da lambadura de pata induzida pela formalina -----	67
4.2.5. Efeito do EE e suas frações no modelo inflamatório de migração celular – BAS -----	68
4.2.5.1. Quantificação de leucócitos totais -----	69
4.2.5.2. Dosagem de citocinas (TNF- α , IL-1 β , IFN- γ) -----	71
4.2.5.3. Quantificação de óxido nítrico (NO) -----	74
4.2.5.4. Dosagem de proteínas -----	76
5. DISCUSSÃO -----	79
6. CONCLUSÕES -----	89
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	91
8. ANEXOS -----	104

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Árvore (A), flores e folhas (B) da <i>Tibouchina granulosa</i> -----	4
Figura 2: Estrutura geral dos flavonoides -----	5
Figura 3: Estrutura geral de uma flavona -----	6
Figura 4: Estrutura da α -amirina e da β -amirina -----	6
Figura 5: Fase inicial de condução da dor -----	9
Figura 6: Representação do mecanismo de rolamento, aderência, diapedese e quimiotaxia dos neutrófilos -----	20
Figura 7: Placas de CCD das frações 114 a 120 e 122 a 128 -----	48
Figura 8: Composto X ou ‘Hispidulina 7-O- β -D-glicosídeo’ -----	49
Figura 9: Espectro de RMN de ^1H do composto X -----	50
Figura 10: Expansão do espectro de RMN de ^1H do composto X ($\delta 6.7$ a $\delta 8.0$)-----	50
Figura 11: Expansão do espectro de RMN de ^1H do composto X ($\delta 2.5$ a $\delta 6.5$) -----	51
Figura 12: Espectro de RMN de ^{13}C do composto X -----	52
Figura 13: Análise da fração em acetato de etila pelo método de CLAE -----	54
Figura 14: Corte longitudinal da folha de <i>T. granulosa</i> -----	60
Figura 15: Focos de Amido -----	60
Figura 16: Tricomas -----	60
Figura 17: Cristais de oxalato de cálcio -----	61
Figura 18: Compostos fenólicos em menor aumento -----	61
Figura 19: Compostos fenólicos em maior aumento -----	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados observados nos RMNs de ^{13}C e ^1H , para a substância X, comparados com os dados observados na literatura -----	53
--	----

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Preparação do extrato etanólico e suas frações a partir das folhas da <i>Tibouchina granulosa</i> -----	28
Esquema 2: Ilustração do CLAE -----	36
Esquema 3: Protocolo do modelo da placa quente -----	38

Esquema 4: Protocolo da nocicepção induzida por capsaicina -----	39
Esquema 5: Protocolo da nocicepção induzida por glutamato -----	40
Esquema 6: Protocolo modelo da lambadura de pata induzida por formalina -----	41
Esquema 7: Protocolo bolsa de ar subcutânea -----	43

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Curva de calibração para o flavonoide Hispidulina 7-O- β -D-glicosídeo ----	54
Gráfico 2: Efeito do Extrato Etanólico e das frações em H, DCM e AE no modelo da placa quente -----	63
Gráfico 3: Efeito do EE e suas frações em H, DCM e AE no modelo de nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina -----	65
Gráfico 4: Efeito do EE e suas frações em H, DCM e AE no modelo de nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato -----	66
Gráfico 5: Efeito do EE, fH, fDCM e fAE No modelo da lambadura de pata induzida pela formalina -----	68
Gráfico 6: Efeito do EE, e as frações H, DCM e AE na migração celular induzida por carragenina na BAS -----	70
Gráfico 7: Efeito do EE, fH, fDCM e fAE na produção de TNF- α induzida por carragenina na BAS -----	72
Gráfico 8: Efeito do EE, fH, fDCM e fAE na produção de IL-1 β induzida por carragenina na BAS -----	73
Gráfico 9: Efeito do EE, fH, fDCM e fAE na produção de IFN- γ induzida por carragenina na BAS -----	74
Gráfico 10: Efeito do EE, fH, fDCM e fAE na produção de NO induzida por carragenina na BAS -----	76
Gráfico 11: Efeito do EE, fH, fDCM e fAE no extravasamento de proteínas plasmáticas induzida por carragenina na BAS -----	78

LISTA DE CONJUNTOS

Conjunto 1: Cromatogramas e tabela sugerindo os componentes da fração em hexano -----	56
Conjunto 2: Cromatogramas e tabela sugerindo os componentes da fração em diclorometano -----	58
Conjunto 3: Cromatograma e tabela sugerindo os componentes da fração em acetato de etila -----	59

LISTA DE ABREVIATURAS

μl	Microlitro
μg	Micrograma
μM	Micro molar
5-HT	Serotonina
a.C.	antes de Cristo
AA	Ácido araquidônico
AAS	Ácido acetilsalicílico
AcOEt	Acetato de etila
AIEs	Anti-inflamatórios esteroidais
AINES	Anti-inflamatórios não esteroidais
AMPA	Ácido α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico
AMPc	Adenosine monofostato cíclica
ANOVA	Análise de variância
ASC	Área sob a curva
BAS	Bolsa de ar subcutânea
BCA	Ácido bicinconínico
BK	Bradicinina
BSA	Albumina bovina sérica
Ca²⁺	Cálcio
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada
CG/EM	Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
COX	Ciclo-oxigenase
CSF	Fator estimulador de colônia
d.p.	Desvio padrão
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO-d6	Dimetilsulfóxido deuterado
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EE	Extrato etanólico
ELISA	Ensaio imunoenzimático
ELL	Extração líquido-líquido
eNOS	Oxido nítrico sintase endotelial
fAE	Fração em acetato de etila
fDCM	Fração em diclorometano
FE	Fase estacionária
fH	Fração em hexano
FLA₂	Fosfolipase A ₂
g	Gramas
G_i	Proteína G inibitória

GMPC	Guanosina monofosfato cíclica
H₂O	Água
H₃PO₄	Ácido fosfórico
He	Hélio
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i>
Hz	Hertz
IASP	Associação Internacional para o estudo da dor
ICAM-1	Molécula de adesão intracelular 1
IFN-γ	Interferon γ
Ig	Imunoglobulina
iGlu	Receptores ionotrópicos glutamatérgicos
IL-1β	Interleucina 1 β
IL-8	Interleucina 8
ILs	Interleucinas
i.p.	Intraperitoneal
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
K⁺	Potássio
KA	Ácido caínico
KH₂PO₄	Fosfato monopotássico
L-NAME	<i>L-NG-nitro-arginine methyl ester</i>
LOX	Lipoxigenases
LTs	Leucotrienos
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos-1
MeOH	Metanol
mg	Miligrama
mGlu	Receptores metabotrópicos glutamatérgicos
ml	Mililitro
Na₂CO₃	Carbonato de sódio
Na₂HPO₄	Fosfato dissódico
NaCl	Cloreto de sódio
NaHCO₃	Bicarbonato de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NF-κB	Fator nuclear κ B
NMDA	N-metil-D-aspartato
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Oxido nítrico sintase
PAF	Fator de ativação plaquetário
PBS	Tampão fosfato salina
PGI₂	Prostaciclina
pg	Picograma
PGs	Prostaglandina
PKA	Proteína quinase A
PMN	Polimorfonucleares

q.s.p	Quantidade suficiente para
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN ¹H	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio
RMN ¹³C	Ressonância Magnética Nuclear de carbono 13
SP	Substância P
<i>T. granulosa</i>	<i>Tibouchina granulosa</i>
TMB	Tetra-metil-dihidrocloro de benzidina
TNF-α	Fator de necrose tumoral α
t_r	Tempo de retenção
TRPV1	<i>Transient receptor potential cation channel subfamily V member 1</i>
TXA₂	Tromboxano A ₂
TXs	Tromboxanos
VCAM-1	Molécula de adesão de célula vascular
v.o.	via oral
WHO	<i>World Health Organization</i>

1. Introdução

1.1. Produtos Naturais

Historicamente, os produtos de origem natural vêm sendo usados como terapia medicinal há séculos. A população busca na natureza o subsídio para suas necessidades básicas, incluindo o tratamento medicamentoso (Dias e cols., 2012).

Os primeiros relatos do uso de medicamentos provenientes da natureza têm origem na Mesopotâmia e datam de 2600 a.C., os quais documentam o uso dos óleos de *Cupressus sempervirens* e *Commiphora* que eram, e ainda são, usados atualmente, no tratamento de resfriados, tosse e inflamação. No entanto, o documento mais conhecido sobre o tema é de origem egípcia, o “*Ebers Papyrus*”, e retrata mais de setecentas preparações, que tinham como base algum componente de origem vegetal. Essas preparações variam de gargarejos, pílulas, infusões até pomadas (Dias e cols., 2012).

Os produtos terapêuticos naturais e seus metabólitos secundários têm sido a fonte mais bem sucedida para a origem de novos fármacos. Levando em consideração que menos de 10% da biodiversidade do mundo foi testada para uma potencial atividade biológica, muitos compostos de origem natural ainda esperam para serem descobertos e isto se torna um desafio tendo como base a diversidade química que ainda precisa ser acessada (Dias e cols., 2012).

O uso de produtos naturais como medicamentos é descrito ao longo da história como “medicina tradicional”, “poções” ou “óleos”, porém muitos dos componentes naturais bioativos continuavam não identificados. A principal fonte de conhecimento para o uso desses produtos naturais se dava pela experimentação humana, através de tentativas e erros, por centenas de séculos (Dias e cols., 2012).

Devido a casos de toxicidade e efeitos adversos, observados quando são administrados produtos de origem natural, e a fim de aumentar a compreensão sobre os efeitos dos mesmos, pesquisas baseadas neste tema são fundamentais, não só para desvendar novas rotas de obtenção de fármacos, mas também para elucidar a composição, mecanismo de ação e efeitos

colaterais destes produtos naturais. De acordo com a *World Health Organization* (WHO), 65% da população mundial se tratam com medicamentos de origem natural e acreditam ser este o melhor caminho para a cura de diversas doenças (Cragg, 2013).

1.2. *Tibouchina granulosa*, do uso popular à experimentação

O gênero *Tibouchina*, pertencente à família Melastomatacea, possui dezenas de espécies ornamentais, do tipo arbustos, herbáceas ou arbóreas e ocorrem tanto em campos e brejos, como em bordas de mata (Joly, 1993). Alguns trabalhos já descreveram atividades antinociceptiva, anti-inflamatória e antioxidante para outras espécies pertencentes a esta família, tais como as espécies, *Osbeckia parvifolia* Arn. e *Clidemia rubra* Mart. (Murugan e Parimelazhagan, 2013; Gordon e cols., 2011).

A *T. granulosa*, popular quaresmeira, é uma árvore de até 12 metros de altura, cujas flores violáceas (figura 1) surgem entre fevereiro e março. Alguns trabalhos já publicados sobre o gênero *Tibouchina*, e a família a qual pertence, descrevem fitocomponentes como as antocianinas (Bobbio e cols., 1985; Lowry, 1975). Estes mesmos trabalhos relatam a presença de antocianinas nas flores da *T. granulosa*, as quais parecem estar correlacionadas ao pigmento que confere as cores das flores desta espécie (Francis e cols., 1982). As antocianinas são componentes do grupo dos flavonoides, estão amplamente distribuídas na natureza, constituem uma fração não energética da dieta do ser humano e estão relacionadas a importantes atividades biológicas. Seus efeitos benéficos em relação à nutrição e saúde estão relacionados às suas propriedades antioxidantes, pois são sequestradoras diretas de radicais livres e desta forma, desempenham um papel importante na prevenção de doenças cardiovasculares, modulação da inflamação, inibição da agregação plaquetária, prevenção do câncer e de sua progressão (Volp e cols., 2007).

Apesar de a espécie em questão ser facilmente encontrada nas regiões de mata Atlântica do Brasil, apenas um trabalho foi publicado sobre ela, neste trabalho, Zampieri e colaboradores (2013) descreveram a *T. granulosa* como um biomarcador de poluição e tentaram explicar, anatomicamente, como esta árvore pode proteger o ambiente de materiais particulados.

Dessa forma, no que diz respeito à farmacologia e à fitoquímica desta espécie, ainda há bastante a se pesquisar. Foi com o intuito de desenvolver um projeto que analisasse as possíveis atividades antinociceptiva e anti-inflamatória, e como a elucidação da composição fitoquímica e da anatomia vegetal desta planta poderiam ajudar a reiterar essas atividades, que o projeto em questão foi desenvolvido.

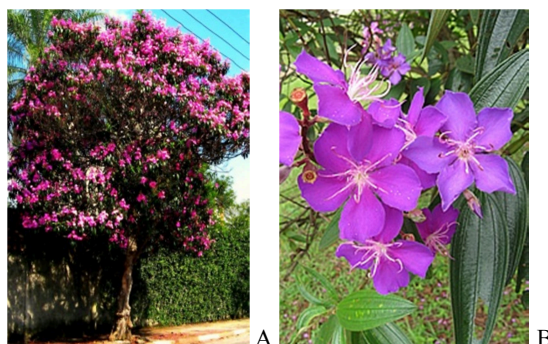


Figura 1: Estão representados, respectivamente, A) árvore e B) flores e folhas da *Tibouchina granulosa* (fotografias retiradas do site www.google.com).

1.2.1. Levantamento bibliográfico da *T. granulosa*

Os flavonoides são compostos polifenólicos (figura 2) encontrados em organismos provenientes da natureza, tais como frutas e vegetais. São metabólitos secundários destes organismos e se apresentam de maneira ubíqua na natureza, podendo ser classificados como: flavonóis, flavonas, flavanonas, catequinas, antocianinas, isoflavonas e chalconas (Pal e Verma, 2013).

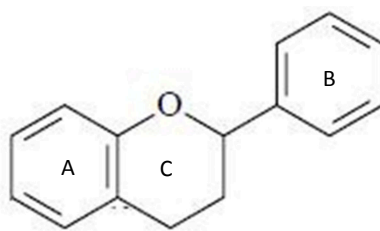


Figura 2: Estrutura geral dos flavonoides. Fonte: Martínez e cols., 2002.

As maiores fontes naturais de flavonoides são frutas cítricas, *berries*, cebolas, salsa, leguminosas e chá verde. Mais especificamente, as antocianinas, citadas anteriormente, são mais encontradas nas frutas denominadas *berries*, e normalmente conferem a pigmentação característica desses produtos. As flavonas ocorrem em sua maioria em maçãs e chás, as flavanonas em frutas cítricas e as isoflavonas em produtos de soja (Pal e Verma, 2013).

Os flavonoides receberam o nome de “modificadores biológicos” devido à habilidade que eles possuem de modificar as reações a estresses nos sistemas biológicos. As reações a alérgenos, carcinógenos ou viroses se tornam mais brandas, tornando o organismo mais resistente a qualquer ameaça. Por isso, eles têm sido descritos como anti-inflamatórios, antialérgicos, anticarcinogênicos, antioxidantes e antivirais (Cook, 1996; Świgło e cols., 2003).

Estudos epidemiológicos mostraram que o consumo de flavonoides está inversamente relacionado com o aumento da mortalidade por doença cardiovascular e incidência de ataques cardíacos. Reiterando a observação dos estudos epidemiológicos, alguns trabalhos demonstraram que flavonoides encontrados em frutas e vegetais agem como potentes antioxidantes, correlacionando desta maneira o caráter cardioprotetor (Knekt e cols., 1996; Volp e cols., 2007).

O grupo de flavonoides de interesse para esse trabalho são as flavonas, mais especificamente, um derivado de quercetina, a hispidulina. As quercetinas são componentes do grupo das flavonas (Volp e cols.), cuja estrutura geral pode ser observada na figura 3.

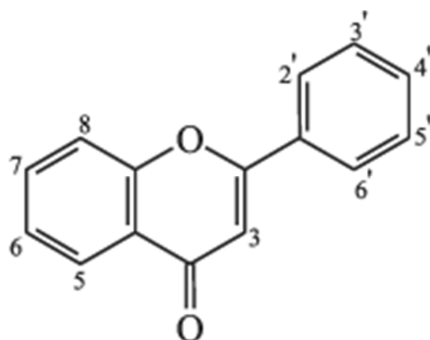


Figura 3: Estrutura geral de uma flavona (Volp e cols., 2007).

A hispidulina já foi descrita como hepatoprotetora (Férrandiz e cols., 1994), antioxidante (Sadasivam e Kumaresan, 2010), inibidora da liberação de glutamato no córtex de ratos (Lin e cols., 2012), inibidora da osteoclastogênese e da reabsorção óssea (Nepal e cols., 2013) e, por fim, aparenta possuir propriedades antitumorais (Gao e cols., 2014). No entanto, efeitos anti-inflamatório e/ou antinociceptivo ainda não foram associados à mesma.

Outra classe de compostos relevantes para este trabalho são as amirinas. Designadas como triterpenos, elas podem se apresentar como α -amirina e β -amirina (figura 4) e são encontradas em diversas espécies vegetais (Oliveira e cols., 2004).

Os triterpenoides são constituintes que têm despertado um grande interesse nos últimos anos em razão da descoberta do seu potencial farmacológico, com inúmeras atividades terapêuticas, tais como: anticancerígenas, anti-inflamatórias, antilepróticas, antivirais, antibacterianas, antifúngicas, antidiuréticas, giardicidas e inibidoras da enzima acetilcolinesterase (Bandeira e cols., 2007).

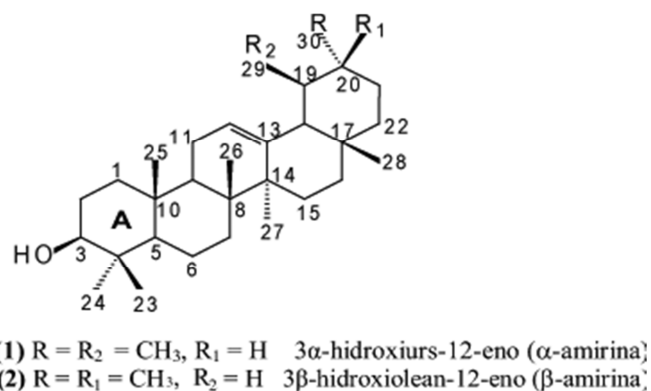


Figura 4: Estrutura da α -amirina e da β -amirina (Bandeira e cols., 2007).

Estudos anteriores já demonstraram que a α -amirina possui efeitos antinociceptivo, anti-inflamatório, hepatoprotetor e propriedades gastroprotetoras quando avaliada *in vivo* (Kweifio-Okai e cols., 1994; Recio e cols., 1995; Oliveira e cols., 2004a,b). Outro efeito associado à α -amirina, quando usada topicamente, é a capacidade de reduzir significativamente três eventos importantes relacionados à inflamação da pele, seriam eles: formação de edema, migração de leucócitos e produção da citocina IL-1 β (Otuki e cols., 2005a). Além disso, a mistura α β -amirina produz significativa antinocicepção periférica, espinhal e supraespinhal em roedores (Otuki e cols., 2005b).

Trabalhos recentes demonstraram que as propriedades anti-inflamatória e antinociceptiva das amirinas estariam associadas à interação delas com receptores canabinoides (Chicca e cols., 2012; Da Silva e cols., 2011) e, além disso, os efeitos seriam mediados principalmente através da sub-regulação de mediadores pró-inflamatórios, redução de desgranulação de mastócitos e transmigração de células inflamatórias (Medeiros e cols., 2007; Oliveira e cols., 2004, 2005).

A terceira e última classe de componentes relevantes para este trabalho são os esteróis encontrados em espécies vegetais, entre os esteróis de interesse, podemos citar o γ -sitosterol e o estigmasterol.

Também chamados de fitoesteróis, esses compostos são semelhantes à molécula do colesterol e podem ser encontrados em muitas plantas, mas são majoritariamente apresentados em óleos vegetais (Ostlund, 2002). Em particular, para o γ -sitosterol, alguns trabalhos comprovam que ele possui atividades antioxidante (Singh, 2012), antitumoral (Sundarraaj e cols., 2012) e antidiabética, sendo esta última através da estimulação da secreção de insulina pelo pâncreas (Balamurugan e cols., 2011). Para o estigmasterol foi comprovado que ele retarda a progressão da osteoartrite, inibindo a liberação de uma série de mediadores

pró-inflamatórios e também impede a degradação da matriz cartilaginosa, eventos típicos observados neste tipo de patologia. Aparentemente, o mecanismo de ação pelo qual ele realiza esta função é pela inibição das vias do fator nuclear κ B (NF- κ B, do inglês, *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) (Gabay e cols., 2010).

1.3. Dor e Nocicepção

Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor, a dor é uma “experiência sensorial e emocional desagradável, associada a um dano tecidual real ou potencial”. Dessa forma, a dor é aquela experiência que associamos a uma lesão tecidual real ou potencial que se estabelece em uma parte ou partes do corpo, sendo sempre desagradável e, portanto, também uma experiência emocional (IASP, 1986).

A dor é normalmente percebida quando há ativação de receptores específicos de dor, denominados nociceptores, presentes em terminações nervosas livres, sensíveis a estímulos químicos, térmicos e/ou mecânicos.

Os nociceptores se diferenciam dos demais receptores sensoriais pelo seu limiar mais alto, sendo ativados somente por estímulos de intensidade nociceptiva suficiente para causar algum grau de lesão tecidual (Cesare e McNaughton, 1996, Julius e Basbaum, 2001).

Após a estimulação dos nociceptores, o impulso nervoso com a informação nociceptiva é conduzido ao corno dorsal da medula através das fibras aferentes primárias dos tipos A δ e C, que conduzem, respectivamente, a dor do tipo aguda e crônica (Cesare e McNaughton, 1997).

Fibras A δ são mielinizadas, com velocidade de condução de aproximadamente de 5-30 m/s, gerando uma sensação dolorosa aguda e bem localizada. Esse tipo de fibra está relacionado à nociceptores térmicos e mecânicos, ou seja, aqueles ativados por temperaturas extremas e por pressão intensa aplicada na pele. As fibras do tipo C são amielínicas e

apresentam velocidade de condução menor que 1 m/s gerando uma sensação dolorosa mais lenta e menos discriminativa. Essas estão associadas à nociceptores polimodais que são ativados por estímulos mecânicos, térmicos ou químicos (Julius e Basbaum, 2001; Brooks e Tracey, 2005).

O início do processo da dor se dá com a transdução do sinal mecânico, térmico ou químico em um sinal elétrico de magnitude suficiente para poder ser conduzido através das fibras nervosas (figura 5). Uma vez ultrapassado o limiar de disparo, o potencial de ação é transmitido através das fibras nervosas até chegar ao corno dorsal da medula espinhal. Essa sinapse sensorial é mediada por neurotransmissores como glutamato, substância P, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP). Os neurônios secundários ascendem na porção contra lateral através do trato espinotalâmico conduzindo o impulso doloroso do corno dorsal da medula até o tálamo, onde fazem sinapse com neurônios terciários, que por sua vez conduzem a informação nociceptiva até o córtex somatossensorial e/ou para o giro cingulado anterior. No córtex somatossensorial a informação dolorosa é processada e interpretada no nível da consciência (Millan, 1999; Basbaum e cols., 2009).

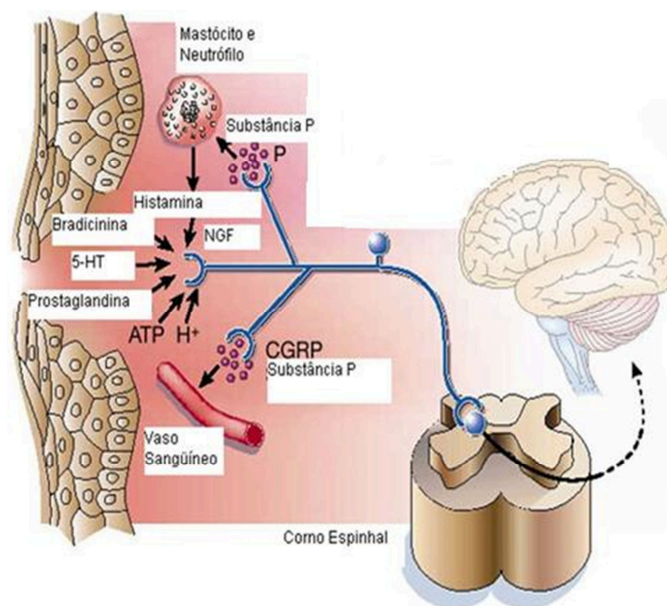


Figura 5 - Fase inicial de condução da dor. Adaptado de Basbaum e cols. (2009).

De acordo com Woolf (2010), a dor é classificada quanto a sua origem em três diferentes tipos, dor nociceptiva, dor inflamatória e dor patológica, sendo esta última denominada neuropática ou disfuncional.

Denomina-se dor nociceptiva quando os nociceptores respondem a estímulos dolorosos comuns, os quais podem ser de natureza térmica, química ou mecânica (Millan, 1999).

Por outro lado, a dor de caráter inflamatória, pode ser definida como lesões teciduais com desencadeamento de processo inflamatório em que ocorre ativação celular e liberação de mediadores, tais como, histamina, bradicinina, serotonina e prostaglandinas, os quais ativam ou sensibilizam (diminuindo o limiar de ativação) os neurônios nociceptivos periféricos (Millan, 1999).

Apesar de a experiência sensorial ser desagradável, as dores nociceptiva e inflamatória são mecanismos de proteção para o indivíduo. Já a dor patológica, não é tida como protetora, e sim decorrente de um funcionamento anormal do sistema nervoso, e é subdividida em dor neuropática ou disfuncional (Woolf, 2010).

A dor neuropática é causada por uma lesão do sistema nervoso central ou periférico, como, por exemplo, uma lesão nas fibras nervosas condutoras do impulso nervoso. De outra forma, a dor disfuncional não possui causa evidente, ela pode ser causada tanto por uma disfunção bioquímica quanto por liberação não programada de neurotransmissores acarretando em uma amplificação da sinalização sensorial nociceptiva no sistema nervoso central, isto é, não há estímulo doloroso, processo inflamatório, nem lesão do sistema nervoso (Woolf, 2010).

Existe ainda a classificação relacionada à duração da sensação dolorosa, podendo ser de caráter transitório, agudo ou crônico. A dor transitória ocorre na ausência de qualquer dano tecidual e se dissipa em poucos segundos ou minutos. A dor aguda decorre de uma lesão

tecidual imediata com ativação direta dos nociceptores locais. Já a dor crônica é aquela que persiste mesmo após a cura da lesão ou se prolonga por semanas, meses ou até anos após a recuperação tecidual e o organismo se torna incapaz de restaurar as funções fisiológicas para os níveis homeostáticos, o que a torna de difícil tratamento (Loeser e Melzack, 1999; Basbaum e cols., 2009).

A dor crônica representa um imenso problema clínico. Há milhares de pessoas sofrendo com esta condição debilitante, portanto existe uma preocupação para melhorar esta situação, através da compreensão não só dos mecanismos da dor, mas também de novos possíveis tratamentos, desenvolvendo novas tecnologias, otimizando e testando as já existentes e facilitando o acesso a casos clínicos (Gereau IV e cols., 2014).

Fármacos anti-inflamatórios e analgésicos periféricos têm seu alvo de ação na síntese e liberação de mediadores inflamatórios, inibindo desta maneira a sensibilização excessiva dos nociceptores (hiperalgesia primária). Já os analgésicos de ação central agem via receptores opioides situados no sistema nervoso supra-segmentar, que quando ocupados ativam a via inibitória descendente de controle endógeno da dor (Katzung, 8ª ed.).

1.3.1. Envolvimento dos sistemas opioide e vaniloide na dor

O uso de opioides exógenos, como a morfina e o fentanil, se tornou comum para o tratamento da dor, quando muito severa e refratária aos analgésicos não opioides. Os opioides usados na clínica atuam em receptores opioides que podem ser divididos em três tipos: μ , κ e δ (Martins e cols., 2012), eles pertencem à família dos receptores acoplados a proteína Gi (Spahn e cols., 2012). A ativação desses receptores promove abertura de canais de potássio (K^+), causando hiperpolarização, evento este importante para o aumento do limiar da dor, e também impedem a abertura de canais de cálcio (Ca^{2+}) dependentes de voltagem, levando a

inibição da liberação de neurotransmissores, como o glutamato e a substância P (Stein e cols, 2003; Stein e Lang, 2009), causando analgesia.

O receptor de potencial transitório do tipo vaniloide (TRPV1, do inglês *transient receptor potential cation channel subfamily V member 1*) é um canal de cátion não seletivo (Na^+ e Ca^{2+}), expresso em neurônios sensoriais periféricos da raiz dorsal e responde a estímulos térmicos e químicos, como a capsaicina, agente químico causador de dor (Spahn e cols., 2012).

A ativação de receptores do tipo μ , produzida por um agonista opioide, é capaz de impedir a fosforilação, via proteína quinase A (PKA), do receptor TRPV1 (Spahn e cols., 2012), ou seja, outra influência importante e consequência da ativação de receptores opioides do tipo μ , é que esses podem modular a atividade do receptor TRPV1 também pela via G_i e AMPc (adenosina monofosfato cíclica), de forma que uma vez que ambos receptores são expressos em fibras nociceptivas periféricas, quando um agonista opioide se liga ao receptor do tipo μ ocorre a dissociação do complexo da proteína G levando a inibição da adenilato ciclase e da formação de AMPc, e como resultado a PKA não é ativada. No processo de dor inflamatória o TRPV1 pode ser fosforilado e regulado por várias proteínas quinases, incluindo PKA. Dessa forma a inibição desses receptores via G_i e AMPc contribui para o efeito antinociceptivo dos agonistas dos receptores opioides (Endres-Becker e cols., 2007).

1.3.2. Glutamato

O glutamato é o neurotransmissor excitatório mais presente na transmissão, desenvolvimento e manutenção da resposta nociceptiva, se concentrando amplamente na medula espinhal. Através da ativação de receptores ionotrópicos glutamatérgicos (iGluR, do inglês *ionotropic glutamatergic receptor*) ou metabotrópicos glutamatérgicos (mGluR, do inglês *metabotropic glutamatergic receptor*) há excitação e sensibilização de nociceptores

periféricos e centrais das porções espinhal e supra-espinhal (Aanonsen e Wilcox, 1989; Budai e cols., 1995; Carlton, 2001).

Foram identificados três tipos de iGluR: N-metil-D-aspartato (NMDA, do inglês *N-methyl-D-aspartate*), ácido caínico (KA, do inglês *kainate*) e ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico (AMPA, do inglês *α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*) (Roger e Nicoll, 2010).

A liberação sustentada de glutamato e neuropeptídios, como a substância P, através da estimulação das fibras C provoca uma ativação persistente dos receptores AMPA com despolarização progressiva da membrana celular dos receptores NMDA, levando à despolarização e, portanto, à diminuição do limiar da dor, e conseqüente amplificação do sinal, levando à hiperalgesia (Sorkin e Wallace, 1999; Khasabov e cols., 2002; D’Mello e Dickenson, 2008). Portanto, substâncias que atuam diminuindo a liberação de glutamato, diminuem a nocicepção induzida por tal neurotransmissor e, por isso, podem contribuir com o efeito analgésico.

1.4. Inflamação

A inflamação é um processo que se dá através de reações vasculares e celulares em resposta à injúria tissular, antígenos ou infecção, caracterizada por vasodilatação indicada pela vermelhidão, rubor e calor, aumento da permeabilidade capilar gerando extravasamento de líquidos e edema, dor, e eventualmente perda de função (Aggarwall e cols., 2006).

Célsius foi o primeiro responsável por enumerar os quatro sinais clássicos da inflamação, sendo eles, calor, rubor, edema e dor. Por fim, o quinto sinal, acrescentado por Virchow, está associado ao agravamento dos quatro sinais cardinais, isto é, caso não haja resolução do problema, há perda da função do órgão ou tecido inflamado (Lawrence e cols., 2002).

Ainda no século XIX, Cohnhein demonstrou as primeiras alterações vasculares, com consequente extravasamento plasmático e migração celular para o foco inflamatório. No final do século XIX, Metchnikoff atribuiu a importância das células fagocitárias na resposta inflamatória (Majno e Joris, 2004). Finalmente, no século XX, Tomas Lewis, somando aos estudos já estabelecidos, mostrou que substâncias químicas eram responsáveis pela mediação de alterações vasculares que ocorrem durante o processo inflamatório, como por exemplo, a histamina (Majno e Joris, 2004).

1.4.1. Mediadores do processo inflamatório

De maneira geral, a partir do momento que há estímulo lesivo, a resposta inflamatória é iniciada com a liberação de mediadores químicos inflamatórios, os quais podem se originar do plasma, das células ou de tecidos (Majno e Joris, 2004) e também mediadores lipídicos, os eicosanoides.

Portanto, os mediadores podem ser divididos em aminas vasoativas, tais como, histamina, substância P, trombina, bradicinina (BK), serotonina; mediadores lipídicos correspondendo aos eicosanoides que englobam os prostanoídes, leucotrienos e lipoxinas derivados do metabolismo do ácido araquidônico; citocinas (TNF- α , IL-1 β , entre outras); quimiocinas (IL-8 e MCP-1) e enzimas proteolíticas como elastina, catepsina e metaloproteases (Majno e Joris, 2004; Walzog e Gaehtgens, 2000; White e cols., 2005).

A histamina está pré-formada e armazenada nos grânulos dos mastócitos, presentes normalmente no tecido conjuntivo adjacente aos vasos sanguíneos. Ela é liberada por desgranulação dos mastócitos em resposta a uma série de estímulos, como por exemplo, substância P, bradicinina, lesão física, reações imunes, proteínas de liberação da histamina derivadas dos leucócitos e citocinas. Quando atua em receptores H₁, na microcirculação,

causa dilatação das arteríolas e aumento da permeabilidade vascular das vênulas, e é por esse motivo, considerada o principal mediador da fase inicial da inflamação (Jutel e cols., 2009).

A serotonina (5-hidroxitriptamina ou 5-HT) também é um mediador vasoativo, pré-formado nas plaquetas, com ações semelhantes às da histamina. A liberação da serotonina das plaquetas é estimulada quando as plaquetas se agregam após contato com o colágeno, trombina ou complexo antígeno-anticorpo (Aller e cols., 2006).

A bradicinina também provoca vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular. Sua ação vasodilatadora resulta em parte, da produção endotelial de PGI₂ e da liberação de óxido nítrico (Marceau e Regoli, 2004), quando atua sobre os receptores do tipo B2 presentes principalmente em células endoteliais, célula muscular lisa e fibroblastos (Couture e cols., 2001). Além disso, a bradicinina exerce diversos efeitos, como por exemplo, a liberação de mediadores inflamatórios tais como prostanoídes, citocinas (IL-1 β e TNF- α) e ainda é um potente agente algésico (Eliis e Fozard, 2002).

A liberação de substância P (SP) é desencadeada quando há uma lesão tecidual, no tecido periférico e provoca ações vasculares pró-inflamatórias como a vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e desgranulação dos mastócitos (Santos e Calixto, 1997; Szallasi e Blumberg, 1999).

No que diz respeito aos eicosanóides, mediadores lipídicos provenientes do metabolismo do ácido araquidônico (AA), um ácido graxo liberado dos fosfolípidos de membrana por ação principalmente da enzima fosfolipase A2 (FLA₂) ativada por injúria tecidual ou produtos microbianos. Uma vez liberado o AA é metabolizado pela via das ciclooxigenases, cujos subtipos são COX-1, COX-2 e COX-3, e pela via das lipoxigenases, 5-LOX, 12-LOX e 15-LOX. Os produtos gerados pelas vias das COXs, chamados de maneira geral como prostanoídes, podem ser denominados como prostaglandinas, como, por exemplo, a PGE₂, a PGD₂ e a PGF₂ α ; prostaciclina, como a PGI₂; e também como tromboxanos,

como o TXA₂, pela via das LOXs são formados os leucotrienos, como o LTA₄, o LTB₄, o LTC₄ e o LTD₄. (Vanegas e Schaible, 2001; Nieves e Moreno, 2006; Rinaldo-Matthis e Haeggstrom, 2010).

A isoforma COX-1, dita constitutiva, é encontrada em vários tecidos e o principal produto gerado por elas são as PGs. Estas irão contribuir para a manutenção das funções fisiológicas, como a citoproteção do trato gastrointestinal, na agregação plaquetária e na melhora da perfusão renal (Botting, 2006). Já a isoforma COX-2 é conhecida como induzida, uma vez que sua expressão ocorre principalmente em resposta a estímulos pró-inflamatórios, sendo ela um importante contribuinte para a síntese de prostanoídes com o progresso da inflamação. Além disso, citocinas inflamatórias podem induzir um aumento de 10 a 80 vezes no nível de expressão de COX-2 em monócitos, macrófagos, condrócitos, fibroblastos, e células endoteliais (Khan e cols., 2007). Entretanto, a COX-2 também pode ser expressa constitutivamente em regiões cerebrais, no aparato justa glomerular renal e no endotélio vascular (Needleman e Iasakson, 1997; Rinaldo-Matthis e Haeggstrom, 2010). Por fim, existe uma terceira enzima, a COX-3, a qual é oriunda de uma variante do gene da COX-1, sendo expressa no cérebro e coração de cães (Chandrasekharan e cols., 2002; Qin e cols., 2005).

As PGs são importantes agentes sensibilizadores de nociceptores e a PGE₂ é um dos principais mediadores hiperalgésicos. Seus efeitos diretos são mediados por sua ação nos seus receptores (EP₁, EP₂, EP₃ e EP₄) e modulação de canais iônicos nos aferentes primários (Burian e Geisslinger, 2005). O envolvimento de proteínas quinase A (PKA) e C (PKC) têm sido descrito na hiperalgesia induzida pela injeção intraplantar de PGE₂ (Kawabata, 2011). Já os efeitos indiretos decorrem do aumento da sensibilidade a outros agentes, como BK (atuando em receptor B₂) e capsaicina (atuando em receptor vaniloide tipo 1, TRPV1) (Burian e Geisslinger, 2005).

A 5-lipoxigenase é a principal enzima do grupo das lipoxigenases, atuando sobre o AA e produzindo o ácido 5-hidroperoxieicosatetraenóico (5-HPETE), um composto quimiotático para leucócitos, que é convertido em leucotrieno A4 (LTA4). Este pode ser convertido em leucotrieno B4 (LTB4) ou em leucotrienos cisteínicos tais como, os LTC4, LTD4 e LTE4. Os leucotrienos cisteínicos são produzidos principalmente por eosinófilos, mastócitos, basófilos e macrófagos, enquanto que o LTB4 é produzido principalmente por neutrófilos e macrófagos (Haeggstrom e Funk, 2011). O LTB4 contribui para o aumento da permeabilidade vascular, aderência e quimiotaxia de leucócitos. LTC4, LTD4 e LTE4 estão envolvidos na vasodilatação do leito vascular, vasoconstrição coronária e contração do músculo brônquico, sendo por isso muito importantes na fisiopatologia da asma (Ishii e cols., 1994; Bertolini e cols., 2002; Haeggstrom e Funk, 2011).

1.4.2. Eventos vasculares - Permeabilidade vascular e exsudação

Durante o processo inflamatório observa-se uma série de alterações vasculares, tais como: mudanças no calibre das arteríolas, vasodilatação, acarretando maior aporte de sangue no local - fenômeno este mediado por substâncias como histamina, leucotrienos (LTs) e prostaglandinas (PGs) - alterações estruturais nos componentes da microcirculação, acarretando em aumento da permeabilidade vascular, saída de células e moléculas dos vasos sanguíneos para os tecidos, migração de células de defesa e acúmulo no espaço extravascular onde ocorreu a injúria (Omoigui, S., 2007; Aller e cols., 2006).

Com o extravasamento de proteínas para o interstício ocorre ainda o aumento da viscosidade do sangue e a redução do fluxo sanguíneo. Essas alterações hemodinâmicas levam à alteração da orientação das células sanguíneas que antes localizadas na região mais central do vaso, passam agora para sua periferia. Esta alteração, por fim, propicia a

marginação leucocitária permitindo assim o contato dos leucócitos com as células endoteliais (Schmid-Schonbein, 2006).

O aumento da permeabilidade vascular permite o influxo de proteínas, moléculas do sistema complemento e células inflamatórias do compartimento intravascular para o interstício (Schmid-Schonbein, 2006).

A ligação dos mediadores vasoativos (serotonina e histamina), eicosanoides (PGs, LTs), fator de ativação plaquetária (PAF, do inglês *platelet activating fator*), bradicinina e citocinas, em receptores específicos nas células endoteliais, resulta em ativação celular, causando contração da célula endotelial e formação de poros no endotélio. Essa ruptura na barreira endotelial promove o extravasamento do líquido intravascular para o espaço extravascular. Esse processo leva à formação do exsudato inflamatório ou “edema” (Kolaczowska e cols., 2006).

O exsudato caracteriza-se pela elevada concentração de proteínas, células inflamatórias e uma variedade de mediadores. Este líquido contém ainda componentes dos seguintes sistemas: complemento, coagulação, fibrinolítico, e das cininas. O exsudato possui funções importantes no processo inflamatório como, por exemplo, suprimento de nutrientes para as células do sistema imunológico, diluição de toxinas, inativação de toxinas por proteases, e deposição de fibrina a partir do fibrinogênio, auxiliando assim a fagocitose e impedindo o avanço da infecção por patógenos (Kolaczowska e cols., 2006).

1.4.3. Eventos celulares

Assim como a dor, o processo inflamatório também pode ser dividido em padrões agudo e crônico (Weiss, 2002). A fase aguda apresenta duração variável e caracteriza-se pela vasodilatação local e aumento da permeabilidade vascular. Posteriormente a essa etapa ocorre a fase subaguda, caracterizada por infiltração de leucócitos e de células responsáveis por

fagocitar. Por fim, a fase de resolução da inflamação, ou proliferativa crônica, quando acontece a regeneração tecidual e/ou fibrose (Suzuki e cols., 2003; Schmid-Schonbein, 2006). A resposta crônica está associada, histologicamente, à presença de linfócitos e macrófagos, bem como angiogênese, fibrose e necrose tecidual. Esse tipo de processo inflamatório está envolvido em doenças do tipo incapacitantes, como artrite reumatoide, aterosclerose, tuberculose e doenças pulmonares crônicas. Na maioria das vezes, observa-se que a inflamação aguda precede ao estágio crônico característico nestas doenças (Mitchell e Cotran, 2010).

Devido à liberação local de mediadores químicos como o óxido nítrico (NO), cininas, serotonina, histamina, PGs, LTs e substâncias liberadas das terminações nervosas como as taquicinas e CGRP, entre outros, há vasodilatação local a qual ocorre, majoritariamente, na fase aguda do processo inflamatório. (Schmid-Schonbein, 2006).

Entende-se por quimiotaxia o fenômeno de migração de leucócitos e células fagocíticas para o sítio inflamado. Nesse processo ocorre o direcionamento do fluxo de células e recrutamento de leucócitos específicos como, por exemplo, os neutrófilos, leucócitos de morfologia polimorfonuclear (PMN) e que são os primeiros a chegar ao local da inflamação (Kelly e cols., 2007).

Os PMNs, em sua maioria neutrófilos, são as primeiras células a serem recrutadas para o local da inflamação. Juntamente com os macrófagos, são responsáveis pela fagocitose e destruição do agente lesivo (Pettersen e Adler, 2002).

O sistema fagocítico mononuclear pode ser representado por monócitos e macrófagos. Em humanos, os monócitos circulantes no sangue representam cerca de 5 a 10% dos leucócitos totais. É uma população heterogênea devido a grande variação de marcadores de superfície, capacidade fagocítica e potencial de diferenciação. Eles podem se diferenciar em

macrófagos, células dendríticas, osteoclastos, microglia no sistema nervoso central e células de Kupffer no fígado (Seta e Kuwana, 2007).

Na etapa seguinte à quimiotaxia ocorre rolamento, adesão e transmigração dos leucócitos para o sítio inflamado (Figura 6, Barkhausen e cols., 2005). Este processo de recrutamento leucocitário é mediado por moléculas de adesão como as selectinas (P-selectinas, L-selectinas e E-selectinas), importantes no rolamento, integrinas (expressas pelos leucócitos) importantes na adesão e a superfamília das moléculas das imunoglobulinas (Ig) (Meager, 1999; Nourshargh e Marelli-Berg, 2005). A indução, por mediadores inflamatórios, do ligante da L-selectina no endotélio dá início à captura e rolamento dos PMN (Meager, 1999).

A expressão ou liberação das moléculas de adesão são fortemente influenciadas por mediadores inflamatórios como histamina, serotonina, interferon- γ (IFN- γ), fator de crescimento tumoral (TNF- α), interleucina 1 (IL-1 β) e quimiocinas (Meager, 1999).

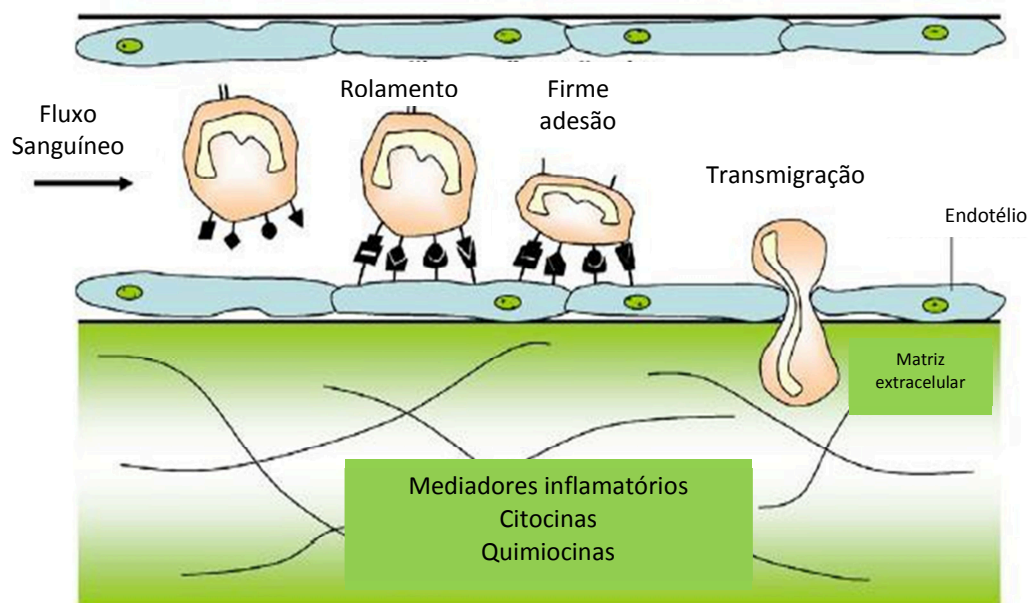


Figura 6: Representação do mecanismo de rolamento, aderência, diapedese e quimiotaxia dos neutrófilos (Adaptado de Barkhausen e cols., 2005).

1.4.4. Envolvimento do Óxido Nítrico (NO) na inflamação

O NO é um mediador com múltiplas funções participando na sinalização de sistemas cardiovasculares, gastrintestinais, geniturinário, respiratório e nervoso (Hanafy e cols., 2001; Ignaro e cols., 2002).

A síntese do NO ocorre a partir da oxidação do nitrogênio guanidina terminal do aminoácido L-arginina, que é então convertido em L-citrulina, reação essa catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) no interior das células (Moncada e cols., 1991).

Alguns tipos de NOS já foram caracterizados; a NOS endotelial (eNOS), encontrada em células endoteliais. O NO produzido por esta enzima tem um papel significativo no controle da pressão arterial, visto que ele é o responsável por diminuir a resistência vascular periférica, diminuindo a pressão arterial; há também a NOS neuronal (nNOS) encontrada em neurônios centrais e periféricos onde o NO participa da neurotransmissão e neuromodulação; e, por fim, a NOS induzida (iNOS) a qual é expressa em diversas células em resposta a estímulos patológicos, como microrganismos invasores ou citocinas. A ativação das enzimas constitutivas (endotelial e neuronal) é regulada pelo complexo cálcio-calmodulina e a produção de NO ocorre em pequenas quantidades e por curtos períodos de tempo. No caso da iNOS, ela é ativada independentemente de cálcio intracelular, sintetiza NO em maiores quantidades e por longo período de tempo, ocorrendo apenas em momentos de estresse para o organismo (Reutov e Sorokina, 1998).

O NO tem várias funções na inflamação e pode ser avaliado quando inibidores seletivos das NOS (como por exemplo, o L-NAME, do inglês *L-NG-nitro-arginine methyl ester*) são testados em modelos de inflamação (Moncada e Higgs, 1995).

Após sua geração, o NO difunde-se pelas membranas e ativa a enzima guanilato ciclase solúvel, a qual promove a formação de guanosina monofosfato cíclica (GMPc). À medida que a concentração de GMPc aumenta, efeitos, tais como relaxamento do músculo

liso vascular e não-vascular, inibição da agregação plaquetária, e da adesão de leucócitos são iniciados (Moncada e Higgs, 1995; Vallance e Leiper, 2002).

1.4.5. Citocinas

As citocinas são mediadores protéicos ou peptídeos produzidos por vários tipos celulares principalmente macrófagos, monócitos e linfócitos ativados. Elas são capazes de modular a função de vários tipos celulares e são determinantes para a infiltração celular e efeitos sistêmicos durante o processo inflamatório agudo e crônico. A secreção das citocinas é estimulada por endotoxinas, complexos imunes, toxinas, lesões físicas e processos inflamatórios. Uma vez liberadas, exercem efeitos autócrinos, parácrinos ou endócrinos se ligando a receptores específicos nas células-alvo (Wong e Fish, 2003, Schmid-Schobein, 2006; Sims e Smith, 2010). A superfamília das citocinas pode ser dividida em: interleucinas (IL), quimiocinas (proteína quimiotática de monócitos-1, MCP-1), interferons (IFN) e fatores de necrose tumoral (TNF), TGF- β (fator de transformação do crescimento), CSF (fator estimulador de colônia) (Sommer e Kress, 2004; Alwani e cols., 2006; Wahl, 1992; Hamilton, 2002).

O TNF- α , uma citocina pró-inflamatória, é produzida e liberada principalmente por macrófagos, é uma das principais citocinas relacionadas ao processo inflamatório (Alwani e cols., 2006). Mesmo em concentrações baixas, o TNF- α induz a expressão de moléculas de adesão e estimula macrófagos e outras células a secretarem quimiocinas. Ele ainda pode regular a produção e liberação de IL-1 β (Sommer e Kress, 2004; Sasakawa e cols., 2005).

A IL-1 β desempenha ações nociceptivas que podem ser mediadas por uma complexa cascata de sinalização e produção secundária de NO, bradicinina e prostaglandinas. A ligação ao seu receptor IL1-RI inicia uma série de eventos intracelulares, ativando fatores transcricionais, induzindo a expressão de COX-2, iNOS, IL-1 β , IL-6 e TNF- α (Sommer e

Kress, 2004; Hori e cols., 1998; Ren e Torres, 2009), acarretando a piora do processo inflamatório.

1.4.6. Finalização do processo inflamatório

Ao final do processo inflamatório, o que se espera é a neutralização dos mediadores químicos - lipídicos liberados e interrupção do extravasamento plasmático, assim como da infiltração leucocitária. Quando ocorre essa interrupção, há redução do edema, e consequentemente, as células ali presentes serão removidas (Rankin, 2004) e o tecido afetado voltará a apresentar equilíbrio.

Quando este sistema funciona de maneira fisiológica, não há persistência da inflamação. No entanto, caso não ocorra a resolução do processo inflamatório o tecido conectivo pode ser substituído por fibrose ou progredir para um processo inflamatório crônico como resultado da permanência do agente (Lawrence e cols., 2002; Stables e Gilroy, 2011).

É devido a este fato que fármacos anti-inflamatórios são utilizados e ainda se buscam alternativas para substituir ou melhorar as terapias já existentes, no intuito de intervir da melhor maneira no processo inflamatório patológico.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

A principal meta deste trabalho é avaliar os potenciais efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório do extrato etanólico e de suas frações provenientes das folhas da *Tibouchina granulosa*, e, possivelmente, associar os efeitos observados aos componentes da planta.

2.2. Objetivos específicos

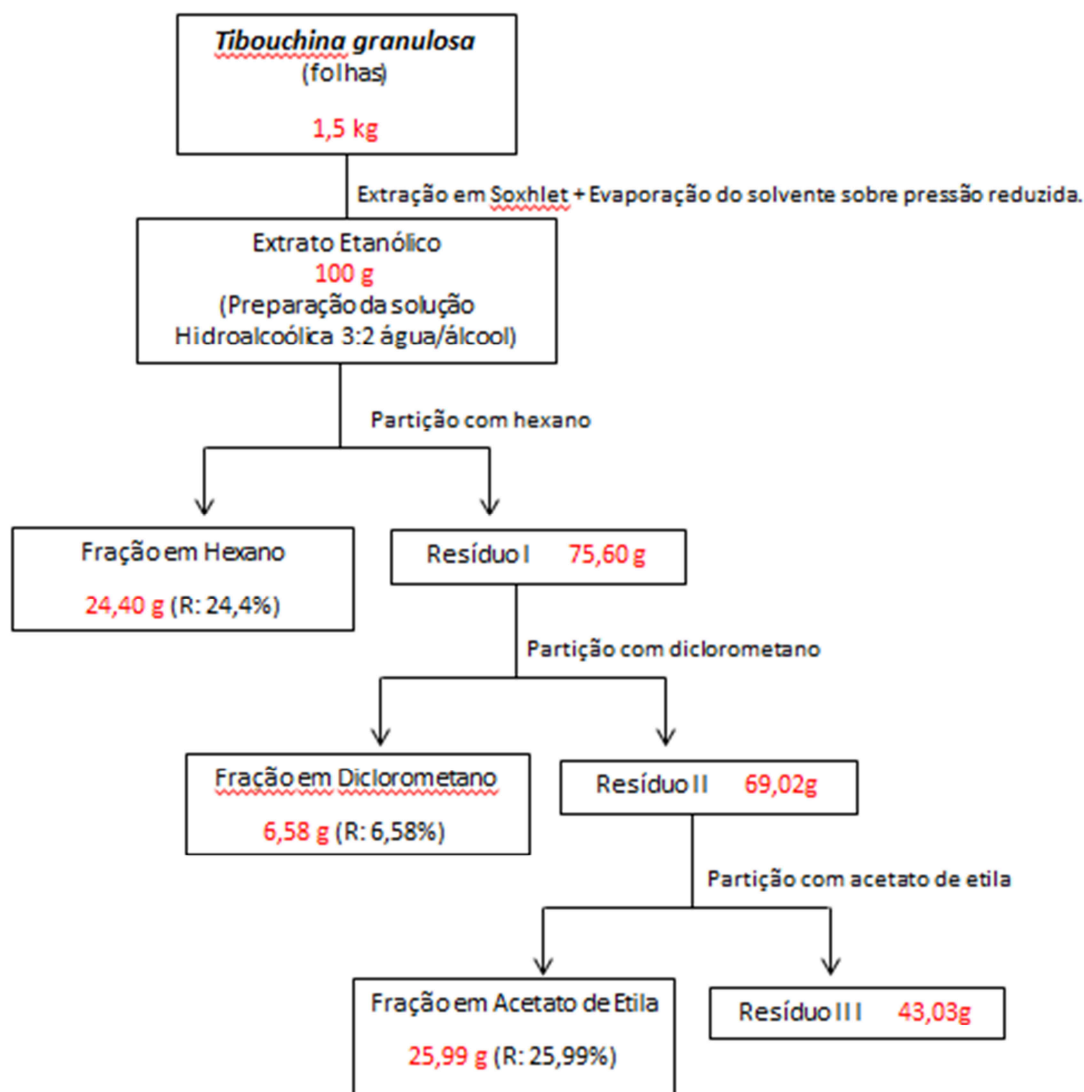
- a) Determinar o perfil fitoquímico das folhas de *Tibouchina granulosa*, através de métodos cromatográficos, como a cromatografia em fase gasosa e a cromatografia líquida de alta eficiência.
- b) Determinar através de ressonância magnética nuclear (RMN) o composto isolado de cromatografia em coluna.
- c) Analisar, anatomicamente, as folhas da *T. granulosa*,
- d) Avaliar a atividade analgésica através dos modelos da placa quente, e da lambadura de pata induzida pela capsaicina ou glutamato,
- e) Avaliar a atividade anti-inflamatória pelos experimentos da lambadura de pata induzida pela formalina, e da bolsa de ar subcutânea (BAS).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Material vegetal

Folhas da quaresmeira foram coletadas na fazenda do Instituto Vital Brazil em Cachoeiras de Macacu - Rio de Janeiro – Brasil, pela responsável Leidilene da Silva, em novembro de 2013. As folhas (1 kg) foram secas em estufa, à 40⁰C e depois trituradas em moinho de facas, modelo A11BS1, fabricante IKA. O produto obtido foi submetido ao processo de extração por *Soxhlet*, durante 72 horas, utilizando álcool etílico absoluto (10 litros) como solvente. Essa solução foi evaporada sobre pressão reduzida, durante 40 horas, fornecendo 150g do extrato etanólico (EE), portanto o rendimento foi de 10%. 100g deste extrato foram divididas em dois béchers contendo 50g do EE cada um, e a cada bécher foi adicionada uma solução hidroalcoólica (proporção de 300 ml de água para 200 ml de álcool), por fim, a extração líquido-líquido (ELL) foi realizada utilizando como solventes, hexano (3 litros), diclorometano (3 litros) e acetato de etila (3 litros), dessa forma foram obtidas as frações em hexano (fH), em diclorometano (fDCM) e em acetato de etila (fAE).

O protocolo de separação está representado no esquema 1.



Esquema 1: Preparação do extrato etanólico e suas frações a partir das folhas da *Tibouchina granulosa*, utilizando os solventes álcool etílico absoluto, hexano, diclorometano e acetato de etila. Observação: resíduo III não testado.

3.2. Reagentes

Foram utilizados formaldeído (Reagen), etanol P.A (Merck AG, Darmstadt, Alemanha), dimetilsulfóxido P.A (DMSO) (Fisher Biotech), éter etílico, tween 20 (Isobar, Rio de Janeiro, Brasil), sulfato de morfina (Cristália, São Paulo, Brasil), fosfato dissódico de dexametasona (Aché, Rio de Janeiro, Brasil), cloridrato de ketamina e cloridrato de xilazina (Ceva Brasil), ácido acetilsalicílico (AAS), ácido L-glutâmico (glutamato), capsaicina,

capsazepina e carragenina, formato de amônio, molibdato de amônio, naftietilenodiamina e sulfanilamida, tampão fosfato-citrato com perborato (TFCP) e pastilhas de tetra-metil-di-hidrocloreto de benzidina (TMB) (Sigma Chemical), soro albumina bovino (BSA) (LGC Biotecnologia), Kit Pierce BCA™ Protein Assay (Thermo Scientific, NY, EUA), Cepa de *Escherichia coli* (ATCC #25922), nitrito de sódio (Isofar, Rio de Janeiro, Brasil), hidróxido de sódio e fosfato monossódico (Reagen), sulfato de zinco (Vetec), imunoplaças F96 Maxisorp (Nunc, Thermo Fisher Scientific, NY, EUA), kits ELISA BD OptEIA™ Set Mouse para TNF- α , IL-1 β , contendo as respectivas citocinas recombinantes de camundongo, anticorpo de captura (anti-camundongo TNF- α , IL-1 β) e anticorpo de detecção anti-camundongo conjugado com peroxidase (BD Biosciences, San Diego, EUA), Sílica gel 60 (70-230 mesh; Merck).

O solvente usado para a extração, álcool etílico absoluto, e os solventes utilizados posteriormente para a elaboração das frações, como hexano, diclorometano e acetato de etila possuíam como fabricante a Tedia. Já os solventes (hexano, diclorometano, acetato de etila, metanol, clorofórmio – Sigma Chemicals) para fase móvel de cromatografia em coluna em sílica gel, cromatografia em camada delgada (CCD) e Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foram adquiridos pelo Prof. Dr. Fabio Boylan, da Trinity College Dublin - Irlanda, assim como os solventes deuterados (DMSO e Clorofórmio – todos esses do fabricante Sigma Chemicals) utilizados para a realização da Ressonância Magnética Nuclear (RMNs).

Para a cromatografia em camada delgada, placas de alumínio pré-revestidas com Sílica gel 60 PF254 (230-400 Mesh ASTM - Merck), com 0,25 mm de espessura e medindo 20 x 20 cm foram usadas.

Na realização dos cortes histológicos das folhas da *T. granulosa* foram utilizadas lâminas de barbear, e o suporte empregado para o corte foi isopor. Depois de realizadas as

secções, foi adicionado a uma placa de *petri* hidrato cloral para que as folhas perdessem a sua coloração natural.

3.3. Preparo dos reagentes e soluções

Formalina: preparada na concentração de 2,5% (v/v) em PBS,

AAS: preparado na concentração de 10 mg/ml em Tris-HCl 1M, pH 8,0.

Morfina: preparada na concentração de 10 mg/ml em água destilada.

Carragenina: preparada na concentração de 1% p/v, em PBS estéril.

Dexametasona: estocada na concentração de 4 mg/ml, formulação injetável.

Capsaicina: preparada na concentração de 4 mg/ml em DMSO.

Glutamato: preparado na concentração de 0,17 g/ml, em água deionizada.

Tampão fosfato salina (PBS 10x concentrado)

KH ₂ PO ₄ (anidro)	17,8 g
Na ₂ HPO ₄ (anidro)	76,1 g
NaCl	85 g
H ₂ O ultrapura q.s.p.	1 l

Tampão de Bloqueio

Soro fetal bovino	10 ml
PBS q.s.p.	100 ml

Tampão Diluente

NaHCO ₃	7,13 g
Na ₂ CO ₃	1,59 g
H ₂ O ultrapura q.s.p.	1000 ml

(pH 9,5)

Tampão de Lavagem

Tween 20 0,5 ml

PBS q.s.p. 1000 ml

Substrato para dosagem de citocinas: 1,0 ml de solução de TMB em 9,0ml de solução de tampão fosfato-citrato com perborato, devido à degradação do produto, esta solução só pôde ser preparada trinta minutos antes da utilização.

Reagente BCA: No momento da dosagem, misturam-se os reagentes A e B, na proporção 50:1, obtidos no kit Pierce BCA™Protein Assay (Thermo Scientific, NY, EUA). Para a quantificação de proteínas, incuba-se 5 µl da amostra ou da proteína da curva padrão com 195 µl da mistura dos reagentes A e B a 37⁰C, por 30 minutos.

Reagente de Griess

Reagente A:

Sulfanilamida 1 g

H₂O ultrapura q.s.p. 100 ml

Reagente B:

Dicloreto de naftiletileno diamina 0,1 g

H₃PO₄ (a 10%) q.s.p. 100 ml

No momento da dosagem, misturam-se partes iguais dos reagentes A e B. Para a quantificação do nitrito, incubam-se volumes iguais da amostra ou da solução para curva padrão e do reagente de Griess pronto.

Anestésicos:

Cloridrato de Ketamina 4,5 ml

Cloridrato de xilazina 1,5 ml

Salina q.s.p. 40 ml

Finalizadas as evaporações do extrato e suas frações, uma solução estoque de 100 mg do extrato e frações formados foram solubilizadas em 1 ml de DMSO e estocadas em freezer à -20°C. O EE, assim como as frações em hexano, em diclorometano e em acetato de etila foram administradas, por via oral, nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg em volume final de 0,1 ml de veículo (água destilada). Em todos os experimentos a concentração final de DMSO não excedeu a 0,5% de modo a não produzir qualquer efeito tóxico nos animais.

Para os controles positivos foram utilizadas as seguintes doses e vias de administração:

- AAS: 200 mg/kg, via oral;
- Morfina: 2,5 mg/kg, via intraperitoneal;
- Dexametasona: 0,5 mg/kg, via intraperitoneal;

Para os agentes químicos tais como, formalina (2,5 % v/v), capsaicina (1,6 µg/pata) e glutamato (3382,2 µg/pata), cada animal recebeu 20 µl/pata de cada uma dessas substâncias. No experimento da bolsa de ar subcutânea, a carragenina 1% foi injetada na cavidade em um volume de 1ml.

No caso dos anestésicos cada animal recebeu uma dose de 112 mg/kg de cloridrato de ketamina e 7,5 mg/kg de cloridrato de xilazina.

3.4. Animais

Camundongos fêmeas Swiss Webster, pesando de 20 a 25 gramas, foram doadas ao nosso laboratório pelo Instituto Vital Brazil. Os animais foram mantidos no biotério do Programa de Pós-graduação em Farmacologia e Química Medicinal, em estante microisolada, com condições ótimas de temperatura, iluminação e umidade ($22 \pm 2^\circ\text{C}$, ciclos de 12h claro/escuro e de 60 a 80% de umidade), com livre acesso a comida e água, no entanto a comida foi retirada três horas antes de cada experimento, a fim de se evitar qualquer interação do alimento com as substâncias testadas.

Para aclimatização dos animais, os mesmos foram deixados no ambiente do laboratório por no mínimo uma hora antes de cada experimento. Os modelos animais seguiram os princípios e regras adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animais (COBEA), aprovados pelo Centro de Ciências da Saúde/Instituto de Ciências Biomédicas - UFRJ, pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal, e recebeu o número DFBCICB015-04/16.

3.5. Estudos Fitoquímicos com *Tibouchina granulosa*

3.5.1. Cromatografia em coluna com emprego de sílica gel

As frações obtidas nas extrações líquido-líquido foram adicionadas às colunas cromatográficas com emprego de sílica gel.

Para a fração em hexano (20,34 g) foi utilizada uma coluna de 35 cm de altura e 7 cm de diâmetro, e as fases móveis seguiram da seguinte maneira: 1) hexano, 2) hexano/acetato de etila 5%, 3) hexano/acetato de etila 10%, 4) hexano/acetato de etila 20%, 5) hexano/acetato de etila 30%, 6) hexano/acetato de etila 50%, 7) hexano/acetato de etila 75%, 8) acetato de etila 100%, 9) acetato de etila/metanol 5%, 10) acetato de etila/metanol 10%, 11) acetato de etila/metanol 20%, 12) acetato de etila/metanol 30%, 13) acetato de etila/metanol 50%, 14) acetato de etila/metanol 75%, 15) metanol 100%.

A segunda fração a ser eluída no sistema cromatográfico em questão foi a em acetato de etila (13,08 g). A coluna utilizada tinha 26 cm de altura e 3 cm de diâmetro. O sistema de eluentes seguiu-se da seguinte maneira: 1) diclorometano, 2) diclorometano/acetato de etila 10%, 3) diclorometano/acetato de etila 25%, 4) diclorometano/acetato de etila 50%, 5) diclorometano/acetato de etila 75%, 6) acetato de etila 100%, 7) acetato de etila/metanol 10%, 8) acetato de etila/metanol 20%, 9) acetato de etila/metanol 30%, 10) acetato de etila/metanol 50%, 11) acetato de etila/metanol 75%, 12) metanol 100%.

A última fração que passou pelo sistema cromatográfico foi a em diclorometano (2,5 g) e a coluna utilizada media 25 cm de altura e 2 cm de diâmetro. O sistema de solventes utilizado seguiu o mesmo padrão da fração em hexano já previamente descrita.

3.5.2. Placas de Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Essa técnica foi utilizada para realizar a separação dos componentes de cada uma das frações, isto é, para todos os frascos recolhidos na cromatografia em coluna em sílica, foi realizada uma placa de CCD.

A fração em hexano (20,34 g) foi adicionada a coluna cromatográfica (35 cm) preenchida com sílica gel (150g, 70-230 Mesh, Merck) e então foi eluída com gradientes de hexano : acetato de etila : metanol, desta fração foram recolhidos 339 frascos nos quais foram realizados a CCD.

A segunda fração a ser eluída na coluna cromatográfica (26 cm), preenchida com sílica gel (70g, 70-230 Mesh, Merck), foi a em acetato de etila (13,08 g), os gradientes usados foram diclorometano : acetato de etila : metanol e, desta fração foram eluídos 170 frascos os quais foram analisados posteriormente por CCD.

Por fim, a fração em diclorometano (2,5 g) foi eluída numa coluna de 25 cm e preenchida com sílica gel (67g, 70-230 Mesh, Merck), os gradientes de solvente utilizados obedeceram a mesma já descrita para a fração em hexano, e, da fração em diclorometano foram coletados 146 frascos, os quais foram posteriormente analisados por CCD.

3.5.3. Análise das amostras por Ressonância Magnética Nuclear

A técnica espectroscópica de Ressonância Magnética Nuclear, ou RMN, é utilizada na pesquisa para determinação do conteúdo e pureza de amostras, bem como a sua estrutura

molecular. Os núcleos dos átomos estão envolvidos no processo de absorção, os núcleos mais utilizados na espectroscopia de RMN são os núcleos de Hidrogênio (^1H) e carbono (^{13}C).

Após a realização das colunas cromatográficas, cada *vial* obtido, após evaporação do solvente, foi analisado a fim de se encontrar cristais que pudessem caracterizar alto grau de pureza da substância que fora isolada.

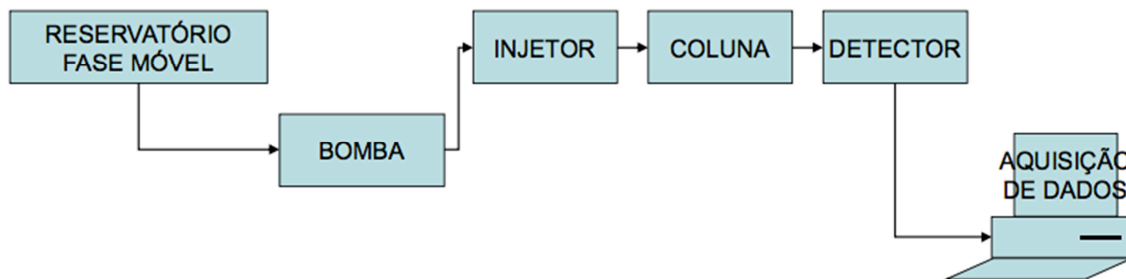
Ao material que aparentava pureza adicionaram-se diversos solventes a fim de determinar em qual havia melhor solubilidade, dependendo deste teste, adicionava-se DMSO ou Clorofórmio deuterados, dependendo da solubilidade da substância isolada, e seguia-se para a análise em aparelho de RMN.

O equipamento disponível para análise por ressonância magnética nuclear era o BRUKER TOPSPIN 2.1 NMR – ^1H RMN (400 and 600 MHz) e ^{13}C RMN (100 e 150 MHz).

3.5.4 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Para a realização de uma curva de calibração foi utilizado o método CLAE, que pode ser resumido em algumas etapas:

- 1) A amostra é dissolvida em um solvente (Metanol para CLAE) e aplicada na coluna cromatográfica preenchida com a fase estacionária (FE),
- 2) Um solvente, usado como fase móvel, é bombeado com vazão constante e desloca os componentes da mistura através da coluna. Esses se distribuem entre as duas fases de acordo com suas afinidades,
- 3) As substâncias com maior afinidade com a FE movem-se mais lentamente. Já as substâncias com pouca afinidade com a FE movem-se mais rapidamente,
- 4) Ao sair da coluna, os componentes passam por um detector que emite um sinal elétrico o qual é registrado, constituindo um cromatograma. Abaixo o sistema ilustrativo (esquema 2).



Esquema 2: Ilustração do CLAE (Argenton, A. 2010).

A curva de calibração foi realizada em sete concentrações (25, 50, 100, 150, 200, 250 e 300 µg/ml).

Os eluentes usados para a realização da curva e, posteriormente, para a corrida da fração em acetato de etila foram ácido acético glacial (0,5%, v/v, solvente A) e metanol (solvente B), seguindo os seguintes gradientes lineares: 38-42% de B de 0,0 até 14,0 minutos; 42-45% de B de 14,0 até 17,0 minutos; 45-48% de B de 17,0-17,1 minutos; 48%-50% de B de 17,1-32,0 minutos; 50-85% de B de 32,0-40,0 minutos.

Antes da injeção de cada uma das amostras (10µl), seguiu-se um período de equilíbrio de 10 minutos. Todas as amostras foram lidas em 342 nm (equipamento Waters Breeze 2 HPLC System) e a coluna utilizada foi uma coluna de fase reversa C18 (250 x 4.6 mm, 5µm) da Thermo Scientific.

3.5.5. Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM)

O método Cromatografia Gasosa - Espectrometria de Massa (CG-EM) combina as características da cromatografia gasosa e da espectrometria de massa para identificar diferentes substâncias em uma amostra. O CG-EM é amplamente aceito como referência na identificação química de compostos orgânicos voláteis e semi-voláteis em misturas, detecção de drogas, análise ambiental, investigação de explosivos e identificação de amostras desconhecidas.

O equipamento usado foi o CG Agilent, modelo 6890; EM Agilent quadrupolo, 5973 no modo scan 50-800 Da. O volume de injeção para a cromatografia gasosa foi de 1 µl e o injetor aquecido à 330 °C, no modo sem divisão de fluxo (splitless; tempo de fechamento de válvula igual a 0,3 min) com pulso de pressão de 10 psi nos primeiros 0,5 min. A coluna capilar usada foi a DB-17HT (50 % fenil, 5 m x 0,25 mm d.i. x 0,15 µm); programação de temperatura do forno: 60 °C (0,25 min) // 12 °C/min // 365 °C (5min).

Para a espectrometria de massas, o detector foi aquecido a 380 °C e o gás carreador usado foi o hélio (He) sob fluxo constante de 3 ml/min.

3.5.6. Anatomia Vegetal

As amostras secas – folhas da *T. granulosa* - foram completamente reidratadas, isto é, as folhas secas foram colocadas em banho maria até que a água fervesse e então estas foram retiradas e, cuidadosamente, dispostas em suporte de isopor no intuito de cortar as secções transversais das folhas de maneira manual, para que estas fossem observadas em microscópio de luz.

As secções foram clarificadas com hidrato cloral, depois lavadas com água destilada e coradas com: 1) Iodo ou 2) Cloreto férrico, ou nenhuma coloração.

As Fotomicrografias foram obtidas com uma câmera digital (Olympus DP25) em microscópio de luz Olympus BX41.

3.6 Estudos farmacológicos da *Tibouchina granulosa*

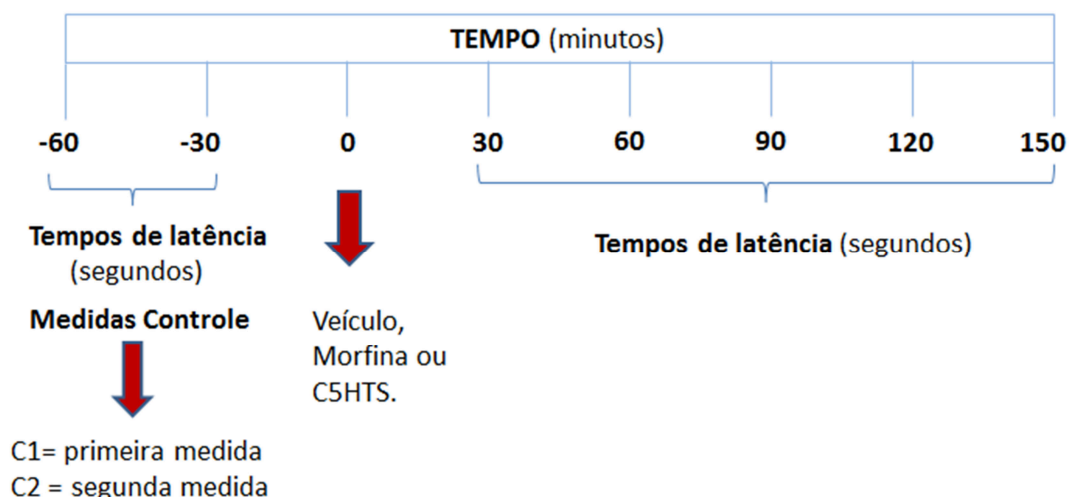
3.6.1. Modelo da placa quente

O experimento seguiu de acordo com os métodos descritos por Sahley e Berntson (1979), com adaptações descritas por Matheus e colaboradores (2005). Este modelo consiste em colocar o animal em uma placa aquecida à $55^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e calcular o seu tempo de latência, o

qual é entendido como o tempo em que o animal demora para apresentar uma reação, que pode ser o ato de retirar as patas ou saltar da superfície aquecida, caracterizando o momento de tira-lo, este momento é consequência da ativação do córtex somatossensorial através de um estímulo térmico (Sahley and Berntson, 1979).

Duas medidas controles, sessenta minutos e trinta minutos antes do tratamento com as substâncias, foram realizadas. A média dessas medidas foi denominada como linha de base. Trinta minutos após a administração do veículo (água destilada), da morfina, do extrato ou das frações foram feitas sucessivas medidas com intervalos de 30 minutos entre cada uma delas. Em todos os tempos citados foi medido o tempo de latência para cada animal e depois calculada uma média para cada um dos grupos. Para evitar danos teciduais às patas, foi estabelecido um tempo máximo de exposição das patas do animal à placa aquecida de três vezes o valor da linha de base e denominado tempo de corte (ou “*cut-off*”).

Os resultados foram expressos como percentual de aumento em relação à linha de base (= tempo de latência x 100/linha de base - 100) ou área sob a curva (ASC). O protocolo está resumido no esquema 3.

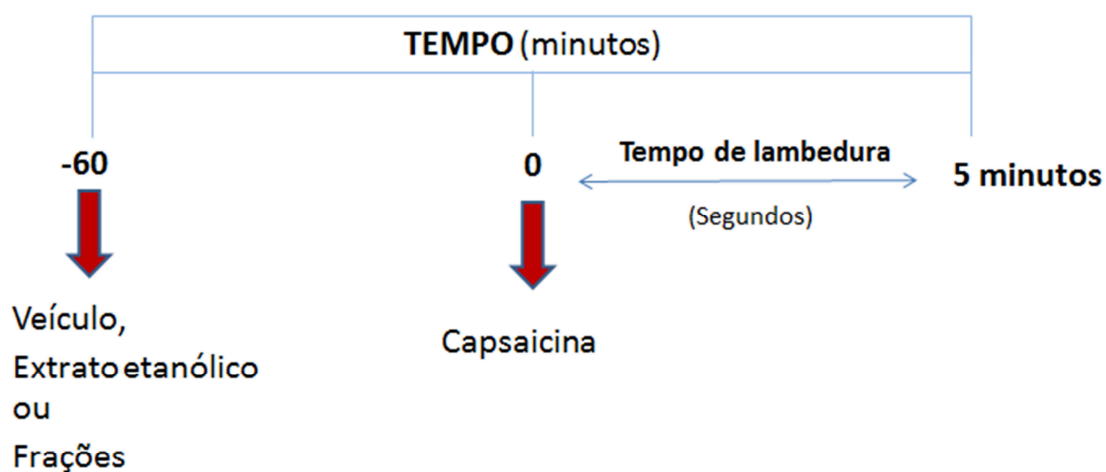


Esquema 3: Protocolo do modelo da placa quente.

3.6.2. Modelo da lambedura de pata induzida pela capsaicina

Com o objetivo de investigar o mecanismo de ação antinociceptivo do extrato e suas frações em outro modelo de nocicepção, utilizamos o modelo da lambedura de pata induzida pela capsaicina, esse modelo permite avaliar o envolvimento de receptores vanilóides (TRPV) na nocicepção (Jancso, 1978; Sakurada e cols., 1992; Marcon e cols, 2009).

Os animais foram pré-tratados por via oral com veículo (água destilada), EE ou frações uma hora antes da administração da capsaicina. Após a injeção na pata posterior direita de 20 µl de capsaicina (1,6 µg/pata), foi registrado durante 5 minutos o tempo que o animal permaneceu lambendo a pata, caracterizando a sua nocicepção. O protocolo experimental está resumido no esquema 4.

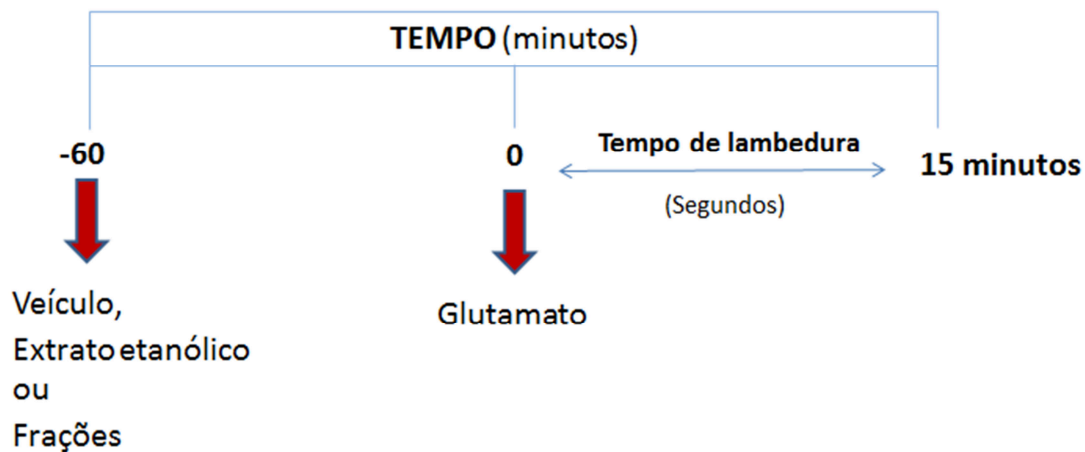


Esquema 4: Protocolo da nocicepção induzida por capsaicina.

3.6.3. Modelo da lambedura de pata induzida por glutamato

Para avaliar o possível envolvimento dos receptores glutamatérgicos no efeito antinociceptivo do extrato e suas frações, o glutamato, um neurotransmissor excitatório, foi administrado por via intraplantar e o tempo de lambedura da pata foi considerado como indicativo de dor neurogênica (Beirith e cols, 2002; Marcon e cols, 2009).

Os animais foram pré-tratados por via oral com veículo, EE ou suas frações, sessenta minutos antes da injeção na pata posterior direita de 20 µl glutamato (3382,2 µg/pata). Após a injeção foi registrado durante 15 minutos o tempo que o animal permaneceu lambendo a pata. O protocolo experimental está resumido no esquema 5.



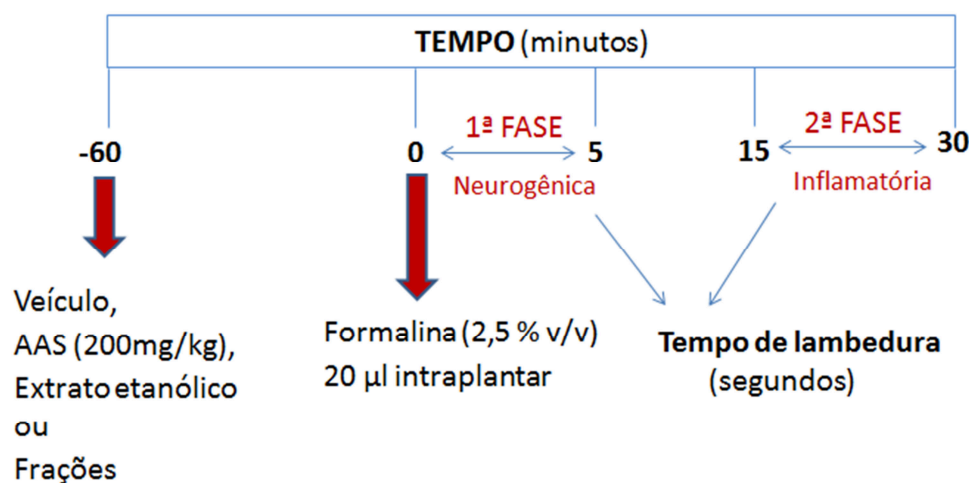
Esquema 5: Protocolo da nociceção induzida por glutamato.

3.6.4. Modelo da lambedura de pata induzida pela formalina

O modelo da formalina foi usado para avaliar dois diferentes tipos de nociceção. A injeção intraplantar produz uma resposta bifásica que consiste de uma fase inicial que ocorre nos primeiros 5 minutos após a injeção da formalina, chamada de 1ª fase ou fase de dor neurogênica, nesta fase, ocorre a ativação dos nociceptores locais, mediada pela serotonina e histamina que são liberadas em resposta ao estímulo neurogênico. E também uma segunda fase tardia que ocorre entre 15 e 30 minutos após a injeção intraplantar, denominada 2ª fase ou fase de dor inflamatória, que conta com envolvimento de mediadores como as prostaglandinas e produção de citocinas (Hunskar e cols., 1987; Gomes e cols., 2007).

Neste modelo uma injeção de 20 µl de formalina 2,5% foi administrada por via intraplantar na pata direita traseira do camundongo e a resposta comportamental dolorosa foi mensurada através do tempo que o animal permaneceu lambendo a pata.

Os animais foram tratados com o veículo (água destilada), AAS, extrato etanólico, ou suas frações em hexano, diclorometano e acetato de etila, 60 minutos antes da injeção intraplantar de da formalina. O protocolo experimental está resumido no esquema 6.



Esquema 6: Protocolo modelo da lambedura de pata induzida por formalina.

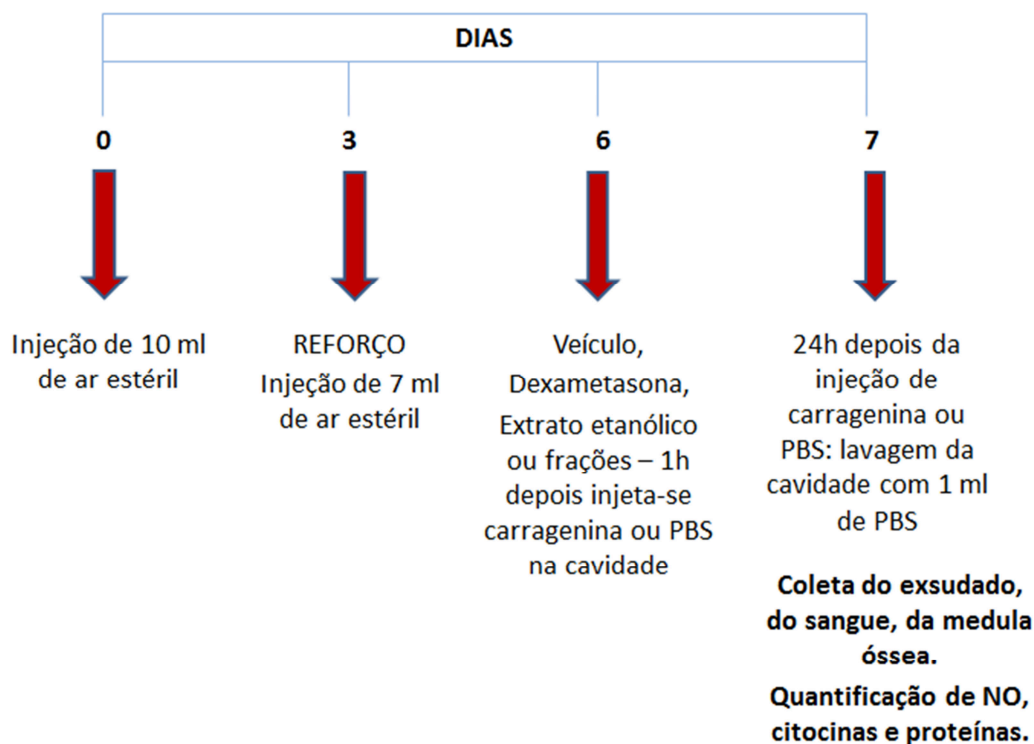
3.6.5. Modelo da migração celular induzida por carragenina (Bolsa de ar subcutânea)

O modelo da bolsa de ar subcutânea (Romano e cols., 1997; Raymundo e cols., 2011), o qual avalia migração de células para um local inflamado, foi realizado para avaliar o efeito do extrato etanólico e suas frações no processo de inflamação aguda.

Como observado no protocolo do experimento uma bolsa de ar subcutânea (BAS) foi formada no dorso dos camundongos após a injeção de 10 ml de ar estéril. Após três dias da primeira injeção de ar uma nova injeção de 7 ml de ar estéril foi feita para a manutenção da cavidade. No 6º dia os animais foram pré-tratados, por via oral, com veículo, dexametasona, EE ou frações e após sessenta minutos desse tratamento, receberam injeção de 1 ml de carragenina 1%. Foram separados três grupos de animais considerados como controles, o controle negativo composto por animais tratados somente com o veículo sessenta minutos antes da injeção de carragenina, o controle positivo composto por animais tratados i.p. com dexametasona (0,5 mg/kg), também sessenta minutos antes da injeção de carragenina e, por

fim, um grupo considerado apenas como “controle da qualidade dos animais” composto por animais tratados com o veículo e que receberam injeção de 1 ml de PBS estéril na BAS. No 7º dia os animais foram eutanasiados e a cavidade foi lavada com 1 ml de PBS para a coleta do exsudato inflamatório, e também retirou-se o sangue e a medula óssea dos animais. Imediatamente após a coleta, a contagem total e diferencial dos leucócitos presentes no exsudato foi determinada em contador automático de células (pocH-100iV Diff, Sysmex), assim como as células do sangue e da medula óssea. O exsudato foi centrifugado a 11.000 rpm por 10 minutos, a 4^oC. O sobrenadante foi aliquoteado e armazenado a -20^oC para posteriores quantificações de óxido nítrico (NO), de proteína e de citocinas.

No caso da contagem diferencial do sangue, realizada com o intuito de definir se a dose mais alta do extrato e suas frações poderia causar algum efeito tóxico ao sangue dos animais, 100µl de sangue foram coletados do olho de cada animal e colocados em um ependorfe contendo 15µl de EDTA e imediatamente foi feita a contagem das células no aparelho. Para contagem diferencial da medula, realizada para que se investigasse algum possível efeito mielotóxico do extrato e suas frações, o fêmur do camundongo foi retirado e lavado com 1 ml de PBS estéril, as células também foram contadas no contador automático de células. O protocolo está representado no esquema 7.



Esquema 7: Protocolo bolsa de ar subcutânea.

3.6.6. Quantificação de citocinas e proteínas

Os sobrenadantes recolhidos do exsudado da BAS foram usados para a quantificação de TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , NO e proteína. As citocinas foram quantificadas pelo método de ELISA, usando o protocolo sugerido pelo fabricante (B&D), que resumidamente, consiste em recobrir imunoplaacas de 96 poços, e incubadar por 18h a 4°C, com anticorpos de captura anti-TNF- α ou anti-IL-1 β ou anti-IL-10 ou anti- IFN- γ , e diluídos no tampão diluente. Após o período de incubação as placas foram lavadas com tampão de lavagem e bloqueadas por 1 hora, em temperatura ambiente, com tampão de bloqueio. Em seguida, foram novamente lavadas com tampão de lavagem e, 50 μ l das amostras ou o padrão específico de citocina recombinante, foram adicionados aos poços. As placas foram incubadas durante a noite a 4°C e posteriormente foram lavadas com tampão de lavagem e incubadas por 1 hora, em temperatura ambiente, com anticorpo de detecção conjugado com a enzima. Após a lavagem das placas, a adição da solução de substrato e a incubação por 30 minutos ao abrigo da luz,

foi adicionado H₃PO₄ 1N (25 µl/poço) como solução de parada. A absorbância foi medida a 450 nm utilizando-se um leitor de microplaca (FlexStation 3, Molecular Devices) e as concentrações das citocinas foram calculadas através da curva padrão de citocinas e expressas em µg/ml.

As proteínas foram quantificadas através do método BCA (BCA™ Protein Assay Kit, Pierce), e para a dosagem, foram misturados os reagentes A (carbonato de sódio, bicarbonato de sódio, ácido bicinônico e tartarato de sódio em 0,1 M de hidróxido de sódio) e B (sulfato de cobre 4%), na proporção 50:1. Em seguida, foram incubados 5 µl da amostra e 195 µl da mistura dos reagentes A e B à 37°C, por 30 minutos. A absorbância foi medida em leitor de microplaca (FlexStation 3, Molecular Devices) a 562 nm. A concentração de proteínas foi expressa em µg/mL calculada usando uma curva padrão de albumina sérica bovina.

3.6.7. Quantificação de nitrato

Para avaliar a produção de NO, a concentração de nitrato (metabólito estável do NO) foi mensurada seguindo os parâmetros observados em Xu e colaboradores (2000), acrescentado de modificações (Raymundo e cols., 2011).

Resumidamente, a técnica consiste em desproteinizar o sobrenadante do exsudato, em seguida, misturar à amostra, fosfato de sódio (0,5 M; pH 7,2), formato de amônio (2,4 M; pH 7,2) e *E. coli*. Após incubação por 2 horas a 37°C, centrifuga-se a 10.000 rotações por minuto (r.p.m.) por 10 minutos. Ao final, mistura-se 100 µl do sobrenadante com igual volume do reagente de Griess (1% sulfanilamida em água e 0,1% naftiletlenodiamina em 10% H₃PO₄), por 10 minutos (Green e cols., 1982). A absorbância foi medida em 540 nm e a concentração de nitrato foi calculada usando como comparação uma curva padrão de nitrato de sódio.

3.6.8. Análise estatística

Todos os experimentos foram compostos por grupos de 6 – 10 animais. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão (d.p.). A área sob a curva (ASC), parâmetro utilizado em farmacologia para definir o efeito das substâncias a serem avaliadas, foi calculada pelo programa Prisma Software 5.0. A significância estatística entre os grupos foi determinada por análise de variância (ANOVA) seguida por teste de Newman-Kels, utilizando o programa *GraphPad Prism 5.0*. Os valores foram considerados significativos quando p foi menor do que 0,05 ($p < 0,05$).

4. Resultados

4.1. Resultados em fitoquímica

4.1.1. Isolamento do flavonoide hispidulina por cromatografia em coluna (CC)

A escolha de um bom sistema de solventes é, talvez, o passo mais importante para a realização das cromatografias em coluna. A cromatografia em coluna com sílica gel foi realizada com todos os extratos obtidos neste trabalho. No entanto, de uma forma mais sucinta, descreveremos somente os resultados da coluna cromatográfica realizada para a fração em acetato de etila.

A fase móvel usada para a realização da cromatografia em coluna da fração em acetato de etila continha os seguintes solventes em gradiente crescente de polaridade: diclorometano, acetato de etila e metanol. As frações obtidas foram cromatografadas em camada fina (Cromatografia em camada delgada – CCD) e posteriormente reunidas de acordo com as suas similaridades cromatográficas.

Na figura 7 pode-se observar o perfil cromatográfico das frações 114 a 128 que eluíram da coluna cromatográfica com a fase móvel composta de acetato de etila : metanol em duas proporções de 8:2 de metanol e 7:3 de metanol. Após a junção dessas frações foi possível isolar uma substância pura cristalina amarela chamada aqui de composto X (20 mg, rendimento de 0,15%).

Uma observação importante quanto à análise das CCDs são os “rastros” deixados pelo composto X. Esses rastros caracterizam a presença de glicosídeos, que quando eluído nos solventes descritos sobre a sílica como fase estacionária, deixam uma “cauda” ou “rastro” na placa de sílica. Além disso, a coloração fortemente amarelada após revelação da placa com ácido sulfúrico indica a possibilidade do composto X ser um flavonoide, possibilidade esta comprovada nos experimentos descritos a seguir.

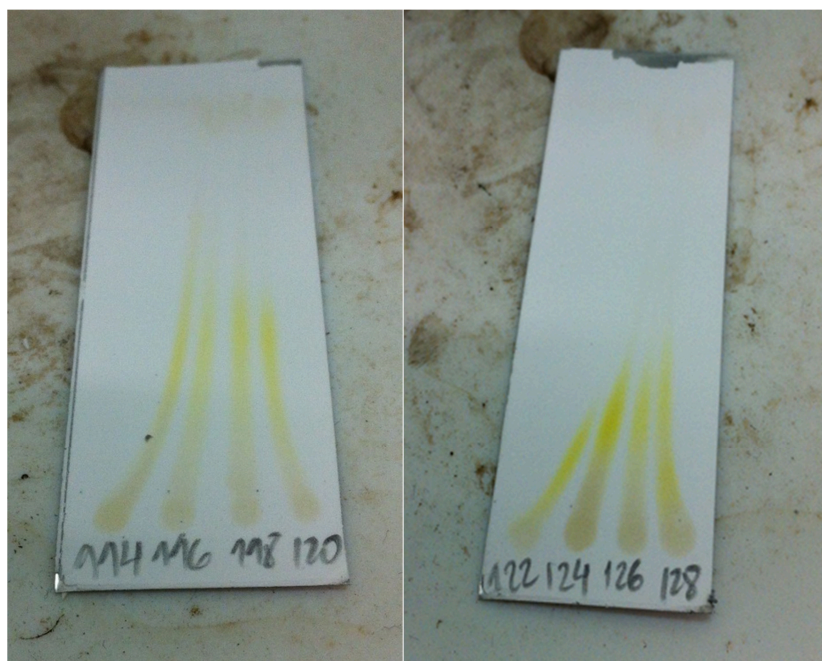


Figura 7: Placas de CCD das frações 114 a 120 e 122 a 128. Fase móvel utilizada para a realização das CCDs (114 – 128): AcOEt 90%/MeOH 10%. Fase móvel na coluna cromatográfica: AcOEt 80%/MeOH 20% (114-120) e AcOEt 70%/MeOH 30% (122 – 128).

4.1.2. Elucidação estrutural do composto X por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Após a separação por cromatografia em coluna, como descrito no item anterior, o composto X (ainda não identificado), foi encaminhado para análise por ressonância magnética nuclear utilizando como solvente DMSO deuterado (DMSO-d₆). Foram realizadas as análises de RMN de Hidrogênio (¹H) e Carbono (¹³C) Após análise dos espectros a estrutura de um flavonoide foi sugerida, como sendo a Hispidulina 7-O- β-D-glicosídeo, representada na Figura 8.

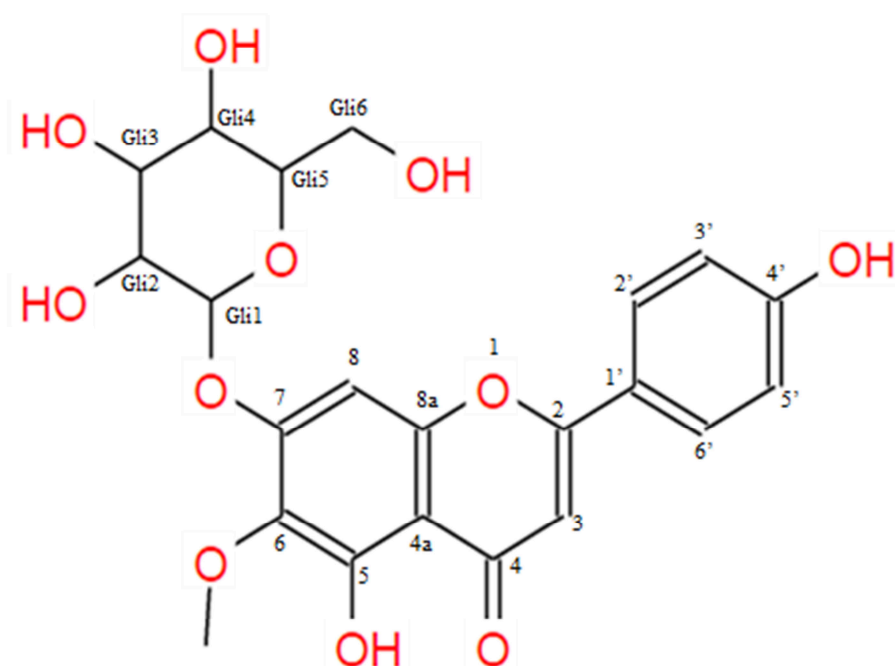


Figura 8: Composto X ou ‘Hispidulina 7-O- β -D-glicosídeo’

O RMN de ^1H (Figura 9) mostra sinais importantes da unidade hispidulina, como a presença de dois dubletos em $\delta 7.97$ ($J=8\text{Hz}$) $\delta 6.95$ ($J=8\text{Hz}$), assinalados aos prótons $2'/6'$ e $3'/5'$ no anel B do esqueleto flavonoidico, respectivamente. Dois singletos aparecem em campo baixo no espectro de RMN ^1H dessa substância, um em $\delta 12.97$ e outro em $\delta 10.42$. Esses sinais são referentes aos hidrogênios de hidroxilas fenólicas livres de flavonoides e indicam que apenas duas estão presentes nesse caso. Dois outros singletos são aparentes no espectro de RMN de ^1H dessa molécula, um em $\delta 7.03$ e outro em $\delta 6.88$, sendo atribuídos a posição 8 do anel A e posição 3 do anel C, respectivamente. As expansões apresentadas nas Figuras 10 e 11 ilustram melhor a distribuição desses sinais, além de nos deixar visualizar que se trata de uma molécula glicosídica.

Acquisition Time (sec)	1.9923	Comment	5 mm PABBO BB-1H/D Z-GRD Z104450/0144	Date	30 Jun 2014 15:28:16
Date Stamp	30 Jun 2014 15:28:16	File Name	C:\Users\roperod\Desktop\Carol\boylan030.1\fid	Frequency (MHz)	400.23
Nucleus	1H	Number of Transients	16	Origin	spect
Points Count	16384	Pulse Sequence	zg30	Original Points Count	16384
Spectrum Offset (Hz)	2471.5852	Spectrum Type	STANDARD	Receiver Gain	161.00
				SW(cyclical) (Hz)	8223.68
				Sweep Width (Hz)	8223.18
				Temperature (degree C)	25.160
				Solvent	DMSO-d6

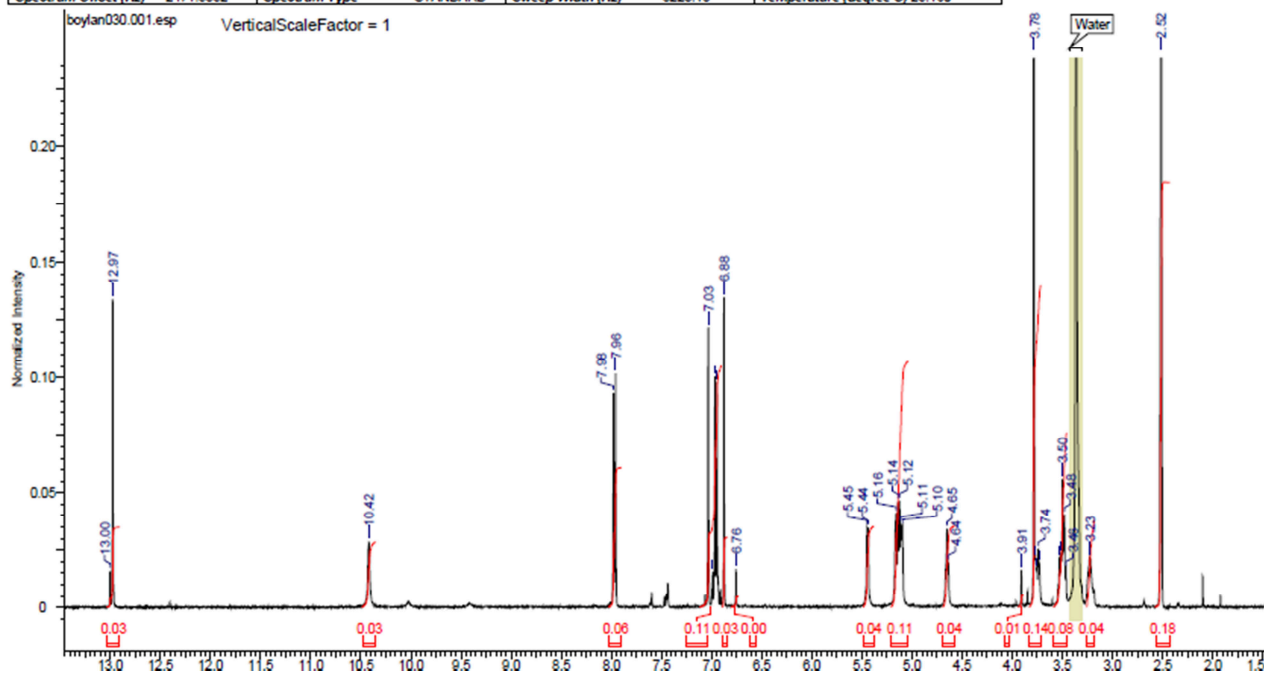


Figura 9: Espectro de RMN de ^1H do composto X.

Acquisition Time (sec)	1.9923	Comment	5 mm PABBO BB-1H/D Z-GRD Z104450/0144	Date	30 Jun 2014 15:28:16
Date Stamp	30 Jun 2014 15:28:16	File Name	C:\Users\roperod\Desktop\Carol\boylan030.1\fid	Frequency (MHz)	400.23
Nucleus	1H	Number of Transients	16	Origin	spect
Points Count	16384	Pulse Sequence	zg30	Original Points Count	16384
Spectrum Offset (Hz)	2471.5852	Spectrum Type	STANDARD	Receiver Gain	161.00
				SW(cyclical) (Hz)	8223.68
				Sweep Width (Hz)	8223.18
				Temperature (degree C)	25.160
				Solvent	DMSO-d6

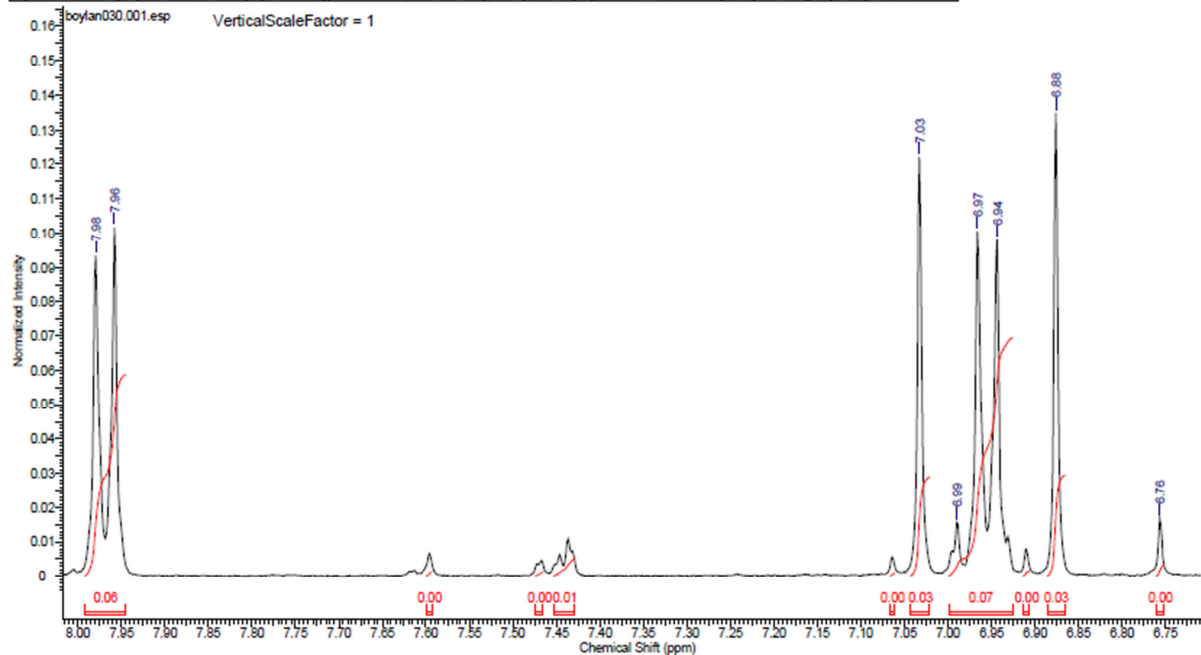


Figura 10: Expansão do espectro de RMN de ^1H do composto X ($\delta 6.7$ a $\delta 8.0$).

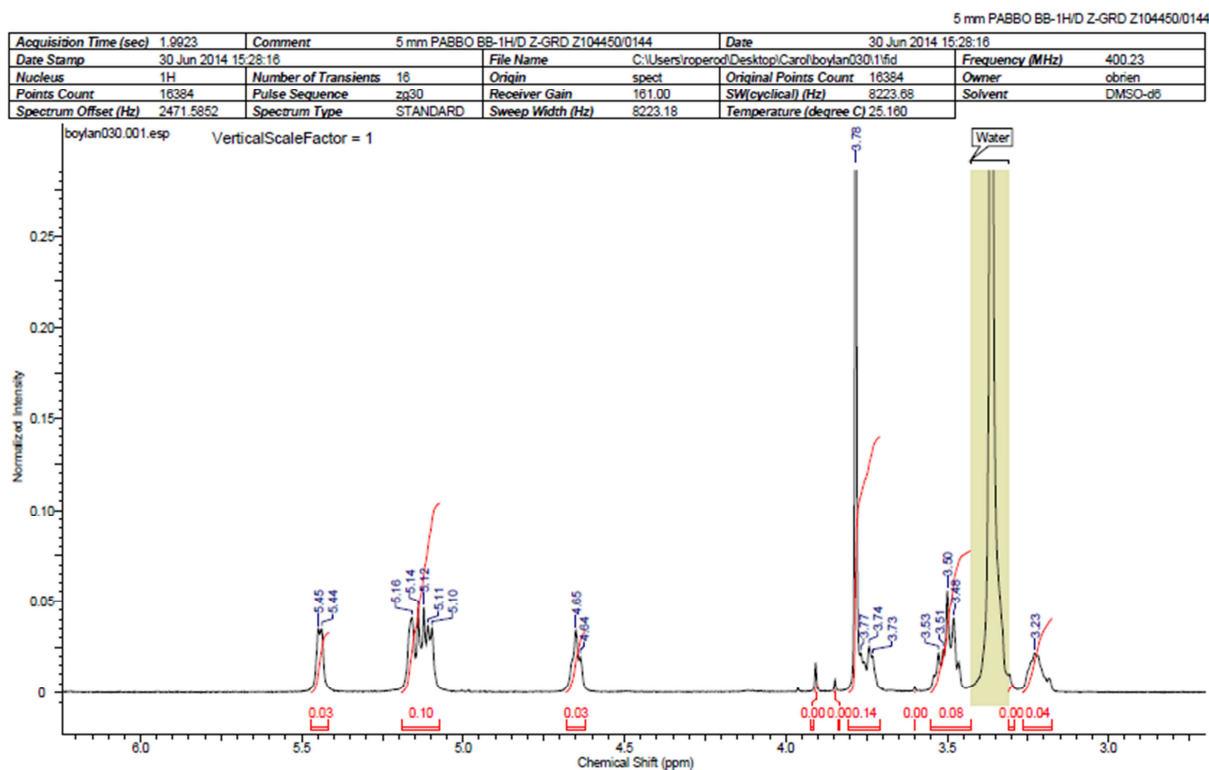


Figura 11: Expansão do espectro de RMN de ¹H do composto X (δ 2.5 a δ 6.5).

O espectro de RMN de ¹³C (Figura 12) mostra de fato 15 carbonos referentes a uma aglicona flavonoidica mais 6 carbonos referentes a uma porção glicosídica. O sinal em campo mais baixo no espectro de RMN de ¹³C, δ 182.2 é referente ao carbono da carbonila na posição 4 do flavonoide, este sinal não está apresentado no espectro por ter sido cortado durante a análise da amostra. Outros sinais importantes são os sinais de carbono ligados a hidroxilas (livres ou protegidas) dessa substância e são δ 161.83, δ 156.96, δ 152.62 e δ 132.99, referentes aos carbonos 4', 7, 5 e 6 respectivamente.

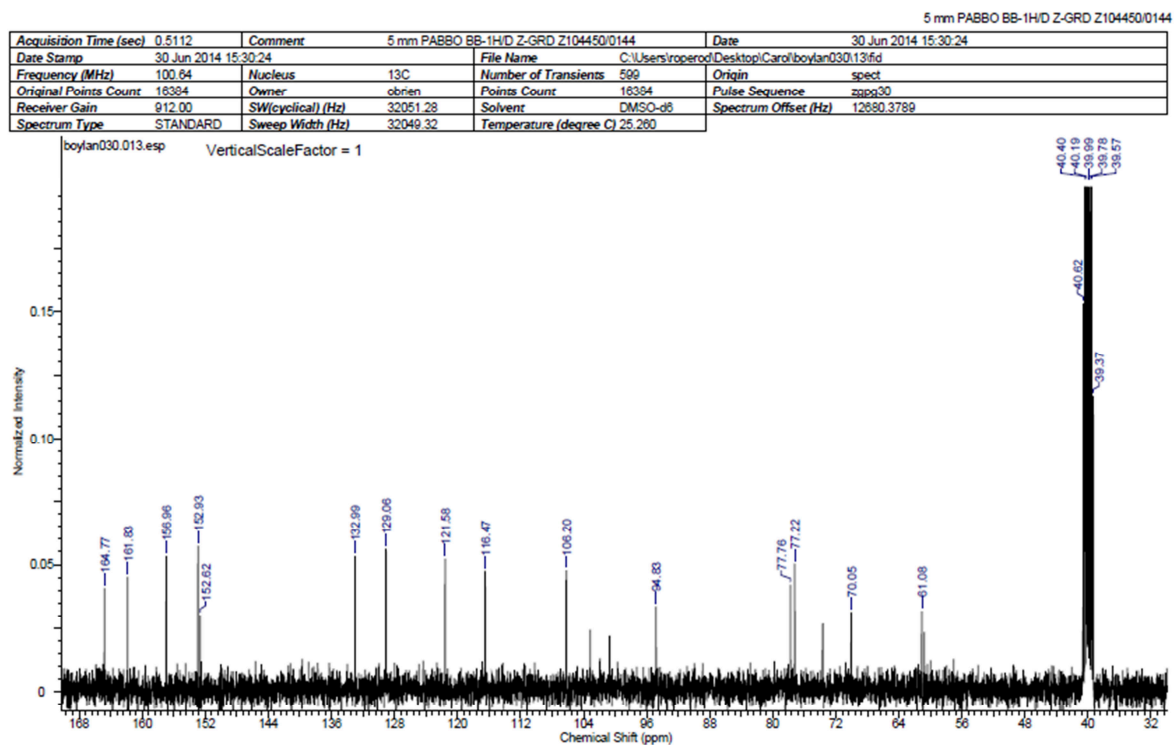


Figura 12: Espectro de RMN de ¹³C do composto X.

Para comprovar que o composto X isolado era de fato o flavonóide Hispidulina 7-O-β-D-glicosídeo, os dados observados nos espectros tanto de carbono quanto de hidrogênio foram comparados aos dados encontrados na literatura (Iwashina e cols., 1999), e estão apresentados na tabela abaixo (Tabela 1).

Tabela 1: Dados observados nos RMNs de ^{13}C e ^1H , para o composto X, comparados com os dados observados na literatura (Iwashina e cols., 1999).

Numeração	Dados da literatura		Dados do composto X	
	^1H RMN, δ_{H} (ppm)	^{13}C RMN, δ_{C} (ppm)	^1H RMN	^{13}C RMN
1	—	—	—	—
2	—	163,2	—	164,77
3	6,84	103,4	6,88	103,9
4	—	182,2	—	182,2
4a	—	152,8	—	152,93
5	—	152,6	—	152,62
6	—	131,5	—	132,99
7	—	157,7	—	156,96
8	7,11	94,5	7,03	94,83
8a	—	104,2	—	106,2
1'	—	124,4	—	121,58
2'	8,25	128,2	8,00	129,06
3'	7,4	116,7	7,00	116,47
4'	—	160,4	—	161,83
5'	7,4	116,7	7,00	116,47
6'	8,25	128,2	8,00	129,06
Gli1	3,73	100,9	3,78	101,7
Gli2	3,70	73,2	3,77	72,34
Gli3	3,22	77,3	3,23	77,22
Gli4	3,50	69,7	3,53	70,05
Gli5	3,45	75,8	3,48	77,76
Gli6	3,52	60,6	3,50	61,08

4.1.3. Dosagem de hispidulina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Para a quantificação do flavonoide na fração em acetato de etila (da qual foi isolado), uma curva de calibração foi realizada, pelo método do CLAE, e está expressa no gráfico 1.

A equação da reta obtida foi $y=31572x - 12994$.

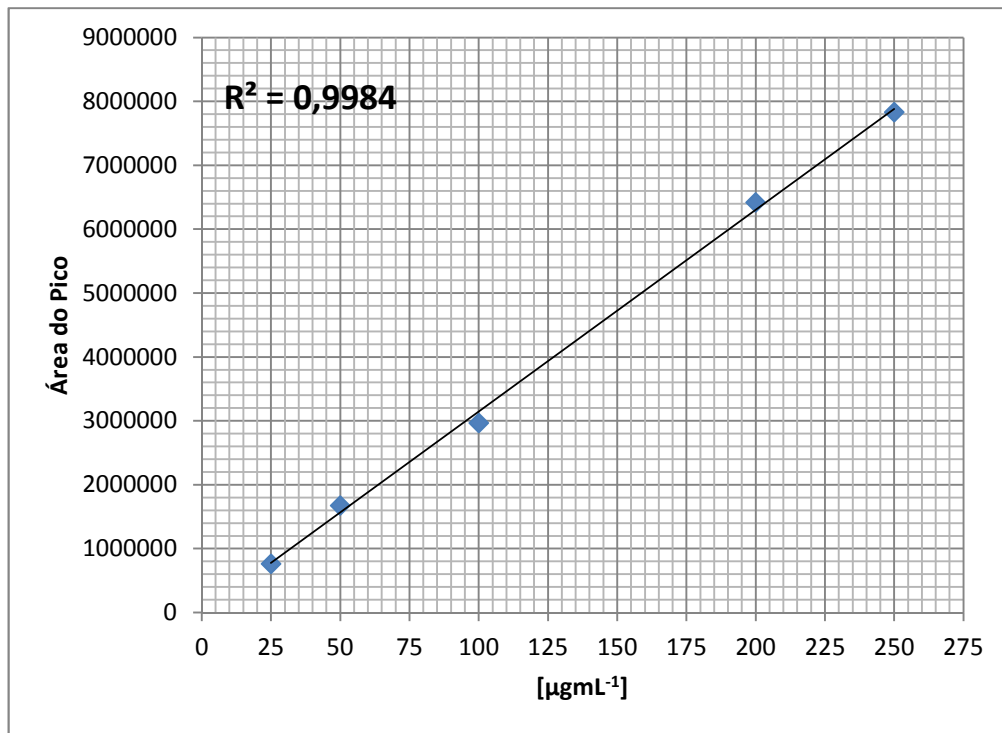


Gráfico 1: Curva de calibração para o flavonoide Hispidulina 7-O- β -D-glicosídeo

A fração em acetato de etila também foi analisada por CLAE utilizando-se a mesma metodologia descrita para construção da curva de calibração da hispidulina 7-O- β -glicosídeo (Figura 13). A área referente ao pico com o mesmo tempo de retenção da hispidulina 7-O- β -glicosídeo foi calculada em 373499,5, o que sugere que o flavonoide esteja na concentração de 117,9 $\mu\text{g/ml}$ na fração em acetato de etila, obtendo um rendimento de 39,3%.

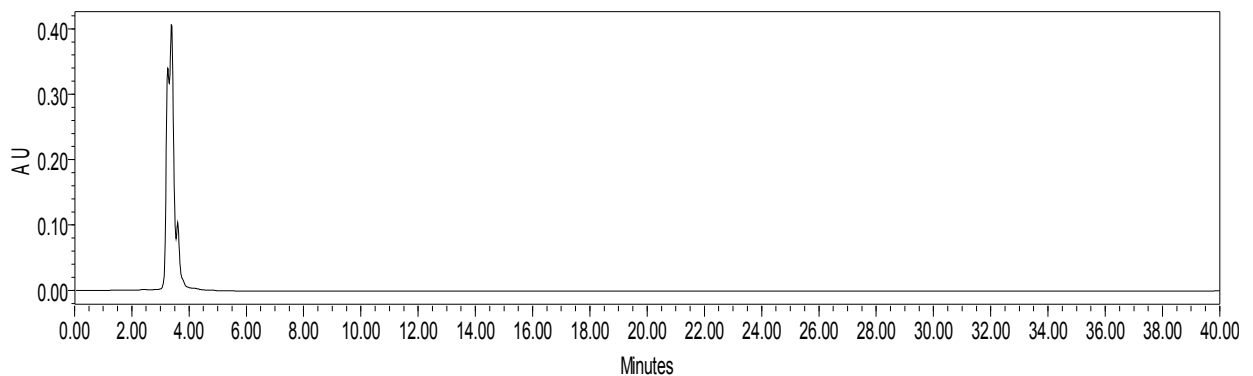


Figura 13: Análise da fração em acetato de etila pelo método de CLAE

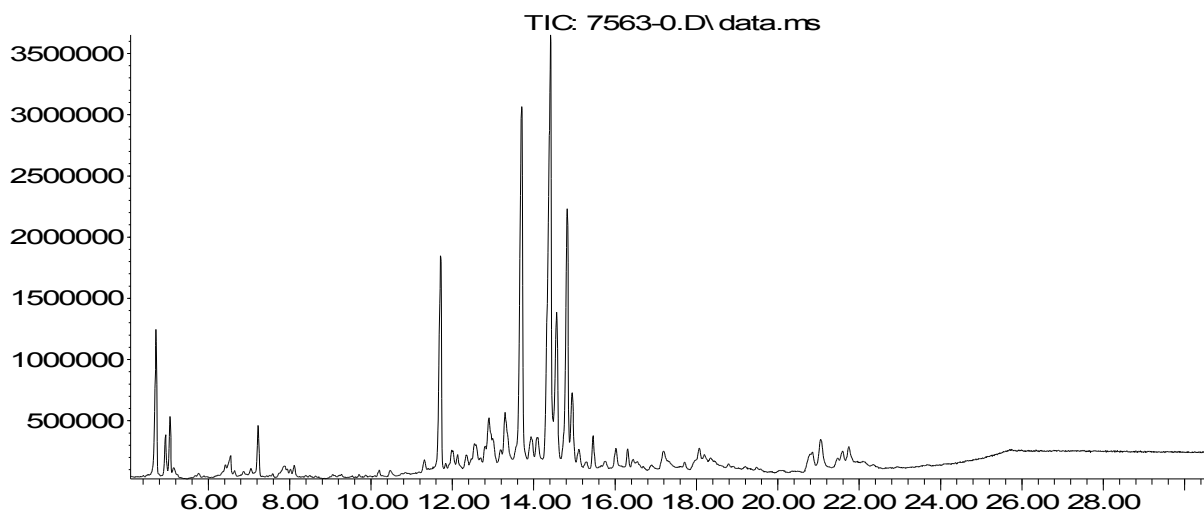
4.1.4. Investigação da composição das frações em hexano, diclorometano e acetato de etila utilizando cromatografia com fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM).

Para seguir com as análises dos componentes das frações, cada uma delas foi analisada pelo método de cromatografia com fase gasosa acoplada a espectroscopia de massas, a fim de que fossem observados outros componentes, nesse caso voláteis, presentes nas frações. É importante ressaltar que o flavonoide por ser uma substância não volátil, não poderá ser observado neste experimento.

Os resultados estão expressos como cromatogramas e tabelas (conjuntos), nas quais estão expressas as relações entre o tempo de retenção (t_R), a substância proposta pela biblioteca e por fim a confiabilidade (em porcentagem), a qual só foi considerada quando o valor era maior do que 80%.

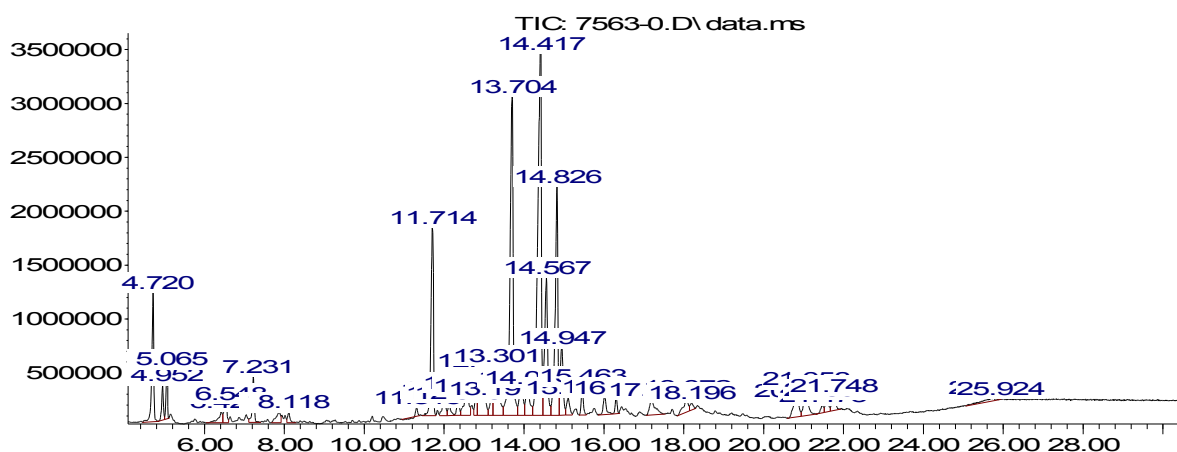
Primeiramente, foi analisado o extrato em hexano (conjunto 1). Para essa fração duas imagens de cromatogramas foram apresentadas, uma sem os tempos de retenção e a outra imagem contendo todos os tempos de retenção. Foram detectadas 31 substâncias das quais somente 16 podem ser considerados confiáveis, elas estão descritas na tabela representada no conjunto 1.

Abundance



Time-->

Abundance



Time →

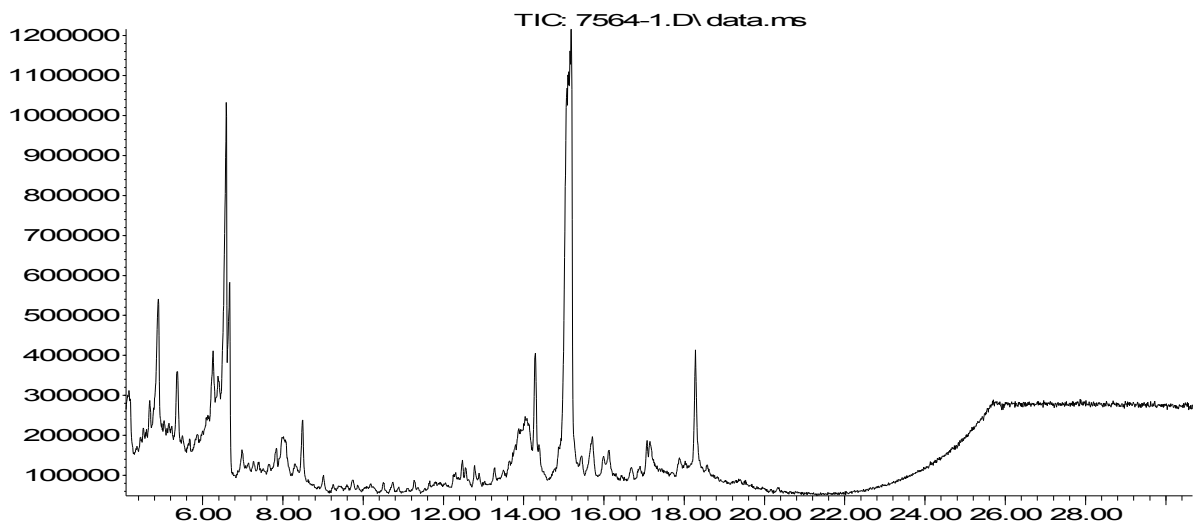
t _R (min)	Substância sugerida pela EM	Confiabilidade
4,720	-	-
4,952	3,7,11,15-Tetrametil-2-hexadecenol	90%
5,065	-	-
6,425	Palmitato de etila	93%
6,548	Ácido palmítico	99%
7,231	Fitol	90%
7,878	Ácido oleico	96%
8,118	-	-
11,714	19, 23-Hexametil -Tetracosahexano	99%
13,301	β-Tocoferol	95%
13,704	Vitamina E	98%
13,940	-	-
14,087	Colest-7-en-3-one,4,4-dimetil	86%
14,417	γ-sitosterol	99%
14,567	β-amirina	95%
14,826	α-amirina	99%
14,947	9,19-Ciclolanostan-3-ol,24-metileno-,(3.beta)	94%
15,113	-	-
16,022	-	-
16,311	-	-
17,193	10-Hidroxi-2,4,6a,6b,9,9,12a-heptametil-1,2,3,4,4a,5,6,6a,7,8,8a,9,10,11,12,12a,13,14b-eicosahidropiceno-2-ácido carboxílico	86%
18,072	-	-
18,196	-	-
20,850	-	-
21,058	-	-
21,475	-	-
21,594	Stigmastan-3,5-dieno	91%
21,748	-	-
25,711	-	-
25,924	-	-

Conjunto 1: Cromatogramas e tabela sugerindo os componentes da fração em hexano.

A fração em diclorometano foi a segunda a ser avaliada (conjunto 2), como a quantidade de picos de retenção demonstrado no segundo cromatograma era muito grande, o primeiro cromatograma foi expresso para a melhor observação dos picos.

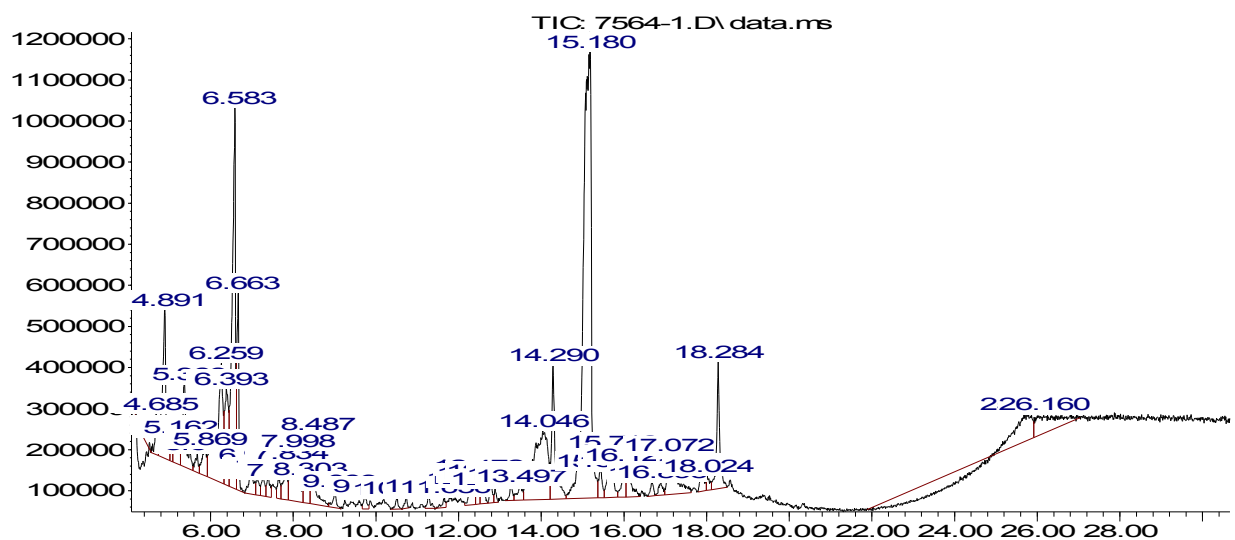
Foram apontados 16 possíveis componentes para a fração em diclorometano, no entanto, apenas 4 apresentavam confiabilidade elevada. Eles estão descritos na tabela abaixo (conjunto 2).

Abundance



Time→

Abundance



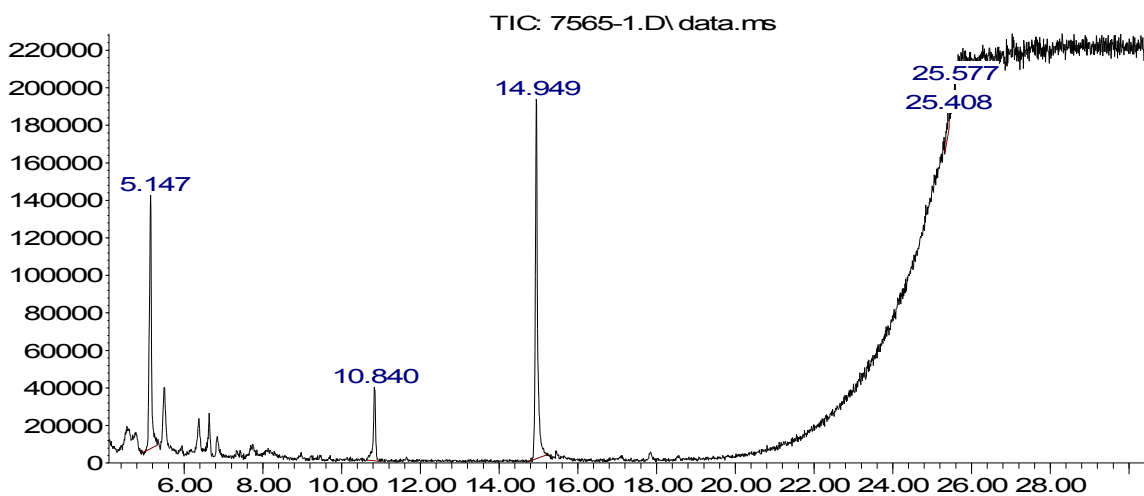
Time→

t _R (min)	Substância sugerida pela EM	Confiabilidade
4,685	-	-
4,894	2-Ciclohexen-1-o, 4-(3-hidroxi-1-butenil)-3,5,5-trimetil	80%
5,368	-	-
6,134	-	-
6,589	-	-
6,668	-	-
8,014	Galato de etila	93%
8,498	-	-
13,878	-	-
14,040	-	-
14,290	Estigmasterol,22,23-diidro	97%
15,180	4H-1-Benzopiran-4-ano, 5,7-diidroxi-2-(4-hidroxifenil) – 6-metoxi	93%
15,715	-	-
17,073	-	-
17,157	-	-
18,283	-	-

Conjunto 2: Cromatogramas e tabela sugerindo os componentes da fração em diclorometano.

Por fim, foi analisada a fração em acetato de etila (conjunto 3). Esta fração apresentou poucos componentes voláteis, isto é, além do flavonoide (componente majoritário desta fração), há, provavelmente, mais 2 outros componentes que fazem parte desta fração, eles estão descritos na tabela abaixo (conjunto 3).

Abundance



Time→

t _R (min)	Composto	Confiabilidade
5,147	-	-
5,496	1,3,5-Benzenotriol, diidrato	86%
10,840	-	-
14,949	4H-1-Benzopiran-4-ano, 5,7-diidroxi-2-(4-hidroxifenil) – 6-metoxi	81%

Conjunto 3: Cromatograma e tabela sugerindo os componentes da fração em acetato de etila.

4.1.5 Anatomia Vegetal

Alguns cortes histológicos foram realizados a fim de se observar estruturas que pudessem corroborar com as análises fitoquímicas e também com os efeitos farmacológicos observados.

A figura 14 representa o corte longitudinal da folha. A foto foi tirada usando o aumento de 10x e não foi usada nenhuma coloração.

Na figura 15 pode-se observar focos de amido (seta vermelha), que só foi possível pois o corte recebeu a coloração com iodo. O aumento utilizado também foi o de 10x.

A figura 16 ressalta a presença de tricomas nas folhas, os quais retêm o óleo essencial desta espécie. A fotografia foi realizada no corte sem coloração, usando um aumento de 10x.

Para a observação dos cristais de oxalato com maior precisão, uma lente polarizada foi utilizada. Na figura 17 é possível observar a presença cristais de oxalato (seta vermelha) no aumento de 40x.

Por fim, as figuras 18 e 19 demonstram a presença de compostos fenólicos (setas vermelhas) após a coloração dos cortes com cloreto férrico a 10% (figura 18) e cloreto férrico 0,1% (figura 19). Os cortes foram observados em um aumento de 10x (figura 18) e em um aumento de 40x (figura 19).

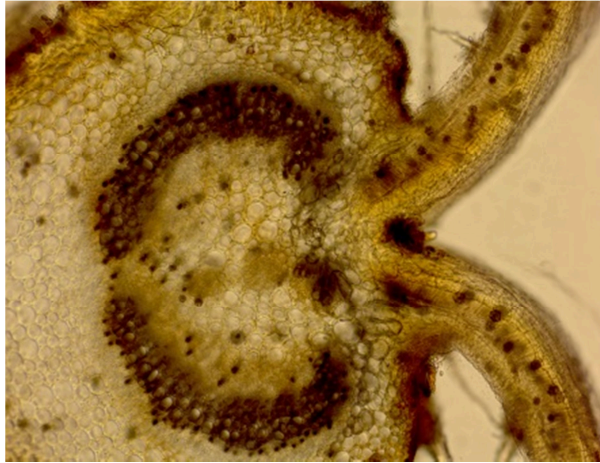


Figura 14: Corte longitudinal da folha de *T. granulosa*, aumento de 10x.

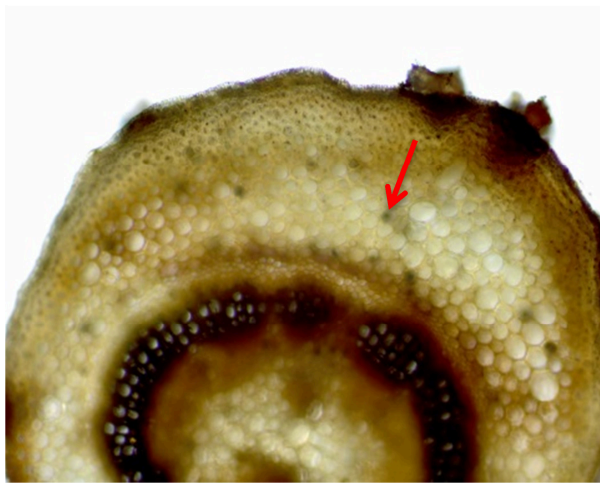


Figura 15: Focos de Amido. Coloração usada: iodo, aumento de 10x.



Figura 16: Tricomas, aumento de 10x.

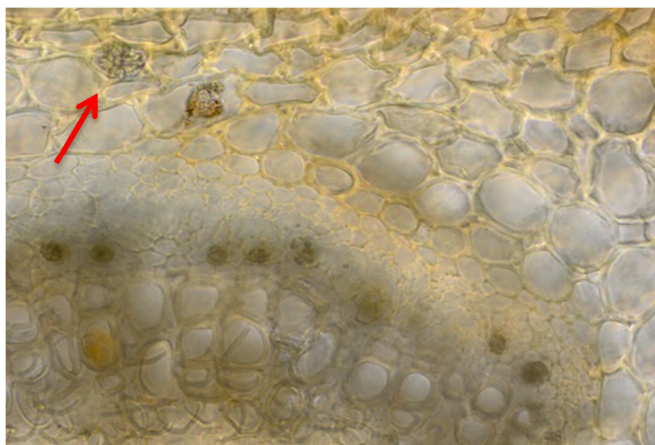
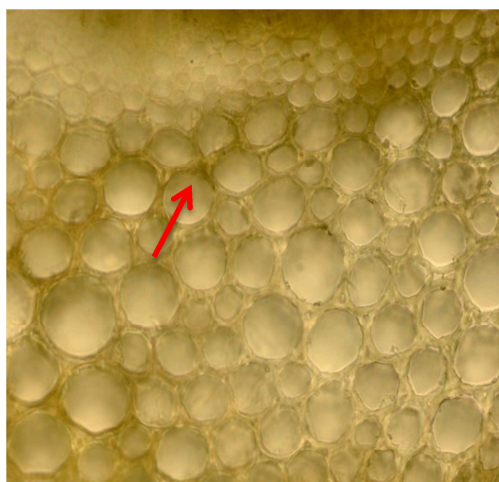
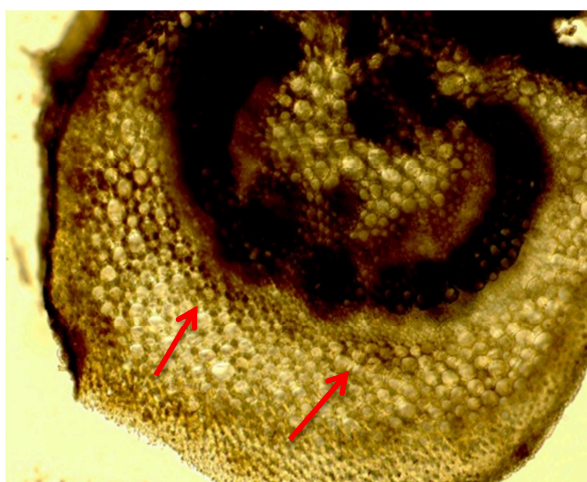


Figura 17: Cristais de oxalato de cálcio, aumento 40x.



Figuras 18 e 19: Compostos fenólicos em menor aumento (figura 18, aumento 10x) e maior aumento (figura 19, aumento 40x). Coloração usada: cloreto férrico 10% (figura 18) e cloreto férrico 0,1% (figura 19).

4.2. Resultados em farmacologia

4.2.1. Efeito do EE e suas frações no modelo da placa quente

O modelo da placa quente foi realizado com o intuito de avaliar a atividade antinociceptiva central do extrato etanólico e as frações em hexano, diclorometano e acetato de etila. Neste modelo o animal tenta lambe ou retirar a pata da superfície aquecida como consequência da ativação do córtex somatossensorial através de um estímulo térmico (Sahley and Berntson, 1979).

Após as duas primeiras medidas da linha de base, os animais foram divididos em grupos de tempo de latência semelhantes e cada grupo recebeu as doses de 10, 30 ou 100 mg/kg do EE, fH, fDCM ou fAE, por via oral (v.o.). Os valores foram comparados aos valores apresentados pela morfina (analgésico opioide) bem como aos valores demonstrados pelo grupo pré-tratado somente com veículo.

Como se pode observar no gráfico 2, os extratos e suas frações apresentaram atividade antinociceptiva central, e de maneira positiva, o extrato etanólico e a fração em hexano apresentaram atividade significativa não só quanto ao veículo, mas também quanto a morfina nas doses de 30 mg/kg. Os valores são representados em percentual de aumento em relação a linha de base (coluna da esquerda) e área sob a curva (ASC – coluna da direita).

Para melhor visualização dos gráficos vide anexo 1.

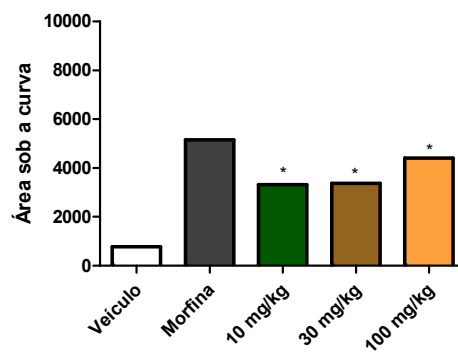
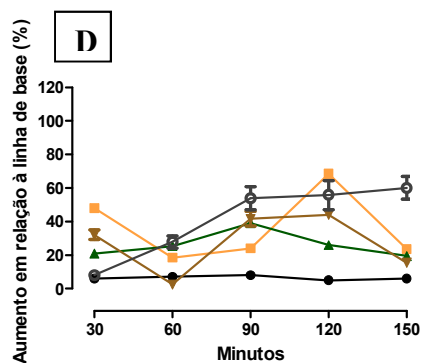
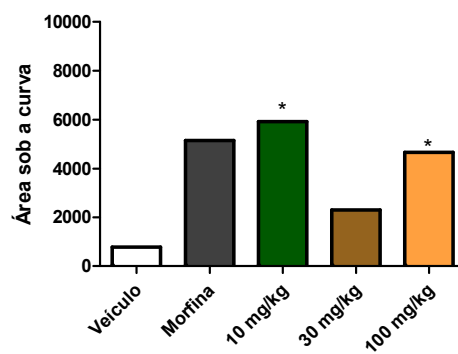
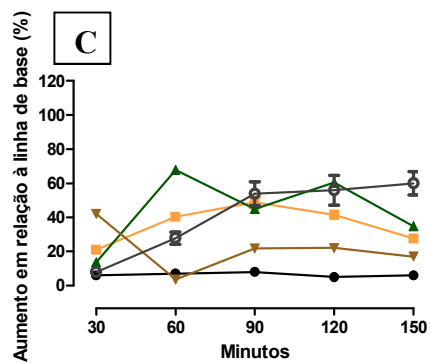
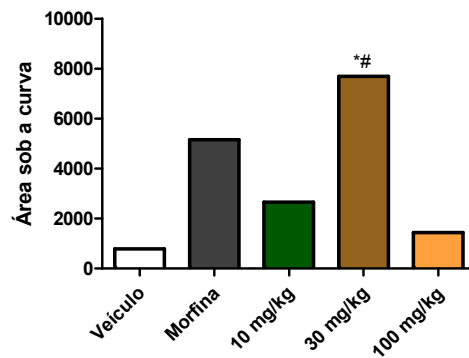
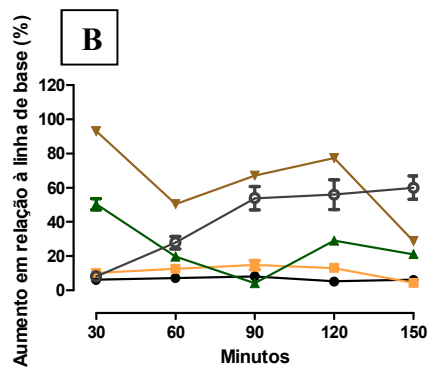
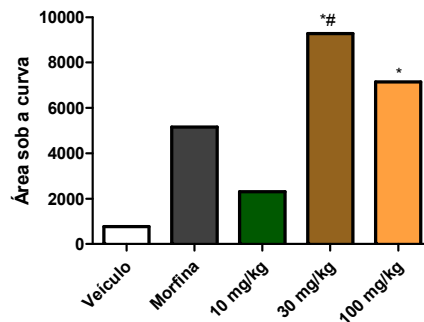
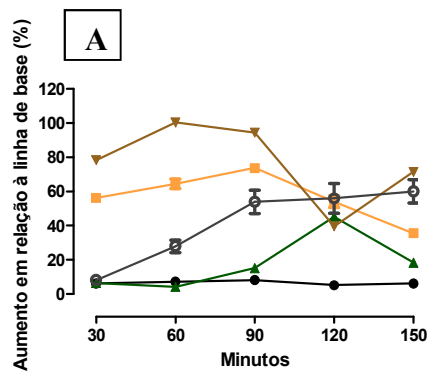


Gráfico 2: Efeito do Extrato Etanólico (A) e das frações em Hexano (B), Diclorometano (C) e Acetato de Etila (D) no modelo da placa quente. Os animais foram pré-tratados oralmente com

veículo, EE, fH, fDCM ou fAE (10, 30 e 100 mg/kg ou morfina (2,5 mg/kg, i.p.) Os resultados são expressos como média \pm d.p. (n=5-7). A significância estatística $p < 0,05$ (*) foi calculada por análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Newman-Kels, entre os grupos tratados com o veículo, o extrato, suas frações ou morfina. Em relação ao extrato etanólico e suas frações comparados ao grupo que recebeu morfina foi usado o símbolo #.

4.2.2. Efeito do EE e suas frações no modelo de nociceção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina

O modelo da lambertura de pata induzida pela capsaicina foi empregado com o intuito de avaliar o envolvimento dos receptores TRPV-1 no efeito antinociceptivo do EE e suas frações este experimento está descrito por Sakurada e cols (1992).

A capsaicina estimula receptores TRPV-1 e aumenta a liberação de vários neurotransmissores, incluindo substância P e glutamato, a partir de terminais periféricos e centrais de neurônios sensoriais primários. Essa estimulação pode contribuir para o processamento nociceptivo (Medvedeva e cols, 2008).

Os resultados obtidos no modelo da capsaicina (gráfico 3) mostram que o grupo pré-tratado com o veículo manifestou uma resposta nociceptiva da lambertura da pata de 43,1 segundos, quando o EE (gráfico 3A) foi administrado, por v.o., na dose de 30 mg/kg e na dose de 100 mg/kg o tempo de lambertura da pata foi reduzido para 20,0 segundos e 17,1 segundos, respectivamente. Para a fração H (gráfico 3B), as doses de 10 mg/kg e 100 mg/kg reduziram o tempo de lambertura da pata para 26,8 e 19,4 segundos, respectivamente. Já para a fração em DCM (gráfico 3C), as doses que apresentaram redução significativa na lambertura da pata foram as de 30 mg/kg e 100 mg/kg, manifestando tempo de lambertura de 28,4 segundos e 17,9 segundos, respectivamente. Por fim, a fração em AE (gráfico 3D) apresentou efeito significativo nas 3 doses administradas, reduzindo os tempos de lambertura

da pata para 32,9 segundos na dose de 10 mg/kg, 12,5 segundos na dose de 30 mg/kg e 23,0 segundos na dose de 100 mg/kg.

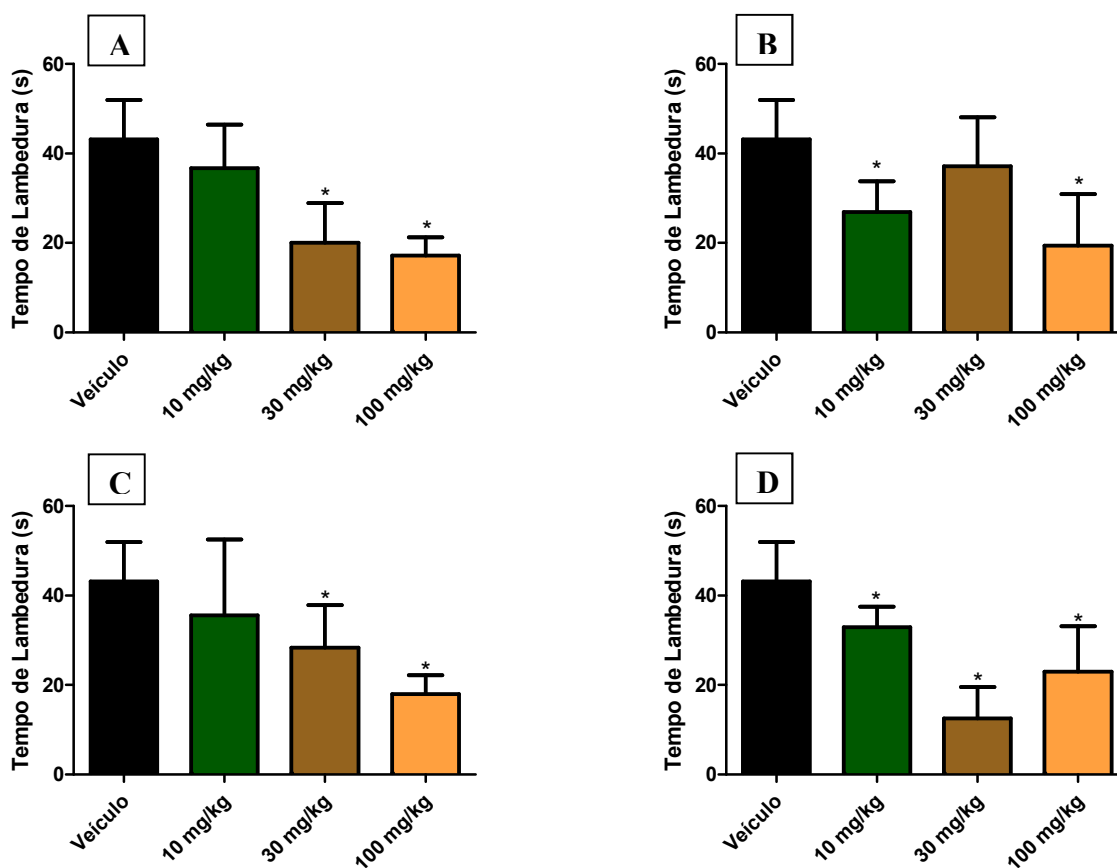


Gráfico 3: Efeito do EE (A) e suas frações em H (B), DCM (C) e AE (D) no modelo de nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina. Os animais foram pré-tratados oralmente com veículo, EE, fH, fDCM ou fAE (10, 30 e 100 mg/kg) 60 minutos antes da injeção de 20 μ l de capsaicina. Os resultados são expressos como média \pm d.p. (n=5-7). A significância estatística (* $p < 0,05$) foi calculada por análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Newman-Kels.

4.2.3. Efeito do EE e suas frações no modelo de nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato

O modelo da lambedura de pata induzida pelo glutamato foi realizado com o objetivo de investigar se a via glutamatérgica – já é bem estabelecido que o glutamato é um dos principais neurotransmissores excitatórios envolvido na transmissão de sinais nociceptivos

(Jancso, 1978; Ju e cols., 1987; Beirith e cols., 2002) - também participava no efeito antinociceptivo do extrato e suas frações, isto é, foi avaliado se as quatro substâncias seriam capazes de reverter o efeito nociceptivo causado pela injeção intraplantar do glutamato.

Conforme apresentado no gráfico 4, o pré-tratamento, por v.o., com todas as substâncias testadas nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg causou redução significativa no tempo que o animal permaneceu lambendo a pata. O animal tratado apenas com o veículo apresentou tempo de lambedura de 150 segundos, para o EE (gráfico 4A) a dose que apresentou maior inibição foi a de 10 mg/kg, reduzindo para 12 segundos o tempo de lambedura da pata. Para todas as frações a dose que demonstrou melhor resposta foi a de 30 mg/kg, reduzindo para 33,9 segundos, 53,1 segundos e 41,6 segundos para fH (gráfico 4B), fDCM (gráfico 4C) e fAE (gráfico 4D), respectivamente.

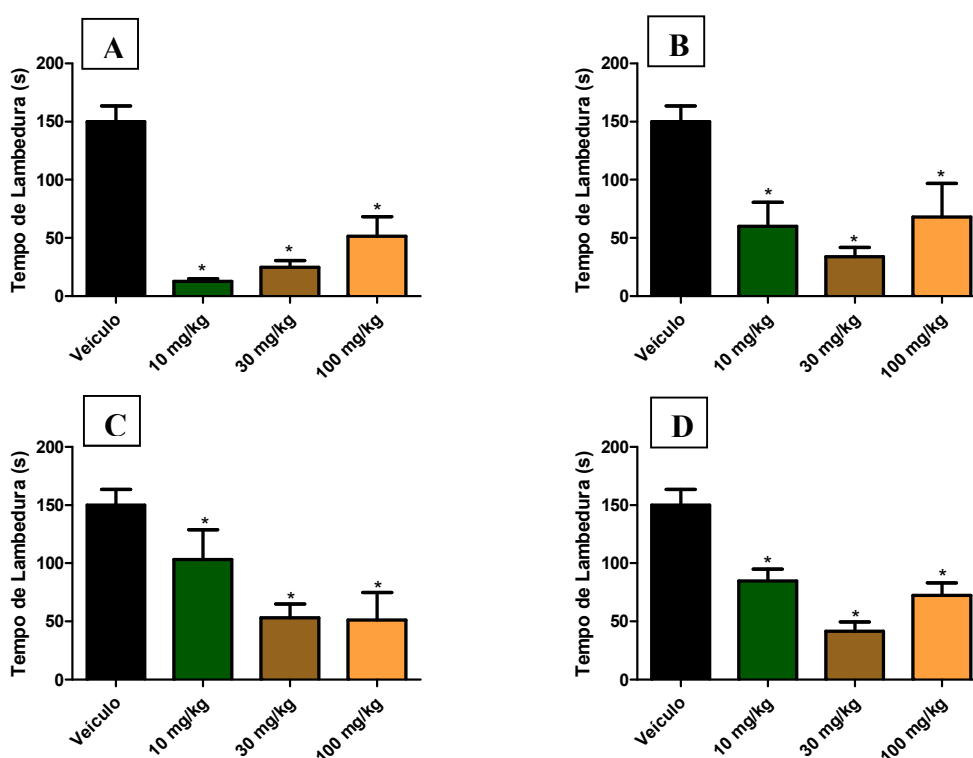


Gráfico 4: Efeito do EE (A) e suas frações em H (B), DCM (C) e AE (D) no modelo de nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato. Os animais foram pré-tratados oralmente com veículo, EE, fH, fDCM ou fAE (10, 30 e 100 mg/kg) 60 minutos antes da injeção de 20 µl de glutamato. Os resultados são expressos como média ± d.p. (n=5-7). A significância estatística (* p <

0,05) foi calculada entre os grupos tratados com o extrato, suas frações e o veículo, por análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Newman-Kels.

4.2.4. Efeito do EE e suas frações no modelo da lambertura de pata induzida pela formalina

A injeção intraplantar de formalina (2,5% v/v) desencadeia uma resposta algésica dividida em duas fases distintas. A 1ª fase (fase neurogênica) ocorre nos primeiros 5 minutos após a injeção da formalina e a 2ª fase (fase inflamatória) ocorre entre 15 e 30 minutos após a injeção de formalina.

Os resultados apresentados no gráfico 5 mostram o efeito do extrato etanólico, e das frações em hexano, diclorometano e acetato de etila, nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg, na resposta de lambertura da pata induzida pela formalina.

Para a primeira fase do experimento, o grupo de animais tratados oralmente com o veículo obteve tempo de lambertura de pata de $69,8 \pm 15,4$ segundos. O grupo que recebeu o pré-tratamento com ácido acetilsalicílico (AAS, 200 mg/kg, controle positivo), permaneceu lambendo a pata por $59,7 \pm 9,7$ segundos, não havendo, portanto, diferença significativa quando comparado ao grupo controle (veículo). Assim como também não houve diferença significativa no tempo de lambertura da pata dos grupos que receberam o pré-tratamento do extrato e as frações na primeira fase do experimento.

Durante a fase inflamatória (2ª fase), os animais pré-tratados oralmente com o veículo apresentaram um tempo de resposta de $336,9 \pm 47,9$ segundos. Já nos animais pré-tratados com AAS, o tempo obtido foi de $164,5 \pm 43,5$ segundos, correspondendo a uma inibição de 51,17% na resposta. Os grupos pré-tratados com EE (gráfico 5A), H (gráfico 5B) e DCM (gráfico 5C) apresentaram uma redução no tempo de resposta somente na dose de 30 mg/kg. Porém, para a fração AE (gráfico 5D) nenhuma das doses inibiu significativamente a lambertura de pata dos animais.

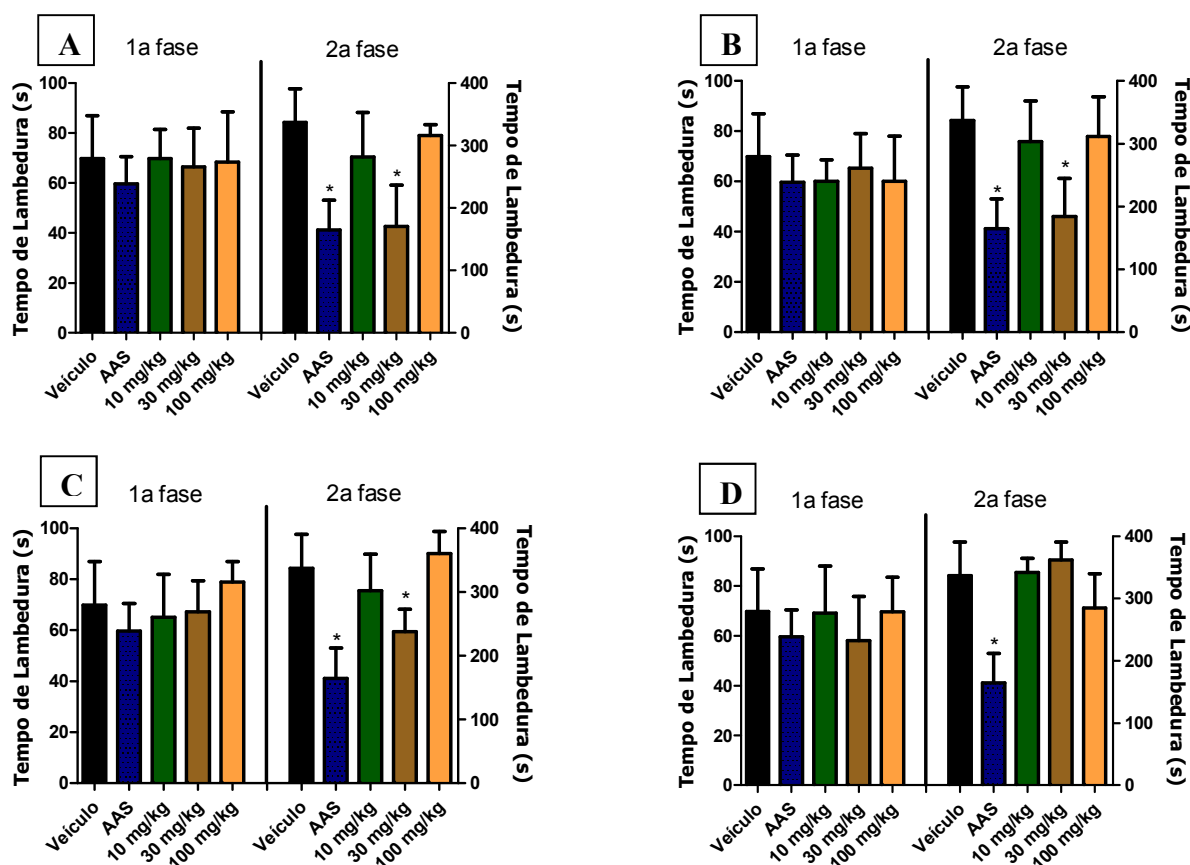


Gráfico 5: Efeito do EE (gráfico 4A), H (gráfico 4B), DCM (gráfico 4C) e AE (gráfico 4D) No modelo da lambedura de pata induzida pela formalina. Os animais foram pré-tratados oralmente com veículo, ácido acetilsalicílico (AAS, 200 mg/kg), EE, fH, fDCM ou fAE (10, 30 e 100 mg/kg), 60 minutos antes da injeção intraplantar de formalina (2,5% v/v). Os resultados são expressos como média ± d.p. do tempo em que os animais permaneceram lambendo a pata injetada com a formalina (n=5-7). A significância estatística $p < 0,05$ foi calculada comparando os grupos pré-tratados com EE, frações ou AAS com o grupo pré-tratado com veículo (*), por análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Newman-Kels.

4.2.5. Efeito do EE e suas frações no modelo inflamatório de migração celular – BAS

Apesar de a resposta anti-inflamatória não ter sido extremamente positiva no experimento da formalina, o modelo da migração celular foi realizado por se tratar de um teste cuja resposta inflamatória é diferente do experimento anterior, isto é, ainda que o

extrato bruto e as frações não tenham apresentado grande redução no tempo de lambertura da pata dos animais na segunda fase do experimento da formalina, o modelo da BAS provoca a transmigração de células para uma cavidade, o extravasamento plasmático e a produção de inúmeros mediadores e diversas citocinas, o que permite investigar o potencial anti-inflamatório de possíveis substâncias candidatas a anti-inflamatórios (Okudaira e Schuwarz, 1962; Clark, 1975; Vigil e cols., 2008) no que tange a migração de leucócitos.

É importante ressaltar que durante a realização deste modelo de migração celular, também foi plausível analisar possíveis efeitos hematológicos e/ou mielotóxicos quando EE ou as frações foram administradas. O que foi observado é que nenhuma das substâncias apresentou qualquer efeito tóxico aos animais (resultados não mostrados).

4.2.5.1. Quantificação de leucócitos totais

Vinte e quatro horas após a injeção da carragenina (1%) na BAS, o primeiro parâmetro avaliado foi da migração celular (gráfico 6), característica de um fenômeno inflamatório em progressão. De acordo com os resultados apresentados, a injeção de carragenina na BAS nos animais pré-tratados oralmente com o veículo causou, após 24 horas, um aumento significativo no número de leucócitos totais na cavidade, $48,0 \pm 12,3 \times 10^6$ células/ml para o EE – gráfico 6^a; $64,8 \pm 10,9 \times 10^6$ células/ml para a fração em acetato de etila – gráfico 6D; e $58,6 \pm 15,9 \times 10^6$ células/ml para as frações em hexano – gráfico 6B e diclorometano – gráfico 6C. Em relação ao grupo que recebeu a injeção de PBS, foram quantificadas $0,9 \pm 0,5 \times 10^6$ células/ml para o extrato em etanol, $1,8 \pm 0,8 \times 10^6$ células/ml para a fração em acetato de etila e $3,0 \pm 1,5 \times 10^6$ células/ml para as frações em hexano e diclorometano. Já os animais que foram pré-tratados intraperitonealmente (i.p.) com o anti-inflamatório esteroideal (AIE) dexametasona (0,5 mg/kg), 1 hora antes da injeção de carragenina na BAS, foi observada uma redução de 48,5% no número total de células

quando comparado a $64,8 \pm 10,9 \times 10^6$ células/ml do grupo que recebeu carragenina, isto é, o número de células na cavidade foi reduzido para $33,4 \pm 13,0 \times 10^6$ células/ml. Para o grupo que recebeu o pré-tratamento com o extrato não houve redução na migração leucocitária, já as frações em hexano e diclorometano apresentaram redução da migração celular nas três doses testadas e, por fim, a fração em acetato de etila reduziu significativamente a migração celular somente nas doses de 10 e 100 mg/kg.

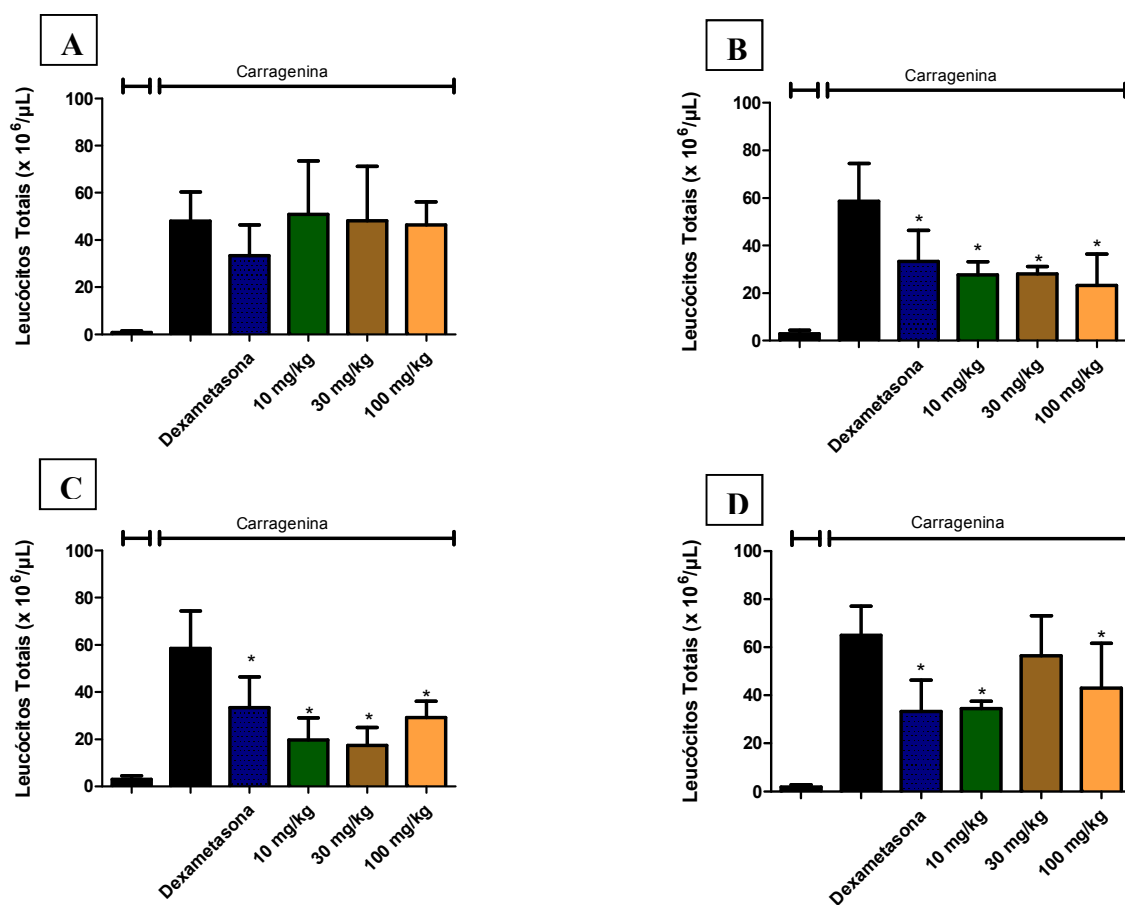


Gráfico 6: Efeito do EE (A), e as frações H (B), DCM (C) e AE (D) na migração celular induzida por carragenina na BAS. Os animais foram pré-tratados oralmente com veículo (água destilada), EE, fH, fDCM ou fAE nas doses (10, 30 e 100 mg/kg) 60 minutos antes da injeção de PBS (grupo controle) ou carragenina (demais grupos) na BAS, ou pré-tratados intraperitonealmente (i.p) com dexametasona (0,5 mg/kg) também 1 hora antes da injeção de carragenina na BAS. Os resultados são expressos como média \pm d.p. do número de leucócitos totais ($\times 10^6$ /mL) (n=5-7). A significância

estatística (* $p < 0,05$) foi calculada entre os grupos tratados com o extrato, frações ou dexametasona e o veículo, por análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Newman-Kels.

4.2.5.2. Dosagem de citocinas (TNF- α , IL-1 β , IFN- γ)

Após a injeção de carragenina na BAS, além da liberação de alguns mediadores inflamatórios, há também a liberação de diversas citocinas que estão envolvidas na evolução do processo inflamatório. Assim, foi avaliado se o EE e suas frações seriam capazes de alterar a produção de algumas citocinas produzidas durante a resposta inflamatória, induzida por carragenina.

A concentração de TNF- α , IL-1 β e, IFN- γ no exsudato inflamatório da BAS nos animais tratados oralmente com o veículo e que receberam injeção de carragenina na cavidade, manteve-se acima de 500 pg/ml (gráficos 7, 8 e 9).

Para a citocina TNF- α (gráfico 7), foi possível observar redução significativa nas três doses administradas para o EE (gráfico 7A) e para a fração em AE (gráfico 7D), enquanto as frações H (gráfico 7B) e DCM (gráfico 7C) não demonstraram efeito significativo na produção desta citocina em nenhuma das doses testadas.

Em relação a produção de IL-1 β (gráfico 8) somente o EE (gráfico 8A) foi capaz de reduzir a produção desta citocina nas três doses administradas, de forma semelhante àquela produzida quando a dexametasona foi administrada (0,5 mg/kg, i.p.).

Por fim, a produção de IFN- γ (gráfico 9) foi reduzida significativamente somente quando houve administração do EE (gráfico 9A) na dose de 10 mg/kg e também para a fração em AE (gráfico 9D) nas doses de 10 e 30 mg/kg.

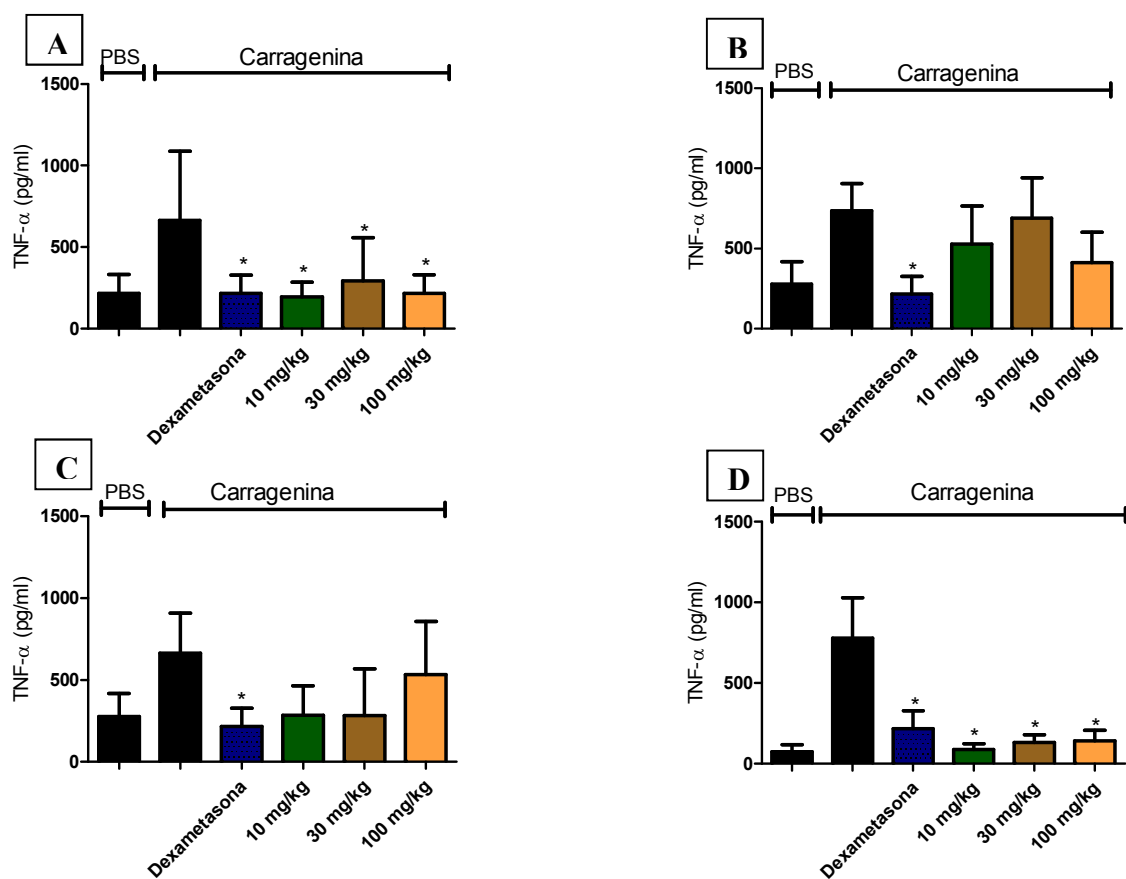


Gráfico 7: Efeito do EE (A), H (B), DCM (C) e AE (D) na produção de TNF- α induzida por carragenina na BAS. Os animais foram pré-tratados oralmente com veículo ou extrato e frações (10, 30 e 100 mg/kg) ou dexametasona (0,5 mg/kg i.p.) 60 min antes da injeção de carragenina na BAS. Os resultados são expressos como média \pm d.p. da concentração de TNF- α (pg/ml) (n= 5-8). A significância estatística (*p < 0,05) foi calculada entre os grupos tratados com o extrato ou suas frações e o veículo, por análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Newman-Kels. * quando comparados os grupos tratados com as e o veículo e o extrato/frações.

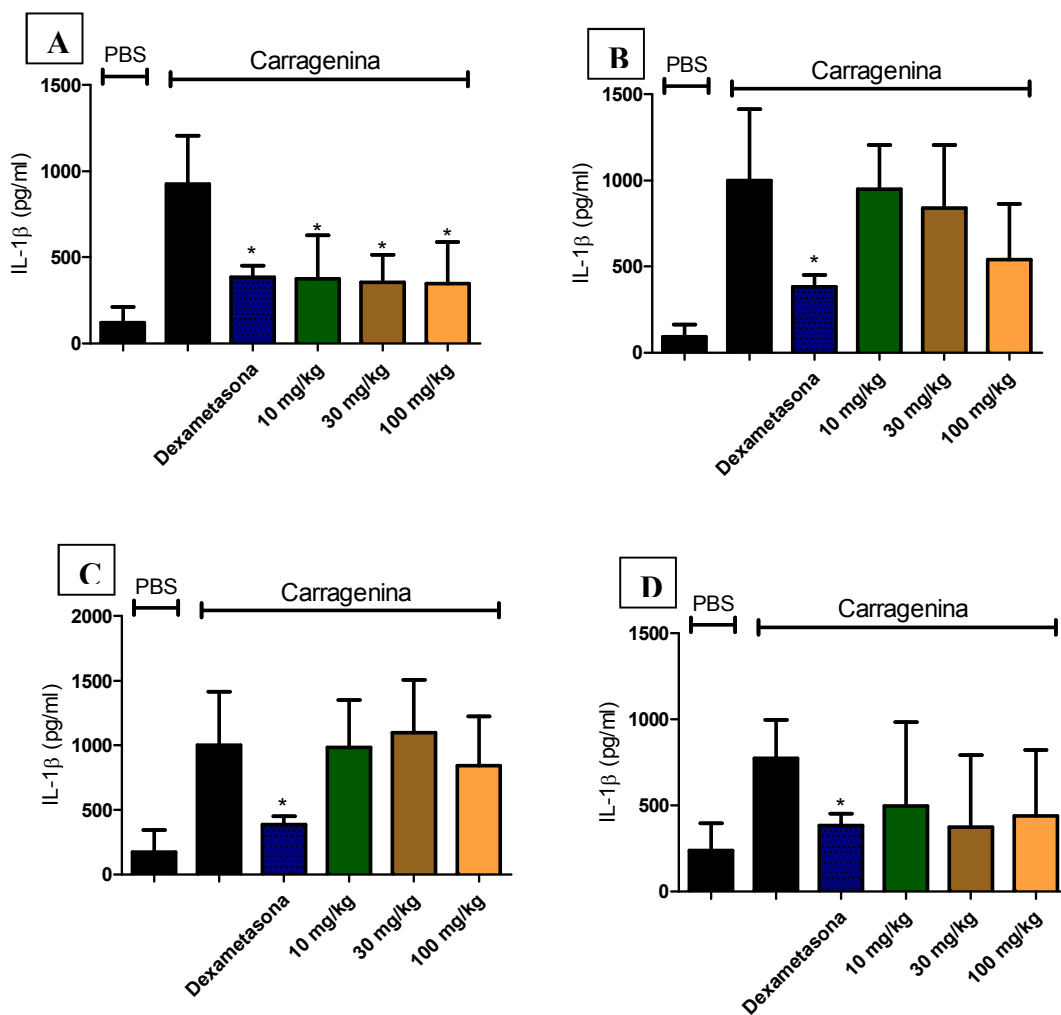


Gráfico 8: Efeito do EE (A), H (B), DCM (C) e AE (D) na produção de IL-1β induzida por carragenina na BAS. Os animais foram pré-tratados oralmente com veículo ou extrato e frações (10, 30 e 100 mg/kg) ou dexametasona (0,5 mg/kg i.p.) 60 min antes da injeção de carragenina na BAS. Os resultados são expressos como média ± d.p. da concentração de IL-1β (pg/ml) (n= 5-8). A significância estatística (*p < 0,05) foi calculada entre os grupos tratados com os três derivados e o veículo, por análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Newman-Kels. * quando comparados os grupos tratados com o extrato/frações e o veículo.

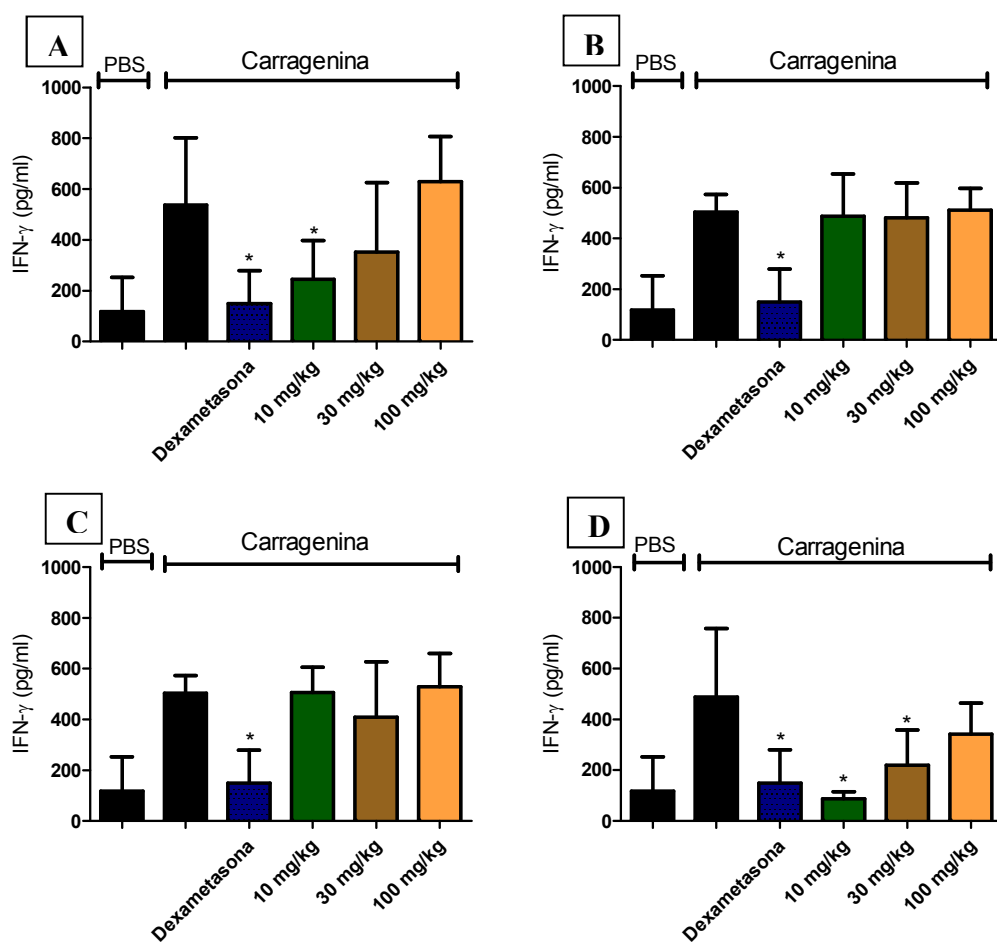


Gráfico 9: Efeito do EE (A), H (B), DCM (C) e AE (D) na produção de IFN- γ induzida por carragenina na BAS. Os animais foram pré-tratados oralmente com veículo ou extrato e frações (10, 30 e 100 mg/kg) ou dexametasona (0,5 mg/kg i.p.) 60 min antes da injeção de carragenina ou PBS na BAS. Os resultados são expressos como média \pm d.p. da concentração de IFN- γ (pg/ml) (n= 5-8). A significância estatística (*p < 0,05) foi calculada entre os grupos tratados com os três derivados e o veículo, por análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Newman-Kels.

4.2.5.3. Quantificação de Oxido Nítrico (NO)

O óxido nítrico é um importante mediador que regula diversos eventos do processo inflamatório (Rossi e cols., 2003).

O gráfico 10 representa a quantificação de oxido nítrico produzido pelas células que migraram para a BAS. No grupo injetado com PBS na cavidade e pré-tratado com veículo, a

concentração de NO no lavado da cavidade foi de $29,9 \pm 19,4 \mu\text{M}$ para o EE, $12,3 \pm 7,2 \mu\text{M}$ para a AE e $40,8 \pm 22,1 \mu\text{M}$ para a fH e fDCM, enquanto o grupo injetado com carragenina na BAS e pré-tratado com veículo foi de $397,6 \pm 200 \mu\text{M}$ para o EE, $430,4 \pm 164 \mu\text{M}$ para fAE e $287,8 \pm 148 \mu\text{M}$ para fH e fDCM. Em animais que receberam intraperitonealmente a dexametasona ($0,5 \text{ mg/kg}$), 1 hora antes da injeção de carragenina na BAS, houve uma redução da produção de NO para $70,2 \pm 50,6 \mu\text{M}$ em relação ao grupo injetado com carragenina na BAS e pré-tratado com veículo. O grupo de animais que recebeu tratamento com o EE (gráfico 10A) não apresentou uma redução significativa na produção de NO, já a fração em hexano (gráfico 10B) foi capaz de reduzir a produção de NO nas doses de 10 e 100 mg/kg. No entanto a fração em DCM (gráfico 10C) só reduziu significativamente a produção de NO na dose de 10 mg/kg e a fração AE (gráfico 10D) somente na dose de 100 mg/kg.

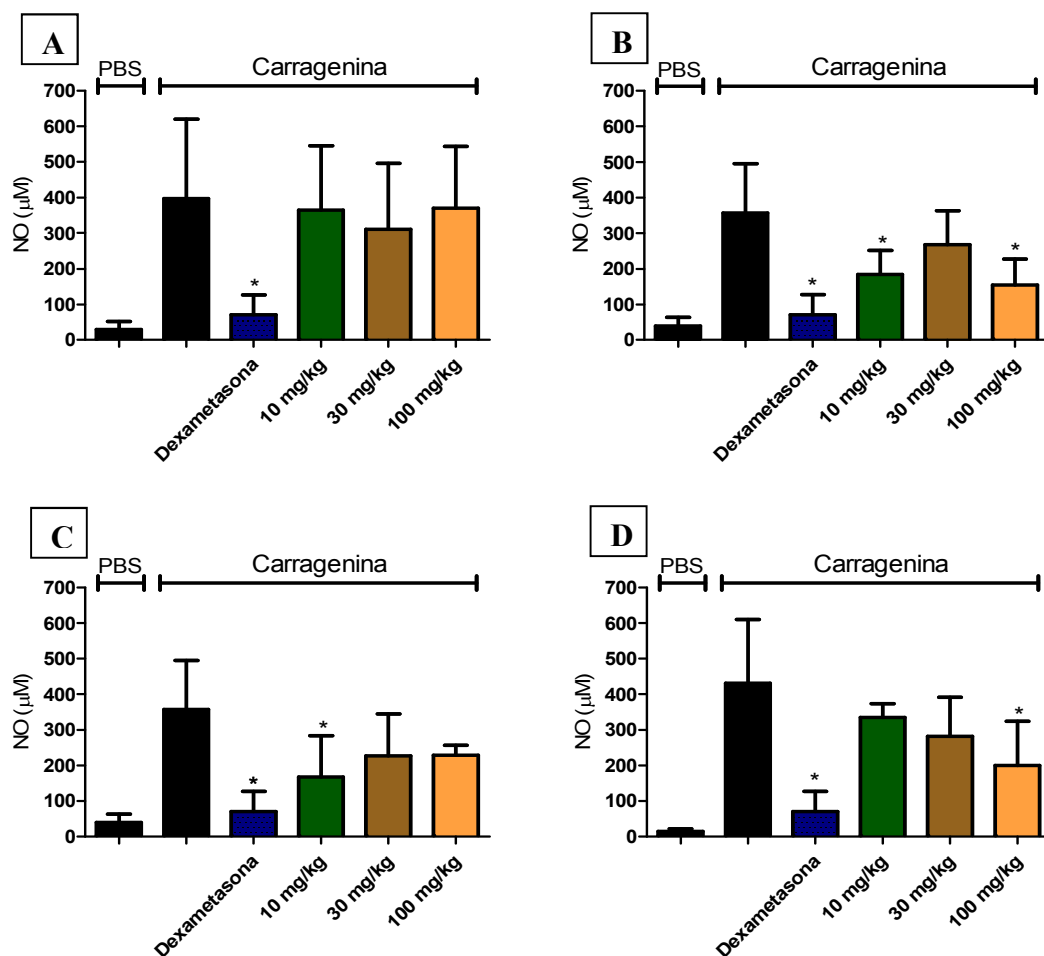


Gráfico 10: Efeito do EE (A), H (B), DCM (C) e AE (D) na produção de NO induzida por carragenina na BAS. Os animais foram pré-tratados oralmente com veículo ou com EE, fH, fDCM e fAE (10, 30 e 100 mg/kg), 60 min antes da injeção de carragenina na BAS, ou pré-tratados i.p.com dexametasona (0,5 mg/kg) 1 hora antes da injeção de carragenina na BAS. Os resultados são expressos como média ± d.p. da concentração de NO (µM) (n=5-7). A significância estatística (*p < 0,05) foi calculada por análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Newman-Kels.

4.2.5.4. Dosagem de proteínas

Mais um evento que ocorre após a injeção da carragenina na BAS é o aumento da permeabilidade vascular que favorece o extravasamento de proteínas plasmáticas do sangue para a BAS.

No gráfico 11, o grupo dos animais pré-tratados com veículo e que recebeu a injeção de PBS na cavidade, foram quantificadas $6,6 \pm 2,0$ mg/ml, $30,8 \pm 26,1$ mg/ml e $7,5 \pm 3,8$ mg/ml de proteínas totais para EE, fAE, fH/fDCM, respectivamente, enquanto no exsudato inflamatório dos animais que receberam injeção de carragenina, foram quantificadas $269,8 \pm 51,3$ mg/mL, $281,5 \pm 62,7$ mg/mL e $296,1 \pm 93,0$ mg/mL de proteínas para EE (gráfico 11A), fAE (gráfico 11D), fH/fDCM (gráfico 11B e 11C, respectivamente). Nos animais pré-tratados com dexametasona (0,5 mg/kg), 1 hora antes da injeção da carragenina na BAS, a concentração de proteína foi $222,8 \pm 73,7$ mg/mL. Portanto, não houve inibição do extravasamento de proteína quando o grupo tratado com dexametasona foi comparado ao grupo que recebeu carragenina na BAS. Considerando os grupos de animais pré-tratados com EE, H, DCM e AC (10, 30 e 100 mg/kg), nenhum dos grupos foi capaz de inibir o extravasamento de proteínas causado pela injeção de carragenina na BAS (gráfico 11).

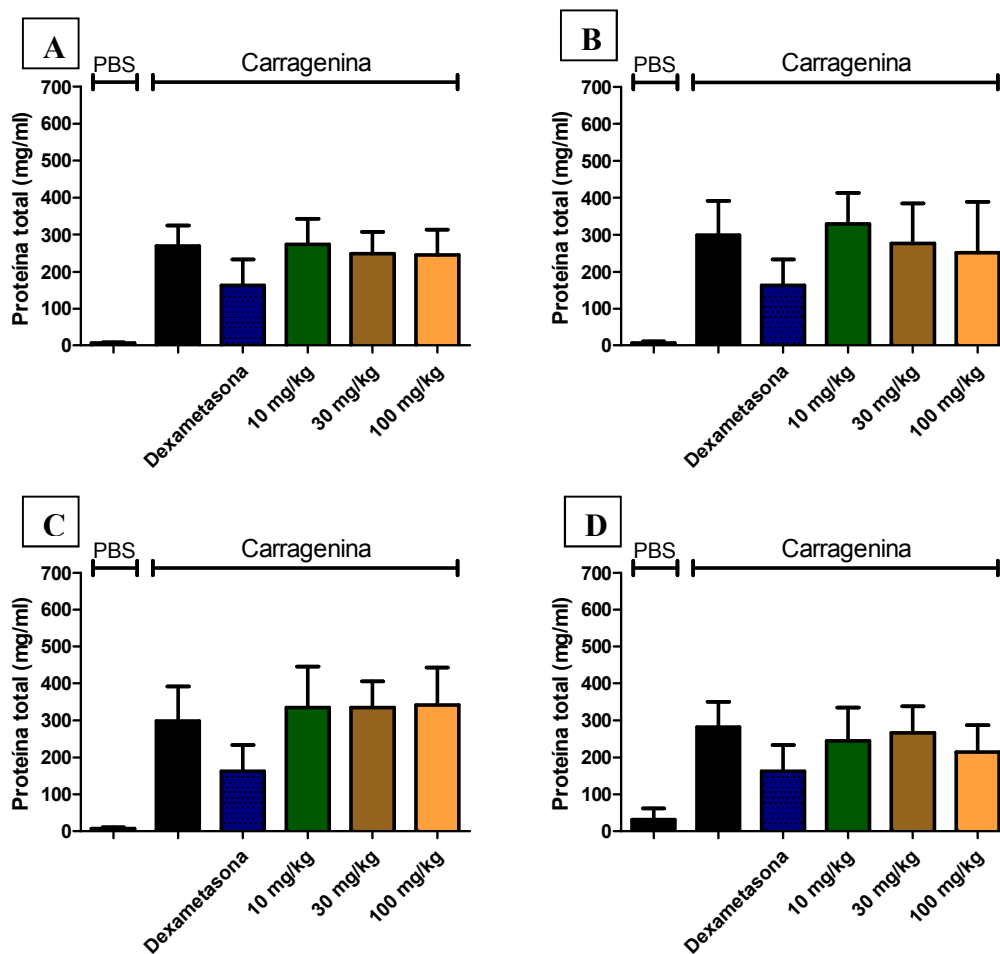


Gráfico 11: Efeito do EE (A), H (B), DCM (C) e AE (D) no extravasamento de proteínas plasmáticas induzida por carragenina na BAS. Os animais foram pré-tratados oralmente com veículo ou com o extrato etanólico e suas frações (10, 30 e 100 mg/kg), 60 min antes da injeção de carragenina na BAS ou pré-tratados i.p. com dexametasona (0,5 mg/kg) 1 hora antes da injeção de carragenina na BAS. Os resultados são expressos como média \pm d.p. da concentração de proteínas plasmáticas totais (mg/ml) (n=5-7).

5. Discussão

Neste trabalho nossos objetivos foram investigar as possíveis atividades antinociceptiva e anti-inflamatória do extrato etanólico e das frações em hexano, diclorometano e acetato de etila das folhas de *Tibouchina granulosa*.

A *T. granulosa* é uma árvore ornamental e o chá de suas folhas é usado na medicina veterinária popular para cicatrização de feridas de animais domésticos (observação pessoal; Fernandes, P.D.). A preparação do extrato bruto e suas frações foi realizada pelo nosso laboratório (LaFDI), assim como os testes farmacológicos realizados com as mesmas. As análises fitoquímicas e anatômicas das folhas, no entanto, foram executadas sob supervisão do prof. Fabio Boylan, no laboratório de farmacognosia da Escola de Farmácia e Ciências Farmacêuticas no Trinity College Dublin/Irlanda.

Para verificar se o extrato e as frações possuíam atividade analgésica central o primeiro modelo realizado neste trabalho foi o da placa quente. É comum utilizar o calor como estímulo nociceptivo em modelos de dor aguda. Os nociceptores são ativados diretamente pelo calor e seus mecanismos de ativação estão relacionados a uma atividade primária na medula espinhal, bem como a processamentos em regiões superiores do Sistema Nervoso Central (Le Bars e cols., 2001).

Os analgésicos opioides e outros fármacos com ação predominantemente central aumentam o tempo de permanência (tempo de latência) dos animais na placa quente, resultado interpretado como antinocicepção. A observação de que o extrato e as frações induziram aumento do tempo de latência dos animais na placa quente, sugere que estes análogos apresentam atividade antinociceptiva central, tendo as doses de 30 mg/kg, tanto do extrato etanólico quanto da fração em hexano, aumentado significativamente o tempo de latência, não somente em relação aos animais tratados com o veículo, mas também quando comparados aos animais tratados com a morfina. Este efeito pode ser

associado, ao menos em parte, à composição da fração em hexano, que como observamos após análise do CG/EM, possuía substâncias como α -amirina e β -amirina as quais já foram caracterizadas como agentes antinociceptivos tanto periférico, como espinhal e supraespinhal em roedores (Otuki e cols, 2005b).

Pensando em um possível mecanismo de ação analgésico do extrato e das frações, o modelo de nociceção neurogênico induzido pela capsaicina foi realizado. Estudos mostram que a nociceção induzida pela capsaicina ocorre através da ativação do receptor vaniloide TRPV1, que é um canal ionotrópico não seletivo a cátions, presentes em neurônios sensoriais primários (Caterina e cols., 1997; Palazzo e cols., 2002). A capsaicina é agente químico provocador de algesia que possui um importante papel no estudo do funcionamento das fibras aferentes sensoriais C e A δ , tendo em vista a sua ação nos nociceptores polimodais e termocetores (Pietrovski e cols., 2006). Ela provoca a liberação de neuropeptídios (substância P), aminoácidos excitatórios (glutamato), óxido nítrico (NO) e mediadores pró-inflamatórios em nervos periféricos, sendo esta informação nociceptiva transmitida para a medula espinhal (Szallasi e Blumberg, 1999).

O glutamato é o neurotransmissor mais relevante envolvido Na transmissão, desenvolvimento e manutenção da resposta nociceptiva, ele age através da ativação de iGluR ou mGluR, levando a excitação e sensibilização de nociceptores periféricos, centrais e supra-espinhais (Aanonsen e Wilcox, 1989; Budai e cols., 1995; Carlton, 2001). A injeção intraplantar de glutamato libera aminoácidos excitatórios, PGE2, NO e cininas (Beirith e cols., 2002; Sakurada e cols., 1992) e promove a ativação de fibras sensoriais, que juntos induzem a liberação de uma série de substâncias (opioides endógenos) no corno dorsal, o que também pode ativar receptores TRPV1 na medula espinhal (Julius e Basbaum, 2001; Millan, 1999).

O que se pôde observar quanto ao comportamento do EE e das frações testadas é que todos, em algum grau, apresentaram efeito antinociceptivo no modelo da lambadura de pata induzida pela capsaicina, sugerindo que o efeito antinociceptivo do extrato e das frações pode estar envolvido com os receptores TRPV1.

Em vista do que foi descrito, os resultados apresentados sugerem que o tratamento com o extrato e as frações obtidas também reduzem a resposta nociceptiva induzida pela injeção intraplantar de glutamato. Estes resultados indicam que o efeito antinociceptivo das substâncias envolve, ao menos em parte, o sistema glutamatérgico. Em conformidade com os resultados obtidos no modelo da nocicepção induzida por capsaicina, é possível que as substâncias estejam produzindo efeito antinociceptivo através da regulação de receptores TRPV1, e, portanto, contribuindo para a modulação da resposta nociceptiva.

A análise fitoquímica desse extrato e suas frações nos permitiu identificar substâncias que poderiam, pelo menos em parte, justificar as ações farmacológicas observadas. O objetivo da cromatografia é separar individualmente os diversos constituintes de uma mistura de substâncias seja para identificação, quantificação ou obtenção da substância pura para os mais diversos fins. Tal separação dá-se através da migração da amostra através de uma fase estacionária, no caso a sílica, por intermédio de um fluido (fase móvel). Após a introdução da amostra no sistema cromatográfico, os componentes da amostra se distribuem entre as duas fases e eluem mais lentamente que a fase móvel devido ao efeito retardatório da fase estacionária. O equilíbrio de distribuição determina a velocidade com a qual cada componente migra através do sistema (Argenton, A. 2010).

Os experimentos de cromatografia com fase gasosa acoplada a espectrometria de massas e de cromatografia líquida de alta eficiência mostram a presença de α e β amirina e do γ -sitosterol na fração em hexano, estigmasterol na fração em diclorometano, e também da hispidulina-7-O- β -D-glicosídeo na fração em acetato de etila. A identificação completa dessa última substância ainda está sendo realizada, porém, com isso, se sugere que a fração em acetato de etila contém uma grande quantidade de derivados fenólicos, notadamente pertencentes à classe dos flavonoides.

Para avaliar se o extrato e suas frações apresentavam efeito antinociceptivo periférico e/ou anti-inflamatório, o modelo da lambadura de pata induzida por formalina foi realizado. Foi demonstrado que a injeção de formalina pode ativar diretamente nociceptores presentes em axônios não mielinizados, como, por exemplo, fibras C, e pouco mielinizados, como as fibras A δ . Além disso, também é capaz de desgranular mastócitos, causando a liberação de histamina e heparina (Parada e cols., 2001). Esses mediadores, por sua vez, ativam os nociceptores, promovendo também a liberação de neuropeptídeos como substância P, neurocinina A, neurocinina B e CGRP, nos terminais periféricos dos aferentes primários (Santos e Calixto, 1997), assim como os aminoácidos excitatórios glutamato e aspartato (Omote e cols., 1998). Desta maneira, acredita-se que este conjunto de mediadores químicos parece ser o responsável pela nocicepção transitória observada nos primeiros cinco minutos após a injeção da formalina (Milano, 2008).

Malmberg e Yaksh (1995) descreveram que a injeção intraplantar de formalina causa um aumento significativo de glutamato e PGE₂ durante a segunda fase do processo doloroso. Portanto, o modelo da formalina é útil para detectar a dor do tipo não inflamatória e inflamatória, correspondendo a primeira e segunda fase, respectivamente.

Fármacos que causam analgesia apresentam atividade diversificada nos dois momentos do modelo da lambadura de pata induzida por formalina. Os opioides possuem ação central e inibem as duas fases. Por outro lado, fármacos com ação periférica, como os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) e glicocorticoides (AIEs), inibem somente a segunda fase (Hunskaar e cols., 1985; Hunskaar e Hole, 1987).

Os resultados deste modelo demonstraram que o extrato etanólico e as frações não foram capazes de diminuir o tempo que o animal permanecia lambendo a pata na primeira fase do experimento, sugerindo que não possuem atividade antinociceptiva periférica, logo, provavelmente não atuam em receptores opioides e/ou não intermedeiam a liberação de mediadores como serotonina, substância P, cininas, histamina e CGRP. No entanto, o extrato etanólico e as frações em hexano e diclorometano foram capazes de inibir significativamente a lambadura de pata dos animais na segunda fase do modelo, quando administradas na dose de 30 mg/kg, o que pode indicar uma inibição na formação e/ou liberação de mediadores pró-inflamatórios como citocinas, eicosanoides, cininas, glutamato e óxido nítrico (Chichorro e cols., 2004; Tassorelli e cols., 2006). Essa inibição pode ser associada à atividade das substâncias já descritas que compõem as frações, além de outras, visto que por serem extrato/frações reúnem outras substâncias que podem não ter sido caracterizadas nos experimentos realizados.

Como o extrato e algumas frações apresentaram efeito anti-inflamatório na segunda fase do modelo da lambadura de pata induzida pela formalina, decidimos realizar o modelo da migração celular para a bolsa de ar subcutânea (BAS), no intuito de avaliar se o extrato e as frações apresentavam alguma atividade neste modelo de

inflamação, que procura observar a transmigração de leucócitos para um sítio inflamado.

A BAS é um modelo de inflamação muito utilizado para a triagem de fármacos com potencial ação anti-inflamatória. Este modelo permite a avaliação de diversos parâmetros inflamatórios como, por exemplo, transmigração de leucócitos, análise de mediadores inflamatórios como citocinas, extravasamento de proteínas e produção de NO. A administração da carragenina na bolsa de ar subcutânea induz um processo inflamatório com características e curso da inflamação semelhantes ao observado na artrite reumatoide, com infiltração de leucócitos polimorfonucleares e liberação de mediadores pró-inflamatórios (Sedgwick e Lees., 1986).

Entre duas e quatro horas após a injeção da carragenina há intenso processo de rolamento de leucócitos e adesão celular. Seis horas após a injeção observa-se grande fluxo de neutrófilos e liberação de agentes quimiotáticos no sítio inflamatório (Secco e cols., 2004). Após 24 horas da injeção de carragenina ocorre o aumento de leucócitos do tipo polimorfonucleares, da atividade da enzima mieloperoxidase, aumento dos níveis dos metabólitos do NO (nitrato e nitrito), e da exsudação e liberação de citocinas pró-inflamatórias (Ferrandiz e cols., 1996; Saleh e cols., 1996; Fröde e Medeiros, 2001; Da Silva, e cols., 2004; Koo e cols., 2005).

Nossos resultados mostraram uma redução na migração leucocitária nos grupos pré-tratados com as frações. No entanto, o extrato etanólico não apresentou redução no número de leucócitos na BAS. Dentre as hipóteses que podem estar relacionadas à inibição da migração leucocitária observada nos animais tratados previamente com as frações podemos destacar a inibição da produção e/ou liberação de substâncias pró-inflamatórias relacionadas à quimiotaxia de leucócitos. Nos nossos experimentos o envolvimento de mediadores pró-inflamatórios e considerados quimiotáticos foi

estudado e podemos citar as citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IFN- γ , assim como o NO.

É importante ressaltar que apesar de o extrato etanólico não ter apresentado redução na migração celular, nos testes subsequentes de quantificação de citocinas, o mesmo apresentou redução significativa na produção destes agentes pro-inflamatórios, sugerindo uma atividade anti-inflamatória no que diz respeito à inibição de algum(s) componente(s) das vias de sinalização das células em relação à produção das citocinas quantificadas.

De uma maneira geral, as frações em hexano e diclorometano não foram capazes de inibir a produção das citocinas, enquanto a fração em acetato, reduziu significativamente a produção de TNF- α e IFN- γ , mas não apresentou inibição significativa na redução da produção de IL-1 β .

Alguns estudos já demonstraram que o TNF- α é capaz de induzir a expressão de moléculas de adesão como: E-selectina, ICAM-1 e VCAM-1 em culturas de células endoteliais da microvasculatura pulmonar e dérmica humana (Jiang e cols., 2005).

Outro estudo que avaliou a expressão de algumas moléculas de adesão importantes para a firme adesão e diapedese dos leucócitos, utilizou combinações de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β , e anti-inflamatórias, como IL-4 e IL-10 e constataram que essas citocinas formam uma rede complexa de comunicação, resultando em efeitos que não são determinados pela ação de uma única citocina, mas pela interrelação entre elas (Daxecker e cols., 2002). Dito isto, supõe-se que a atividade anti-inflamatória da fração em acetato de etila, a qual foi capaz de inibir a citocina TNF- α e a migração celular, pode estar associada à inibição de moléculas de adesão, via inibição de uma das citocinas responsável pela indução da produção destas moléculas, isto é, a fração pode estar atuando em um ou mais eventos celulares, inibindo

mediadores que estimulam a expressão de moléculas de adesão (como a citocina pró-inflamatória TNF- α) ou fatores de transcrição pró-inflamatórios como o NF- κ B.

O IFN- γ possui diversos efeitos imunoregulatórios, incluindo a ativação e estimulação de macrófagos a fim de que eles liberem espécies reativas de oxigênio, as quais são danosas para o organismo. Esta citocina aumenta a permeabilidade vascular, desempenhando assim um papel crucial no processo inflamatório que acompanha, por exemplo, as doenças neurodegenerativas. Outros efeitos do IFN- γ incluem a indução da produção de TNF- α e IL-1 e efeitos sinérgicos com a citocina TNF- α , especificamente, sobre a expressão de moléculas do sistema imunológico (Gately e cols., 1994). Portanto, o resultado apresentado pela fração em acetato de etila indica que além de inibir a citocina TNF- α , esta fração também é capaz de inibir a produção de IFN- γ , sugerindo um efeito anti-inflamatório sinérgico na diminuição de moléculas do sistema imunológico, ou até mesmo diminuindo a permeabilidade vascular na BAS.

Outro parâmetro analisado foi a produção de NO. Os efeitos desse mediador na resposta inflamatória são complexos e envolvem tanto quimiotaxia de leucócitos como aumento da permeabilidade vascular. Nossos resultados mostraram que o pré-tratamento oral com as frações foi capaz de inibir significativamente a produção de NO. Essa menor produção de NO pode ser consequência: 1) de um menor número de células que transmigraram para a BAS quando as frações foram administradas; 2) de no caso da administração por via oral da fração em acetato de etila, a mesma estar atuando na diminuição da produção de citocinas dentre outros mediadores, fato este demonstrado nos gráficos 7 e 9, nos quais a fração em questão foi capaz de inibir a produção de TNF- α e IFN- γ (Chichorro e cols., 2004; Tassorelli e cols., 2006) 3) da atividade da iNOS ou ainda, pode ser decorrente de alteração na expressão da enzima. No entanto, mais

experimentos se fazem necessários para comprovar a terceira hipótese, experimentos estes que mostrem a ação das frações sobre a expressão da iNOS.

Os mediadores inflamatórios liberados na BAS também são capazes de causar aumento na permeabilidade vascular (Aller e cols., 2006; Schmid-Schonbein, 2006). Sendo assim, o último parâmetro avaliado foi o extravasamento de proteínas plasmáticas. Entretanto, o extrato e as frações não foram capazes de reduzir a concentração de proteínas totais no exsudato inflamatório, sugerindo que o extrato e as frações não alteram o aumento de permeabilidade vascular gerado pelos mediadores que ainda se encontram no sítio inflamado.

Portanto, o efeito do extrato etanólico no que tange a diminuição da produção de citocinas; o efeito das frações em hexano e diclorometano na inibição da migração leucocitária, e modulação negativa na síntese de NO; e, por fim, a redução da migração de leucócitos somada a inibição da produção de citocinas e NO por parte da fração em acetato de etila, sugerem uma ação anti-inflamatória destes compostos. Os efeitos do EE e das frações H, DCM e AE podem estar associados à composição fitoquímica descrita, reforçando a atividade do flavonoide hispidulina, já que, a fração em acetato de etila aparenta ser a que melhor inibe o processo inflamatório, tanto pela via da modulação negativa da produção de mediadores pró-inflamatórios, como as citocinas TNF- α e IFN- γ e o NO, quanto pela diminuição da transmigração leucocitária para a BAS.

A fim de localizar a presença de substâncias fenólicas (como é o caso do flavonoide hispidulina-7-O-glicosídeo) nas folhas da *T.granulosa* estudos de anatomia vegetal foram realizados nesse trabalho. Além de substâncias fenólicas, pode-se observar também a presença de amido, tricomas e cristais de oxalato de cálcio, características anatômicas da espécie em estudo.

6. Conclusão

Levando em consideração os resultados obtidos com as análises fitoquímicas e farmacológicas para o extrato em etanol e as frações em hexano, diclorometano e acetato de etila de *T. granulosa*, pode-se concluir que:

- EE e as frações apresentaram efeito antinociceptivo central observado no modelo da placa quente.
- Este efeito antinociceptivo pode estar relacionado, ao menos em parte, aos receptores vanilóides (TRPV1), comprovado no modelo da lambadura de pata induzida pela capsaicina.
- O mecanismo de ação antinociceptivo também parece estar relacionado de forma direta ou indireta ao sistema glutamatérgico, visto que o extrato e as frações foram capazes de reduzir a lambadura de pata induzida pela injeção de glutamato.
- Todos os extratos testados apresentaram atividade anti-inflamatória, seja no modelo da formalina, como no modelo da migração celular, visto que EE, H e DCM inibiram o tempo de lambadura da pata induzida pela injeção de formalina na segunda fase do modelo e, além disso, as frações H, DCM e AE foram capazes de inibir a migração leucocitária no modelo da BAS, além de em algum grau terem inibido mediadores pró-inflamatórios. Assim como, o EE foi capaz de inibir todas as citocinas quantificadas neste trabalho.
- As substâncias isoladas e/ou identificadas em cada fração estudada estão intimamente associadas às atividades descritas neste trabalho. No entanto, mais experimentos farmacológicos serão necessários para que as atividades das frações possam ser completamente atribuídas às substâncias descritas.

7. Referências Bibliográficas

- AANONSEN, L.M., WILCOX, G.L. Muscimol, gamma-aminobutyric acid A receptors and excitatory amino acids in the mouse spinal cord. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 248: 1034–1038. 1989.
- AGGARWAL, B.B.; SHISHODIA, S.; SANDUR, S.K.; PANDEY, M.K.; SETHI, G. *Inflammation and cancer: How hot is the link?* **Biochemical Pharmacology.** 72: 1605-1621. 2006.
- ALWANI, M. E.; WU, B.X.; OBEID, L.M.; HANNUN, Y.A. Bioactive sphingolipids in the modulation of the inflammatory response. **Pharmacol. Ther.** 112:171–183. 2006.
- ALLER, M.A.; ARIAS, J.L.; ARIAS, J.I.; SÁNCHEZ-PATÁN, F.; ARIAS, J. The inflammatory response: an efficient way of life. **Med. Sci. Monit.** 12:225-234. 2006.
- ARGENTON, A. *Conceitos fundamentais de Cromatografia a líquido de Alto Desempenho (HPLC).* **Minicurso CRQ-IV.** 2010.
- BALAMURUGAN, R.; DURAIANDIYAN, V.; IGNACIMUTHU, S. *Antidiabetic activity of γ sitosterol isolated from *Lippia nodiflora* L. in streptozotocin induced diabetic rats.* **European Journal of Pharmacology.** 667: 410-118. 2011.
- BANDEIRA, P.N.; LEMOS, T.L.G.; COSTA, S.M.O.; SANTOS, H.S. *Obtention of derivatives from α -and β -amyrin triterpenoid mixture: ^{13}C NMR data.* **Revs. Bras. Farmacogn.** 17(2): 204-208. 2007.
- BARKHAUSEN, T.; KRETTEK, C.; GRIENSVEN, M. *L-selectin: Adhesion, signalling and its importance in pathologic posttraumatic endotoxemia and non-septic inflammation.* **Experimental and Toxicologic Pathology.** 57: 39-52. 2005.
- BASBAUM, A.I.; BAUTISTA, D.M.; SCHERRER, G.; JULIUS, D. *Cellular and molecular mechanisms of pain.* **Cell.** 139:267-284. 2009.
- BEIRITH, A.; SANTOS, A.R.S.; CALIXTO, J.B. *Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw.* **Brain Res.** 924: 219-228. 2002.
- BERTOLINI, A.; OTTANI, A.; SANDRINI, M. *Selective COX-2 inhibitors and dual acting anti-inflammatory drugs: critical remarks.* **Curr. Med. Chem.** 9:1033-1043. 2002.
- BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P.A.; DEGÁSPARI, C.H. *Antocyanins from *Tibouchina grandiflora*.* **Food Chemistry.** 18: 153-159. 1985.
- BOTTING, R.M. *Cyclooxygenase: Past, present and future.* **J. Therm. Biol.** 31: 208-219. 2006.
- BROOKS, J.; TRACEY, I. *From nociception to pain perception: imaging the spinal and supraspinal pathways.* **J. Anat.** 207:19-33. 2005.

- BUDAI, D. , WILCOX, G.L., LARSON, A.A. *Effects of nitric oxide availability on responses of spinal wide dynamic range neurons to excitatory aminoacids.* **Eur. J. Pharmacol.** 278: 39–47. 1995.
- BURIAN, M.; GEISSLINGER, G. *COX-dependent mechanisms involved in the antinociceptive action of NSAIDs at central and peripheral sites.* **Pharm. Ther.** 107: 139-154. 2005.
- CARLTON, S.M. *Peripheral excitatory aminoacids.* **Curr. Opin. Pharmacol.** 1: 52–56. 2001.
- CATERINA, M.J.; SCHUMACHER, M.A.; TOMINAGA, M.; ROSEN, T.A.; LEVINE, J.D.; JULIUS, D. *The capsaicin receptor, a heat-activated ion channel in the pain pathway.* **Nature.** 39:819-824. 1997.
- CESARE, P.; McNAUGHTON, P. *A novel heat-activated current in nociceptive neurons and its sensitization by bradykinin.* **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 93: 15435-15439. 1996.
- CHANDRASEKHARAN, N.V.; DAI, H.; EVANSON, N.K.; TOMSIK, J.; ELTON, T.S.; SIMMONS, D.L. *COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression.* **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 99: 13929-13931. 2002
- CHICCA, A.; MARAZZI, J.; GERTSCH, J. *The antinociceptive triterpene beta-amyrin inhibits 2-arachidonoylglycerol (2-AG) hydrolysis without directly targeting CB receptors.* **British Journal of Pharmacology.** 167: 1596–1608. 2012.
- CHICHORRO, J.G.; LORENZETTI, B.B.; ZAMPRONIO, A.R. *Involvement of bradykinin, cytokines, sympathetic amines and prostaglandins in formalin-induced orofacial nociception in rats.* **Br. J. Pharmacol.** 141:1175-1184. 2004.
- CLARK, J.M. *Uptake of colloidal thorium dioxide by the mouse connective tissue mast cell.* **Tex. Rep. Biol. Med.** 33:397-406. 1975.
- COOK, N.C. *Flavonoids – chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources.* **Nutr Biochem.** 7: 66-76, 1996.
- COUTURE, R.; HARRISON, M.; VIANNA, R.M.; COUTIER, F. *Kinin receptors in pain and inflammation.* **Eur. J. Pharmacol.** 429:161-176. 2001.
- CRAGG, G.M. *Natural products: A continuing source of novel drug leads.* **Biochimica et Biophysica Acta.** 1830: 670-695. 2013.
- DAXECKER, H.; RAAB, M.; MARKOVIC, S.; KARIMI, A.; ANDREA, G.; MUELLER, M.M. *Endothelial adhesion molecule expression in an in vitro model of inflammation.* **Clin. Chim. Acta** 325:171-175. 2002.

Da SILVA, M.B.; FARGES, R.C.; FRÖDE, T.S. *Involvement of steroids in anti-inflammatory effects of PK11195 in a murine model of pleurisy.* **Mediators. Inflamm.** 13:93-103. 2004.

Da SILVA, K.A.; PASZCUK, A.F.; PASSOS, G.F.; SILVA, E.S.; BENTO, A.F.; MEOTTI, F.C.; CALIXTO, J.B. *Activation of cannabinoid receptors by the pentacyclic triterpene alpha,beta-amyrin inhibits inflammatory and neuropathic persistent pain in mice.* **Pain.** 152: 1872–1887. 2011.

DIAS, D.A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. *A historical overview of natural Products in drug discovery.* 2: 303-336. 2012

D'MELLO, R.; DICKENSON, H. *Spinal cord mechanisms of pain.* **Br. J. Anaesth.** 101:8-16. 2008.

ELIIS, K.M.; FOZARD, J.R. *Species differences in bradykinin receptor-mediated responses of the airways.* **Auton. Autacoid Pharmacol.** 22:3-16. 2002.

ENDRES-BECKER, J; HEPPENSTALL, P.A; MOUSA, S. DOMINIKA, L.; OKSCHE,A.; SCHAFER, M.; STEIN, C.; ZOLLNER, C. *μ -receptor activation modulates TRPV1 currents in sensory neurons in a model of inflammatory pain.* **Mol. Pharmacol.** 71:12-18. 2007.

FERRÁNDIZ, M.L.; BUSTUS, G.; PAYÁ, M.; GUNASEGARAN, R.; ALCARAZ, M.J. *Hispidulin protection against hepatotoxicity induced by bromobenzene in mice.* **Pharmacology Letters.** 55(8): 145-150. 1994.

FERRANDIZ, M.L.; GIL, B.; SANZ, M.L.; UBEDA, A.; GONZALEZ, E.; NEGRETE, R.; PACHECO, S.; PAYÁ, M.; ALCARAZ, M.J. *Effect of bakuchiol on leukocytes function and some inflammatory responses in mice.* **J. Pharm. Pharmacol.** 48: 975-980. 1996.

FRANCIS, F.J; DRAETTA, I.; BALDINI, V.; IADEROZA, M. *New anthocyanins from Tibouchina granulosa.* **J. Amer. Soc. Hort. Sci.** 107(5): 789. 1982.

FRÖDE, T.S.; MEDEIROS, Y.S. *Myeloperoxidase and adenosine-deaminase levels in the pleural fluid leakage induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy.* **Mediators Inflamm.** 10: 223-227. 2001.

GABAY, O.; SANCHEZ, C.; SALVAT, C.; CHEVY, F.; BRETON, M.; NOURISSAT, G.; WOLF, C.; JACQUES, C.; BERENBAUM, F. *Stigmasterol: a phytosterol with potential anti-osteoarthritic properties.* **Osteoarthritis and Cartilage.** 18: 106-116. 2010.

GAO, H.; XIE, J.; HAN, Y.; JIAN, Q.; HAN, M.; WANG, C. *Hispidulin inhibits proliferation and enhances chemosensitivity of gallbladder cancer cells by targeting HIF-1 α .* **Experimental Cell Research.** 2014.

GATELY, M.K.; WARRIER, R.R.; HONASOGE, S.; CARVAJAL, D.M.; FABERTY, D.A.; CONNANGHTON, S.E.; ANDERSON, T.D.; SARMIENTO, U.; HUBBARD,

- B.R. MURPHY, M. *Administration of recombinant IL-12 to normal mice enhances cytolytic lymphocyte activity and induces production of interferon gamma in vivo.* **Int. Immunol.** 6: 157–167. 1994.
- GEREAU IV, R.W.; SLUKA, K.A.; MAIXNER, W.; SAVAGE, S.R.; PRICE, T.J.; MURINSON, B.B.; SULLIVAN, M.D.; FILLINGIN, R.B. *A pain research agenda for the 21st Century.* **The Journal of Pain.** 15: 1203-1214. 2014.
- GOMES, N.M.; REZENDE, C.M.; FONTES, S.P.; MATHEUS, M.E., FERNANDES, P.D. *Antinociceptive activity of Amazonian Copaiba oils.* **J. Ethnopharmacol.** 109: 486–492. 2007.
- GORDON, A.; SHADOW, B.; QUIJANO, C.E.; Marx, F. *Chemical characterization and antioxidant capacity of berries from Clidemia rubra (Aubl.) Mart. (Melastomataceae).* **Food Research International.** 44: 2120-2127. 2011.
- GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHONK, J.S.; TANNENBAUN, S.R. *Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids.* **Anal. Biochem.** 126: 131-138. 1982.
- HAEGGSTROM, J.Z.; FUNK, C.D. *Lipoxygenase and leucotriene pathways: biochemistry, biology, and roles in disease.* **Chem. Rev.** 12: 5866-5898. 2011.
- HAMILTON, J.A. *GM-CSF in inflammation and autoimmunity.* **Trends Immunol.** 23: 403-408. 2002.
- HANAFY, K.; A., KRUMENACKER.; J. S.; MURAD, F. *NO, nitrotyrosine, and cyclic GMP in signal transduction.* **Med. Sci. Monit.** 7: 801–819. 2001.
- HORI, T.; OKA, T.; HOSOI, M.; AOU, S. *Pain modulatory actions of cytokines and prostaglandin E2 in the brain .* **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 840:269-281. 1998.
- HUNSKAAR, S.; FASMER, O.B.; HOLE, K. *Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesia.* **J.Neurosci. Methods.** 14:69-76. 1985.
- HUNSKAAR, S.; HOLE, K. *The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain.* **Pain.** 30:103-114.1987.
- IASP. *Classification of chronic pain. Descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. Prepared by the International association for the Study of Pain (IASP), Subcommittee on Taxonomy.* **Pain.** 1986. 3:216-226.
- IGNARO, L. J.; NAPOLI, C.; LOSCALZO, J. *Nitric oxide donors and cardiovascular agents modulating the bioactivity of nitric oxide.* **Circ. Res.** 90:21–28. 2002.
- ISHII, K.; MOTOYOSHI, S.; KAWATA, J.; NAKAGAWA, H.; TAKEYAMA, K. *A useful method for differential evaluation of anti-inflammatory effects due to cyclooxygenase and 5-lipoxygenase inhibitors in mice.* **Jpn. J. Pharmacol.** 65: 297-303. 1994.

IWASHINA, T.; KAMENSONO, K.; UENO, T. *Hispidulin and nepetin 4'-glucosides from Cirsium olivophyllum*. **Phytochemistry**. 51: 1109-1111. 1999.

JANCSO, G. *Selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurones induced by capsaicin: glial changes*. **Cell Tissue Res**. 195:145-152. 1978.

JIANG, Y.; XU, J.; WU, Z.; ZHONG, S.; LIU, J.; LUO, W.; CHEN, T.; QIN, Q.; DENG, P. *Characterization of cytokine/chemokine profiles of severe acute respiratory syndrome*. **Am. J. Resp. Crit. Care Med**. 171:850-857. 2005.

JOLY, A.B. *Introdução a taxonomia vegetal*. **Ed. Nacional, São Paulo**. 11: 510-512. 1993.

JU, G.; HOKFELT, T.; BRODIN, E.; FAHRENKRUG, J.; FISCHER, J.A.; FREY, P.; ELDE, R.P.; BROWN, J.C. *Primary sensory neurons of the rat showing calcitonin gene-related peptide immunoreactivity and their relation to substance P-, somatostatin-, galanin-, vasoactive intestinal polypeptide- and cholecystokinin-immunoreactive ganglion cells*. **Cell Tissue Res**. 247: 417-431. 1987.

JULIUS, D.; BASBAUM, A.I. *Molecular mechanisms of nociception*. **Nature**. 413: 203-210. 2001.

JUTEL, M.; AKDIS, M.; AKDIS, C. A. *Histamine, histamine receptors and their role in immune pathology*. **Clin. Exp. Allergy**. 39: 1786-800. 2009.

KAWABATA, A. *Prostaglandin E2 and pain – an Update*. **Biol. Pharm. Bull**. 34: 1170-1173. 2011.

KELLY, M.; HWANG, J.M.; KUBES, P. *Modulating leukocyte recruitment in inflammation*. **J. Allergy and Clin. Immunol**. 120:3-10. 2007.

KHAN, A.A.; IADAROLA, M.; YANG, H.Y.T.; DIONNE, R.A. *Expression of COX-1 and COX-2 in a clinical model of acute inflammation*. **J. Pain**. 8: 349-354. 2007.

KHASABOV, S.G; ROGERS, S.D; GHILARDI, J.R; PETERS, C.M; MANTYH, P.W; SIMONE D.A. *Spinal neurons that possess the substance P receptor are required for the development of central sensitization*. **J. Neurosci**. 22:9086-9098. 2002.

KOO, H.J.; LIM, K.H.; JUNG, H.J.; PARK, E.H. *Anti-inflammatory evaluation of gardenia extract, geniposide and genipin*. **J. Ethnopharmacol**. 2005.

KOLACZKOWSKA, E.; SCISLOWSKA-CZARNECKA, A.; CHADZINSKA, M.; PLYTYCZ, B.; ROOIJEN, N.V.; OPDENAKKER, G.; ARNOLD, B. *Enhanced early vascular permeability in gelatinase b (MMP-9)-deficient mice: putative contribution of cox-1-derived PGE2 of macrophage origin*. **Journal of Leukocyte Biology**. 80: 125-132. 2006.

KNEKT, P.; JARVINEN, R.; REUNANEM, A.; MAATELA, J. *Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study*. **BMJ**. 312: 478-481. 1996.

- KWEIFIO-OKAI, G.; DE MUNK, F.; RUMBLE, B.A.; MACRIDES, T.A.; CROPLEY, M. *Antiarthritic mechanisms of amyirin triterpenes*. **Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.** 85: 45–55. 1994.
- LAWRENCE, T.; WILLOUGHBY, D.A.; GILROY, D.W. *Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation*. **Nat. Rev. Immunol.** 2: 787-795. 2002.
- LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S.W. *Animal models of nociception*. **Pharmacol. Rev.** 53: 597-652. 2001.
- LIN, T.Y.; LU, C.W.; WANG, C.C.; LU, J.F.; WANG, S.J. *Hispidulin inhibits the release of glutamate in rat cerebrocortical nerve terminals*. **Toxicology and Applied Pharmacology.** 263: 233-243. 2012.
- LOESER, J.D.; MELZACK, R. *Pain: an overview*. **Lancet.** 353:1607-1609. 1999.
- LOWRY, J.B. *Anthocyanins of the Melastomatacea, Myrtaceae and some allied families*. **Phytochemistry.** 15: 513-516. 1975.
- MAJNO, G.; JORIS, I. *Inflammation: The actors and their language*. In: *Cells, tissues and disease: Principles of general pathology*. **MAJNO, G.; JORIS.** Nova York: **Oxford University Press.** 307-382. 2004.
- MALMBERG, A.B.; YAKSH, T.L. *Cyclooxygenase inhibition and the spinal release of prostaglandin E2 and amino acids evoked by paw formalin injection: a microdialysis study in unanesthetized rats*. **J. Neurosci.**15:2768-2776. 1995.
- MARCEAU, F.; REGOLI, D. *Bradykinin receptor ligands: therapeutic perspectives*. **Nat. Rev. Drug Discov.** 3: 845-852. 2004.
- MATHEUS, M.E., BERRONDO, L.F., VIEITAS, E.C., MENEZES, F.S., FERNANDES, P.D. *Evaluation of the antinociceptive properties from Brillantaisia palisotii Lindau stems extracts*. **Journal of Ethnopharmacology.** 102: 377–381. 2005.
- MARCON, R.; LUIZ, A.P.; WERNER, M.F.; FREITAS, C.S; BAGGIO, C.H.; NASCIMENTO, F.P.; SOLDI, C.; PIZZOLATTI, M.G; SANTOS, A.R. *Evidence of TRPV1 receptor and PKC signaling pathway in the antinociceptive effect of amyirin octanoate*. **Brain Res.** 1295: 76–88. 2009.
- MARTINS, R.T.; ALMEIDA, D.B.; MONTEIRO, F.M.R.; KOWACS, P.A.; RAMINA, R. *Opioid receptors to date*. **Rev. Dor.** 13(1): 75-79. 2012.
- MARTÍNEZ, F.S.; GONZÁLEX, G.J.; CULEBRAS, J.M.; TUÑÓN, M.J. *Los flavonoids: propiedades y acciones antioxidantes*. **Nutr. Hosp.** 17(6): 271-278. 2002.
- MEAGER, A. *Cytokine regulation of cellular adhesion molecule expression in inflammation*. **Cytokine & Growth Factor Reviews.** 10: 27-39. 1999.

- MEDEIROS, R.; OTUKI, M.F.; AVELLAR, M.C.; CALIXTO, J.B. *Mechanisms underlying the inhibitory actions of the pentacyclic triterpene alpha-amyrin in the mouse skin inflammation induced by phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate*. **European Journal of Pharmacology**. 559: 227–235. 2007.
- MEDVEDEVA, Y.V.; KIM, M.S.; USACHEV, Y.M. *Mechanisms of prolonged presynaptic Ca²⁺ signaling and glutamate release induced by TRPV1 activation in rat sensory neurons*. **J. Neurosci**. 28: 5295–5311. 2008.
- MILANO, J. Avaliação do Potencial Antinociceptivo de 5-trialometil-4,5-diidro-1h-pirazol metil Ésteres Inéditos em Camundongos. **Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Maria**. 2008.
- MILLAN, M. J. *The induction of pain: an integrative review*. **Progress Neurobiol**. 57:1-164. 1999.
- MITCHELL, R.N., COTRAN, R.S. *Acute and Chronic Inflammation*. **In: Basic Pathology**. ROBBINS, S.L.; KUMAR, V.; COTRAN, R. Eds. Pennsylvania: Saunders. 8th edition. 33-59. 2010.
- MONCADA, S.; PALMER, R.M. J.; HIGGS, E.A. *Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology*. **Pharmacol. Rev.** 43:109-142. 1991.
- MONCADA, S. HIGGS, E.A. *Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide*. **Faseb J**. 9: 1319-1330. 1995.
- MURUGAN, R.; PARIMELAZHAGAN, T. *Study of anti-nociceptive, anti-inflammatory properties and phytochemical profiles of Osbeckia parvifolia Arn. (Melastomataceae)*. **Industrial Crops and Products**. 51: 360-369. 2013.
- NEEDLEMAN, P.; ISAKSON, P.C. *The discovery and function of COX-2*. **J Rheumatol**. 24: 6–8. 1997.
- NEPAL, M.; CHOI, H.J.; CHOI, B.Y.; YANG, M.S.; CHAE, J.; LI, L.; SOH, Y. *Hispidulin attenuates bone resorption and osteoclastogenesis via the RANKL-induced NF-κB and NFATc1 pathways*. **European Journal of Pharmacology**. 715: 96-104. 2013.
- NIEVES, D.; MORENO, J. J. *Role of 5-lipoxygenase pathway in the regulation of RAW 264.7 macrophage proliferation*. **Biochem. Pharmacol**. 72: 1022-1030. 2006.
- NOURSHARGH, S.; MARELLI-BERG, F. M. *Transmigration through venular walls: a key regulator of leukocyte phenotype and function*. **Trends Immunol**. 26: 158-165. 2005.
- OKUDAIRA, M.; SCHWARZ, J. *Histoplasma capsulatum infection in rat air pouch*. **Arch. Pathol**. 74: 239-243, 1962.

- OLIVEIRA, F. A.; VIEIRA-JUNIOR, H. M.; CHAVES, M. H.; ALMEIDA, F. R. C.; FLORÊNCIO, M. G.; LIMA-JUNIOR, R. C. P.; SILVA, R. M.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. N. *Gastroprotective and anti-inflammatory effects of resin from Protium heptaphyllum in mice and rats*. **Pharmacol. Res.** 49: 105-111. 2004.
- OLIVEIRA, F.A.; LIMA-JUNIOR, R.C.; CORDEIRO, W.M.; VIEIRA-JUNIOR, G.M.; CHAVES, M.H.; ALMEIDA, F.R.; SILVA, R.M.; SANTOS, F.A.; RAO, V.S. *Pentacyclic triterpenoids, alpha, beta-amyrins, suppress the scratching behavior in a mouse model of pruritus*. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 78: 719–725. 2004a.
- OLIVEIRA, F.A.; VIEIRA-JUNIOR, G.M.; CHAVES, M.H.; ALMEIDA, F.R.; SANTOS, K.A.; MARTINS, F.S.; SILVA, R.M.; SANTOS, F.A.; RAO, V.S. *Gastroprotective effect of the mixture of alpha- and beta-amyrin from Protium heptaphyllum: role of capsaicin sensitive primary afferent neurons*. **Planta Med.** 70: 780–782. 2004b.
- OLIVEIRA, F.A., CHAVES, M.H., ALMEIDA, F.R., LIMA-JUNIOR, R.C., SILVA, R.M., MAIA, J.L., BRITO, G.A., SANTOS, F.A., RAO, V.S. *Protective effect of alpha- and beta-amyrin, a triterpene mixture from Protium heptaphyllum (Aubl.) March. trunk wood resin, against acetaminophen-induced liver injury in mice*. **Journal of Ethnopharmacology.** 98: 103–108. 2005.
- OMOIGUI, S. *The biochemical origin of pain – Proposing a new law of pain: The origin of all pain is inflammation and the inflammatory response*. **Medical Hypotheses.** 69: 70-82. 2007.
- OMOTE, K.; KAWAMATA, T.; NAMIKI, A. *Formalin-induced release of excitatory amino acids in the skin of the rat hindpaw*. **Brain Res.** 787: 161-164. 1998.
- OSTLUND, R. *Phytosterols in human nutrition*. **Annual Review of Nutrition.** 22: 533–549. 2002.
- OTUKI, M.F.; VIEIRA-LIMA, F.; MALHEIROS, A.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. *Topical antiinflammatory effects of the ether extract from Protium kleinii and alpha-amyrin pentacyclic triterpene*. **Eur. J. Pharmacol.** 507: 253–259. 2005a.
- OTUKI, M.F.; FERREIRA, J.; LIMA, F.V.; MEYRE-SILVA, C.; MALHEIROS, A.; MULLER, L.A.; CANI, G.S.; SANTOS, A.R.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. *Antinociceptive properties of mixture of alpha-amyrin and beta-amyrin triterpenes: evidence for participation of protein kinase C and protein kinase A pathways*. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 313: 310-318. 2005b.
- PAL, D.; VERMA, P. *Flavonoids: A powerful and abundant source of antioxidants*. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.** 293: 95-98. 2013.
- PALAZZO, E.; NOVELLIS, V.; MARABESE, I.; CUOMO, D. *Interaction between vaniloid and glutamate receptors in the central modulation of nociception*. **Eur. J. Pharmacol.** 439:69-75. 2002.

PARADA, S.A.; TAMBELI, C.H.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. *The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced nociception.* **Neuroscience**. 4: 937-944. 2001.

PETTERSEN, C.A.; ADLER, K.B. *Airways inflammation and COPD: Epithelial neutrophil interactions.* **Chest**. 121:142-150. 2002.

PIETROVSKI, E.F.; ROSA, K.A.; FACUNDO, V.A.; RIOS, K.; MARQUES, M.C.A.; SANTOS, A.R. *Antinociceptive properties of the ethanolic extract and of the titerpene 3 β , 6 β , 16 β – trihidroxilup-20 (29)-ene obtained from the flowers of *Combretum Leprosum* in mice.* **Pharmacol. Biochem. Behavior**. 38:90-99. 2006.

QIN, N.; ZHANG, S.P.; REITZ, T.L. MEI, J.M.; FLORES, C.M. *Cloning, expression, and functional characterization of human cyclooxygenase-1 splincing variants: evidence for intron 1 retention.* **J.Pharmacol. Exp. Ther.** 315: 1298-1305. 2005.

RANKIN, J. A. *Biological mediators of acute inflammation.* **AACN Clinical**. 15: 3-17. 2004.

RAYMUNDO, L.J.R.P.; GUILHON, C.C.; ALVIANO, D.S.; MATHEUS, M.E.; ANTONIOLLI, A.R.; CAVALCANTI, S.C.H.; ALVES, P.B.; ALVIANO, C.S.; FERNANDES, P.D. *Characterisation of the anti-inflammatory and antinociceptive activities of the *Hypis pectinata* (L.) Poit essential oil.* **J. Ethnopharmacol**. 134: 725-732. 2011.

RECIO, M.C.; GINER; R.M.; MANEZ, S.; RIOS, J.L. *Structural requirements for the antiinflammatory activity of natural triterpenoids.* **Planta Med**. 61: 182–185. 1995.

REN, K.; TORRES, R. *Role of interleukin 1 β during pain and inflammation.* **Brain Res. Rev**. 60: 57-64. 2009.

REUTOV. V. P.; SOROKINA, E. G. *NO-syntase and nitric-redutase components of nitric oxide cycle.* **Biochemistry**. 7:874-884. 1998.

RINALDO-MATTHIS, A.; HAEGGSTRÖM, J. Z. *Structures and mechanisms of enzymes in the leukotriene cascade.* **Biochimie**. 92: 676-681. 2010.

ROGER, A.; NICOLL, M.D. *Introdução à farmacologia dos fármacos que agem no SNC em Farmacologia Básica e Clínica.* **Katzung, B.G. McGrawHill e Artmed**. Porto Alegre, pp. 297-308. 2010.

ROMANO, M.; FAGGIONI, R.; SIRONI, M.; SACCO,S.; ECHTENACHER, B.; Di SANTO, E.; SALMONA, M.; GHEZZI, P. *Carrageenan-induced acute inflammation in the mouse air pouch synovial model. Role of tumor necrosis factor.* **Mediators Inflamm**. 6: 32-38. 1997.

ROSSI, A.; CUZZOCREA, S.; MAZZON, E.; SERRAINO, I.; DE SARRO, A.; DUGO, L.; FELICE, M.R.; DE LOO, F.A.J.V.; DI ROSA, M.; MUSCI, G.; CAPUTI, A.P.; SAUTEBIN, L. *Regulation of prostaglandin generation in carrageenan-induced*

pleurisy by inducible nitric oxide synthase in knockout mice. Life Sci. 72: 1199-1208. 2003.

SADASIVAM, K.; KUMARESAN, R. *Theoretical investigation on the antioxidant behavior of chrysoeriol and hispidulin flavonoid compounds – A DFT study. Computational and Theoretical Chemistry.* 963: 227-235. 2010.

SAHLEY, T.L.; BERNTSON, G.G. *Antinociceptive effects of central and systemic administration of nicotine in the rat. Psychopharmacol.* 65: 279-283. 1979.

SALEH, T.S.; CALIXTO, J.B.; MEDEIROS, Y.S. *Anti-inflammatory effects of theophylline, cromolyn and salbutamol in a murine model of pleurisy. Br. J. Pharmacol.* 118: 811-819. 1996.

SANTOS, A.R.S.; CALIXTO, J.B. *Further evidence for the involvement of tachykinin receptor subtypes in formalin and capsaicin models of pain in mice. Neuropeptides.* 31: 381-389. 1997.

SASAKAWA, T.; SASAKAWA, Y.; MASUNAGA, T.; FUJITSU, T.; HIRAYAMA, Y.; OHKUBO, Y.; MUTOH, S. *FK506 suppresses E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 expression on vascular endothelial cells by inhibiting tumor necrosis factor a secretion from peripheral blood mononuclear cells. Cytokine.* 29: 67-71. 2005.

SAKURADA, T.; KATSUMATA, K.; TAN-NO K.; SAKURADA, S.; KISARA, K. *The capsaicin test in mice for evaluating tachykinin antagonists in the spinal cord. Neuropharmacology* 31: 1279–1285. 1992.

SCHMID-SCHONBEIN, G.W. *Analysis of inflammation. Anu. Rev. Biomed. Eng.* 8: 93-151. 2006.

SECCO, D.D.; PARON, J.A.; DE OLIVEIRA, S.H.P.; FERREIRA, S.H. *Neutrophil migration in inflammation: nitric oxide inhibits rolling, adhesion and induces apoptosis. Nitric Oxide.* 9:153-164.2004.

SEDGWICK, A. D.; LEES, P. *Studies of eicosanoid production in the air pouch model of synovial inflammation. Agents Actions.* 18: 439-446. 1986.

SETA, N.; KUWANA, M. *Human circulating monocytes as multipotential progenitors. The Keio J. Med.* 56:41-47. 2007.

SIMS, J. E.; SMITH, D. E. *The IL-1 family: regulators of immunity. Nat. Rev. Immunol.* 10:89-102. 2010.

SINGH, A. *Sitosterol as an antioxidant in frying oils. Food Chemistry.* 137: 62-67. 2012.

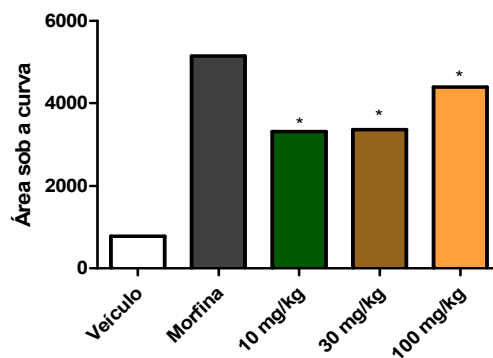
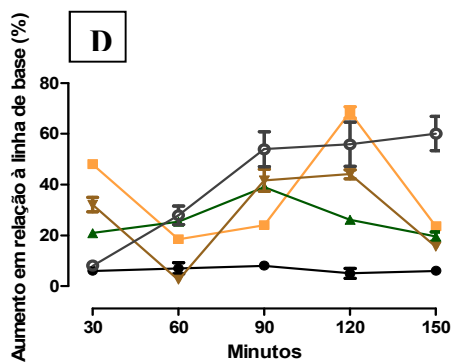
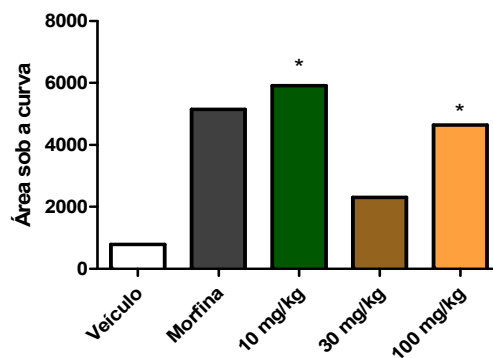
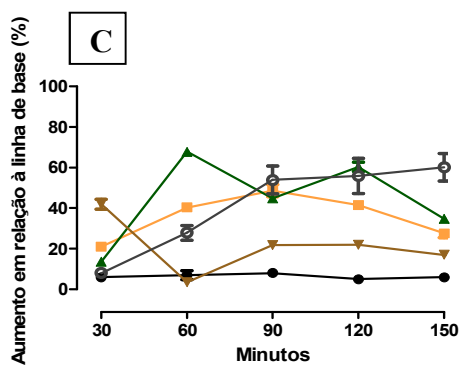
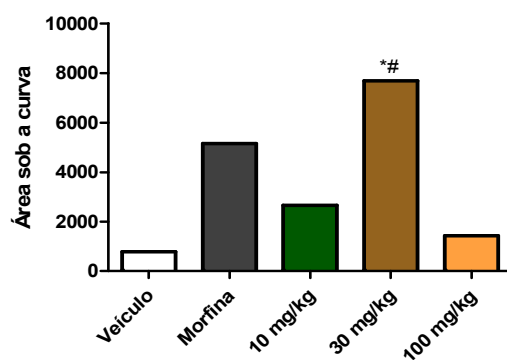
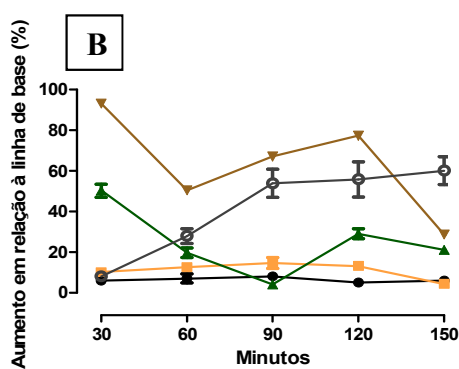
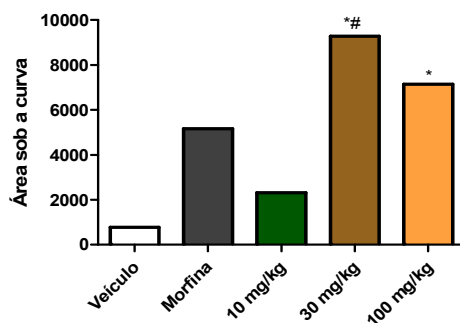
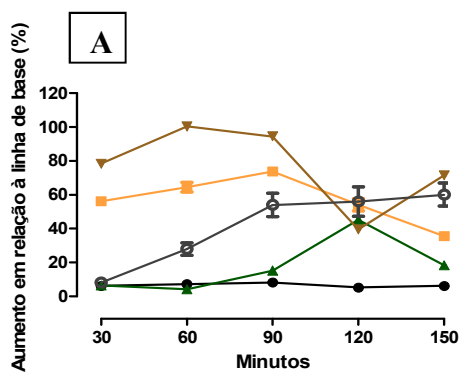
SOMMER, C.; KRESS, M. *Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. Neurosci. Lett.* 361: 184-187. 2004.

- SORKIN, L.S., WALLACE, M.S. *Acute pain mechanisms*. **Surg. Clin. North. Am.** 79:213-229. 1999.
- SPAHN, V.; FISHER, O.; ENDRES-BECKER, J.; SCHAFER, M.; STEIN, C.; ZOLLNER, C. *Opioid withdrawal increases transient receptor potential vanilloid 1 activity in a protein kinase A-dependent manner*. **Pain**. 154: 598-608. 2012.
- STABLES, M.J.; GILROY, D.W. *Old and new generation lipid mediators in acute inflammation and resolution*. **Prog Lipid Res.**1: 35-51. 2011.
- STEIN, C.; SCHÄFER, M.; MACHELSKA, H. *Attacking Pain at its Source: New Perspectives on Opioids*. **Nat. Med.** 9:1003–1008. 2003.
- STEIN, C.; LANG, L.J. *Peripheral mechanisms of opioid analgesia*. **Curr. Opin. Pharmacol.** 9:3-8. 2009.
- SUNDARRAJ, S.; THANGAM, R.; SREEVANI, V.; KAVERI, K.; GUNASEKARAN, P.; ACHIRAMAN, S.; KANNAN, S. *γ -Sitosterol from *Acacia nilotica* L. induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis through c-Myc suppression in MCF-7 and A549 cells*. **Journal of Ethnopharmacology**. 141: 803-809. 2012.
- SUZUKI, Y.; RUIZ-ORTEGA, M.; LORENZO, O.; RUPEREZ, M.; ESTEBAN, V.; EGIDO, J. *Inflammation and angiotensin II*. **Int. J. Biochem. Cell Biol.** 35:881-900. 2003.
- SWIGLO, G.; TYRAKOWSKA, B. *Quality of commercial apple juices evaluated on the basis of the polyphenol content and the TEAC antioxidant activity*. **J. Food Sci.** 68(5): 1844-1849. 2003.
- SZALLASI, R.; BLUMBERG, P.M. *Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanisms*. **Pharmacol. Rev.** 5:159-212. 1999.
- TASSORELLI, C.; GRECO, R.; WANG, D.; SANDRINI, G.; NAPPI, G. *Prostaglandins, glutamate and nitric oxide synthase mediate nitroglycerin-induced hyperalgesia in the formalin test*. **Eur. J. Pharmacol.** 534: 103-107. 2006.
- VALLANCE, P.; LEIPER, J. *Blocking NO synthesis: how, where and why?* **Nat. Rev. Drug Discov.** 1: 939-950. 2002.
- VANEGAS, H.; SCHAIBLE, H.G. *Prostaglandin and cyclooxygenases in the spinal cord*. **Prg. Neurobiol.** 64: 327-363.2001.
- VIGIL, S. V. G.; DE LIZ, R.; MEDEIROS, Y. S.; FRÖDE, T. S. *Efficacy of tacrolimus in inhibiting inflammation caused by carrageenan in a murine model of air pouch*. **Transplant. Immunol.** 19:25-29. 2008.
- VOLP, A.C.P.V.; RENHE, I.R.T.; BARRA, K.; STRINGUETA, P.C.; *Flavonoides antocianinas: características e propriedades na nutrição e saúde*. **Rev. Bras. Nutr. Clin.** 23(2): 141-149. 2007.

- WAHL, S.M. *Transforming growth factor beta (TGF-beta) in inflammation: a cause and a cure.* **J.Clin.Immunol.** 12: 61-74. 1992.
- WALZOG, B.; GAEHTGENS, P. *Adhesion Molecules: The path to a new understanding of acute inflammation.* **News Physiol. Sciences.** 15: 107 – 113. 2000.
- WATKINS, L.R.; MAYER, D.J. *Organization of endogenous opiate and nonopiate pain control systems.* **Science.** 11:1185-1192. 1982.
- WEISS, U. *Inflammation.* **Nature.** 420: 845. 2002.
- WHITE, F.A.; BHANGOO, S.K.; MILLER, R.J. *Chemokines: integrators of pain and inflammation.* **Nat. Rev. Drug Discov.** 4: 834-844. 2005.
- WOOLF, C.J. *Central sensitization: Implications for the diagnosis and treatment of pain.* **Pain.** 152:2-15. 2010.
- WONG, M.M.; FISH, E.M. *Chemokines: Attractive mediators of the immune response.* **Sem. Immunol.** 15: 5-14. 2003.
- XU, J.; XU, X.; VERSTRAETE, W. *Adaptation of E. coli cell method for microscale nitrate measurement with the Griess reaction in culture media.* **Journal of Microbiological Methods.** 41: 23–33. 2000.
- ZAMPIERI, M.C.T; SARKIS, J.E.S; PESTANA, R.C.B; TAVARES, TAVARES, A.R.; MELLO-DE-PINNA, G.F.A. *Characterization of Tibouchina granulosa (Desr.) Cong. (Melastomatacea) as a biomonitor of air pollution and quantification of particulate matter adsorbed by leaves.* **Ecological Engineering.** 61: 316-327. 2013.

8. Anexos

Anexo 1: Modelo da placa quente



Efeito do Extrato Etanólico (A) e das frações em Hexano (B), Diclorometano (C) e Acetato de Etila (D) no modelo da placa quente.

Anexo 2: Artigos

Abaixo estão listados artigos submetidos (i) e já publicados (ii) desde 2011 até o presente momento.

i. Artigo submetido

1. **GUILHON, C. C.**, Abdul-Wahab, I. R., Boylan, F., Fernandes, P. D.
Central antinociceptive and mechanism of action of *Pereskia bleo* Kunth leaves crude extract, fractions and isolated compounds. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, n#915927, 2014.

ii. Artigos publicados

1. Abdul-Wahab, Ikarastika Rahayu; **Guilhon, Carolina Carvalho**; Fernandes, Patricia Dias; Boylan, Fabio.
Anti-nociceptive activity of *Pereskia bleo* Kunth. (Cactaceae) leaves extracts. **Journal of Ethnopharmacology**. v.144, p.741 - 746, 2012.

2. **Guilhon, C. C.**, Raymundo, Larissa J.R.P., Alviano, Daniela S., Blank, Arie F., Arrigoni-Blank, Maria F., Matheus, Maria Eline, Cavalcanti, Sócrates C.H., Alviano, Celuta S., Fernandes, Patrícia D.
Characterisation of the anti-inflammatory and antinociceptive activities and the mechanism of the action of *Lippia gracilis* essential oil. **Journal of Ethnopharmacology**. v.135, p.406 - 413, 2011.

3. Raymundo, Larissa J.R.P., **Guilhon, Carolina C.**, Alves B., Alviano, Daniela S., Cavalcanti, Sócrates C.H., Fernandes, Patricia D., Alviano, Celuta S., Antonioli, Angelo R., Matheus, Maria Eline.
Characterisation of the anti-inflammatory and antinociceptive activities of the *Hyptis pectinata* (L.) Poit essential oil. **Journal of Ethnopharmacology**. v.134, p.725 - 732, 2011.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA E

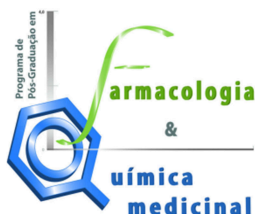
QUÍMICA MEDICINAL

Análise fitoquímica e farmacológica da
Tibouchina granulosa.

CAROLINA CARVALHO GUILHON

RIO DE JANEIRO

2015



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO

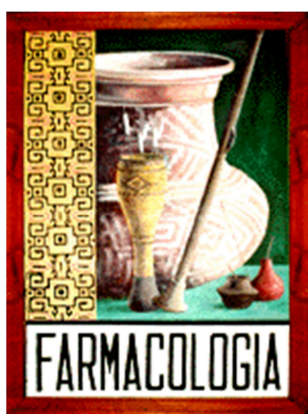
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA E

QUÍMICA MEDICINAL

Análise fitoquímica e farmacológica da *Tibouchina granulosa.*

CAROLINA CARVALHO GUILHON



Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Farmacologia e Química Medicinal), do Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, visando à obtenção do grau de mestre em Ciências Biológicas (Farmacologia e Química Medicinal).

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Dias Fernandes

Co-orientador: Prof. Dr. Fabio Boylan

RIO DE JANEIRO

Março de 2015

Análise fitoquímica e farmacológica da *Tibouchina granulosa*.

Carolina Carvalho Guilhon

Orientadora: Profa. Dra. Patrícia Dias Fernandes

Co-orientador: Prof. Dr. Fabio Boylan

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal, Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Farmacologia).

Aprovada por:

Prof. Dr. Paulo de Assis Melo

Prof. Dra. Cláudia Lúcia Martins da Silva

Profa. Dra. Claudia Moraes de Rezende

Profa. Dra. Maria Eline Matheus (Revisora)

Profa. Dra. Patrícia Dias Fernandes (Orientadora)

RIO DE JANEIRO
Março de 2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Guilhon, Carolina Carvalho

Análise fitoquímica e farmacológica da *Tibouchina granulosa*./ Carolina Carvalho Guilhon. – Rio de Janeiro: UFRJ, ICB – PPGFQM, 2015.

xvii, 106 f.:il; 31 cm

Orientadora: Patrícia Dias Fernandes

Co-orientador: Fabio Boylan

Dissertação (Mestrado), UFRJ, ICB, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal, 2015.

Referências Bibliográficas: f 91

1. *T. granulosa*
2. Dor
3. Inflamação
4. Atividade anti-inflamatória.
5. Atividade antinociceptiva. I. Fernandes, Patrícia Dias. II. Universidade Federal do Rio de Janeiro, Instituto de Ciências Biomédicas, Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai e minha mãe, que estiveram sempre ao meu lado. Meus exemplos de força, bondade e sabedoria, que me apoiaram em todos os momentos para chegar até aqui. Sem a confiança e o apoio de vocês eu nada seria. Muito obrigada.

Às minhas irmãs e meus lindos sobrinhos, sempre ao meu redor, torcendo e apoiando. Vocês me aconselham e me estimulam para que eu continue crescendo e amadurecendo.

À professora Patricia Dias, a quem palavras nunca serão suficientes para agradecer. Além de acreditar no meu trabalho, foi a maior incentivadora para que tudo fosse possível. Muito obrigada, espero que eu consiga retribuir tudo o que você fez e tem feito por mim com o meu trabalho.

Ao professor Fabio Boylan, por ter me recebido e guiado em seu laboratório no Trinity College Dublin. Uma parte do trabalho só foi possível graças a sua paciência e atenção.

Aos alunos do laboratório de Farmacologia da Dor e Inflamação que compartilham do dia a dia comigo: Fabiana, Andrea, Natália, Thaís, Gabriella, Larissa (que me acompanha desde a época de iniciação científica), Jorge, Patricia, Thais, Milena, Thayná. Obrigada pela companhia, ajuda e pelo ótimo ambiente de trabalho.

Ao técnico e grande amigo Alan, que não poupou esforços para ajudar na realização deste e de outros trabalhos. Espero que a nossa parceria seja eterna. Muito obrigada.

Às amigas de fora do laboratório que estão sempre me apoiando. Não importa se perto ou longe, sei que sempre poderei contar com vocês.

Aos professores Paulo Melo, Cláudia Martins e Claudia Rezende pela participação na Banca Examinadora.

À professora Eline Matheus pelas contribuições, paciência e atenção durante a revisão deste trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal, por terem contribuído para a minha formação.

À todos os funcionários da Farmacologia.

Ao instituto Vital Brazil pela doação dos animais.

Às Agências de Fomento (CAPES, CNPq e FAPERJ) pelo apoio financeiro concedido como bolsa de pesquisa ou auxílio financeiro ao Laboratório.

RESUMO

Análise fitoquímica e farmacológica da *Tibouchina granulosa*.

Carolina Carvalho Guilhon

Orientadora: Dra. Patrícia Dias Fernandes.

Co-orientador: Dr. Fabio Boylan.

Resumo da dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia e Química Medicinal, Instituto de Ciências Biomédicas, da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências.

Tibouchina granulosa pertence à família Melastomataceae e é vastamente distribuída em regiões de mata atlântica no Brasil. *T. granulosa* é popularmente conhecida como ‘quaresmeira’ e é comumente usada como planta ornamental. Algumas espécies do gênero são usadas na medicina veterinária, observações pessoais indicam que o chá das folhas apresenta efeito cicatrizante, no entanto, não há comprovação científica que suporte tal aplicação.

As metodologias aplicadas para este trabalho incluíram a preparação de secções anatômicas e as suas descrições; extração, isolamento e purificação de substâncias e elucidação estrutural das mesmas; quantificação do composto isolado e composição fitoquímica através de cromatografias e, por fim, ensaios farmacológicos do extrato etanólico e das frações em hexano, diclorometano e acetato de etila, provenientes das folhas de *Tibouchina granulosa*.

Os resultados da análise anatômica estão alinhados com as principais características dos vegetais pertencentes a família Melastomataceae.

As análises fitoquímicas da fração em acetato de etila das folhas de *Tibouchina granulosa* levaram ao isolamento e identificação da hispidulina-7-O- β -D-glicosídeo, isolada através de coluna cromatográfica com sílica gel, este flavonoide foi então quantificado através de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) na fração em acetato de etila. A técnica de cromatografia gasosa com fase gasosa acoplada a espectroscopia de massas resultou na identificação de α e β amirina e γ -sitosterol na fração em hexano e estigmasterol na fração em diclorometano.

O extrato etanólico provenientes das folhas de *T. granulosa* e todas as frações foram testadas para avaliar os seus potenciais anti-inflamatórios, através do teste da formalina e do modelo da BAS (incluindo quantificação de citocinas, óxido nítrico e proteínas), e suas atividades antinociceptivas através do teste da placa quente e pelos modelos da lambadura de pata induzida por capsaicina e glutamato.

O extrato etanólico e as frações apresentaram potencial efeito anti-inflamatório e atividade antinociceptiva, além disso, a análise fitoquímica confirma que a composição química das folhas pode ser responsável por essas atividades.

Palavras-chave: 1. *T. granulosa* 2. Dor 3. Inflamação 4. Atividade antinociceptiva. 5. Atividade anti-inflamatória

**Rio de Janeiro
Março de 2015**

ABSTRACT

Tibouchina granulosa belongs to the Melastomataceae family which is widely distributed in atlantic forest regions in Brazil. *T. granulosa* is popularly known as 'quaresmeira' and is commonly used as an ornamental plant. Some species of the genus are used in popular vet medicine, personal observations indicate that teas from the leaves present a significant wound healing effect, however, there are no scientific data that support these applications.

The methodology designed for this study included the preparation of anatomic sections and their description, extraction, isolation and purification of substances, structural elucidation, chromatography, and pharmacological assays based on the crude ethanol extract and the hexane, dichloromethane and ethyl acetate fractions of *Tibouchina granulosa* leaves.

The results of the anatomical study are aligned with the main characteristics for plants belonging to the Melastomataceae family.

The phytochemical analysis of the ethyl acetate fraction of *Tibouchina granulosa* leaves led to the isolation and identification of hispidulin-7-O- β -D-glucoside, isolated from the column chromatography using silica, this flavonoid was then quantified using high performance liquid chromatography (HPLC) in ethyl acetate fraction. The gas chromatography/ mass spectrometry technique led to the identification of α and β amirin and γ -sitosterol in the hexane fraction and stigmaterol in the dichloromethane fraction.

Ethanol extract of the leaves of *T. granulosa* and all the fractions were assayed for their anti-inflammatory potential, using formalin test and SAP (including quantification of cytokines, nitric oxide and proteins), and antinociceptive activity by displaying the hot plate test and capsaicin and glutamate-induced foot licking models.

The ethanol extract and the fractions presented anti-inflammatory potential and antinociceptive activity, and the phytochemical analysis confirm that the chemical composition of the leaves could be responsible for their activity.

Keywords: 1. *T. granulosa* 2. Pain 3. Inflammation 4. Antinociceptive activity. 5. Anti-inflammatory activity.

SUMÁRIO

Lista de Figuras -----	xiii
Lista de Tabelas -----	xiii
Lista de Esquemas -----	xiii
Lista de Gráficos -----	xiv
Lista de Conjuntos -----	xiv
Lista de Abreviaturas -----	xv

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Produtos Naturais	2
1.2. <i>Tibouchina granulosa</i> , do uso popular à experimentação	3
1.2.1. Compostos de interesse encontrados na <i>T. granulosa</i>	4
1.3. Dor e nocicepção	8
1.3.1. Envolvimento dos sistemas opioide e vaniloide na dor	11
1.3.2. Glutamato	12
1.4. Inflamação	13
1.4.1. Mediadores do processo inflamatório	14
1.4.2. Eventos vasculares – Permeabilidade vascular e exsudação	17
1.4.3. Eventos celulares	18
1.4.4. Envolvimento do óxido nítrico (NO) na inflamação	21
1.4.5. Citocinas	22
1.4.6. Finalização do processo inflamatório	23
2. OBJETIVOS	24
2.1. Objetivo geral	25
2.2. Objetivos específicos	25
3. MATERIAIS E MÉTODOS	26
3.1. Material Vegetal	27
3.2. Materiais sintéticos	28
3.3. Preparo dos reagentes e soluções	30
3.4. Animais	32
3.5. Estudos Fitoquímicos com a <i>Tibouchina granulosa</i>	33
3.5.1. Cromatografia em coluna em sílica	33
3.5.2. Placas de Cromatografia em Camada Delgada	34

3.5.3. Análise das amostras por Ressonância Magnética Nuclear -----	34
3.5.4. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) -----	35
3.5.5. Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG/EM) -----	36
3.5.6. Anatomia Vegetal -----	37
3.6. Estudos farmacológicos da <i>Tibouchina granulosa</i> -----	37
3.6.1. Modelo da placa quente -----	37
3.6.2. Modelo da lambedura de pata induzida pela capsaicina -----	39
3.6.3. Modelo da lambedura de pata induzida por glutamato -----	39
3.6.4. Modelo da lambedura de pata induzida pela formalina -----	40
3.6.5. Modelo da migração celular induzida por carragenina (Bolsa de ar subcutânea) -----	41
3.6.6. Quantificação de citocinas e proteínas -----	43
3.6.7. Quantificação de nitrato -----	44
3.6.8. Análise Estatística -----	45
4. RESULTADOS -----	46
4.1. Resultados em fitoquímica -----	47
4.1.1. Isolamento do flavonoide hispidulina por cromatografia em coluna---	47
4.1.2. Elucidação estrutural do composto X por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) -----	48
4.1.3. Dosagem de hispidulina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) -----	53
4.1.4. Investigação da composição das frações em hexano, diclorometano e acetato de etila utilizando cromatografia com fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) -----	55
4.1.5. Anatomia Vegetal -----	59
4.2. Resultados em farmacologia -----	61
4.2.1. Efeito do EE e suas frações no modelo da placa quente -----	61
4.2.2. Efeito do EE e suas frações no modelo de nocicepção induzida pela	

injeção intraplantar de capsaicina -----	64
4.2.3. Efeito do EE e suas frações no modelo de nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato -----	65
4.2.4. Efeito do EE e suas frações no modelo da lambadura de pata induzida pela formalina -----	67
4.2.5. Efeito do EE e suas frações no modelo inflamatório de migração celular – BAS -----	68
4.2.5.1. Quantificação de leucócitos totais -----	69
4.2.5.2. Dosagem de citocinas (TNF- α , IL-1 β , IFN- γ) -----	71
4.2.5.3. Quantificação de óxido nítrico (NO) -----	74
4.2.5.4. Dosagem de proteínas -----	76
5. DISCUSSÃO -----	79
6. CONCLUSÕES -----	89
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	91
8. ANEXOS -----	104

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Árvore (A), flores e folhas (B) da <i>Tibouchina granulosa</i> -----	4
Figura 2: Estrutura geral dos flavonoides -----	5
Figura 3: Estrutura geral de uma flavona -----	6
Figura 4: Estrutura da α -amirina e da β -amirina -----	6
Figura 5: Fase inicial de condução da dor -----	9
Figura 6: Representação do mecanismo de rolamento, aderência, diapedese e quimiotaxia dos neutrófilos -----	20
Figura 7: Placas de CCD das frações 114 a 120 e 122 a 128 -----	48
Figura 8: Composto X ou ‘Hispidulina 7-O- β -D-glicosídeo’ -----	49
Figura 9: Espectro de RMN de ^1H do composto X -----	50
Figura 10: Expansão do espectro de RMN de ^1H do composto X ($\delta 6.7$ a $\delta 8.0$)-----	50
Figura 11: Expansão do espectro de RMN de ^1H do composto X ($\delta 2.5$ a $\delta 6.5$) -----	51
Figura 12: Espectro de RMN de ^{13}C do composto X -----	52
Figura 13: Análise da fração em acetato de etila pelo método de CLAE -----	54
Figura 14: Corte longitudinal da folha de <i>T. granulosa</i> -----	60
Figura 15: Focos de Amido -----	60
Figura 16: Tricomas -----	60
Figura 17: Cristais de oxalato de cálcio -----	61
Figura 18: Compostos fenólicos em menor aumento -----	61
Figura 19: Compostos fenólicos em maior aumento -----	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Dados observados nos RMNs de ^{13}C e ^1H , para a substância X, comparados com os dados observados na literatura -----	53
--	----

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1: Preparação do extrato etanólico e suas frações a partir das folhas da <i>Tibouchina granulosa</i> -----	28
Esquema 2: Ilustração do CLAE -----	36
Esquema 3: Protocolo do modelo da placa quente -----	38

Esquema 4: Protocolo da nocicepção induzida por capsaicina -----	39
Esquema 5: Protocolo da nocicepção induzida por glutamato -----	40
Esquema 6: Protocolo modelo da lambadura de pata induzida por formalina -----	41
Esquema 7: Protocolo bolsa de ar subcutânea -----	43

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1: Curva de calibração para o flavonoide Hispidulina 7-O-β-D-glicosídeo ----	54
Gráfico 2: Efeito do Extrato Etanólico e das frações em H, DCM e AE no modelo da placa quente -----	63
Gráfico 3: Efeito do EE e suas frações em H, DCM e AE no modelo de nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina -----	65
Gráfico 4: Efeito do EE e suas frações em H, DCM e AE no modelo de nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato -----	66
Gráfico 5: Efeito do EE, fH, fDCM e fAE No modelo da lambadura de pata induzida pela formalina -----	68
Gráfico 6: Efeito do EE, e as frações H, DCM e AE na migração celular induzida por carragenina na BAS -----	70
Gráfico 7: Efeito do EE, fH, fDCM e fAE na produção de TNF-α induzida por carragenina na BAS -----	72
Gráfico 8: Efeito do EE, fH, fDCM e fAE na produção de IL-1β induzida por carragenina na BAS -----	73
Gráfico 9: Efeito do EE, fH, fDCM e fAE na produção de IFN- γ induzida por carragenina na BAS -----	74
Gráfico 10: Efeito do EE, fH, fDCM e fAE na produção de NO induzida por carragenina na BAS -----	76
Gráfico 11: Efeito do EE, fH, fDCM e fAE no extravasamento de proteínas plasmáticas induzida por carragenina na BAS -----	78

LISTA DE CONJUNTOS

Conjunto 1: Cromatogramas e tabela sugerindo os componentes da fração em hexano -----	56
Conjunto 2: Cromatogramas e tabela sugerindo os componentes da fração em diclorometano -----	58
Conjunto 3: Cromatograma e tabela sugerindo os componentes da fração em acetato de etila -----	59

LISTA DE ABREVIATURAS

µl	Microlitro
µg	Micrograma
µM	Micro molar
5-HT	Serotonina
a.C.	antes de Cristo
AA	Ácido araquidônico
AAS	Ácido acetilsalicílico
AcOEt	Acetato de etila
AIEs	Anti-inflamatórios esteroidais
AINES	Anti-inflamatórios não esteroidais
AMPA	Ácido α-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico
AMPc	Adenosine monofostato cíclica
ANOVA	Análise de variância
ASC	Área sob a curva
BAS	Bolsa de ar subcutânea
BCA	Ácido bicinconínico
BK	Bradicinina
BSA	Albumina bovina sérica
Ca²⁺	Cálcio
CC	Cromatografia em coluna
CCD	Cromatografia em camada delgada
CG/EM	Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
COX	Ciclo-oxigenase
CSF	Fator estimulador de colônia
d.p.	Desvio padrão
DMSO	Dimetilsulfóxido
DMSO-d6	Dimetilsulfóxido deuterado
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EE	Extrato etanólico
ELISA	Ensaio imunoenzimático
ELL	Extração líquido-líquido
eNOS	Oxido nítrico sintase endotelial
fAE	Fração em acetato de etila
fDCM	Fração em diclorometano
FE	Fase estacionária
fH	Fração em hexano
FLA₂	Fosfolipase A ₂
g	Gramas
G_i	Proteína G inibitória

GMPC	Guanosina monofosfato cíclica
H₂O	Água
H₃PO₄	Ácido fosfórico
He	Hélio
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i>
Hz	Hertz
IASP	Associação Internacional para o estudo da dor
ICAM-1	Molécula de adesão intracelular 1
IFN-γ	Interferon γ
Ig	Imunoglobulina
iGlu	Receptores ionotrópicos glutamatérgicos
IL-1β	Interleucina 1 β
IL-8	Interleucina 8
ILs	Interleucinas
i.p.	Intraperitoneal
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
K⁺	Potássio
KA	Ácido caínico
KH₂PO₄	Fosfato monopotássico
L-NAME	<i>L-NG-nitro-arginine methyl ester</i>
LOX	Lipoxigenases
LTs	Leucotrienos
MCP-1	Proteína quimiotática de monócitos-1
MeOH	Metanol
mg	Miligrama
mGlu	Receptores metabotrópicos glutamatérgicos
ml	Mililitro
Na₂CO₃	Carbonato de sódio
Na₂HPO₄	Fosfato dissódico
NaCl	Cloreto de sódio
NaHCO₃	Bicarbonato de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NF-κB	Fator nuclear κ B
NMDA	N-metil-D-aspartato
nNOS	Óxido nítrico sintase neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Oxido nítrico sintase
PAF	Fator de ativação plaquetário
PBS	Tampão fosfato salina
PGI₂	Prostaciclina
pg	Picograma
PGs	Prostaglandina
PKA	Proteína quinase A
PMN	Polimorfonucleares

q.s.p	Quantidade suficiente para
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN ¹H	Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio
RMN ¹³C	Ressonância Magnética Nuclear de carbono 13
SP	Substância P
<i>T. granulosa</i>	<i>Tibouchina granulosa</i>
TMB	Tetra-metil-dihidrocloro de benzidina
TNF-α	Fator de necrose tumoral α
t_r	Tempo de retenção
TRPV1	<i>Transient receptor potential cation channel subfamily V member 1</i>
TXA₂	Tromboxano A ₂
TXs	Tromboxanos
VCAM-1	Molécula de adesão de célula vascular
v.o.	via oral
WHO	<i>World Health Organization</i>

1. Introdução

1.1. Produtos Naturais

Historicamente, os produtos de origem natural vêm sendo usados como terapia medicinal há séculos. A população busca na natureza o subsídio para suas necessidades básicas, incluindo o tratamento medicamentoso (Dias e cols., 2012).

Os primeiros relatos do uso de medicamentos provenientes da natureza têm origem na Mesopotâmia e datam de 2600 a.C., os quais documentam o uso dos óleos de *Cupressus sempervirens* e *Commiphora* que eram, e ainda são, usados atualmente, no tratamento de resfriados, tosse e inflamação. No entanto, o documento mais conhecido sobre o tema é de origem egípcia, o “*Ebers Papyrus*”, e retrata mais de setecentas preparações, que tinham como base algum componente de origem vegetal. Essas preparações variam de gargarejos, pílulas, infusões até pomadas (Dias e cols., 2012).

Os produtos terapêuticos naturais e seus metabólitos secundários têm sido a fonte mais bem sucedida para a origem de novos fármacos. Levando em consideração que menos de 10% da biodiversidade do mundo foi testada para uma potencial atividade biológica, muitos compostos de origem natural ainda esperam para serem descobertos e isto se torna um desafio tendo como base a diversidade química que ainda precisa ser acessada (Dias e cols., 2012).

O uso de produtos naturais como medicamentos é descrito ao longo da história como “medicina tradicional”, “poções” ou “óleos”, porém muitos dos componentes naturais bioativos continuavam não identificados. A principal fonte de conhecimento para o uso desses produtos naturais se dava pela experimentação humana, através de tentativas e erros, por centenas de séculos (Dias e cols., 2012).

Devido a casos de toxicidade e efeitos adversos, observados quando são administrados produtos de origem natural, e a fim de aumentar a compreensão sobre os efeitos dos mesmos, pesquisas baseadas neste tema são fundamentais, não só para desvendar novas rotas de obtenção de fármacos, mas também para elucidar a composição, mecanismo de ação e efeitos

colaterais destes produtos naturais. De acordo com a *World Health Organization* (WHO), 65% da população mundial se tratam com medicamentos de origem natural e acreditam ser este o melhor caminho para a cura de diversas doenças (Cragg, 2013).

1.2. *Tibouchina granulosa*, do uso popular à experimentação

O gênero *Tibouchina*, pertencente à família Melastomatacea, possui dezenas de espécies ornamentais, do tipo arbustos, herbáceas ou arbóreas e ocorrem tanto em campos e brejos, como em bordas de mata (Joly, 1993). Alguns trabalhos já descreveram atividades antinociceptiva, anti-inflamatória e antioxidante para outras espécies pertencentes a esta família, tais como as espécies, *Osbeckia parvifolia* Arn. e *Clidemia rubra* Mart. (Murugan e Parimelazhagan, 2013; Gordon e cols., 2011).

A *T. granulosa*, popular quaresmeira, é uma árvore de até 12 metros de altura, cujas flores violáceas (figura 1) surgem entre fevereiro e março. Alguns trabalhos já publicados sobre o gênero *Tibouchina*, e a família a qual pertence, descrevem fitocomponentes como as antocianinas (Bobbio e cols., 1985; Lowry, 1975). Estes mesmos trabalhos relatam a presença de antocianinas nas flores da *T. granulosa*, as quais parecem estar correlacionadas ao pigmento que confere as cores das flores desta espécie (Francis e cols., 1982). As antocianinas são componentes do grupo dos flavonoides, estão amplamente distribuídas na natureza, constituem uma fração não energética da dieta do ser humano e estão relacionadas a importantes atividades biológicas. Seus efeitos benéficos em relação à nutrição e saúde estão relacionados às suas propriedades antioxidantes, pois são sequestradoras diretas de radicais livres e desta forma, desempenham um papel importante na prevenção de doenças cardiovasculares, modulação da inflamação, inibição da agregação plaquetária, prevenção do câncer e de sua progressão (Volp e cols., 2007).

Apesar de a espécie em questão ser facilmente encontrada nas regiões de mata Atlântica do Brasil, apenas um trabalho foi publicado sobre ela, neste trabalho, Zampieri e colaboradores (2013) descreveram a *T. granulosa* como um biomarcador de poluição e tentaram explicar, anatomicamente, como esta árvore pode proteger o ambiente de materiais particulados.

Dessa forma, no que diz respeito à farmacologia e à fitoquímica desta espécie, ainda há bastante a se pesquisar. Foi com o intuito de desenvolver um projeto que analisasse as possíveis atividades antinociceptiva e anti-inflamatória, e como a elucidação da composição fitoquímica e da anatomia vegetal desta planta poderiam ajudar a reiterar essas atividades, que o projeto em questão foi desenvolvido.

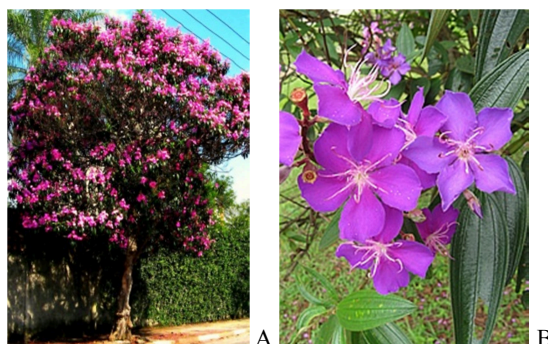


Figura 1: Estão representados, respectivamente, A) árvore e B) flores e folhas da *Tibouchina granulosa* (fotografias retiradas do site www.google.com).

1.2.1. Levantamento bibliográfico da *T. granulosa*

Os flavonoides são compostos polifenólicos (figura 2) encontrados em organismos provenientes da natureza, tais como frutas e vegetais. São metabólitos secundários destes organismos e se apresentam de maneira ubíqua na natureza, podendo ser classificados como: flavonóis, flavonas, flavanonas, catequinas, antocianinas, isoflavonas e chalconas (Pal e Verma, 2013).

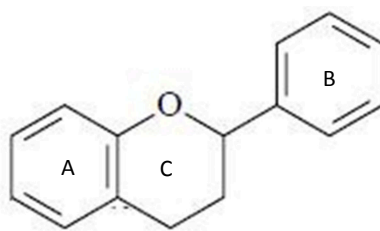


Figura 2: Estrutura geral dos flavonoides. Fonte: Martínez e cols., 2002.

As maiores fontes naturais de flavonoides são frutas cítricas, *berries*, cebolas, salsa, leguminosas e chá verde. Mais especificamente, as antocianinas, citadas anteriormente, são mais encontradas nas frutas denominadas *berries*, e normalmente conferem a pigmentação característica desses produtos. As flavonas ocorrem em sua maioria em maçãs e chás, as flavanonas em frutas cítricas e as isoflavonas em produtos de soja (Pal e Verma, 2013).

Os flavonoides receberam o nome de “modificadores biológicos” devido à habilidade que eles possuem de modificar as reações a estresses nos sistemas biológicos. As reações a alérgenos, carcinógenos ou viroses se tornam mais brandas, tornando o organismo mais resistente a qualquer ameaça. Por isso, eles têm sido descritos como anti-inflamatórios, antialérgicos, anticarcinogênicos, antioxidantes e antivirais (Cook, 1996; Świgło e cols., 2003).

Estudos epidemiológicos mostraram que o consumo de flavonoides está inversamente relacionado com o aumento da mortalidade por doença cardiovascular e incidência de ataques cardíacos. Reiterando a observação dos estudos epidemiológicos, alguns trabalhos demonstraram que flavonoides encontrados em frutas e vegetais agem como potentes antioxidantes, correlacionando desta maneira o caráter cardioprotetor (Knekt e cols., 1996; Volp e cols., 2007).

O grupo de flavonoides de interesse para esse trabalho são as flavonas, mais especificamente, um derivado de quercetina, a hispidulina. As quercetinas são componentes do grupo das flavonas (Volp e cols.), cuja estrutura geral pode ser observada na figura 3.

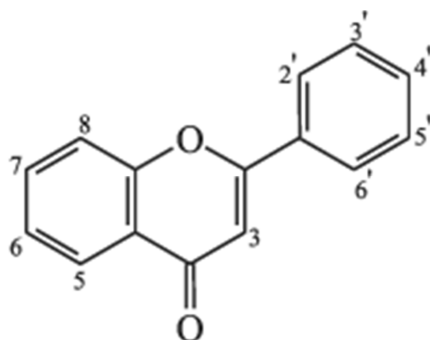


Figura 3: Estrutura geral de uma flavona (Volp e cols., 2007).

A hispidulina já foi descrita como hepatoprotetora (Férrandiz e cols., 1994), antioxidante (Sadasivam e Kumaresan, 2010), inibidora da liberação de glutamato no córtex de ratos (Lin e cols., 2012), inibidora da osteoclastogênese e da reabsorção óssea (Nepal e cols., 2013) e, por fim, aparenta possuir propriedades antitumorais (Gao e cols., 2014). No entanto, efeitos anti-inflamatório e/ou antinociceptivo ainda não foram associados à mesma.

Outra classe de compostos relevantes para este trabalho são as amirinas. Designadas como triterpenos, elas podem se apresentar como α -amirina e β -amirina (figura 4) e são encontradas em diversas espécies vegetais (Oliveira e cols., 2004).

Os triterpenoides são constituintes que têm despertado um grande interesse nos últimos anos em razão da descoberta do seu potencial farmacológico, com inúmeras atividades terapêuticas, tais como: anticancerígenas, anti-inflamatórias, antilepróticas, antivirais, antibacterianas, antifúngicas, antidiuréticas, giardicidas e inibidoras da enzima acetilcolinesterase (Bandeira e cols., 2007).

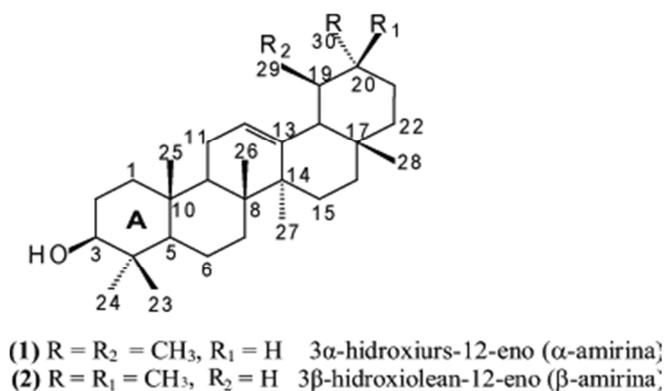


Figura 4: Estrutura da α -amirina e da β -amirina (Bandeira e cols., 2007).

Estudos anteriores já demonstraram que a α -amirina possui efeitos antinociceptivo, anti-inflamatório, hepatoprotetor e propriedades gastroprotetoras quando avaliada *in vivo* (Kweifio-Okai e cols., 1994; Recio e cols., 1995; Oliveira e cols., 2004a,b). Outro efeito associado à α -amirina, quando usada topicamente, é a capacidade de reduzir significativamente três eventos importantes relacionados à inflamação da pele, seriam eles: formação de edema, migração de leucócitos e produção da citocina IL-1 β (Otuki e cols., 2005a). Além disso, a mistura α β -amirina produz significativa antinocicepção periférica, espinhal e supraespinhal em roedores (Otuki e cols., 2005b).

Trabalhos recentes demonstraram que as propriedades anti-inflamatória e antinociceptiva das amirinas estariam associadas à interação delas com receptores canabinoides (Chicca e cols., 2012; Da Silva e cols., 2011) e, além disso, os efeitos seriam mediados principalmente através da sub-regulação de mediadores pró-inflamatórios, redução de desgranulação de mastócitos e transmigração de células inflamatórias (Medeiros e cols., 2007; Oliveira e cols., 2004, 2005).

A terceira e última classe de componentes relevantes para este trabalho são os esteróis encontrados em espécies vegetais, entre os esteróis de interesse, podemos citar o γ -sitosterol e o estigmasterol.

Também chamados de fitoesteróis, esses compostos são semelhantes à molécula do colesterol e podem ser encontrados em muitas plantas, mas são majoritariamente apresentados em óleos vegetais (Ostlund, 2002). Em particular, para o γ -sitosterol, alguns trabalhos comprovam que ele possui atividades antioxidante (Singh, 2012), antitumoral (Sundarraaj e cols., 2012) e antidiabética, sendo esta última através da estimulação da secreção de insulina pelo pâncreas (Balamurugan e cols., 2011). Para o estigmasterol foi comprovado que ele retarda a progressão da osteoartrite, inibindo a liberação de uma série de mediadores

pró-inflamatórios e também impede a degradação da matriz cartilaginosa, eventos típicos observados neste tipo de patologia. Aparentemente, o mecanismo de ação pelo qual ele realiza esta função é pela inibição das vias do fator nuclear κ B (NF- κ B, do inglês, *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) (Gabay e cols., 2010).

1.3. Dor e Nocicepção

Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor, a dor é uma “experiência sensorial e emocional desagradável, associada a um dano tecidual real ou potencial”. Dessa forma, a dor é aquela experiência que associamos a uma lesão tecidual real ou potencial que se estabelece em uma parte ou partes do corpo, sendo sempre desagradável e, portanto, também uma experiência emocional (IASP, 1986).

A dor é normalmente percebida quando há ativação de receptores específicos de dor, denominados nociceptores, presentes em terminações nervosas livres, sensíveis a estímulos químicos, térmicos e/ou mecânicos.

Os nociceptores se diferenciam dos demais receptores sensoriais pelo seu limiar mais alto, sendo ativados somente por estímulos de intensidade nociceptiva suficiente para causar algum grau de lesão tecidual (Cesare e McNaughton, 1996, Julius e Basbaum, 2001).

Após a estimulação dos nociceptores, o impulso nervoso com a informação nociceptiva é conduzido ao corno dorsal da medula através das fibras aferentes primárias dos tipos A δ e C, que conduzem, respectivamente, a dor do tipo aguda e crônica (Cesare e McNaughton, 1997).

Fibras A δ são mielinizadas, com velocidade de condução de aproximadamente de 5-30 m/s, gerando uma sensação dolorosa aguda e bem localizada. Esse tipo de fibra está relacionado à nociceptores térmicos e mecânicos, ou seja, aqueles ativados por temperaturas extremas e por pressão intensa aplicada na pele. As fibras do tipo C são amielínicas e

apresentam velocidade de condução menor que 1 m/s gerando uma sensação dolorosa mais lenta e menos discriminativa. Essas estão associadas à nociceptores polimodais que são ativados por estímulos mecânicos, térmicos ou químicos (Julius e Basbaum, 2001; Brooks e Tracey, 2005).

O início do processo da dor se dá com a transdução do sinal mecânico, térmico ou químico em um sinal elétrico de magnitude suficiente para poder ser conduzido através das fibras nervosas (figura 5). Uma vez ultrapassado o limiar de disparo, o potencial de ação é transmitido através das fibras nervosas até chegar ao corno dorsal da medula espinhal. Essa sinapse sensorial é mediada por neurotransmissores como glutamato, substância P, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP). Os neurônios secundários ascendem na porção contra lateral através do trato espinotalâmico conduzindo o impulso doloroso do corno dorsal da medula até o tálamo, onde fazem sinapse com neurônios terciários, que por sua vez conduzem a informação nociceptiva até o córtex somatossensorial e/ou para o giro cingulado anterior. No córtex somatossensorial a informação dolorosa é processada e interpretada no nível da consciência (Millan, 1999; Basbaum e cols., 2009).

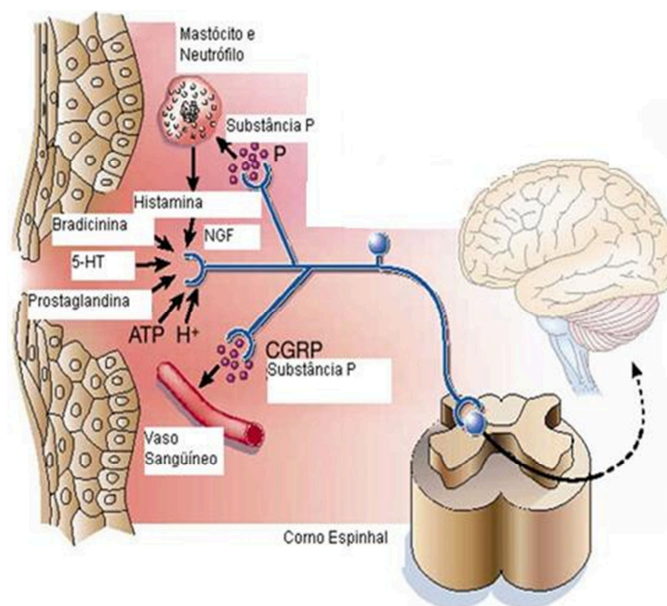


Figura 5 - Fase inicial de condução da dor. Adaptado de Basbaum e cols. (2009).

De acordo com Woolf (2010), a dor é classificada quanto a sua origem em três diferentes tipos, dor nociceptiva, dor inflamatória e dor patológica, sendo esta última denominada neuropática ou disfuncional.

Denomina-se dor nociceptiva quando os nociceptores respondem a estímulos dolorosos comuns, os quais podem ser de natureza térmica, química ou mecânica (Millan, 1999).

Por outro lado, a dor de caráter inflamatória, pode ser definida como lesões teciduais com desencadeamento de processo inflamatório em que ocorre ativação celular e liberação de mediadores, tais como, histamina, bradicinina, serotonina e prostaglandinas, os quais ativam ou sensibilizam (diminuindo o limiar de ativação) os neurônios nociceptivos periféricos (Millan, 1999).

Apesar de a experiência sensorial ser desagradável, as dores nociceptiva e inflamatória são mecanismos de proteção para o indivíduo. Já a dor patológica, não é tida como protetora, e sim decorrente de um funcionamento anormal do sistema nervoso, e é subdividida em dor neuropática ou disfuncional (Woolf, 2010).

A dor neuropática é causada por uma lesão do sistema nervoso central ou periférico, como, por exemplo, uma lesão nas fibras nervosas condutoras do impulso nervoso. De outra forma, a dor disfuncional não possui causa evidente, ela pode ser causada tanto por uma disfunção bioquímica quanto por liberação não programada de neurotransmissores acarretando em uma amplificação da sinalização sensorial nociceptiva no sistema nervoso central, isto é, não há estímulo doloroso, processo inflamatório, nem lesão do sistema nervoso (Woolf, 2010).

Existe ainda a classificação relacionada à duração da sensação dolorosa, podendo ser de caráter transitório, agudo ou crônico. A dor transitória ocorre na ausência de qualquer dano tecidual e se dissipa em poucos segundos ou minutos. A dor aguda decorre de uma lesão

tecidual imediata com ativação direta dos nociceptores locais. Já a dor crônica é aquela que persiste mesmo após a cura da lesão ou se prolonga por semanas, meses ou até anos após a recuperação tecidual e o organismo se torna incapaz de restaurar as funções fisiológicas para os níveis homeostáticos, o que a torna de difícil tratamento (Loeser e Melzack, 1999; Basbaum e cols., 2009).

A dor crônica representa um imenso problema clínico. Há milhares de pessoas sofrendo com esta condição debilitante, portanto existe uma preocupação para melhorar esta situação, através da compreensão não só dos mecanismos da dor, mas também de novos possíveis tratamentos, desenvolvendo novas tecnologias, otimizando e testando as já existentes e facilitando o acesso a casos clínicos (Gereau IV e cols., 2014).

Fármacos anti-inflamatórios e analgésicos periféricos têm seu alvo de ação na síntese e liberação de mediadores inflamatórios, inibindo desta maneira a sensibilização excessiva dos nociceptores (hiperalgesia primária). Já os analgésicos de ação central agem via receptores opioides situados no sistema nervoso supra-segmentar, que quando ocupados ativam a via inibitória descendente de controle endógeno da dor (Katzung, 8ª ed.).

1.3.1. Envolvimento dos sistemas opioide e vaniloide na dor

O uso de opioides exógenos, como a morfina e o fentanil, se tornou comum para o tratamento da dor, quando muito severa e refratária aos analgésicos não opioides. Os opioides usados na clínica atuam em receptores opioides que podem ser divididos em três tipos: μ , κ e δ (Martins e cols., 2012), eles pertencem à família dos receptores acoplados a proteína Gi (Spahn e cols., 2012). A ativação desses receptores promove abertura de canais de potássio (K^+), causando hiperpolarização, evento este importante para o aumento do limiar da dor, e também impedem a abertura de canais de cálcio (Ca^{2+}) dependentes de voltagem, levando a

inibição da liberação de neurotransmissores, como o glutamato e a substância P (Stein e cols, 2003; Stein e Lang, 2009), causando analgesia.

O receptor de potencial transitório do tipo vaniloide (TRPV1, do inglês *transient receptor potential cation channel subfamily V member 1*) é um canal de cátion não seletivo (Na^+ e Ca^{2+}), expresso em neurônios sensoriais periféricos da raiz dorsal e responde a estímulos térmicos e químicos, como a capsaicina, agente químico causador de dor (Spahn e cols., 2012).

A ativação de receptores do tipo μ , produzida por um agonista opioide, é capaz de impedir a fosforilação, via proteína quinase A (PKA), do receptor TRPV1 (Spahn e cols., 2012), ou seja, outra influência importante e consequência da ativação de receptores opioides do tipo μ , é que esses podem modular a atividade do receptor TRPV1 também pela via G_i e AMPc (adenosina monofosfato cíclica), de forma que uma vez que ambos receptores são expressos em fibras nociceptivas periféricas, quando um agonista opioide se liga ao receptor do tipo μ ocorre a dissociação do complexo da proteína G levando a inibição da adenilato ciclase e da formação de AMPc, e como resultado a PKA não é ativada. No processo de dor inflamatória o TRPV1 pode ser fosforilado e regulado por várias proteínas quinases, incluindo PKA. Dessa forma a inibição desses receptores via G_i e AMPc contribui para o efeito antinociceptivo dos agonistas dos receptores opioides (Endres-Becker e cols., 2007).

1.3.2. Glutamato

O glutamato é o neurotransmissor excitatório mais presente na transmissão, desenvolvimento e manutenção da resposta nociceptiva, se concentrando amplamente na medula espinhal. Através da ativação de receptores ionotrópicos glutamatérgicos (iGluR, do inglês *ionotropic glutamatergic receptor*) ou metabotrópicos glutamatérgicos (mGluR, do inglês *metabotropic glutamatergic receptor*) há excitação e sensibilização de nociceptores

periféricos e centrais das porções espinhal e supra-espinhal (Aanonsen e Wilcox, 1989; Budai e cols., 1995; Carlton, 2001).

Foram identificados três tipos de iGluR: N-metil-D-aspartato (NMDA, do inglês *N-methyl-D-aspartate*), ácido caínico (KA, do inglês *kainate*) e ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol-propiónico (AMPA, do inglês *α -amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid*) (Roger e Nicoll, 2010).

A liberação sustentada de glutamato e neuropeptídios, como a substância P, através da estimulação das fibras C provoca uma ativação persistente dos receptores AMPA com despolarização progressiva da membrana celular dos receptores NMDA, levando à despolarização e, portanto, à diminuição do limiar da dor, e conseqüente amplificação do sinal, levando à hiperalgisia (Sorkin e Wallace, 1999; Khasabov e cols., 2002; D'Mello e Dickenson, 2008). Portanto, substâncias que atuam diminuindo a liberação de glutamato, diminuem a nocicepção induzida por tal neurotransmissor e, por isso, podem contribuir com o efeito analgésico.

1.4. Inflamação

A inflamação é um processo que se dá através de reações vasculares e celulares em resposta à injúria tissular, antígenos ou infecção, caracterizada por vasodilatação indicada pela vermelhidão, rubor e calor, aumento da permeabilidade capilar gerando extravasamento de líquidos e edema, dor, e eventualmente perda de função (Aggarwall e cols., 2006).

Célsius foi o primeiro responsável por enumerar os quatro sinais clássicos da inflamação, sendo eles, calor, rubor, edema e dor. Por fim, o quinto sinal, acrescentado por Virchow, está associado ao agravamento dos quatro sinais cardinais, isto é, caso não haja resolução do problema, há perda da função do órgão ou tecido inflamado (Lawrence e cols., 2002).

Ainda no século XIX, Cohnhein demonstrou as primeiras alterações vasculares, com consequente extravasamento plasmático e migração celular para o foco inflamatório. No final do século XIX, Metchnikoff atribuiu a importância das células fagocitárias na resposta inflamatória (Majno e Joris, 2004). Finalmente, no século XX, Tomas Lewis, somando aos estudos já estabelecidos, mostrou que substâncias químicas eram responsáveis pela mediação de alterações vasculares que ocorrem durante o processo inflamatório, como por exemplo, a histamina (Majno e Joris, 2004).

1.4.1. Mediadores do processo inflamatório

De maneira geral, a partir do momento que há estímulo lesivo, a resposta inflamatória é iniciada com a liberação de mediadores químicos inflamatórios, os quais podem se originar do plasma, das células ou de tecidos (Majno e Joris, 2004) e também mediadores lipídicos, os eicosanoides.

Portanto, os mediadores podem ser divididos em aminas vasoativas, tais como, histamina, substância P, trombina, bradicinina (BK), serotonina; mediadores lipídicos correspondendo aos eicosanoides que englobam os prostanoídes, leucotrienos e lipoxinas derivados do metabolismo do ácido araquidônico; citocinas (TNF- α , IL-1 β , entre outras); quimiocinas (IL-8 e MCP-1) e enzimas proteolíticas como elastina, catepsina e metaloproteases (Majno e Joris, 2004; Walzog e Gaehtgens, 2000; White e cols., 2005).

A histamina está pré-formada e armazenada nos grânulos dos mastócitos, presentes normalmente no tecido conjuntivo adjacente aos vasos sanguíneos. Ela é liberada por desgranulação dos mastócitos em resposta a uma série de estímulos, como por exemplo, substância P, bradicinina, lesão física, reações imunes, proteínas de liberação da histamina derivadas dos leucócitos e citocinas. Quando atua em receptores H₁, na microcirculação,

causa dilatação das arteríolas e aumento da permeabilidade vascular das vênulas, e é por esse motivo, considerada o principal mediador da fase inicial da inflamação (Jutel e cols., 2009).

A serotonina (5-hidroxitriptamina ou 5-HT) também é um mediador vasoativo, pré-formado nas plaquetas, com ações semelhantes às da histamina. A liberação da serotonina das plaquetas é estimulada quando as plaquetas se agregam após contato com o colágeno, trombina ou complexo antígeno-anticorpo (Aller e cols., 2006).

A bradicinina também provoca vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular. Sua ação vasodilatadora resulta em parte, da produção endotelial de PGI₂ e da liberação de óxido nítrico (Marceau e Regoli, 2004), quando atua sobre os receptores do tipo B2 presentes principalmente em células endoteliais, célula muscular lisa e fibroblastos (Couture e cols., 2001). Além disso, a bradicinina exerce diversos efeitos, como por exemplo, a liberação de mediadores inflamatórios tais como prostanoídes, citocinas (IL-1 β e TNF- α) e ainda é um potente agente algésico (Eliis e Fozard, 2002).

A liberação de substância P (SP) é desencadeada quando há uma lesão tecidual, no tecido periférico e provoca ações vasculares pró-inflamatórias como a vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e desgranulação dos mastócitos (Santos e Calixto, 1997; Szallasi e Blumberg, 1999).

No que diz respeito aos eicosanóides, mediadores lipídicos provenientes do metabolismo do ácido araquidônico (AA), um ácido graxo liberado dos fosfolípidos de membrana por ação principalmente da enzima fosfolipase A2 (FLA₂) ativada por injúria tecidual ou produtos microbianos. Uma vez liberado o AA é metabolizado pela via das ciclo-oxigenases, cujos subtipos são COX-1, COX-2 e COX-3, e pela via das lipoxigenases, 5-LOX, 12-LOX e 15-LOX. Os produtos gerados pelas vias das COXs, chamados de maneira geral como prostanoídes, podem ser denominados como prostaglandinas, como, por exemplo, a PGE₂, a PGD₂ e a PGF₂ α ; prostaciclina, como a PGI₂; e também como tromboxanos,

como o TXA₂, pela via das LOXs são formados os leucotrienos, como o LTA₄, o LTB₄, o LTC₄ e o LTD₄. (Vanegas e Schaible, 2001; Nieves e Moreno, 2006; Rinaldo-Matthis e Haeggstrom, 2010).

A isoforma COX-1, dita constitutiva, é encontrada em vários tecidos e o principal produto gerado por elas são as PGs. Estas irão contribuir para a manutenção das funções fisiológicas, como a citoproteção do trato gastrointestinal, na agregação plaquetária e na melhora da perfusão renal (Botting, 2006). Já a isoforma COX-2 é conhecida como induzida, uma vez que sua expressão ocorre principalmente em resposta a estímulos pró-inflamatórios, sendo ela um importante contribuinte para a síntese de prostanoídes com o progresso da inflamação. Além disso, citocinas inflamatórias podem induzir um aumento de 10 a 80 vezes no nível de expressão de COX-2 em monócitos, macrófagos, condrócitos, fibroblastos, e células endoteliais (Khan e cols., 2007). Entretanto, a COX-2 também pode ser expressa constitutivamente em regiões cerebrais, no aparato justa glomerular renal e no endotélio vascular (Needleman e Iasakson, 1997; Rinaldo-Matthis e Haeggstrom, 2010). Por fim, existe uma terceira enzima, a COX-3, a qual é oriunda de uma variante do gene da COX-1, sendo expressa no cérebro e coração de cães (Chandrasekharan e cols., 2002; Qin e cols., 2005).

As PGs são importantes agentes sensibilizadores de nociceptores e a PGE₂ é um dos principais mediadores hiperalgésicos. Seus efeitos diretos são mediados por sua ação nos seus receptores (EP₁, EP₂, EP₃ e EP₄) e modulação de canais iônicos nos aferentes primários (Burian e Geisslinger, 2005). O envolvimento de proteínas quinase A (PKA) e C (PKC) têm sido descrito na hiperalgesia induzida pela injeção intraplantar de PGE₂ (Kawabata, 2011). Já os efeitos indiretos decorrem do aumento da sensibilidade a outros agentes, como BK (atuando em receptor B₂) e capsaicina (atuando em receptor vaniloide tipo 1, TRPV1) (Burian e Geisslinger, 2005).

A 5-lipoxigenase é a principal enzima do grupo das lipoxigenases, atuando sobre o AA e produzindo o ácido 5-hidroperoxieicosatetraenóico (5-HPETE), um composto quimiotático para leucócitos, que é convertido em leucotrieno A4 (LTA4). Este pode ser convertido em leucotrieno B4 (LTB4) ou em leucotrienos cisteínicos tais como, os LTC4, LTD4 e LTE4. Os leucotrienos cisteínicos são produzidos principalmente por eosinófilos, mastócitos, basófilos e macrófagos, enquanto que o LTB4 é produzido principalmente por neutrófilos e macrófagos (Haeggstrom e Funk, 2011). O LTB4 contribui para o aumento da permeabilidade vascular, aderência e quimiotaxia de leucócitos. LTC4, LTD4 e LTE4 estão envolvidos na vasodilatação do leito vascular, vasoconstrição coronária e contração do músculo brônquico, sendo por isso muito importantes na fisiopatologia da asma (Ishii e cols., 1994; Bertolini e cols., 2002; Haeggstrom e Funk, 2011).

1.4.2. Eventos vasculares - Permeabilidade vascular e exsudação

Durante o processo inflamatório observa-se uma série de alterações vasculares, tais como: mudanças no calibre das arteríolas, vasodilatação, acarretando maior aporte de sangue no local - fenômeno este mediado por substâncias como histamina, leucotrienos (LTs) e prostaglandinas (PGs) - alterações estruturais nos componentes da microcirculação, acarretando em aumento da permeabilidade vascular, saída de células e moléculas dos vasos sanguíneos para os tecidos, migração de células de defesa e acúmulo no espaço extravascular onde ocorreu a injúria (Omoigui, S., 2007; Aller e cols., 2006).

Com o extravasamento de proteínas para o interstício ocorre ainda o aumento da viscosidade do sangue e a redução do fluxo sanguíneo. Essas alterações hemodinâmicas levam à alteração da orientação das células sanguíneas que antes localizadas na região mais central do vaso, passam agora para sua periferia. Esta alteração, por fim, propicia a

marginação leucocitária permitindo assim o contato dos leucócitos com as células endoteliais (Schmid-Schonbein, 2006).

O aumento da permeabilidade vascular permite o influxo de proteínas, moléculas do sistema complemento e células inflamatórias do compartimento intravascular para o interstício (Schmid-Schonbein, 2006).

A ligação dos mediadores vasoativos (serotonina e histamina), eicosanoides (PGs, LTs), fator de ativação plaquetária (PAF, do inglês *platelet activating fator*), bradicinina e citocinas, em receptores específicos nas células endoteliais, resulta em ativação celular, causando contração da célula endotelial e formação de poros no endotélio. Essa ruptura na barreira endotelial promove o extravasamento do líquido intravascular para o espaço extravascular. Esse processo leva à formação do exsudato inflamatório ou “edema” (Kolaczowska e cols., 2006).

O exsudato caracteriza-se pela elevada concentração de proteínas, células inflamatórias e uma variedade de mediadores. Este líquido contém ainda componentes dos seguintes sistemas: complemento, coagulação, fibrinolítico, e das cininas. O exsudato possui funções importantes no processo inflamatório como, por exemplo, suprimento de nutrientes para as células do sistema imunológico, diluição de toxinas, inativação de toxinas por proteases, e deposição de fibrina a partir do fibrinogênio, auxiliando assim a fagocitose e impedindo o avanço da infecção por patógenos (Kolaczowska e cols., 2006).

1.4.3. Eventos celulares

Assim como a dor, o processo inflamatório também pode ser dividido em padrões agudo e crônico (Weiss, 2002). A fase aguda apresenta duração variável e caracteriza-se pela vasodilatação local e aumento da permeabilidade vascular. Posteriormente a essa etapa ocorre a fase subaguda, caracterizada por infiltração de leucócitos e de células responsáveis por

fagocitar. Por fim, a fase de resolução da inflamação, ou proliferativa crônica, quando acontece a regeneração tecidual e/ou fibrose (Suzuki e cols., 2003; Schmid-Schonbein, 2006). A resposta crônica está associada, histologicamente, à presença de linfócitos e macrófagos, bem como angiogênese, fibrose e necrose tecidual. Esse tipo de processo inflamatório está envolvido em doenças do tipo incapacitantes, como artrite reumatoide, aterosclerose, tuberculose e doenças pulmonares crônicas. Na maioria das vezes, observa-se que a inflamação aguda precede ao estágio crônico característico nestas doenças (Mitchell e Cotran, 2010).

Devido à liberação local de mediadores químicos como o óxido nítrico (NO), cininas, serotonina, histamina, PGs, LTs e substâncias liberadas das terminações nervosas como as taquicininas e CGRP, entre outros, há vasodilatação local a qual ocorre, majoritariamente, na fase aguda do processo inflamatório. (Schmid-Schonbein, 2006).

Entende-se por quimiotaxia o fenômeno de migração de leucócitos e células fagocíticas para o sítio inflamado. Nesse processo ocorre o direcionamento do fluxo de células e recrutamento de leucócitos específicos como, por exemplo, os neutrófilos, leucócitos de morfologia polimorfonuclear (PMN) e que são os primeiros a chegar ao local da inflamação (Kelly e cols., 2007).

Os PMNs, em sua maioria neutrófilos, são as primeiras células a serem recrutadas para o local da inflamação. Juntamente com os macrófagos, são responsáveis pela fagocitose e destruição do agente lesivo (Pettersen e Adler, 2002).

O sistema fagocítico mononuclear pode ser representado por monócitos e macrófagos. Em humanos, os monócitos circulantes no sangue representam cerca de 5 a 10% dos leucócitos totais. É uma população heterogênea devido a grande variação de marcadores de superfície, capacidade fagocítica e potencial de diferenciação. Eles podem se diferenciar em

macrófagos, células dendríticas, osteoclastos, microglia no sistema nervoso central e células de Kupffer no fígado (Seta e Kuwana, 2007).

Na etapa seguinte à quimiotaxia ocorre rolamento, adesão e transmigração dos leucócitos para o sítio inflamado (Figura 6, Barkhausen e cols., 2005). Este processo de recrutamento leucocitário é mediado por moléculas de adesão como as selectinas (P-selectinas, L-selectinas e E-selectinas), importantes no rolamento, integrinas (expressas pelos leucócitos) importantes na adesão e a superfamília das moléculas das imunoglobulinas (Ig) (Meager, 1999; Nourshargh e Marelli-Berg, 2005). A indução, por mediadores inflamatórios, do ligante da L-selectina no endotélio dá início à captura e rolamento dos PMN (Meager, 1999).

A expressão ou liberação das moléculas de adesão são fortemente influenciadas por mediadores inflamatórios como histamina, serotonina, interferon- γ (IFN- γ), fator de crescimento tumoral (TNF- α), interleucina 1 (IL-1 β) e quimiocinas (Meager, 1999).

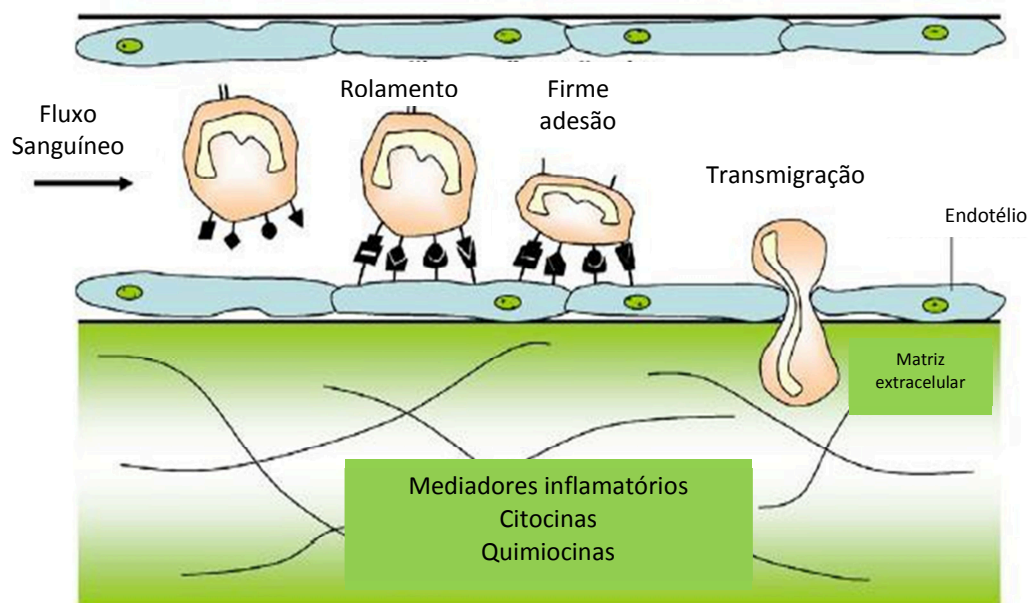


Figura 6: Representação do mecanismo de rolamento, aderência, diapedese e quimiotaxia dos neutrófilos (Adaptado de Barkhausen e cols., 2005).

1.4.4. Envolvimento do Óxido Nítrico (NO) na inflamação

O NO é um mediador com múltiplas funções participando na sinalização de sistemas cardiovasculares, gastrintestinais, geniturinário, respiratório e nervoso (Hanafy e cols., 2001; Ignaro e cols., 2002).

A síntese do NO ocorre a partir da oxidação do nitrogênio guanidina terminal do aminoácido L-arginina, que é então convertido em L-citrulina, reação essa catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) no interior das células (Moncada e cols., 1991).

Alguns tipos de NOS já foram caracterizados; a NOS endotelial (eNOS), encontrada em células endoteliais. O NO produzido por esta enzima tem um papel significativo no controle da pressão arterial, visto que ele é o responsável por diminuir a resistência vascular periférica, diminuindo a pressão arterial; há também a NOS neuronal (nNOS) encontrada em neurônios centrais e periféricos onde o NO participa da neurotransmissão e neuromodulação; e, por fim, a NOS induzida (iNOS) a qual é expressa em diversas células em resposta a estímulos patológicos, como microrganismos invasores ou citocinas. A ativação das enzimas constitutivas (endotelial e neuronal) é regulada pelo complexo cálcio-calmodulina e a produção de NO ocorre em pequenas quantidades e por curtos períodos de tempo. No caso da iNOS, ela é ativada independentemente de cálcio intracelular, sintetiza NO em maiores quantidades e por longo período de tempo, ocorrendo apenas em momentos de estresse para o organismo (Reutov e Sorokina, 1998).

O NO tem várias funções na inflamação e pode ser avaliado quando inibidores seletivos das NOS (como por exemplo, o L-NAME, do inglês *L-NG-nitro-arginine methyl ester*) são testados em modelos de inflamação (Moncada e Higgs, 1995).

Após sua geração, o NO difunde-se pelas membranas e ativa a enzima guanilato ciclase solúvel, a qual promove a formação de guanosina monofosfato cíclica (GMPc). À medida que a concentração de GMPc aumenta, efeitos, tais como relaxamento do músculo

liso vascular e não-vascular, inibição da agregação plaquetária, e da adesão de leucócitos são iniciados (Moncada e Higgs, 1995; Vallance e Leiper, 2002).

1.4.5. Citocinas

As citocinas são mediadores protéicos ou peptídeos produzidos por vários tipos celulares principalmente macrófagos, monócitos e linfócitos ativados. Elas são capazes de modular a função de vários tipos celulares e são determinantes para a infiltração celular e efeitos sistêmicos durante o processo inflamatório agudo e crônico. A secreção das citocinas é estimulada por endotoxinas, complexos imunes, toxinas, lesões físicas e processos inflamatórios. Uma vez liberadas, exercem efeitos autócrinos, parácrinos ou endócrinos se ligando a receptores específicos nas células-alvo (Wong e Fish, 2003, Schmid-Schobein, 2006; Sims e Smith, 2010). A superfamília das citocinas pode ser dividida em: interleucinas (IL), quimiocinas (proteína quimiotática de monócitos-1, MCP-1), interferons (IFN) e fatores de necrose tumoral (TNF), TGF- β (fator de transformação do crescimento), CSF (fator estimulador de colônia) (Sommer e Kress, 2004; Alwani e cols., 2006; Wahl, 1992; Hamilton, 2002).

O TNF- α , uma citocina pró-inflamatória, é produzida e liberada principalmente por macrófagos, é uma das principais citocinas relacionadas ao processo inflamatório (Alwani e cols., 2006). Mesmo em concentrações baixas, o TNF- α induz a expressão de moléculas de adesão e estimula macrófagos e outras células a secretarem quimiocinas. Ele ainda pode regular a produção e liberação de IL-1 β (Sommer e Kress, 2004; Sasakawa e cols., 2005).

A IL-1 β desempenha ações nociceptivas que podem ser mediadas por uma complexa cascata de sinalização e produção secundária de NO, bradicinina e prostaglandinas. A ligação ao seu receptor IL1-RI inicia uma série de eventos intracelulares, ativando fatores transcricionais, induzindo a expressão de COX-2, iNOS, IL-1 β , IL-6 e TNF- α (Sommer e

Kress, 2004; Hori e cols., 1998; Ren e Torres, 2009), acarretando a piora do processo inflamatório.

1.4.6. Finalização do processo inflamatório

Ao final do processo inflamatório, o que se espera é a neutralização dos mediadores químicos - lipídicos liberados e interrupção do extravasamento plasmático, assim como da infiltração leucocitária. Quando ocorre essa interrupção, há redução do edema, e consequentemente, as células ali presentes serão removidas (Rankin, 2004) e o tecido afetado voltará a apresentar equilíbrio.

Quando este sistema funciona de maneira fisiológica, não há persistência da inflamação. No entanto, caso não ocorra a resolução do processo inflamatório o tecido conectivo pode ser substituído por fibrose ou progredir para um processo inflamatório crônico como resultado da permanência do agente (Lawrence e cols., 2002; Stables e Gilroy, 2011).

É devido a este fato que fármacos anti-inflamatórios são utilizados e ainda se buscam alternativas para substituir ou melhorar as terapias já existentes, no intuito de intervir da melhor maneira no processo inflamatório patológico.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

A principal meta deste trabalho é avaliar os potenciais efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório do extrato etanólico e de suas frações provenientes das folhas da *Tibouchina granulosa*, e, possivelmente, associar os efeitos observados aos componentes da planta.

2.2. Objetivos específicos

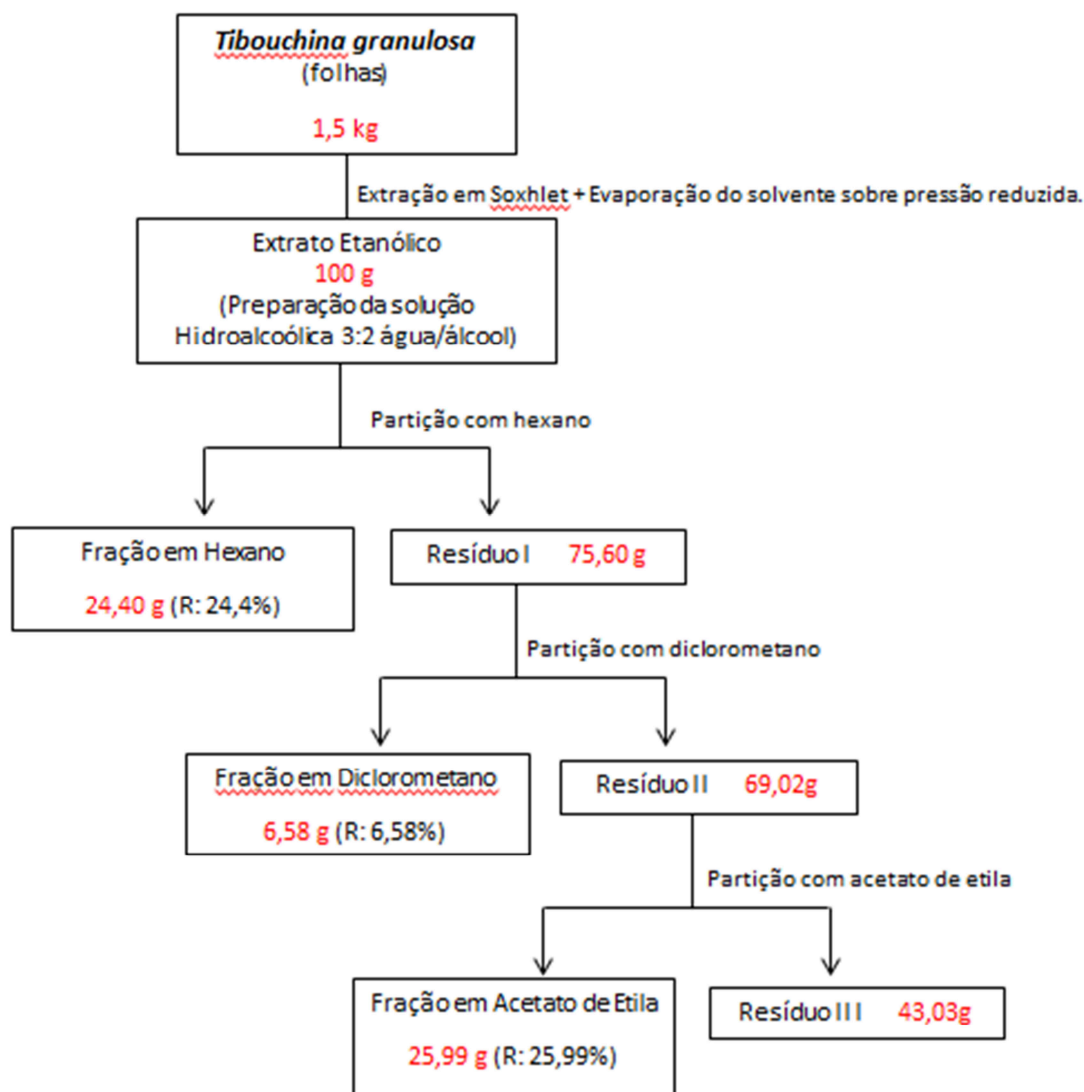
- a) Determinar o perfil fitoquímico das folhas de *Tibouchina granulosa*, através de métodos cromatográficos, como a cromatografia em fase gasosa e a cromatografia líquida de alta eficiência.
- b) Determinar através de ressonância magnética nuclear (RMN) o composto isolado de cromatografia em coluna.
- c) Analisar, anatomicamente, as folhas da *T. granulosa*,
- d) Avaliar a atividade analgésica através dos modelos da placa quente, e da lambadura de pata induzida pela capsaicina ou glutamato,
- e) Avaliar a atividade anti-inflamatória pelos experimentos da lambadura de pata induzida pela formalina, e da bolsa de ar subcutânea (BAS).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Material vegetal

Folhas da quaresmeira foram coletadas na fazenda do Instituto Vital Brazil em Cachoeiras de Macacu - Rio de Janeiro – Brasil, pela responsável Leidilene da Silva, em novembro de 2013. As folhas (1 kg) foram secas em estufa, à 40⁰C e depois trituradas em moinho de facas, modelo A11BS1, fabricante IKA. O produto obtido foi submetido ao processo de extração por *Soxhlet*, durante 72 horas, utilizando álcool etílico absoluto (10 litros) como solvente. Essa solução foi evaporada sobre pressão reduzida, durante 40 horas, fornecendo 150g do extrato etanólico (EE), portanto o rendimento foi de 10%. 100g deste extrato foram divididas em dois béchers contendo 50g do EE cada um, e a cada bécher foi adicionada uma solução hidroalcoólica (proporção de 300 ml de água para 200 ml de álcool), por fim, a extração líquido-líquido (ELL) foi realizada utilizando como solventes, hexano (3 litros), diclorometano (3 litros) e acetato de etila (3 litros), dessa forma foram obtidas as frações em hexano (fH), em diclorometano (fDCM) e em acetato de etila (fAE).

O protocolo de separação está representado no esquema 1.



Esquema 1: Preparação do extrato etanólico e suas frações a partir das folhas da *Tibouchina granulosa*, utilizando os solventes álcool etílico absoluto, hexano, diclorometano e acetato de etila. Observação: resíduo III não testado.

3.2. Reagentes

Foram utilizados formaldeído (Reagen), etanol P.A (Merck AG, Darmstadt, Alemanha), dimetilsulfóxido P.A (DMSO) (Fisher Biotech), éter etílico, tween 20 (Isogar, Rio de Janeiro, Brasil), sulfato de morfina (Cristália, São Paulo, Brasil), fosfato dissódico de dexametasona (Aché, Rio de Janeiro, Brasil), cloridrato de ketamina e cloridrato de xilazina (Ceva Brasil), ácido acetilsalicílico (AAS), ácido L-glutâmico (glutamato), capsaicina,

capsazepina e carragenina, formato de amônio, molibdato de amônio, naftietilenodiamina e sulfanilamida, tampão fosfato-citrato com perborato (TFCP) e pastilhas de tetra-metil-di-hidrocloreto de benzidina (TMB) (Sigma Chemical), soro albumina bovino (BSA) (LGC Biotecnologia), Kit Pierce BCA™ Protein Assay (Thermo Scientific, NY, EUA), Cepa de *Escherichia coli* (ATCC #25922), nitrito de sódio (Isofar, Rio de Janeiro, Brasil), hidróxido de sódio e fosfato monossódico (Reagen), sulfato de zinco (Vetec), imunoplaças F96 Maxisorp (Nunc, Thermo Fisher Scientific, NY, EUA), kits ELISA BD OptEIA™ Set Mouse para TNF- α , IL-1 β , contendo as respectivas citocinas recombinantes de camundongo, anticorpo de captura (anti-camundongo TNF- α , IL-1 β) e anticorpo de detecção anti-camundongo conjugado com peroxidase (BD Biosciences, San Diego, EUA), Sílica gel 60 (70-230 mesh; Merck).

O solvente usado para a extração, álcool etílico absoluto, e os solventes utilizados posteriormente para a elaboração das frações, como hexano, diclorometano e acetato de etila possuíam como fabricante a Tedia. Já os solventes (hexano, diclorometano, acetato de etila, metanol, clorofórmio – Sigma Chemicals) para fase móvel de cromatografia em coluna em sílica gel, cromatografia em camada delgada (CCD) e Cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) foram adquiridos pelo Prof. Dr. Fabio Boylan, da Trinity College Dublin - Irlanda, assim como os solventes deuterados (DMSO e Clorofórmio – todos esses do fabricante Sigma Chemicals) utilizados para a realização da Ressonância Magnética Nuclear (RMNs).

Para a cromatografia em camada delgada, placas de alumínio pré-revestidas com Sílica gel 60 PF254 (230-400 Mesh ASTM - Merck), com 0,25 mm de espessura e medindo 20 x 20 cm foram usadas.

Na realização dos cortes histológicos das folhas da *T. granulosa* foram utilizadas lâminas de barbear, e o suporte empregado para o corte foi isopor. Depois de realizadas as

secções, foi adicionado a uma placa de *petri* hidrato cloral para que as folhas perdessem a sua coloração natural.

3.3. Preparo dos reagentes e soluções

Formalina: preparada na concentração de 2,5% (v/v) em PBS,

AAS: preparado na concentração de 10 mg/ml em Tris-HCl 1M, pH 8,0.

Morfina: preparada na concentração de 10 mg/ml em água destilada.

Carragenina: preparada na concentração de 1% p/v, em PBS estéril.

Dexametasona: estocada na concentração de 4 mg/ml, formulação injetável.

Capsaicina: preparada na concentração de 4 mg/ml em DMSO.

Glutamato: preparado na concentração de 0,17 g/ml, em água deionizada.

Tampão fosfato salina (PBS 10x concentrado)

KH ₂ PO ₄ (anidro)	17,8 g
Na ₂ HPO ₄ (anidro)	76,1 g
NaCl	85 g
H ₂ O ultrapura q.s.p.	1 l

Tampão de Bloqueio

Soro fetal bovino	10 ml
PBS q.s.p.	100 ml

Tampão Diluente

NaHCO ₃	7,13 g
Na ₂ CO ₃	1,59 g
H ₂ O ultrapura q.s.p.	1000 ml

(pH 9,5)

Tampão de Lavagem

Tween 20 0,5 ml

PBS q.s.p. 1000 ml

Substrato para dosagem de citocinas: 1,0 ml de solução de TMB em 9,0ml de solução de tampão fosfato-citrato com perborato, devido à degradação do produto, esta solução só pôde ser preparada trinta minutos antes da utilização.

Reagente BCA: No momento da dosagem, misturam-se os reagentes A e B, na proporção 50:1, obtidos no kit Pierce BCATMProtein Assay (Thermo Scientific, NY, EUA). Para a quantificação de proteínas, incuba-se 5 µl da amostra ou da proteína da curva padrão com 195 µl da mistura dos reagentes A e B a 37⁰C, por 30 minutos.

Reagente de Griess

Reagente A:

Sulfanilamida 1 g

H₂O ultrapura q.s.p. 100 ml

Reagente B:

Dicloreto de naftiletileno diamina 0,1 g

H₃PO₄ (a 10%) q.s.p. 100 ml

No momento da dosagem, misturam-se partes iguais dos reagentes A e B. Para a quantificação do nitrito, incubam-se volumes iguais da amostra ou da solução para curva padrão e do reagente de Griess pronto.

Anestésicos:

Cloridrato de Ketamina 4,5 ml

Cloridrato de xilazina 1,5 ml

Salina q.s.p. 40 ml

Finalizadas as evaporações do extrato e suas frações, uma solução estoque de 100 mg do extrato e frações formados foram solubilizadas em 1 ml de DMSO e estocadas em freezer à -20°C. O EE, assim como as frações em hexano, em diclorometano e em acetato de etila foram administradas, por via oral, nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg em volume final de 0,1 ml de veículo (água destilada). Em todos os experimentos a concentração final de DMSO não excedeu a 0,5% de modo a não produzir qualquer efeito tóxico nos animais.

Para os controles positivos foram utilizadas as seguintes doses e vias de administração:

- AAS: 200 mg/kg, via oral;
- Morfina: 2,5 mg/kg, via intraperitoneal;
- Dexametasona: 0,5 mg/kg, via intraperitoneal;

Para os agentes químicos tais como, formalina (2,5 % v/v), capsaicina (1,6 µg/pata) e glutamato (3382,2 µg/pata), cada animal recebeu 20 µl/pata de cada uma dessas substâncias. No experimento da bolsa de ar subcutânea, a carragenina 1% foi injetada na cavidade em um volume de 1ml.

No caso dos anestésicos cada animal recebeu uma dose de 112 mg/kg de cloridrato de ketamina e 7,5 mg/kg de cloridrato de xilazina.

3.4. Animais

Camundongos fêmeas Swiss Webster, pesando de 20 a 25 gramas, foram doadas ao nosso laboratório pelo Instituto Vital Brazil. Os animais foram mantidos no biotério do Programa de Pós-graduação em Farmacologia e Química Medicinal, em estante microisolada, com condições ótimas de temperatura, iluminação e umidade ($22 \pm 2^\circ\text{C}$, ciclos de 12h claro/escuro e de 60 a 80% de umidade), com livre acesso a comida e água, no entanto a comida foi retirada três horas antes de cada experimento, a fim de se evitar qualquer interação do alimento com as substâncias testadas.

Para aclimatização dos animais, os mesmos foram deixados no ambiente do laboratório por no mínimo uma hora antes de cada experimento. Os modelos animais seguiram os princípios e regras adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animais (COBEA), aprovados pelo Centro de Ciências da Saúde/Instituto de Ciências Biomédicas - UFRJ, pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal, e recebeu o número DFBCICB015-04/16.

3.5. Estudos Fitoquímicos com *Tibouchina granulosa*

3.5.1. Cromatografia em coluna com emprego de sílica gel

As frações obtidas nas extrações líquido-líquido foram adicionadas às colunas cromatográficas com emprego de sílica gel.

Para a fração em hexano (20,34 g) foi utilizada uma coluna de 35 cm de altura e 7 cm de diâmetro, e as fases móveis seguiram da seguinte maneira: 1) hexano, 2) hexano/acetato de etila 5%, 3) hexano/acetato de etila 10%, 4) hexano/acetato de etila 20%, 5) hexano/acetato de etila 30%, 6) hexano/acetato de etila 50%, 7) hexano/acetato de etila 75%, 8) acetato de etila 100%, 9) acetato de etila/metanol 5%, 10) acetato de etila/metanol 10%, 11) acetato de etila/metanol 20%, 12) acetato de etila/metanol 30%, 13) acetato de etila/metanol 50%, 14) acetato de etila/metanol 75%, 15) metanol 100%.

A segunda fração a ser eluída no sistema cromatográfico em questão foi a em acetato de etila (13,08 g). A coluna utilizada tinha 26 cm de altura e 3 cm de diâmetro. O sistema de eluentes seguiu-se da seguinte maneira: 1) diclorometano, 2) diclorometano/acetato de etila 10%, 3) diclorometano/acetato de etila 25%, 4) diclorometano/acetato de etila 50%, 5) diclorometano/acetato de etila 75%, 6) acetato de etila 100%, 7) acetato de etila/metanol 10%, 8) acetato de etila/metanol 20%, 9) acetato de etila/metanol 30%, 10) acetato de etila/metanol 50%, 11) acetato de etila/metanol 75%, 12) metanol 100%.

A última fração que passou pelo sistema cromatográfico foi a em diclorometano (2,5 g) e a coluna utilizada media 25 cm de altura e 2 cm de diâmetro. O sistema de solventes utilizado seguiu o mesmo padrão da fração em hexano já previamente descrita.

3.5.2. Placas de Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Essa técnica foi utilizada para realizar a separação dos componentes de cada uma das frações, isto é, para todos os frascos recolhidos na cromatografia em coluna em sílica, foi realizada uma placa de CCD.

A fração em hexano (20,34 g) foi adicionada a coluna cromatográfica (35 cm) preenchida com sílica gel (150g, 70-230 Mesh, Merck) e então foi eluída com gradientes de hexano : acetato de etila : metanol, desta fração foram recolhidos 339 frascos nos quais foram realizados a CCD.

A segunda fração a ser eluída na coluna cromatográfica (26 cm), preenchida com sílica gel (70g, 70-230 Mesh, Merck), foi a em acetato de etila (13,08 g), os gradientes usados foram diclorometano : acetato de etila : metanol e, desta fração foram eluídos 170 frascos os quais foram analisados posteriormente por CCD.

Por fim, a fração em diclorometano (2,5 g) foi eluída numa coluna de 25 cm e preenchida com sílica gel (67g, 70-230 Mesh, Merck), os gradientes de solvente utilizados obedeceram a mesma já descrita para a fração em hexano, e, da fração em diclorometano foram coletados 146 frascos, os quais foram posteriormente analisados por CCD.

3.5.3. Análise das amostras por Ressonância Magnética Nuclear

A técnica espectroscópica de Ressonância Magnética Nuclear, ou RMN, é utilizada na pesquisa para determinação do conteúdo e pureza de amostras, bem como a sua estrutura

molecular. Os núcleos dos átomos estão envolvidos no processo de absorção, os núcleos mais utilizados na espectroscopia de RMN são os núcleos de Hidrogênio (^1H) e carbono (^{13}C).

Após a realização das colunas cromatográficas, cada *vial* obtido, após evaporação do solvente, foi analisado a fim de se encontrar cristais que pudessem caracterizar alto grau de pureza da substância que fora isolada.

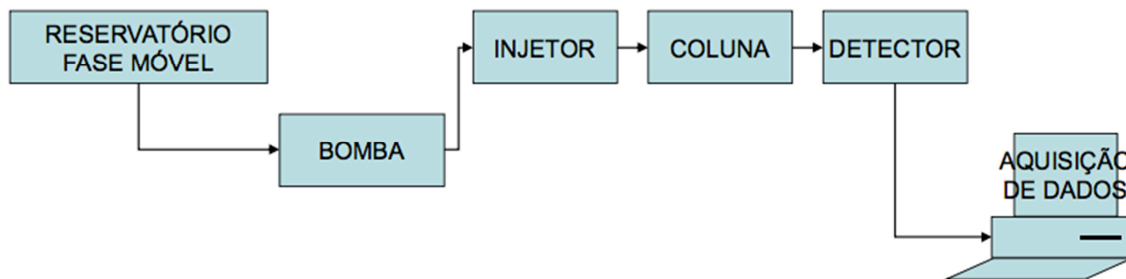
Ao material que aparentava pureza adicionaram-se diversos solventes a fim de determinar em qual havia melhor solubilidade, dependendo deste teste, adicionava-se DMSO ou Clorofórmio deuterados, dependendo da solubilidade da substância isolada, e seguia-se para a análise em aparelho de RMN.

O equipamento disponível para análise por ressonância magnética nuclear era o BRUKER TOPSPIN 2.1 NMR – ^1H RMN (400 and 600 MHz) e ^{13}C RMN (100 e 150 MHz).

3.5.4 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Para a realização de uma curva de calibração foi utilizado o método CLAE, que pode ser resumido em algumas etapas:

- 1) A amostra é dissolvida em um solvente (Metanol para CLAE) e aplicada na coluna cromatográfica preenchida com a fase estacionária (FE),
- 2) Um solvente, usado como fase móvel, é bombeado com vazão constante e desloca os componentes da mistura através da coluna. Esses se distribuem entre as duas fases de acordo com suas afinidades,
- 3) As substâncias com maior afinidade com a FE movem-se mais lentamente. Já as substâncias com pouca afinidade com a FE movem-se mais rapidamente,
- 4) Ao sair da coluna, os componentes passam por um detector que emite um sinal elétrico o qual é registrado, constituindo um cromatograma. Abaixo o sistema ilustrativo (esquema 2).



Esquema 2: Ilustração do CLAE (Argenton, A. 2010).

A curva de calibração foi realizada em sete concentrações (25, 50, 100, 150, 200, 250 e 300 µg/ml).

Os eluentes usados para a realização da curva e, posteriormente, para a corrida da fração em acetato de etila foram ácido acético glacial (0,5%, v/v, solvente A) e metanol (solvente B), seguindo os seguintes gradientes lineares: 38-42% de B de 0,0 até 14,0 minutos; 42-45% de B de 14,0 até 17,0 minutos; 45-48% de B de 17,0-17,1 minutos; 48%-50% de B de 17,1-32,0 minutos; 50-85% de B de 32,0-40,0 minutos.

Antes da injeção de cada uma das amostras (10µl), seguiu-se um período de equilíbrio de 10 minutos. Todas as amostras foram lidas em 342 nm (equipamento Waters Breeze 2 HPLC System) e a coluna utilizada foi uma coluna de fase reversa C18 (250 x 4.6 mm, 5µm) da Thermo Scientific.

3.5.5. Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM)

O método Cromatografia Gasosa - Espectrometria de Massa (CG-EM) combina as características da cromatografia gasosa e da espectrometria de massa para identificar diferentes substâncias em uma amostra. O CG-EM é amplamente aceito como referência na identificação química de compostos orgânicos voláteis e semi-voláteis em misturas, detecção de drogas, análise ambiental, investigação de explosivos e identificação de amostras desconhecidas.

O equipamento usado foi o CG Agilent, modelo 6890; EM Agilent quadrupolo, 5973 no modo scan 50-800 Da. O volume de injeção para a cromatografia gasosa foi de 1 µl e o injetor aquecido à 330 °C, no modo sem divisão de fluxo (splitless; tempo de fechamento de válvula igual a 0,3 min) com pulso de pressão de 10 psi nos primeiros 0,5 min. A coluna capilar usada foi a DB-17HT (50 % fenil, 5 m x 0,25 mm d.i. x 0,15 µm); programação de temperatura do forno: 60 °C (0,25 min) // 12 °C/min // 365 °C (5min).

Para a espectrometria de massas, o detector foi aquecido a 380 °C e o gás carreador usado foi o hélio (He) sob fluxo constante de 3 ml/min.

3.5.6. Anatomia Vegetal

As amostras secas – folhas da *T. granulosa* - foram completamente reidratadas, isto é, as folhas secas foram colocadas em banho maria até que a água fervesse e então estas foram retiradas e, cuidadosamente, dispostas em suporte de isopor no intuito de cortar as secções transversais das folhas de maneira manual, para que estas fossem observadas em microscópio de luz.

As secções foram clarificadas com hidrato cloral, depois lavadas com água destilada e coradas com: 1) Iodo ou 2) Cloreto férrico, ou nenhuma coloração.

As Fotomicrografias foram obtidas com uma câmera digital (Olympus DP25) em microscópio de luz Olympus BX41.

3.6 Estudos farmacológicos da *Tibouchina granulosa*

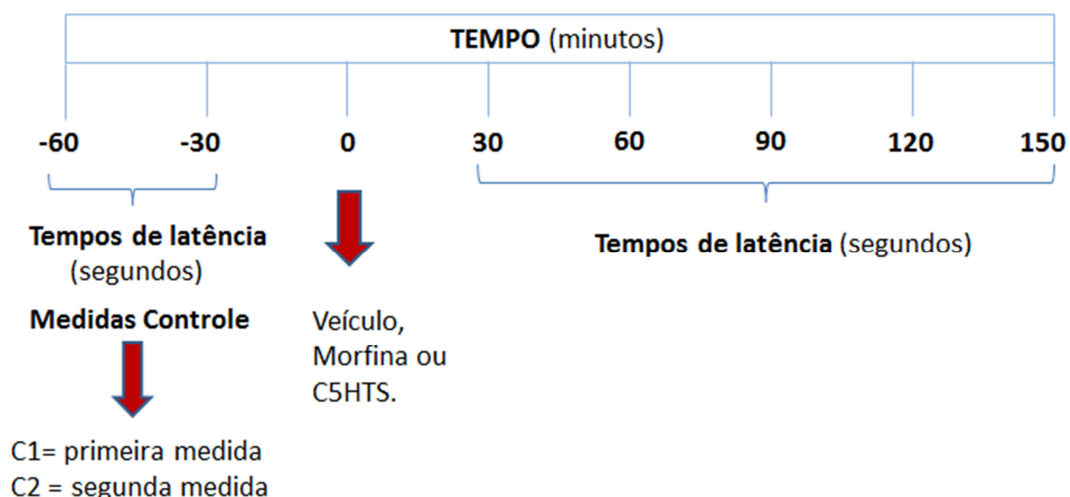
3.6.1. Modelo da placa quente

O experimento seguiu de acordo com os métodos descritos por Sahley e Berntson (1979), com adaptações descritas por Matheus e colaboradores (2005). Este modelo consiste em colocar o animal em uma placa aquecida à $55^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ e calcular o seu tempo de latência, o

qual é entendido como o tempo em que o animal demora para apresentar uma reação, que pode ser o ato de retirar as patas ou saltar da superfície aquecida, caracterizando o momento de tira-lo, este momento é consequência da ativação do córtex somatossensorial através de um estímulo térmico (Sahley and Berntson, 1979).

Duas medidas controles, sessenta minutos e trinta minutos antes do tratamento com as substâncias, foram realizadas. A média dessas medidas foi denominada como linha de base. Trinta minutos após a administração do veículo (água destilada), da morfina, do extrato ou das frações foram feitas sucessivas medidas com intervalos de 30 minutos entre cada uma delas. Em todos os tempos citados foi medido o tempo de latência para cada animal e depois calculada uma média para cada um dos grupos. Para evitar danos teciduais às patas, foi estabelecido um tempo máximo de exposição das patas do animal à placa aquecida de três vezes o valor da linha de base e denominado tempo de corte (ou “*cut-off*”).

Os resultados foram expressos como percentual de aumento em relação à linha de base (= tempo de latência x 100/linha de base - 100) ou área sob a curva (ASC). O protocolo está resumido no esquema 3.

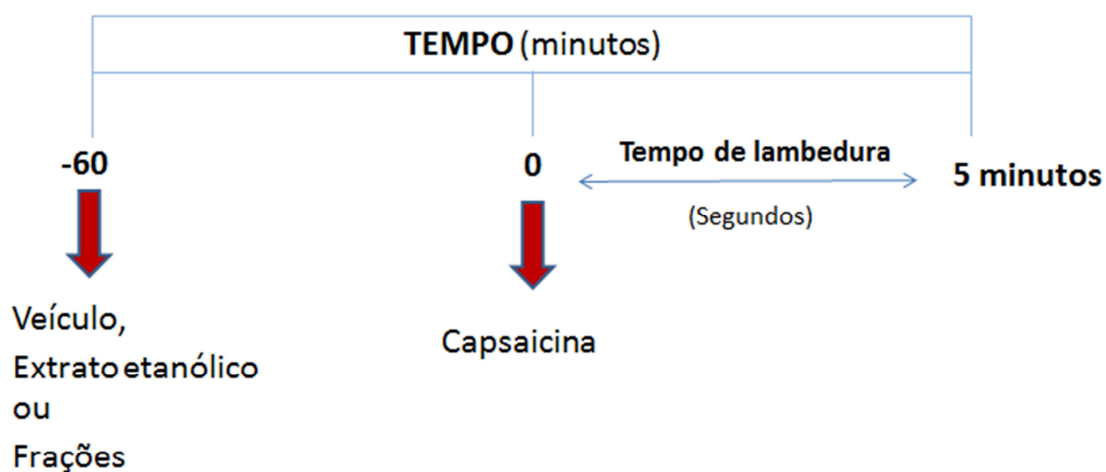


Esquema 3: Protocolo do modelo da placa quente.

3.6.2. Modelo da lambedura de pata induzida pela capsaicina

Com o objetivo de investigar o mecanismo de ação antinociceptivo do extrato e suas frações em outro modelo de nocicepção, utilizamos o modelo da lambedura de pata induzida pela capsaicina, esse modelo permite avaliar o envolvimento de receptores vanilóides (TRPV) na nocicepção (Jancso, 1978; Sakurada e cols., 1992; Marcon e cols, 2009).

Os animais foram pré-tratados por via oral com veículo (água destilada), EE ou frações uma hora antes da administração da capsaicina. Após a injeção na pata posterior direita de 20 µl de capsaicina (1,6 µg/pata), foi registrado durante 5 minutos o tempo que o animal permaneceu lambendo a pata, caracterizando a sua nocicepção. O protocolo experimental está resumido no esquema 4.

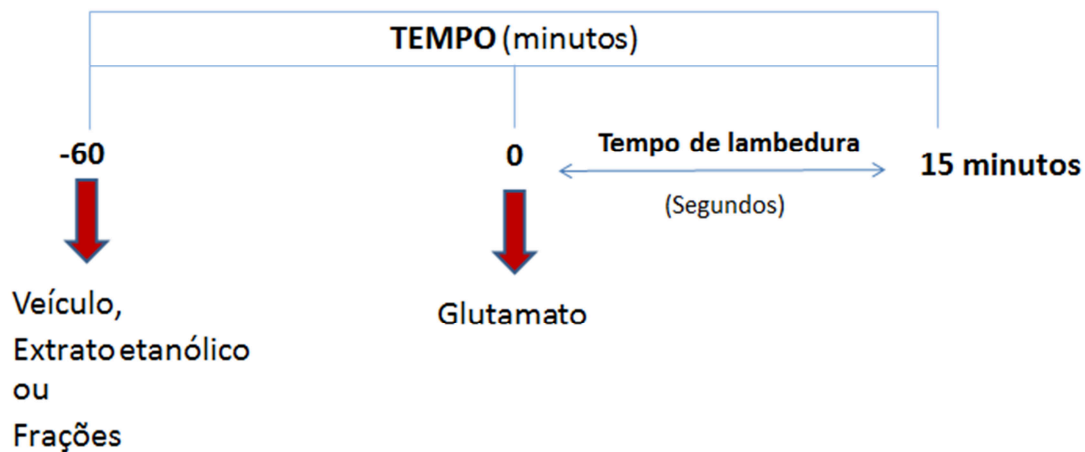


Esquema 4: Protocolo da nocicepção induzida por capsaicina.

3.6.3. Modelo da lambedura de pata induzida por glutamato

Para avaliar o possível envolvimento dos receptores glutamatérgicos no efeito antinociceptivo do extrato e suas frações, o glutamato, um neurotransmissor excitatório, foi administrado por via intraplantar e o tempo de lambedura da pata foi considerado como indicativo de dor neurogênica (Beirith e cols, 2002; Marcon e cols, 2009).

Os animais foram pré-tratados por via oral com veículo, EE ou suas frações, sessenta minutos antes da injeção na pata posterior direita de 20 µl glutamato (3382,2 µg/pata). Após a injeção foi registrado durante 15 minutos o tempo que o animal permaneceu lambendo a pata. O protocolo experimental está resumido no esquema 5.



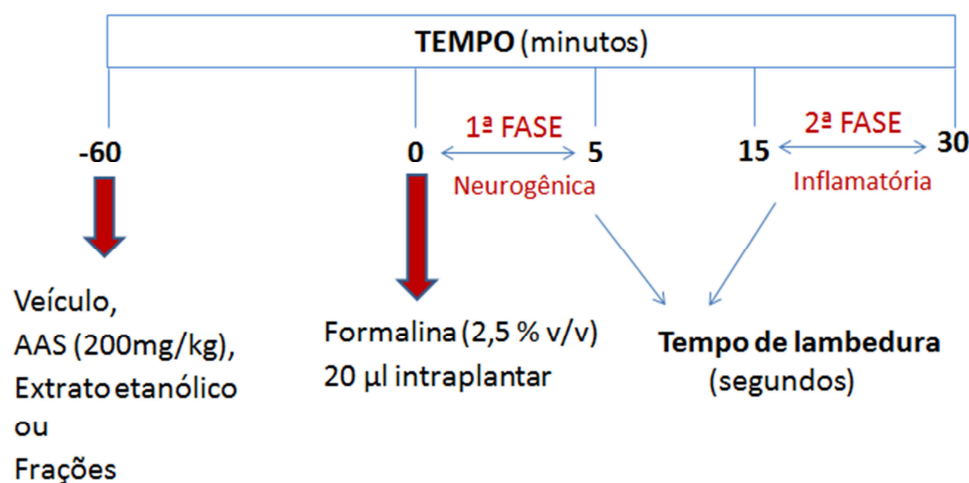
Esquema 5: Protocolo da nocicepção induzida por glutamato.

3.6.4. Modelo da lambedura de pata induzida pela formalina

O modelo da formalina foi usado para avaliar dois diferentes tipos de nocicepção. A injeção intraplantar produz uma resposta bifásica que consiste de uma fase inicial que ocorre nos primeiros 5 minutos após a injeção da formalina, chamada de 1ª fase ou fase de dor neurogênica, nesta fase, ocorre a ativação dos nociceptores locais, mediada pela serotonina e histamina que são liberadas em resposta ao estímulo neurogênico. E também uma segunda fase tardia que ocorre entre 15 e 30 minutos após a injeção intraplantar, denominada 2ª fase ou fase de dor inflamatória, que conta com envolvimento de mediadores como as prostaglandinas e produção de citocinas (Hunskar e cols., 1987; Gomes e cols., 2007).

Neste modelo uma injeção de 20 µl de formalina 2,5% foi administrada por via intraplantar na pata direita traseira do camundongo e a resposta comportamental dolorosa foi mensurada através do tempo que o animal permaneceu lambendo a pata.

Os animais foram tratados com o veículo (água destilada), AAS, extrato etanólico, ou suas frações em hexano, diclorometano e acetato de etila, 60 minutos antes da injeção intraplantar de da formalina. O protocolo experimental está resumido no esquema 6.



Esquema 6: Protocolo modelo da lambedura de pata induzida por formalina.

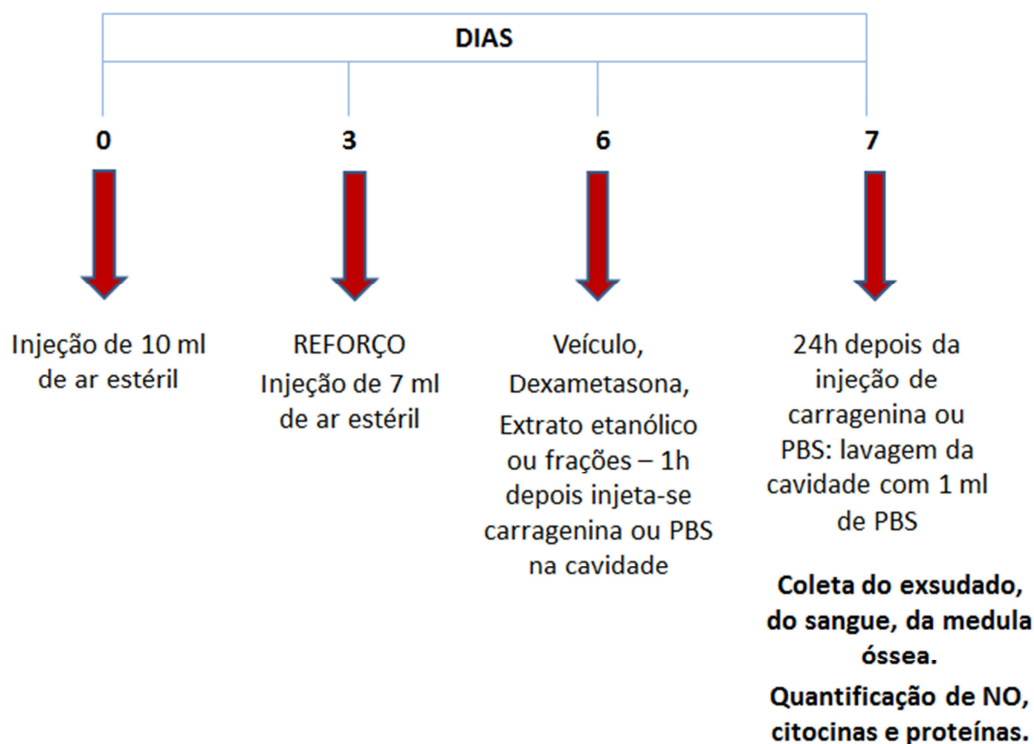
3.6.5. Modelo da migração celular induzida por carragenina (Bolsa de ar subcutânea)

O modelo da bolsa de ar subcutânea (Romano e cols., 1997; Raymundo e cols., 2011), o qual avalia migração de células para um local inflamado, foi realizado para avaliar o efeito do extrato etanólico e suas frações no processo de inflamação aguda.

Como observado no protocolo do experimento uma bolsa de ar subcutânea (BAS) foi formada no dorso dos camundongos após a injeção de 10 ml de ar estéril. Após três dias da primeira injeção de ar uma nova injeção de 7 ml de ar estéril foi feita para a manutenção da cavidade. No 6º dia os animais foram pré-tratados, por via oral, com veículo, dexametasona, EE ou frações e após sessenta minutos desse tratamento, receberam injeção de 1 ml de carragenina 1%. Foram separados três grupos de animais considerados como controles, o controle negativo composto por animais tratados somente com o veículo sessenta minutos antes da injeção de carragenina, o controle positivo composto por animais tratados i.p. com dexametasona (0,5 mg/kg), também sessenta minutos antes da injeção de carragenina e, por

fim, um grupo considerado apenas como “controle da qualidade dos animais” composto por animais tratados com o veículo e que receberam injeção de 1 ml de PBS estéril na BAS. No 7º dia os animais foram eutanasiados e a cavidade foi lavada com 1 ml de PBS para a coleta do exsudato inflamatório, e também retirou-se o sangue e a medula óssea dos animais. Imediatamente após a coleta, a contagem total e diferencial dos leucócitos presentes no exsudato foi determinada em contador automático de células (pocH-100iV Diff, Sysmex), assim como as células do sangue e da medula óssea. O exsudato foi centrifugado a 11.000 rpm por 10 minutos, a 4^oC. O sobrenadante foi aliquoteado e armazenado a -20^oC para posteriores quantificações de óxido nítrico (NO), de proteína e de citocinas.

No caso da contagem diferencial do sangue, realizada com o intuito de definir se a dose mais alta do extrato e suas frações poderia causar algum efeito tóxico ao sangue dos animais, 100µl de sangue foram coletados do olho de cada animal e colocados em um ependorfe contendo 15µl de EDTA e imediatamente foi feita a contagem das células no aparelho. Para contagem diferencial da medula, realizada para que se investigasse algum possível efeito mielotóxico do extrato e suas frações, o fêmur do camundongo foi retirado e lavado com 1 ml de PBS estéril, as células também foram contadas no contador automático de células. O protocolo está representado no esquema 7.



Esquema 7: Protocolo bolsa de ar subcutânea.

3.6.6. Quantificação de citocinas e proteínas

Os sobrenadantes recolhidos do exsudado da BAS foram usados para a quantificação de TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , NO e proteína. As citocinas foram quantificadas pelo método de ELISA, usando o protocolo sugerido pelo fabricante (B&D), que resumidamente, consiste em recobrir imunoplaacas de 96 poços, e incubadar por 18h a 4°C, com anticorpos de captura anti-TNF- α ou anti-IL-1 β ou anti-IL-10 ou anti- IFN- γ , e diluídos no tampão diluente. Após o período de incubação as placas foram lavadas com tampão de lavagem e bloqueadas por 1 hora, em temperatura ambiente, com tampão de bloqueio. Em seguida, foram novamente lavadas com tampão de lavagem e, 50 μ l das amostras ou o padrão específico de citocina recombinante, foram adicionados aos poços. As placas foram incubadas durante a noite a 4°C e posteriormente foram lavadas com tampão de lavagem e incubadas por 1 hora, em temperatura ambiente, com anticorpo de detecção conjugado com a enzima. Após a lavagem das placas, a adição da solução de substrato e a incubação por 30 minutos ao abrigo da luz,

foi adicionado H₃PO₄ 1N (25 µl/poço) como solução de parada. A absorbância foi medida a 450 nm utilizando-se um leitor de microplaca (FlexStation 3, Molecular Devices) e as concentrações das citocinas foram calculadas através da curva padrão de citocinas e expressas em µg/ml.

As proteínas foram quantificadas através do método BCA (BCATM Protein Assay Kit, Pierce), e para a dosagem, foram misturados os reagentes A (carbonato de sódio, bicarbonato de sódio, ácido bicinônico e tartarato de sódio em 0,1 M de hidróxido de sódio) e B (sulfato de cobre 4%), na proporção 50:1. Em seguida, foram incubados 5 µl da amostra e 195 µl da mistura dos reagentes A e B à 37°C, por 30 minutos. A absorbância foi medida em leitor de microplaca (FlexStation 3, Molecular Devices) a 562 nm. A concentração de proteínas foi expressa em µg/mL calculada usando uma curva padrão de albumina sérica bovina.

3.6.7. Quantificação de nitrato

Para avaliar a produção de NO, a concentração de nitrato (metabólito estável do NO) foi mensurada seguindo os parâmetros observados em Xu e colaboradores (2000), acrescentado de modificações (Raymundo e cols., 2011).

Resumidamente, a técnica consiste em desproteinizar o sobrenadante do exsudato, em seguida, misturar à amostra, fosfato de sódio (0,5 M; pH 7,2), formato de amônio (2,4 M; pH 7,2) e *E. coli*. Após incubação por 2 horas a 37°C, centrifuga-se a 10.000 rotações por minuto (r.p.m.) por 10 minutos. Ao final, mistura-se 100 µl do sobrenadante com igual volume do reagente de Griess (1% sulfanilamida em água e 0,1% naftiletlenodiamina em 10% H₃PO₄), por 10 minutos (Green e cols., 1982). A absorbância foi medida em 540 nm e a concentração de nitrato foi calculada usando como comparação uma curva padrão de nitrato de sódio.

3.6.8. Análise estatística

Todos os experimentos foram compostos por grupos de 6 – 10 animais. Os resultados são apresentados como média \pm desvio padrão (d.p.). A área sob a curva (ASC), parâmetro utilizado em farmacologia para definir o efeito das substâncias a serem avaliadas, foi calculada pelo programa Prisma Software 5.0. A significância estatística entre os grupos foi determinada por análise de variância (ANOVA) seguida por teste de Newman-Kels, utilizando o programa *GraphPad Prism 5.0*. Os valores foram considerados significativos quando p foi menor do que 0,05 ($p < 0,05$).

4. Resultados

4.1. Resultados em fitoquímica

4.1.1. Isolamento do flavonoide hispidulina por cromatografia em coluna (CC)

A escolha de um bom sistema de solventes é, talvez, o passo mais importante para a realização das cromatografias em coluna. A cromatografia em coluna com sílica gel foi realizada com todos os extratos obtidos neste trabalho. No entanto, de uma forma mais sucinta, descreveremos somente os resultados da coluna cromatográfica realizada para a fração em acetato de etila.

A fase móvel usada para a realização da cromatografia em coluna da fração em acetato de etila continha os seguintes solventes em gradiente crescente de polaridade: diclorometano, acetato de etila e metanol. As frações obtidas foram cromatografadas em camada fina (Cromatografia em camada delgada – CCD) e posteriormente reunidas de acordo com as suas similaridades cromatográficas.

Na figura 7 pode-se observar o perfil cromatográfico das frações 114 a 128 que eluíram da coluna cromatográfica com a fase móvel composta de acetato de etila : metanol em duas proporções de 8:2 de metanol e 7:3 de metanol. Após a junção dessas frações foi possível isolar uma substância pura cristalina amarela chamada aqui de composto X (20 mg, rendimento de 0,15%).

Uma observação importante quanto à análise das CCDs são os “rastros” deixados pelo composto X. Esses rastros caracterizam a presença de glicosídeos, que quando eluído nos solventes descritos sobre a sílica como fase estacionária, deixam uma “cauda” ou “rastro” na placa de sílica. Além disso, a coloração fortemente amarelada após revelação da placa com ácido sulfúrico indica a possibilidade do composto X ser um flavonoide, possibilidade esta comprovada nos experimentos descritos a seguir.

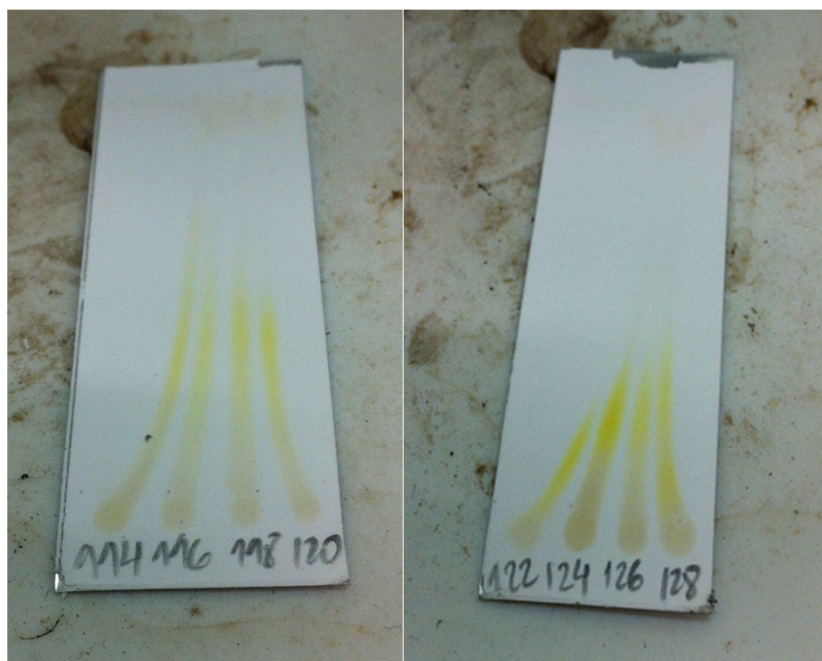


Figura 7: Placas de CCD das frações 114 a 120 e 122 a 128. Fase móvel utilizada para a realização das CCDs (114 – 128): AcOEt 90%/MeOH 10%. Fase móvel na coluna cromatográfica: AcOEt 80%/MeOH 20% (114-120) e AcOEt 70%/MeOH 30% (122 – 128).

4.1.2. Elucidação estrutural do composto X por Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Após a separação por cromatografia em coluna, como descrito no item anterior, o composto X (ainda não identificado), foi encaminhado para análise por ressonância magnética nuclear utilizando como solvente DMSO deuterado (DMSO-d₆). Foram realizadas as análises de RMN de Hidrogênio (¹H) e Carbono (¹³C) Após análise dos espectros a estrutura de um flavonoide foi sugerida, como sendo a Hispidulina 7-O- β-D-glicosídeo, representada na Figura 8.

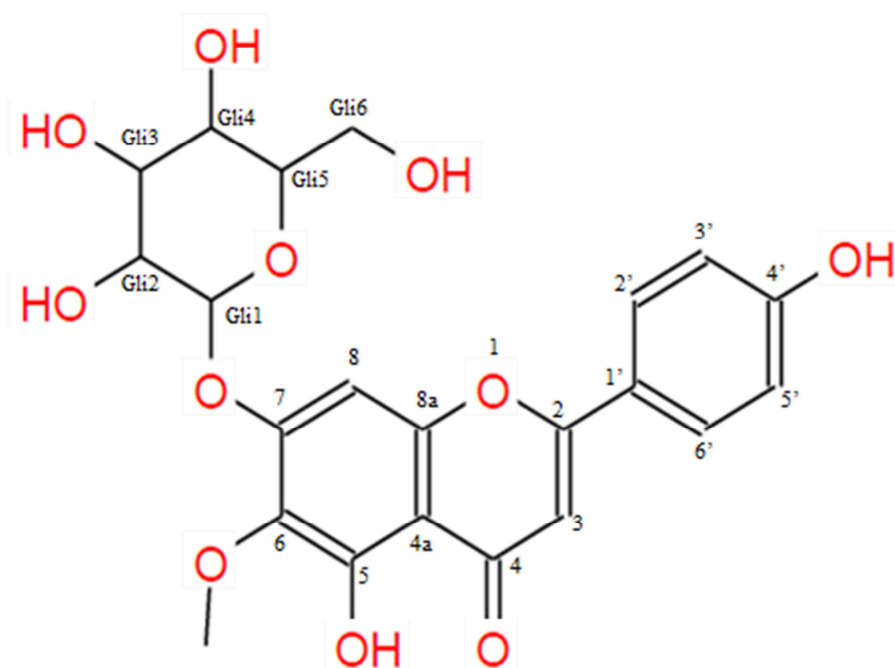


Figura 8: Composto X ou ‘Hispidulina 7-O-β-D-glicosídeo’

O RMN de ^1H (Figura 9) mostra sinais importantes da unidade hispidulina, como a presença de dois dubletos em $\delta 7.97$ ($J=8\text{Hz}$) $\delta 6.95$ ($J=8\text{Hz}$), assinalados aos prótons $2'/6'$ e $3'/5'$ no anel B do esqueleto flavonoidico, respectivamente. Dois singletos aparecem em campo baixo no espectro de RMN ^1H dessa substância, um em $\delta 12.97$ e outro em $\delta 10.42$. Esses sinais são referentes aos hidrogênios de hidroxilas fenólicas livres de flavonoides e indicam que apenas duas estão presentes nesse caso. Dois outros singletos são aparentes no espectro de RMN de ^1H dessa molécula, um em $\delta 7.03$ e outro em $\delta 6.88$, sendo atribuídos a posição 8 do anel A e posição 3 do anel C, respectivamente. As expansões apresentadas nas Figuras 10 e 11 ilustram melhor a distribuição desses sinais, além de nos deixar visualizar que se trata de uma molécula glicosídica.

Acquisition Time (sec)	1.9923	Comment	5 mm PABBO BB-1H/D Z-GRD Z104450/0144	Date	30 Jun 2014 15:28:16
Date Stamp	30 Jun 2014 15:28:16	File Name	C:\Users\roperod\Desktop\Carol\boylan030.1\fid	Frequency (MHz)	400.23
Nucleus	1H	Number of Transients	16	Origin	spect
Points Count	16384	Pulse Sequence	zg30	Original Points Count	16384
Spectrum Offset (Hz)	2471.5852	Spectrum Type	STANDARD	Receiver Gain	161.00
				SW(cyclical) (Hz)	8223.68
				Sweep Width (Hz)	8223.18
				Temperature (degree C)	25.160
				Solvent	DMSO-d6

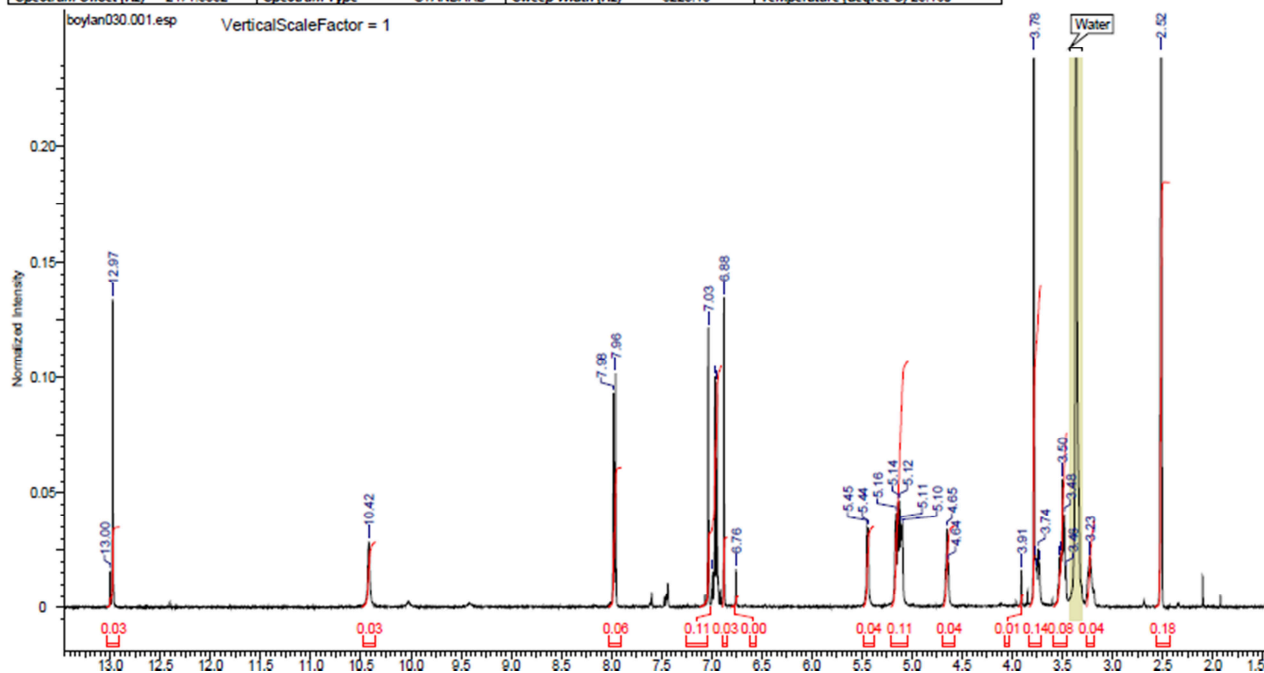


Figura 9: Espectro de RMN de ^1H do composto X.

Acquisition Time (sec)	1.9923	Comment	5 mm PABBO BB-1H/D Z-GRD Z104450/0144	Date	30 Jun 2014 15:28:16
Date Stamp	30 Jun 2014 15:28:16	File Name	C:\Users\roperod\Desktop\Carol\boylan030.1\fid	Frequency (MHz)	400.23
Nucleus	1H	Number of Transients	16	Origin	spect
Points Count	16384	Pulse Sequence	zg30	Original Points Count	16384
Spectrum Offset (Hz)	2471.5852	Spectrum Type	STANDARD	Receiver Gain	161.00
				SW(cyclical) (Hz)	8223.68
				Sweep Width (Hz)	8223.18
				Temperature (degree C)	25.160
				Solvent	DMSO-d6

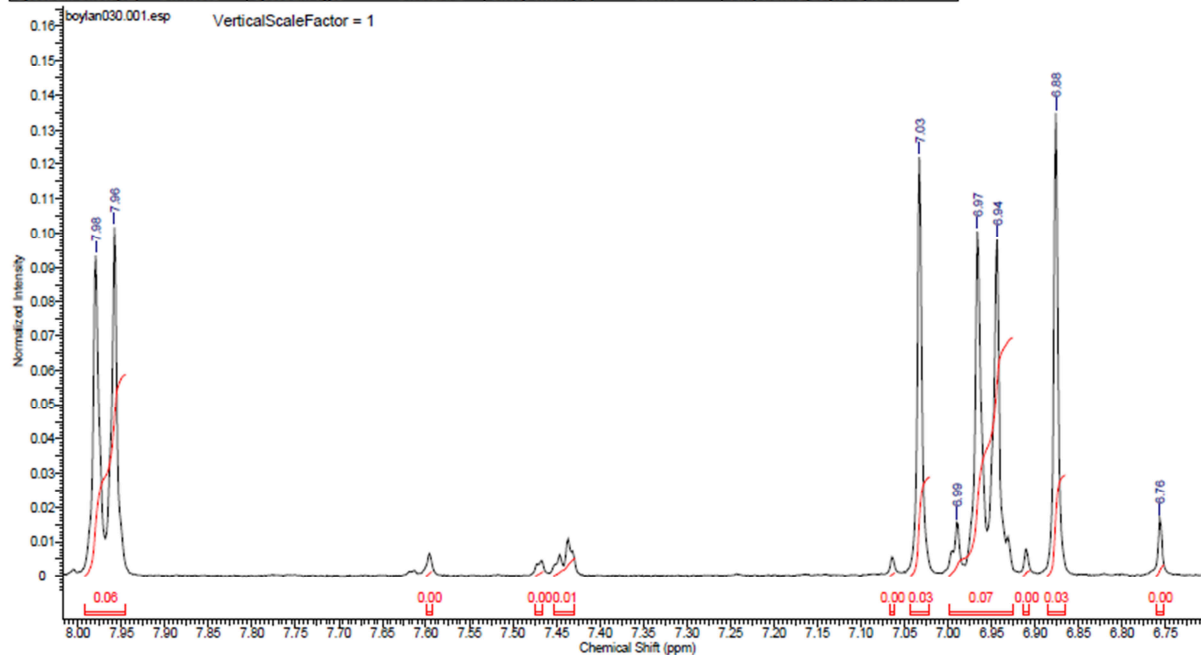


Figura 10: Expansão do espectro de RMN de ^1H do composto X (86.7 a 88.0).

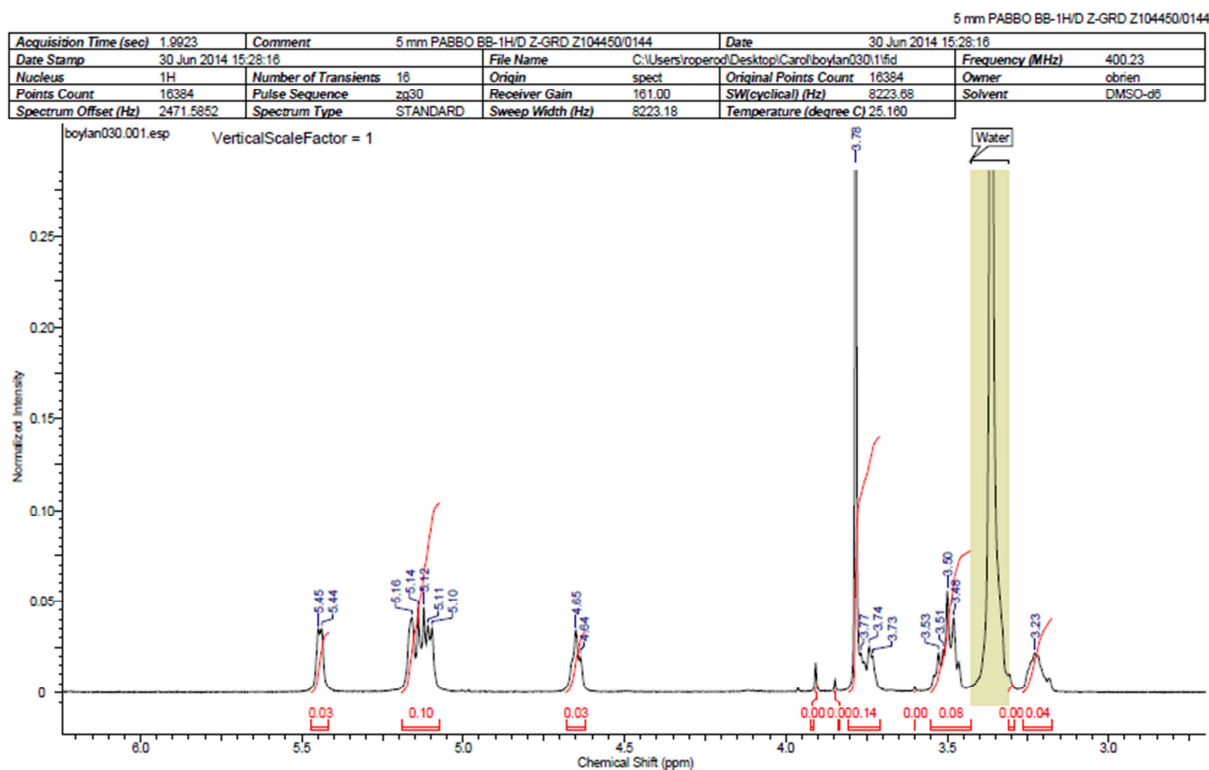


Figura 11: Expansão do espectro de RMN de ¹H do composto X (δ 2.5 a δ 6.5).

O espectro de RMN de ¹³C (Figura 12) mostra de fato 15 carbonos referentes a uma aglicona flavonoidica mais 6 carbonos referentes a uma porção glicosídica. O sinal em campo mais baixo no espectro de RMN de ¹³C, δ 182.2 é referente ao carbono da carbonila na posição 4 do flavonoide, este sinal não está apresentado no espectro por ter sido cortado durante a análise da amostra. Outros sinais importantes são os sinais de carbono ligados a hidroxilas (livres ou protegidas) dessa substância e são δ 161.83, δ 156.96, δ 152.62 e δ 132.99, referentes aos carbonos 4', 7, 5 e 6 respectivamente.

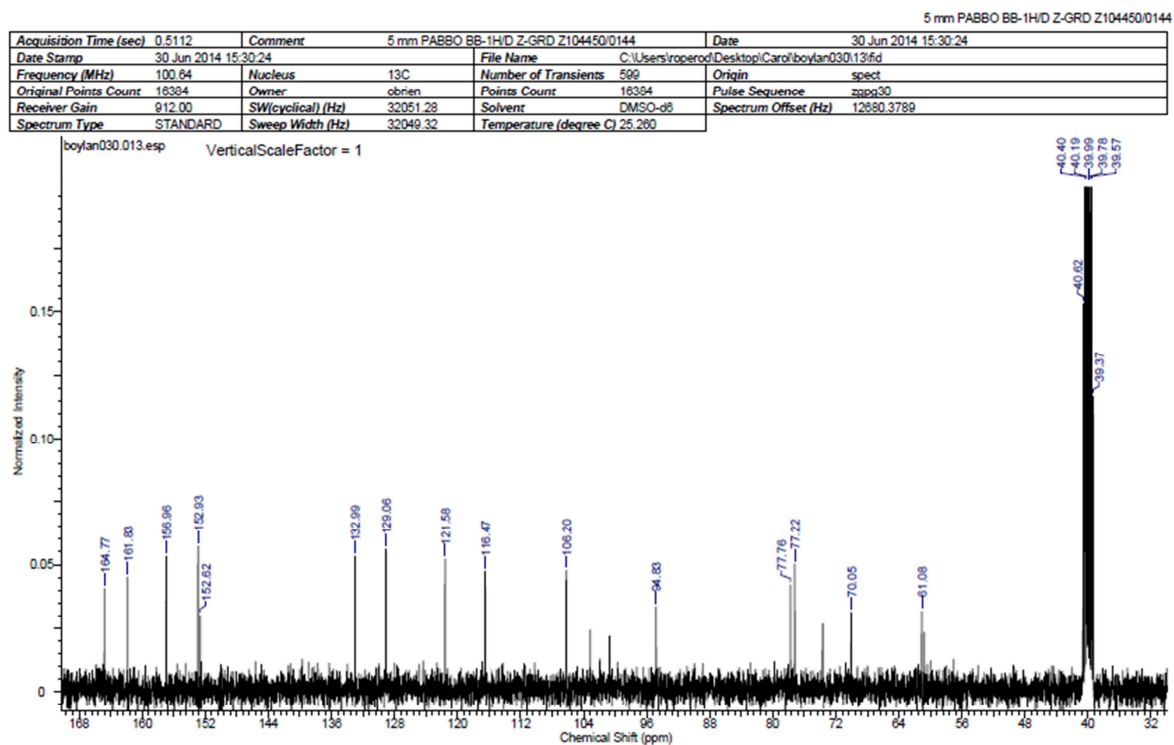


Figura 12: Espectro de RMN de ^{13}C do composto X.

Para comprovar que o composto X isolado era de fato o flavonóide Hispidulina 7-O- β -D-glicosídeo, os dados observados nos espectros tanto de carbono quanto de hidrogênio foram comparados aos dados encontrados na literatura (Iwashina e cols., 1999), e estão apresentados na tabela abaixo (Tabela 1).

Tabela 1: Dados observados nos RMNs de ^{13}C e ^1H , para o composto X, comparados com os dados observados na literatura (Iwashina e cols., 1999).

Numeração	Dados da literatura		Dados do composto X	
	^1H RMN, δ_{H} (ppm)	^{13}C RMN, δ_{C} (ppm)	^1H RMN	^{13}C RMN
1	—	—	—	—
2	—	163,2	—	164,77
3	6,84	103,4	6,88	103,9
4	—	182,2	—	182,2
4a	—	152,8	—	152,93
5	—	152,6	—	152,62
6	—	131,5	—	132,99
7	—	157,7	—	156,96
8	7,11	94,5	7,03	94,83
8a	—	104,2	—	106,2
1'	—	124,4	—	121,58
2'	8,25	128,2	8,00	129,06
3'	7,4	116,7	7,00	116,47
4'	—	160,4	—	161,83
5'	7,4	116,7	7,00	116,47
6'	8,25	128,2	8,00	129,06
Gli1	3,73	100,9	3,78	101,7
Gli2	3,70	73,2	3,77	72,34
Gli3	3,22	77,3	3,23	77,22
Gli4	3,50	69,7	3,53	70,05
Gli5	3,45	75,8	3,48	77,76
Gli6	3,52	60,6	3,50	61,08

4.1.3. Dosagem de hispidulina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

Para a quantificação do flavonoide na fração em acetato de etila (da qual foi isolado), uma curva de calibração foi realizada, pelo método do CLAE, e está expressa no gráfico 1.

A equação da reta obtida foi $y=31572x - 12994$.

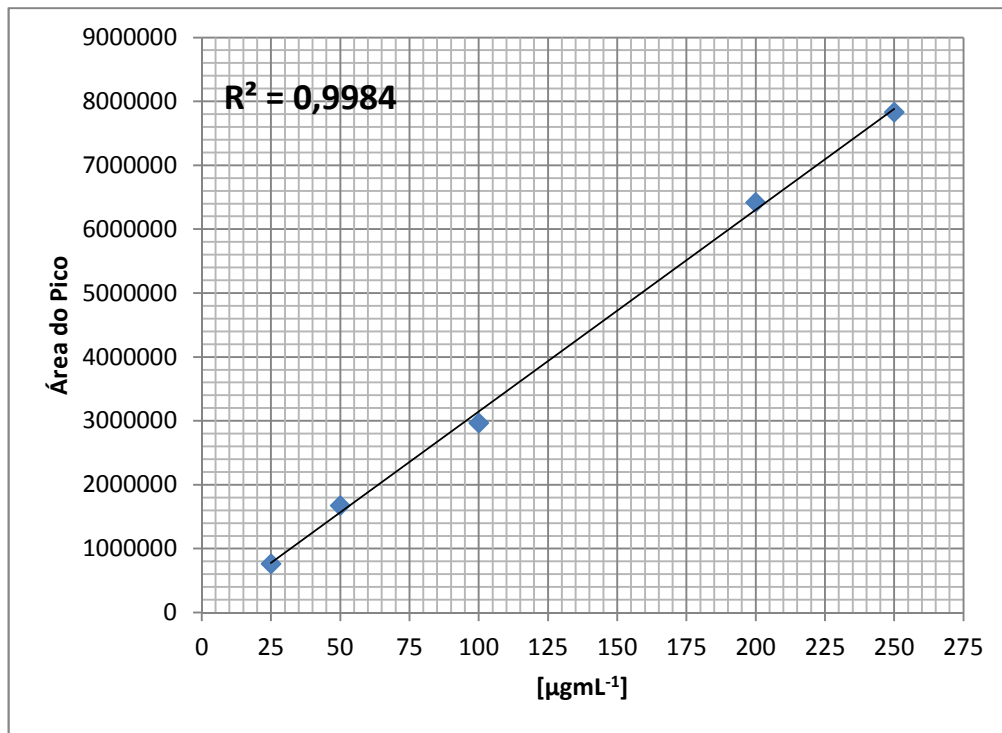


Gráfico 1: Curva de calibração para o flavonoide Hispidulina 7-O- β -D-glicosídeo

A fração em acetato de etila também foi analisada por CLAE utilizando-se a mesma metodologia descrita para construção da curva de calibração da hispidulina 7-O- β -glicosídeo (Figura 13). A área referente ao pico com o mesmo tempo de retenção da hispidulina 7-O- β -glicosídeo foi calculada em 373499,5, o que sugere que o flavonoide esteja na concentração de 117,9 $\mu\text{g/ml}$ na fração em acetato de etila, obtendo um rendimento de 39,3%.

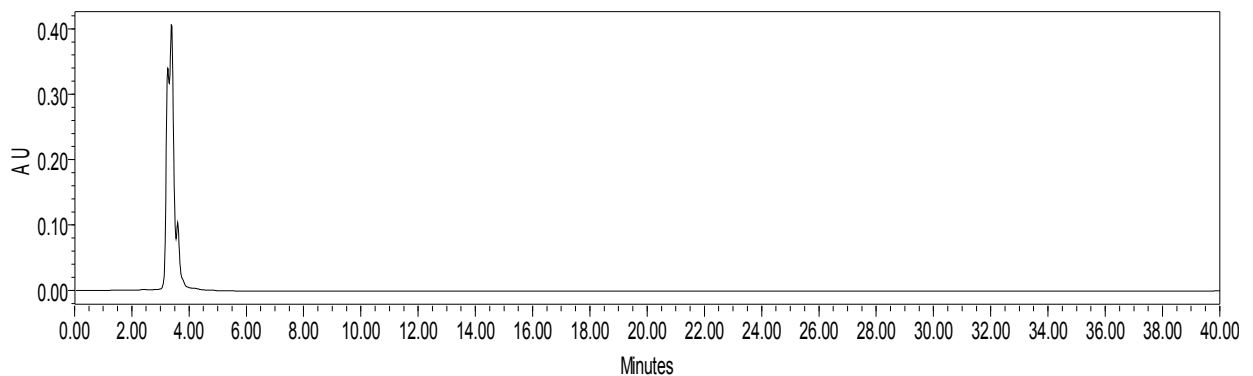


Figura 13: Análise da fração em acetato de etila pelo método de CLAE

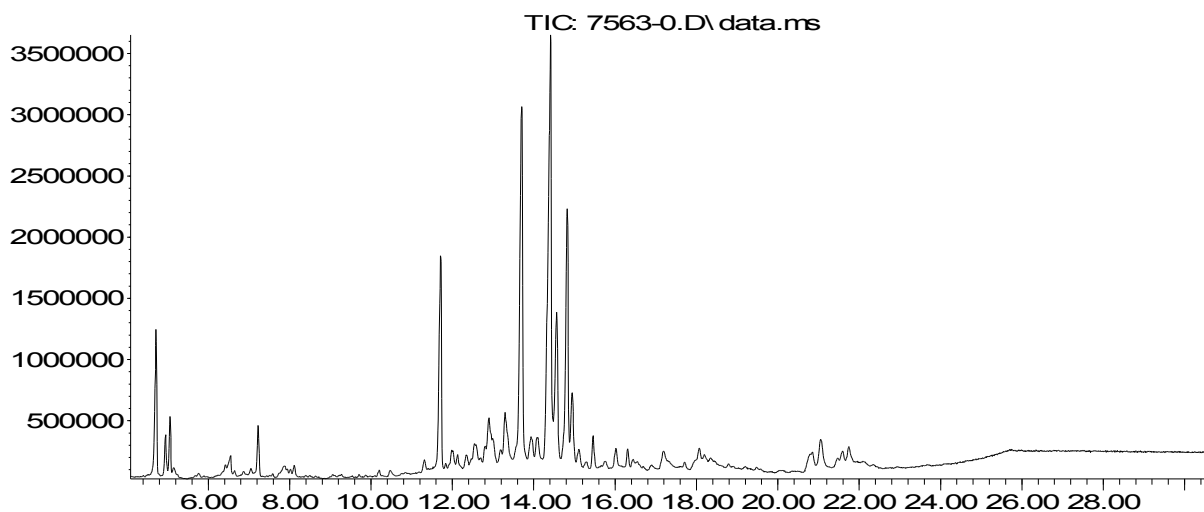
4.1.4. Investigação da composição das frações em hexano, diclorometano e acetato de etila utilizando cromatografia com fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM).

Para seguir com as análises dos componentes das frações, cada uma delas foi analisada pelo método de cromatografia com fase gasosa acoplada a espectroscopia de massas, a fim de que fossem observados outros componentes, nesse caso voláteis, presentes nas frações. É importante ressaltar que o flavonoide por ser uma substância não volátil, não poderá ser observado neste experimento.

Os resultados estão expressos como cromatogramas e tabelas (conjuntos), nas quais estão expressas as relações entre o tempo de retenção (t_R), a substância proposta pela biblioteca e por fim a confiabilidade (em porcentagem), a qual só foi considerada quando o valor era maior do que 80%.

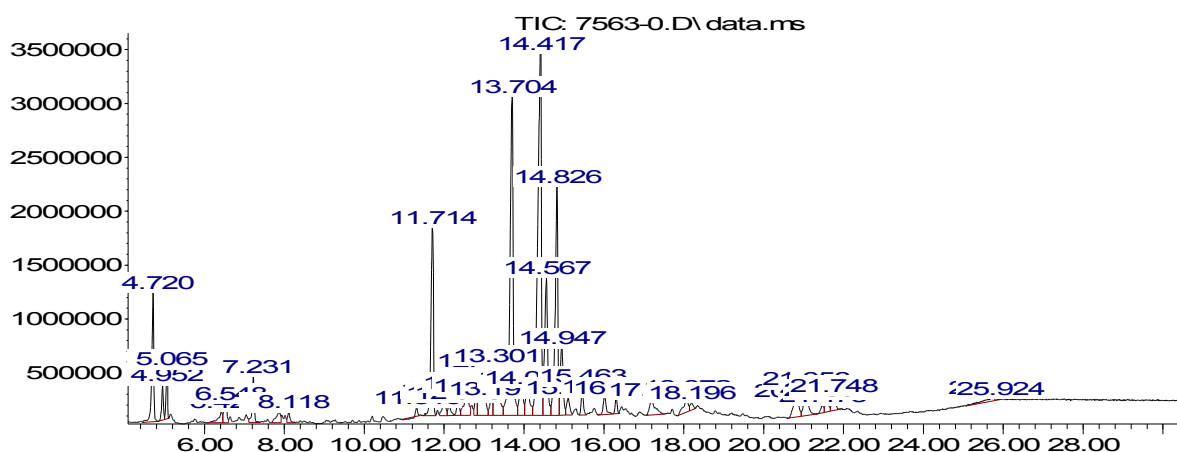
Primeiramente, foi analisado o extrato em hexano (conjunto 1). Para essa fração duas imagens de cromatogramas foram apresentadas, uma sem os tempos de retenção e a outra imagem contendo todos os tempos de retenção. Foram detectadas 31 substâncias das quais somente 16 podem ser considerados confiáveis, elas estão descritas na tabela representada no conjunto 1.

Abundance



Time→

Abundance



Time →

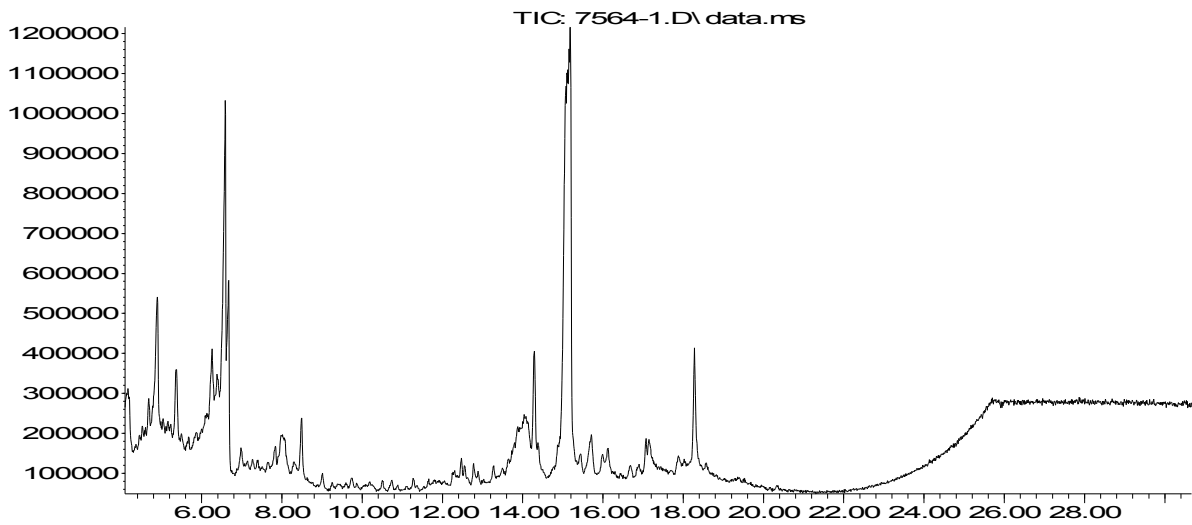
t _R (min)	Substância sugerida pela EM	Confiabilidade
4,720	-	-
4,952	3,7,11,15-Tetrametil-2-hexadecenol	90%
5,065	-	-
6,425	Palmitato de etila	93%
6,548	Ácido palmítico	99%
7,231	Fitol	90%
7,878	Ácido oleico	96%
8,118	-	-
11,714	19, 23-Hexametil -Tetracosahexano	99%
13,301	β-Tocoferol	95%
13,704	Vitamina E	98%
13,940	-	-
14,087	Colest-7-en-3-one,4,4-dimetil	86%
14,417	γ-sitosterol	99%
14,567	β-amirina	95%
14,826	α-amirina	99%
14,947	9,19-Ciclolanostan-3-ol,24-metileno-,(3.beta)	94%
15,113	-	-
16,022	-	-
16,311	-	-
17,193	10-Hidroxi-2,4,6a,6b,9,9,12a-heptametil-1,2,3,4,4a,5,6,6a,7,8,8a,9,10,11,12,12a,13,14b-eicosahidropiceno-2-ácido carboxílico	86%
18,072	-	-
18,196	-	-
20,850	-	-
21,058	-	-
21,475	-	-
21,594	Stigmastan-3,5-dieno	91%
21,748	-	-
25,711	-	-
25,924	-	-

Conjunto 1: Cromatogramas e tabela sugerindo os componentes da fração em hexano.

A fração em diclorometano foi a segunda a ser avaliada (conjunto 2), como a quantidade de picos de retenção demonstrado no segundo cromatograma era muito grande, o primeiro cromatograma foi expresso para a melhor observação dos picos.

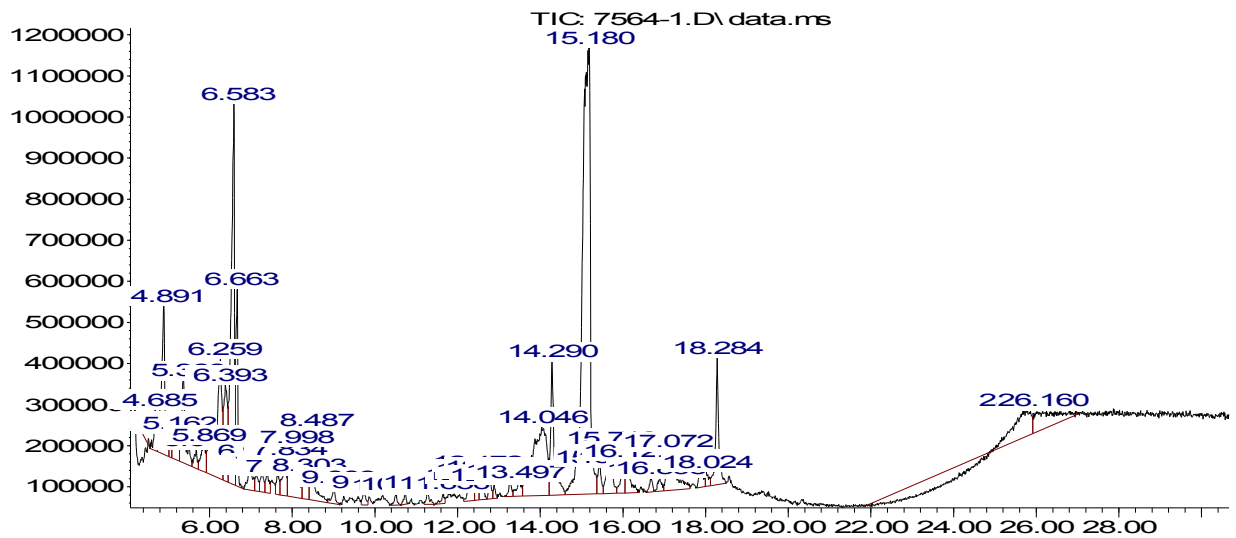
Foram apontados 16 possíveis componentes para a fração em diclorometano, no entanto, apenas 4 apresentavam confiabilidade elevada. Eles estão descritos na tabela abaixo (conjunto 2).

Abundance



Time→

Abundance



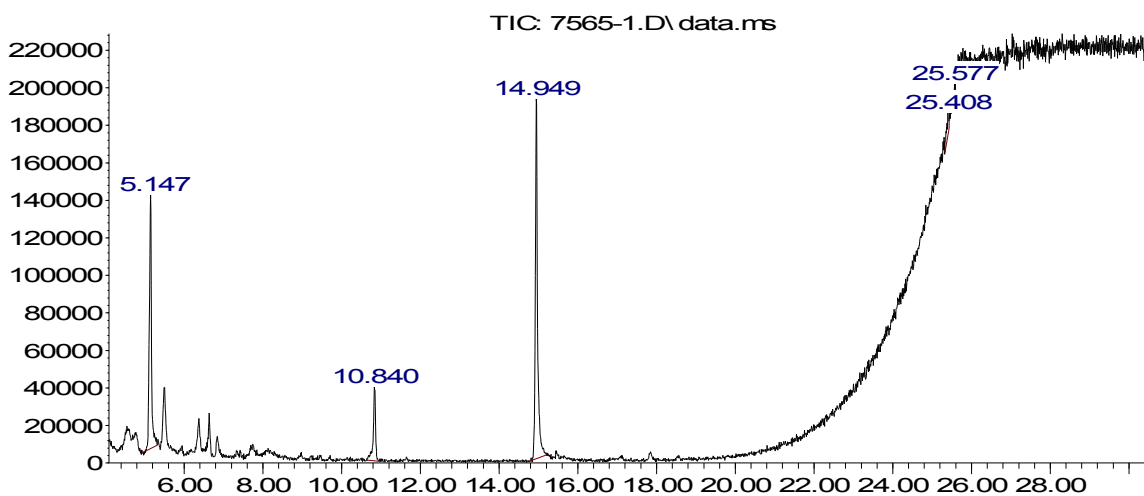
Time→

t _R (min)	Substância sugerida pela EM	Confiabilidade
4,685	-	-
4,894	2-Ciclohexen-1-o, 4-(3-hidroxi-1-butenil)-3,5,5-trimetil	80%
5,368	-	-
6,134	-	-
6,589	-	-
6,668	-	-
8,014	Galato de etila	93%
8,498	-	-
13,878	-	-
14,040	-	-
14,290	Estigmasterol,22,23-diidro	97%
15,180	4H-1-Benzopiran-4-ano, 5,7-diidroxi-2-(4-hidroxifenil) – 6-metoxi	93%
15,715	-	-
17,073	-	-
17,157	-	-
18,283	-	-

Conjunto 2: Cromatogramas e tabela sugerindo os componentes da fração em diclorometano.

Por fim, foi analisada a fração em acetato de etila (conjunto 3). Esta fração apresentou poucos componentes voláteis, isto é, além do flavonoide (componente majoritário desta fração), há, provavelmente, mais 2 outros componentes que fazem parte desta fração, eles estão descritos na tabela abaixo (conjunto 3).

Abundance



Time→

t _R (min)	Composto	Confiabilidade
5,147	-	-
5,496	1,3,5-Benzenotriol, diidrato	86%
10,840	-	-
14,949	4H-1-Benzopiran-4-ano, 5,7-diidroxi-2-(4-hidroxifenil) – 6-metoxi	81%

Conjunto 3: Cromatograma e tabela sugerindo os componentes da fração em acetato de etila.

4.1.5 Anatomia Vegetal

Alguns cortes histológicos foram realizados a fim de se observar estruturas que pudessem corroborar com as análises fitoquímicas e também com os efeitos farmacológicos observados.

A figura 14 representa o corte longitudinal da folha. A foto foi tirada usando o aumento de 10x e não foi usada nenhuma coloração.

Na figura 15 pode-se observar focos de amido (seta vermelha), que só foi possível pois o corte recebeu a coloração com iodo. O aumento utilizado também foi o de 10x.

A figura 16 ressalta a presença de tricomas nas folhas, os quais retêm o óleo essencial desta espécie. A fotografia foi realizada no corte sem coloração, usando um aumento de 10x.

Para a observação dos cristais de oxalato com maior precisão, uma lente polarizada foi utilizada. Na figura 17 é possível observar a presença cristais de oxalato (seta vermelha) no aumento de 40x.

Por fim, as figuras 18 e 19 demonstram a presença de compostos fenólicos (setas vermelhas) após a coloração dos cortes com cloreto férrico a 10% (figura 18) e cloreto férrico 0,1% (figura 19). Os cortes foram observados em um aumento de 10x (figura 18) e em um aumento de 40x (figura 19).

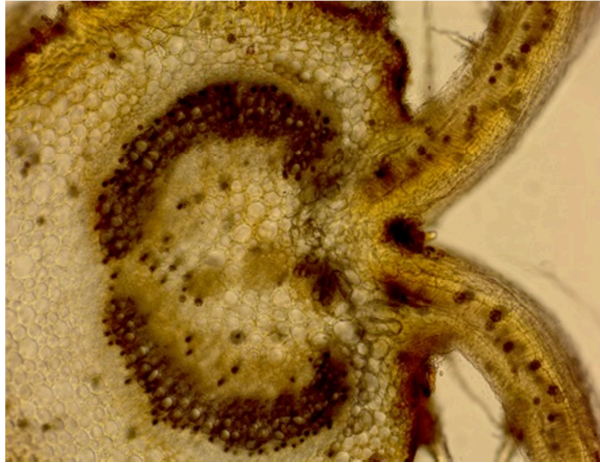


Figura 14: Corte longitudinal da folha de *T. granulosa*, aumento de 10x.

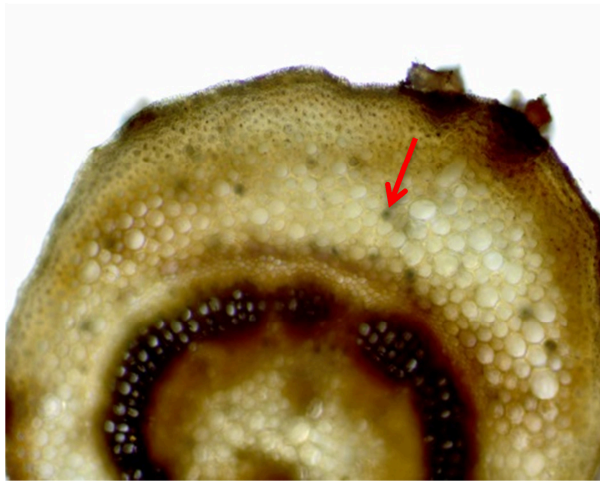


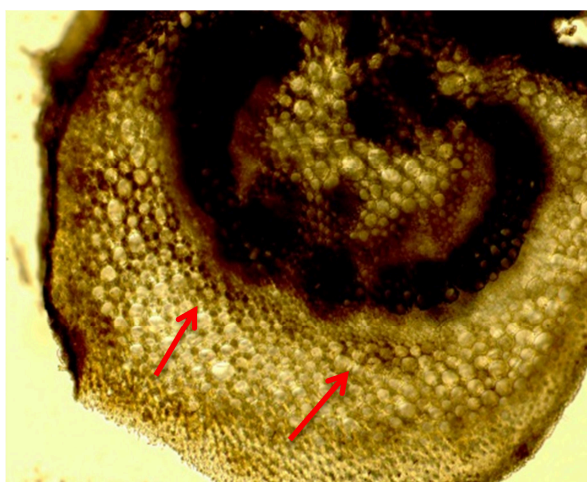
Figura 15: Focos de Amido. Coloração usada: iodo, aumento de 10x.



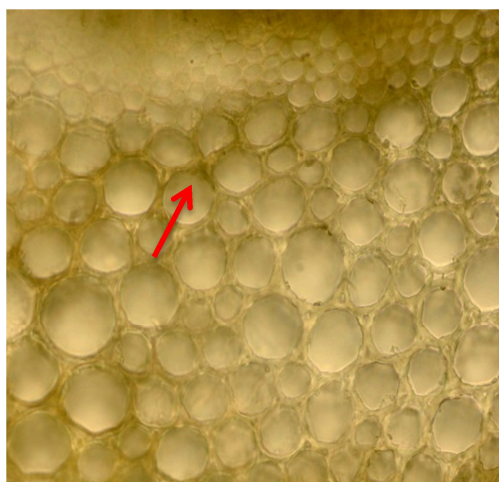
Figura 16: Tricomas, aumento de 10x.



Figura 17: Cristais de oxalato de cálcio, aumento 40x.



18



19

Figuras 18 e 19: Compostos fenólicos em menor aumento (figura 18, aumento 10x) e maior aumento (figura 19, aumento 40x). Coloração usada: cloreto férrico 10% (figura 18) e cloreto férrico 0,1% (figura 19).

4.2. Resultados em farmacologia

4.2.1. Efeito do EE e suas frações no modelo da placa quente

O modelo da placa quente foi realizado com o intuito de avaliar a atividade antinociceptiva central do extrato etanólico e as frações em hexano, diclorometano e acetato de etila. Neste modelo o animal tenta lambe ou retirar a pata da superfície aquecida como consequência da ativação do córtex somatossensorial através de um estímulo térmico (Sahley and Berntson, 1979).

Após as duas primeiras medidas da linha de base, os animais foram divididos em grupos de tempo de latência semelhantes e cada grupo recebeu as doses de 10, 30 ou 100 mg/kg do EE, fH, fDCM ou fAE, por via oral (v.o.). Os valores foram comparados aos valores apresentados pela morfina (analgésico opioide) bem como aos valores demonstrados pelo grupo pré-tratado somente com veículo.

Como se pode observar no gráfico 2, os extratos e suas frações apresentaram atividade antinociceptiva central, e de maneira positiva, o extrato etanólico e a fração em hexano apresentaram atividade significativa não só quanto ao veículo, mas também quanto a morfina nas doses de 30 mg/kg. Os valores são representados em percentual de aumento em relação a linha de base (coluna da esquerda) e área sob a curva (ASC – coluna da direita).

Para melhor visualização dos gráficos vide anexo 1.

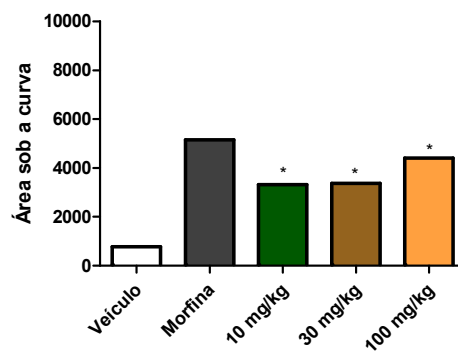
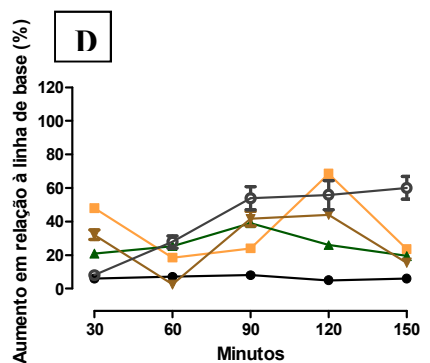
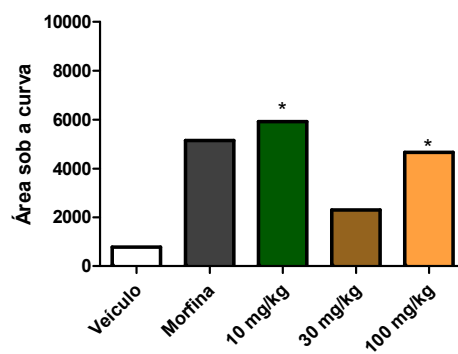
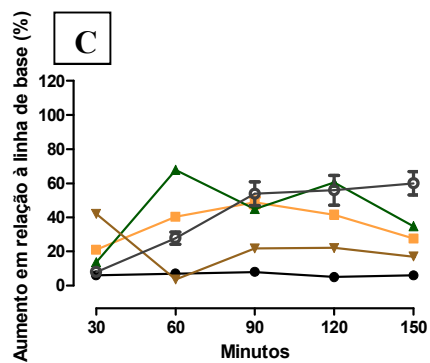
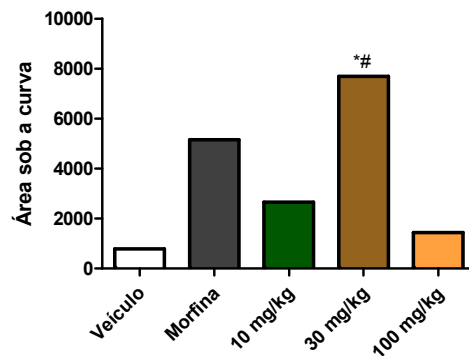
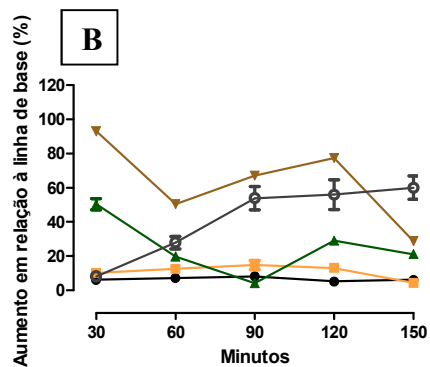
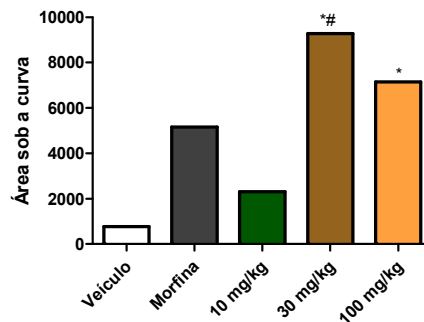
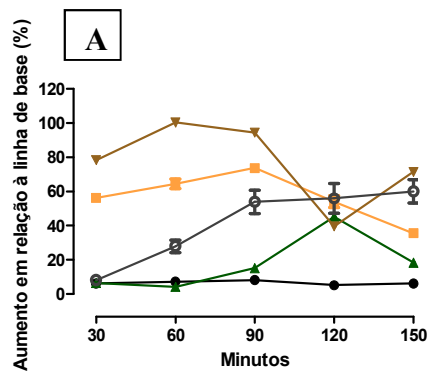


Gráfico 2: Efeito do Extrato Etanólico (A) e das frações em Hexano (B), Diclorometano (C) e Acetato de Etila (D) no modelo da placa quente. Os animais foram pré-tratados oralmente com

veículo, EE, fH, fDCM ou fAE (10, 30 e 100 mg/kg ou morfina (2,5 mg/kg, i.p.) Os resultados são expressos como média \pm d.p. (n=5-7). A significância estatística $p < 0,05$ (*) foi calculada por análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Newman-Kels, entre os grupos tratados com o veículo, o extrato, suas frações ou morfina. Em relação ao extrato etanólico e suas frações comparados ao grupo que recebeu morfina foi usado o símbolo #.

4.2.2. Efeito do EE e suas frações no modelo de nociceção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina

O modelo da lambertura de pata induzida pela capsaicina foi empregado com o intuito de avaliar o envolvimento dos receptores TRPV-1 no efeito antinociceptivo do EE e suas frações este experimento está descrito por Sakurada e cols (1992).

A capsaicina estimula receptores TRPV-1 e aumenta a liberação de vários neurotransmissores, incluindo substância P e glutamato, a partir de terminais periféricos e centrais de neurônios sensoriais primários. Essa estimulação pode contribuir para o processamento nociceptivo (Medvedeva e cols, 2008).

Os resultados obtidos no modelo da capsaicina (gráfico 3) mostram que o grupo pré-tratado com o veículo manifestou uma resposta nociceptiva da lambertura da pata de 43,1 segundos, quando o EE (gráfico 3A) foi administrado, por v.o., na dose de 30 mg/kg e na dose de 100 mg/kg o tempo de lambertura da pata foi reduzido para 20,0 segundos e 17,1 segundos, respectivamente. Para a fração H (gráfico 3B), as doses de 10 mg/kg e 100 mg/kg reduziram o tempo de lambertura da pata para 26,8 e 19,4 segundos, respectivamente. Já para a fração em DCM (gráfico 3C), as doses que apresentaram redução significativa na lambertura da pata foram as de 30 mg/kg e 100 mg/kg, manifestando tempo de lambertura de 28,4 segundos e 17,9 segundos, respectivamente. Por fim, a fração em AE (gráfico 3D) apresentou efeito significativo nas 3 doses administradas, reduzindo os tempos de lambertura

da pata para 32,9 segundos na dose de 10 mg/kg, 12,5 segundos na dose de 30 mg/kg e 23,0 segundos na dose de 100 mg/kg.

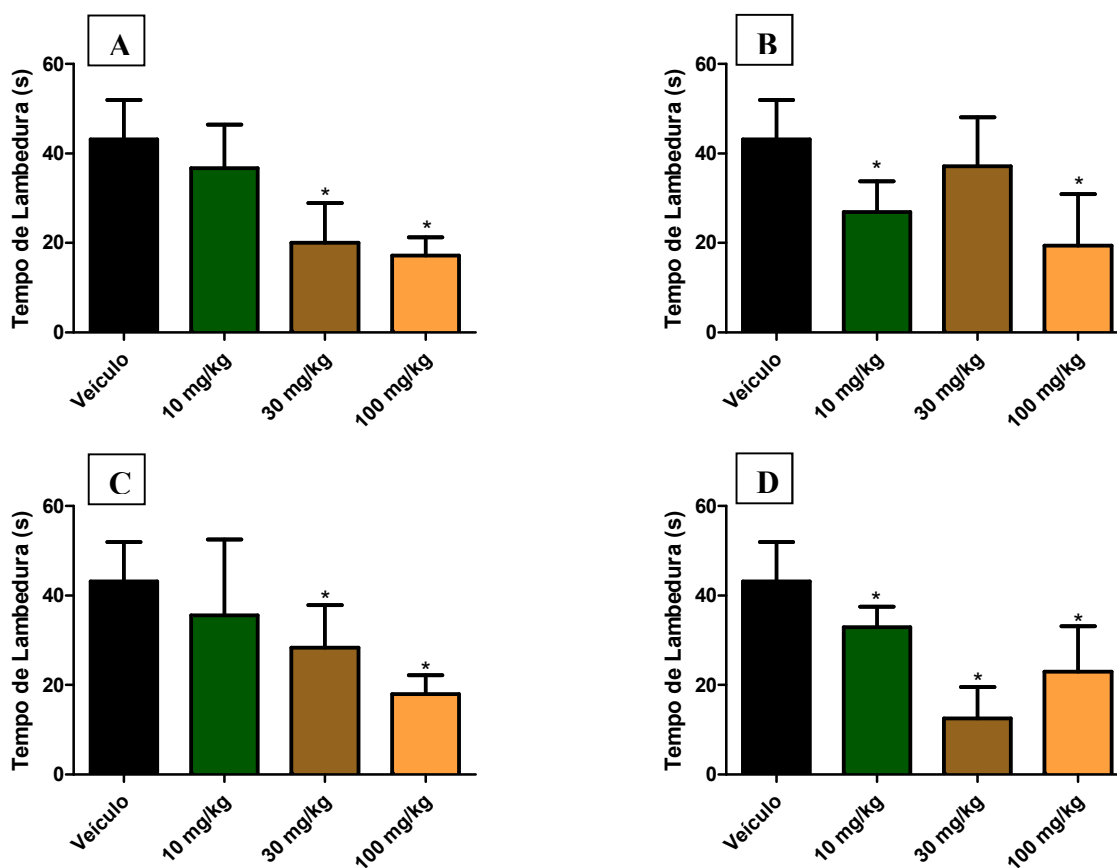


Gráfico 3: Efeito do EE (A) e suas frações em H (B), DCM (C) e AE (D) no modelo de nocicepção induzida pela injeção intraplantar de capsaicina. Os animais foram pré-tratados oralmente com veículo, EE, fH, fDCM ou fAE (10, 30 e 100 mg/kg) 60 minutos antes da injeção de 20 µl de capsaicina. Os resultados são expressos como média ± d.p. (n=5-7). A significância estatística (* p < 0,05) foi calculada por análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Newman-Kels.

4.2.3. Efeito do EE e suas frações no modelo de nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato

O modelo da lambedura de pata induzida pelo glutamato foi realizado com o objetivo de investigar se a via glutamatérgica – já é bem estabelecido que o glutamato é um dos principais neurotransmissores excitatórios envolvido na transmissão de sinais nociceptivos

(Jancso, 1978; Ju e cols., 1987; Beirith e cols., 2002) - também participava no efeito antinociceptivo do extrato e suas frações, isto é, foi avaliado se as quatro substâncias seriam capazes de reverter o efeito nociceptivo causado pela injeção intraplantar do glutamato.

Conforme apresentado no gráfico 4, o pré-tratamento, por v.o., com todas as substâncias testadas nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg causou redução significativa no tempo que o animal permaneceu lambendo a pata. O animal tratado apenas com o veículo apresentou tempo de lambedura de 150 segundos, para o EE (gráfico 4A) a dose que apresentou maior inibição foi a de 10 mg/kg, reduzindo para 12 segundos o tempo de lambedura da pata. Para todas as frações a dose que demonstrou melhor resposta foi a de 30 mg/kg, reduzindo para 33,9 segundos, 53,1 segundos e 41,6 segundos para fH (gráfico 4B), fDCM (gráfico 4C) e fAE (gráfico 4D), respectivamente.

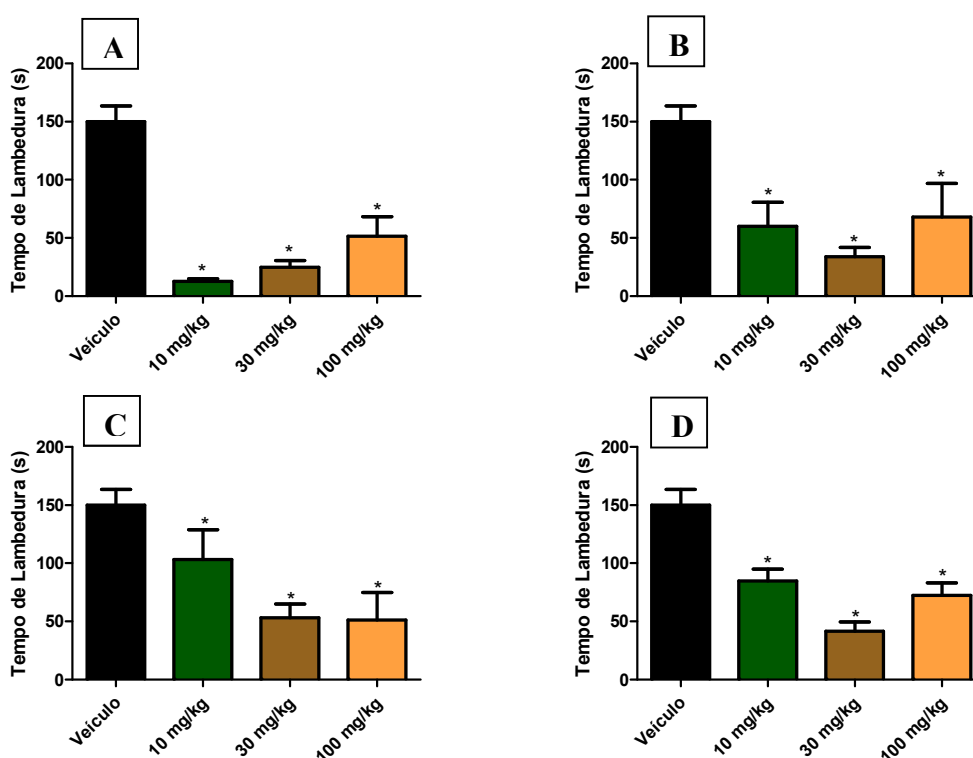


Gráfico 4: Efeito do EE (A) e suas frações em H (B), DCM (C) e AE (D) no modelo de nocicepção induzida pela injeção intraplantar de glutamato. Os animais foram pré-tratados oralmente com veículo, EE, fH, fDCM ou fAE (10, 30 e 100 mg/kg) 60 minutos antes da injeção de 20 µl de glutamato. Os resultados são expressos como média ± d.p. (n=5-7). A significância estatística (* p <

0,05) foi calculada entre os grupos tratados com o extrato, suas frações e o veículo, por análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Newman-Kels.

4.2.4. Efeito do EE e suas frações no modelo da lambertura de pata induzida pela formalina

A injeção intraplantar de formalina (2,5% v/v) desencadeia uma resposta algésica dividida em duas fases distintas. A 1ª fase (fase neurogênica) ocorre nos primeiros 5 minutos após a injeção da formalina e a 2ª fase (fase inflamatória) ocorre entre 15 e 30 minutos após a injeção de formalina.

Os resultados apresentados no gráfico 5 mostram o efeito do extrato etanólico, e das frações em hexano, diclorometano e acetato de etila, nas doses de 10, 30 e 100 mg/kg, na resposta de lambertura da pata induzida pela formalina.

Para a primeira fase do experimento, o grupo de animais tratados oralmente com o veículo obteve tempo de lambertura de pata de $69,8 \pm 15,4$ segundos. O grupo que recebeu o pré-tratamento com ácido acetilsalicílico (AAS, 200 mg/kg, controle positivo), permaneceu lambendo a pata por $59,7 \pm 9,7$ segundos, não havendo, portanto, diferença significativa quando comparado ao grupo controle (veículo). Assim como também não houve diferença significativa no tempo de lambertura da pata dos grupos que receberam o pré-tratamento do extrato e as frações na primeira fase do experimento.

Durante a fase inflamatória (2ª fase), os animais pré-tratados oralmente com o veículo apresentaram um tempo de resposta de $336,9 \pm 47,9$ segundos. Já nos animais pré-tratados com AAS, o tempo obtido foi de $164,5 \pm 43,5$ segundos, correspondendo a uma inibição de 51,17% na resposta. Os grupos pré-tratados com EE (gráfico 5A), H (gráfico 5B) e DCM (gráfico 5C) apresentaram uma redução no tempo de resposta somente na dose de 30 mg/kg. Porém, para a fração AE (gráfico 5D) nenhuma das doses inibiu significativamente a lambertura de pata dos animais.

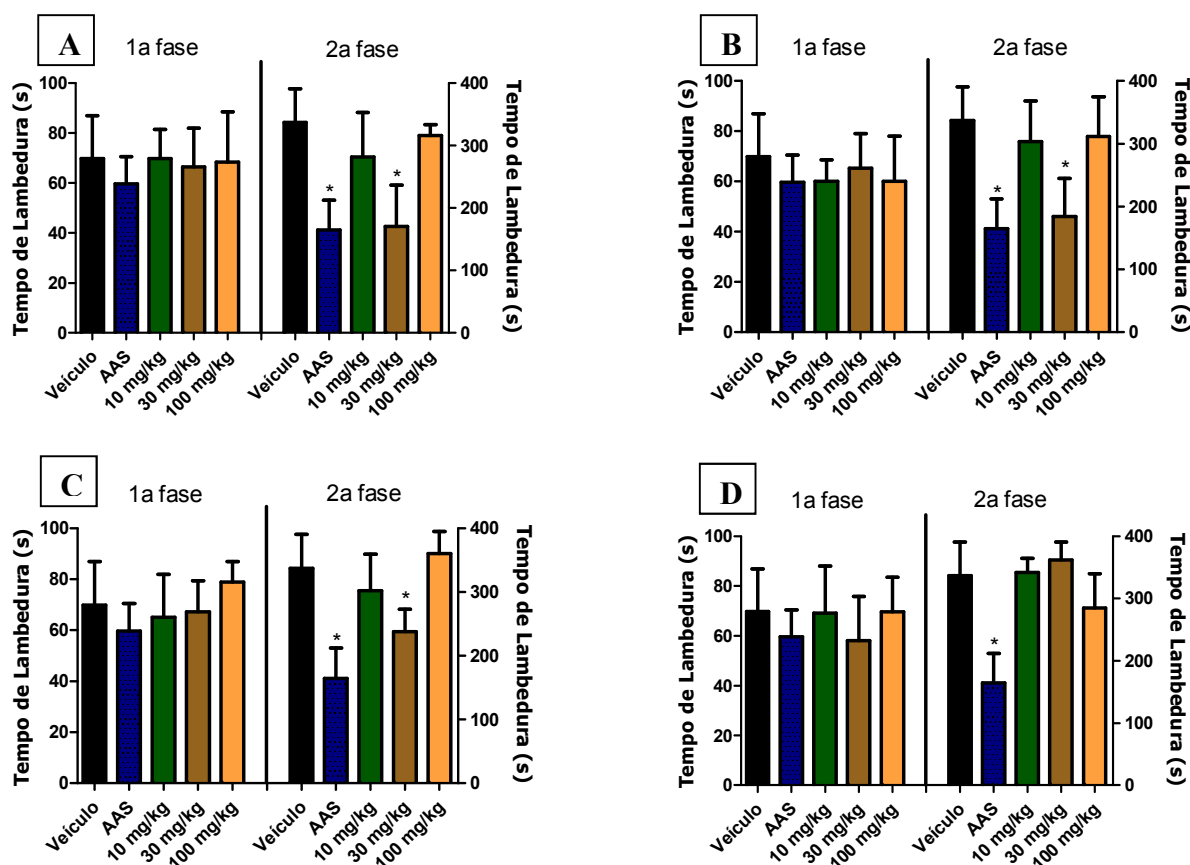


Gráfico 5: Efeito do EE (gráfico 4A), H (gráfico 4B), DCM (gráfico 4C) e AE (gráfico 4D) No modelo da lambertura de pata induzida pela formalina. Os animais foram pré-tratados oralmente com veículo, ácido acetilsalicílico (AAS, 200 mg/kg), EE, fH, fDCM ou fAE (10, 30 e 100 mg/kg), 60 minutos antes da injeção intraplantar de formalina (2,5% v/v). Os resultados são expressos como média \pm d.p. do tempo em que os animais permaneceram lambendo a pata injetada com a formalina (n=5-7). A significância estatística $p < 0,05$ foi calculada comparando os grupos pré-tratados com EE, frações ou AAS com o grupo pré-tratado com veículo (*), por análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Newman-Kels.

4.2.5. Efeito do EE e suas frações no modelo inflamatório de migração celular – BAS

Apesar de a resposta anti-inflamatória não ter sido extremamente positiva no experimento da formalina, o modelo da migração celular foi realizado por se tratar de um teste cuja resposta inflamatória é diferente do experimento anterior, isto é, ainda que o

extrato bruto e as frações não tenham apresentado grande redução no tempo de lambertura da pata dos animais na segunda fase do experimento da formalina, o modelo da BAS provoca a transmigração de células para uma cavidade, o extravasamento plasmático e a produção de inúmeros mediadores e diversas citocinas, o que permite investigar o potencial anti-inflamatório de possíveis substâncias candidatas a anti-inflamatórios (Okudaira e Schuwarz, 1962; Clark, 1975; Vigil e cols., 2008) no que tange a migração de leucócitos.

É importante ressaltar que durante a realização deste modelo de migração celular, também foi plausível analisar possíveis efeitos hematológicos e/ou mielotóxicos quando EE ou as frações foram administradas. O que foi observado é que nenhuma das substâncias apresentou qualquer efeito tóxico aos animais (resultados não mostrados).

4.2.5.1. Quantificação de leucócitos totais

Vinte e quatro horas após a injeção da carragenina (1%) na BAS, o primeiro parâmetro avaliado foi da migração celular (gráfico 6), característica de um fenômeno inflamatório em progressão. De acordo com os resultados apresentados, a injeção de carragenina na BAS nos animais pré-tratados oralmente com o veículo causou, após 24 horas, um aumento significativo no número de leucócitos totais na cavidade, $48,0 \pm 12,3 \times 10^6$ células/ml para o EE – gráfico 6^a; $64,8 \pm 10,9 \times 10^6$ células/ml para a fração em acetato de etila – gráfico 6D; e $58,6 \pm 15,9 \times 10^6$ células/ml para as frações em hexano – gráfico 6B e diclorometano – gráfico 6C. Em relação ao grupo que recebeu a injeção de PBS, foram quantificadas $0,9 \pm 0,5 \times 10^6$ células/ml para o extrato em etanol, $1,8 \pm 0,8 \times 10^6$ células/ml para a fração em acetato de etila e $3,0 \pm 1,5 \times 10^6$ células/ml para as frações em hexano e diclorometano. Já os animais que foram pré-tratados intraperitonealmente (i.p.) com o anti-inflamatório esteroide (AIE) dexametasona (0,5 mg/kg), 1 hora antes da injeção de carragenina na BAS, foi observada uma redução de 48,5% no número total de células

quando comparado a $64,8 \pm 10,9 \times 10^6$ células/ml do grupo que recebeu carragenina, isto é, o número de células na cavidade foi reduzido para $33,4 \pm 13,0 \times 10^6$ células/ml. Para o grupo que recebeu o pré-tratamento com o extrato não houve redução na migração leucocitária, já as frações em hexano e diclorometano apresentaram redução da migração celular nas três doses testadas e, por fim, a fração em acetato de etila reduziu significativamente a migração celular somente nas doses de 10 e 100 mg/kg.

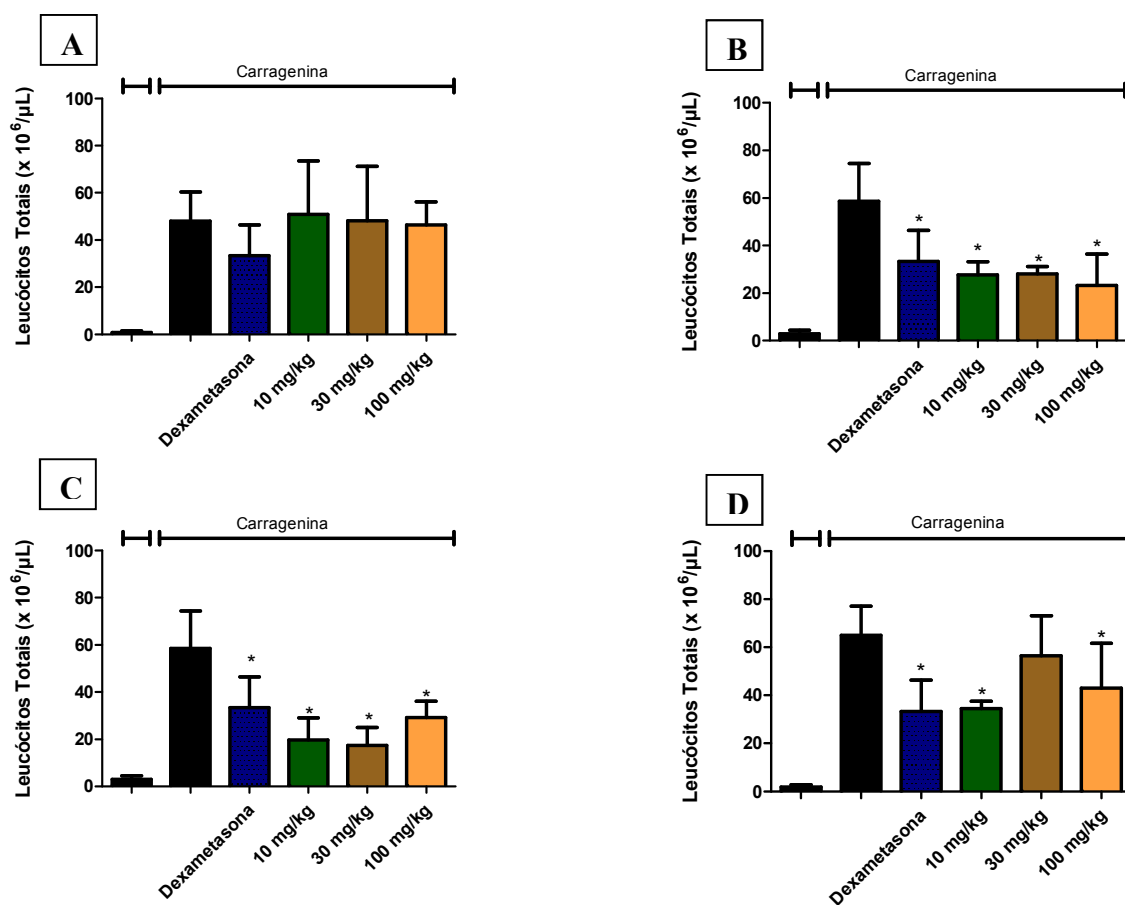


Gráfico 6: Efeito do EE (A), e as frações H (B), DCM (C) e AE (D) na migração celular induzida por carragenina na BAS. Os animais foram pré-tratados oralmente com veículo (água destilada), EE, fH, fDCM ou fAE nas doses (10, 30 e 100 mg/kg) 60 minutos antes da injeção de PBS (grupo controle) ou carragenina (demais grupos) na BAS, ou pré-tratados intraperitonealmente (i.p) com dexametasona (0,5 mg/kg) também 1 hora antes da injeção de carragenina na BAS. Os resultados são expressos como média \pm d.p. do número de leucócitos totais (x 10⁶/mL) (n=5-7). A significância

estatística (* $p < 0,05$) foi calculada entre os grupos tratados com o extrato, frações ou dexametasona e o veículo, por análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Newman-Kels.

4.2.5.2. Dosagem de citocinas (TNF- α , IL-1 β , IFN- γ)

Após a injeção de carragenina na BAS, além da liberação de alguns mediadores inflamatórios, há também a liberação de diversas citocinas que estão envolvidas na evolução do processo inflamatório. Assim, foi avaliado se o EE e suas frações seriam capazes de alterar a produção de algumas citocinas produzidas durante a resposta inflamatória, induzida por carragenina.

A concentração de TNF- α , IL-1 β e, IFN- γ no exsudato inflamatório da BAS nos animais tratados oralmente com o veículo e que receberam injeção de carragenina na cavidade, manteve-se acima de 500 pg/ml (gráficos 7, 8 e 9).

Para a citocina TNF- α (gráfico 7), foi possível observar redução significativa nas três doses administradas para o EE (gráfico 7A) e para a fração em AE (gráfico 7D), enquanto as frações H (gráfico 7B) e DCM (gráfico 7C) não demonstraram efeito significativo na produção desta citocina em nenhuma das doses testadas.

Em relação a produção de IL-1 β (gráfico 8) somente o EE (gráfico 8A) foi capaz de reduzir a produção desta citocina nas três doses administradas, de forma semelhante àquela produzida quando a dexametasona foi administrada (0,5 mg/kg, i.p.).

Por fim, a produção de IFN- γ (gráfico 9) foi reduzida significativamente somente quando houve administração do EE (gráfico 9A) na dose de 10 mg/kg e também para a fração em AE (gráfico 9D) nas doses de 10 e 30 mg/kg.

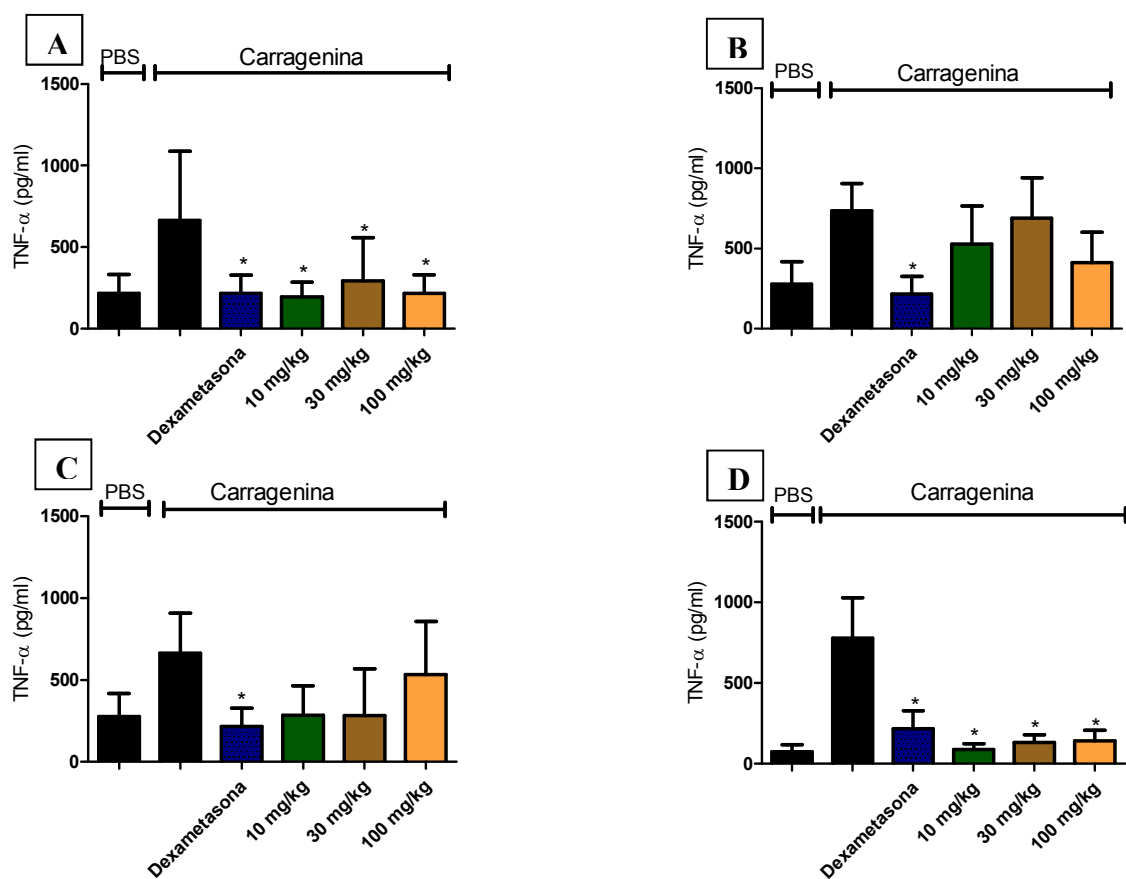


Gráfico 7: Efeito do EE (A), H (B), DCM (C) e AE (D) na produção de TNF- α induzida por carragenina na BAS. Os animais foram pré-tratados oralmente com veículo ou extrato e frações (10, 30 e 100 mg/kg) ou dexametasona (0,5 mg/kg i.p.) 60 min antes da injeção de carragenina na BAS. Os resultados são expressos como média \pm d.p. da concentração de TNF- α (pg/ml) (n= 5-8). A significância estatística (*p < 0,05) foi calculada entre os grupos tratados com o extrato ou suas frações e o veículo, por análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Newman-Kels. * quando comparados os grupos tratados com as e o veículo e o extrato/frações.

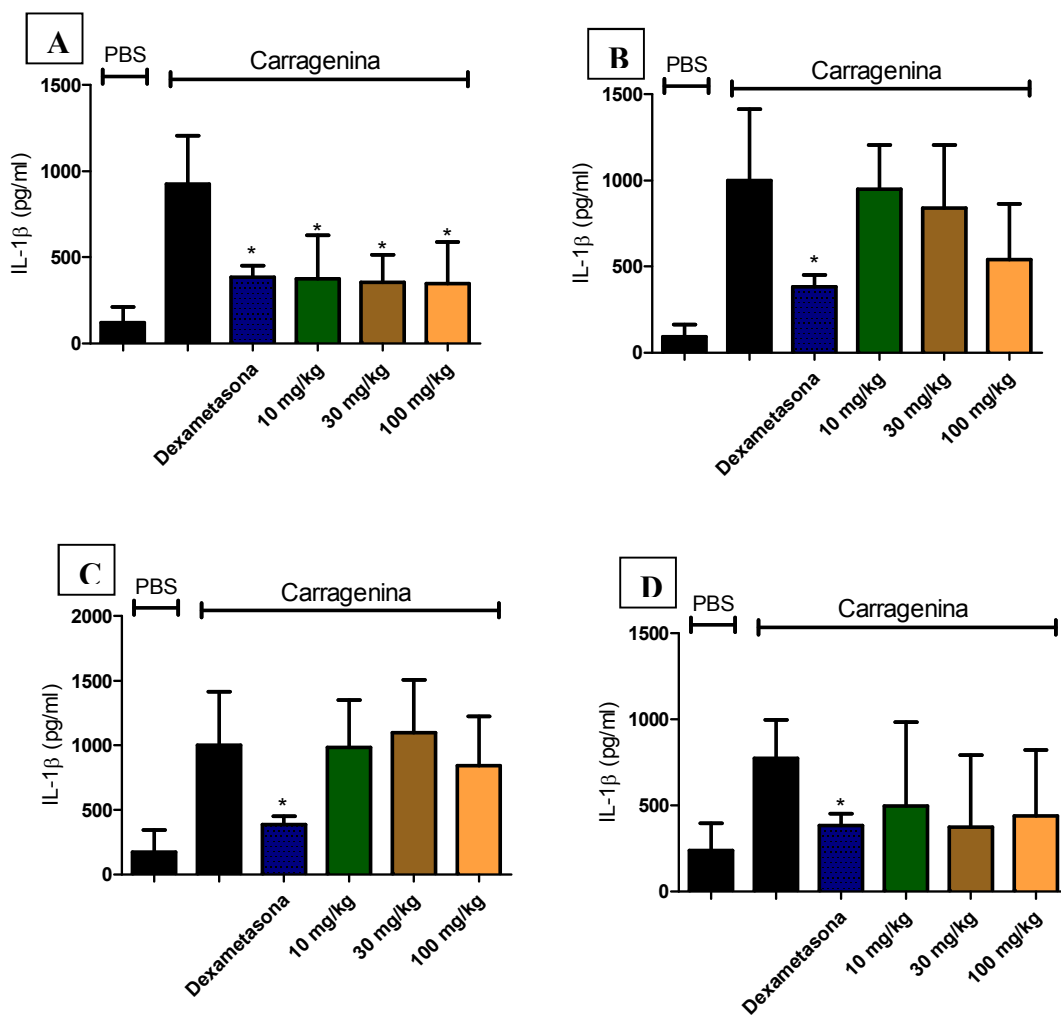


Gráfico 8: Efeito do EE (A), H (B), DCM (C) e AE (D) na produção de IL-1 β induzida por carragenina na BAS. Os animais foram pré-tratados oralmente com veículo ou extrato e frações (10, 30 e 100 mg/kg) ou dexametasona (0,5 mg/kg i.p.) 60 min antes da injeção de carragenina na BAS. Os resultados são expressos como média \pm d.p. da concentração de IL-1 β (pg/ml) (n= 5-8). A significância estatística (*p < 0,05) foi calculada entre os grupos tratados com os três derivados e o veículo, por análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Newman-Kels. * quando comparados os grupos tratados com o extrato/frações e o veículo.

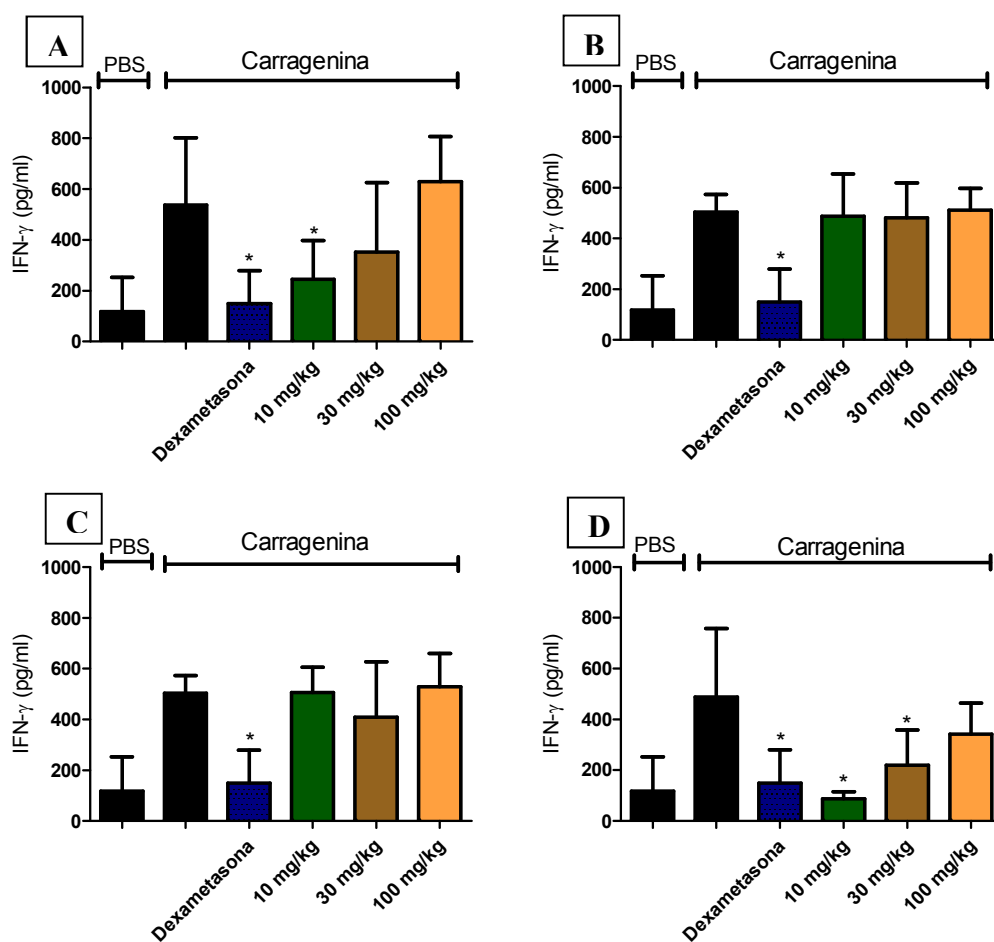


Gráfico 9: Efeito do EE (A), H (B), DCM (C) e AE (D) na produção de IFN- γ induzida por carragenina na BAS. Os animais foram pré-tratados oralmente com veículo ou extrato e frações (10, 30 e 100 mg/kg) ou dexametasona (0,5 mg/kg i.p.) 60 min antes da injeção de carragenina ou PBS na BAS. Os resultados são expressos como média \pm d.p. da concentração de IFN- γ (pg/ml) (n= 5-8). A significância estatística (*p < 0,05) foi calculada entre os grupos tratados com os três derivados e o veículo, por análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Newman-Kels.

4.2.5.3. Quantificação de Oxido Nítrico (NO)

O óxido nítrico é um importante mediador que regula diversos eventos do processo inflamatório (Rossi e cols., 2003).

O gráfico 10 representa a quantificação de oxido nítrico produzido pelas células que migraram para a BAS. No grupo injetado com PBS na cavidade e pré-tratado com veículo, a

concentração de NO no lavado da cavidade foi de $29,9 \pm 19,4 \mu\text{M}$ para o EE, $12,3 \pm 7,2 \mu\text{M}$ para a AE e $40,8 \pm 22,1 \mu\text{M}$ para a fH e fDCM, enquanto o grupo injetado com carragenina na BAS e pré-tratado com veículo foi de $397,6 \pm 200 \mu\text{M}$ para o EE, $430,4 \pm 164 \mu\text{M}$ para fAE e $287,8 \pm 148 \mu\text{M}$ para fH e fDCM. Em animais que receberam intraperitonealmente a dexametasona ($0,5 \text{ mg/kg}$), 1 hora antes da injeção de carragenina na BAS, houve uma redução da produção de NO para $70,2 \pm 50,6 \mu\text{M}$ em relação ao grupo injetado com carragenina na BAS e pré-tratado com veículo. O grupo de animais que recebeu tratamento com o EE (gráfico 10A) não apresentou uma redução significativa na produção de NO, já a fração em hexano (gráfico 10B) foi capaz de reduzir a produção de NO nas doses de 10 e 100 mg/kg. No entanto a fração em DCM (gráfico 10C) só reduziu significativamente a produção de NO na dose de 10 mg/kg e a fração AE (gráfico 10D) somente na dose de 100 mg/kg.

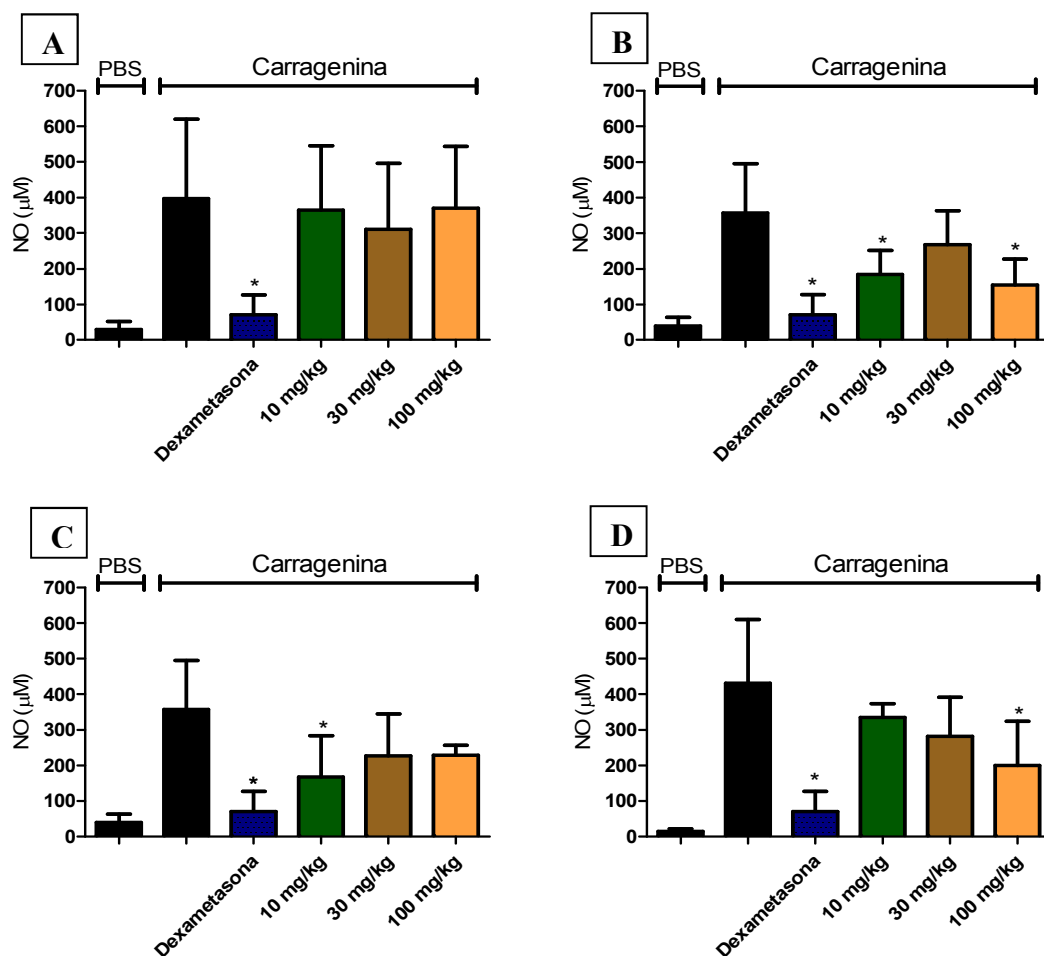


Gráfico 10: Efeito do EE (A), H (B), DCM (C) e AE (D) na produção de NO induzida por carragenina na BAS. Os animais foram pré-tratados oralmente com veículo ou com EE, fH, fDCM e fAE (10, 30 e 100 mg/kg), 60 min antes da injeção de carragenina na BAS, ou pré-tratados i.p. com dexametasona (0,5 mg/kg) 1 hora antes da injeção de carragenina na BAS. Os resultados são expressos como média ± d.p. da concentração de NO (µM) (n=5-7). A significância estatística (*p < 0,05) foi calculada por análise de variância (ANOVA) seguida do pós-teste de Newman-Kels.

4.2.5.4. Dosagem de proteínas

Mais um evento que ocorre após a injeção da carragenina na BAS é o aumento da permeabilidade vascular que favorece o extravasamento de proteínas plasmáticas do sangue para a BAS.

No gráfico 11, o grupo dos animais pré-tratados com veículo e que recebeu a injeção de PBS na cavidade, foram quantificadas $6,6 \pm 2,0$ mg/ml, $30,8 \pm 26,1$ mg/ml e $7,5 \pm 3,8$ mg/ml de proteínas totais para EE, fAE, fH/fDCM, respectivamente, enquanto no exsudato inflamatório dos animais que receberam injeção de carragenina, foram quantificadas $269,8 \pm 51,3$ mg/mL, $281,5 \pm 62,7$ mg/mL e $296,1 \pm 93,0$ mg/mL de proteínas para EE (gráfico 11A), fAE (gráfico 11D), fH/fDCM (gráfico 11B e 11C, respectivamente). Nos animais pré-tratados com dexametasona (0,5 mg/kg), 1 hora antes da injeção da carragenina na BAS, a concentração de proteína foi $222,8 \pm 73,7$ mg/mL. Portanto, não houve inibição do extravasamento de proteína quando o grupo tratado com dexametasona foi comparado ao grupo que recebeu carragenina na BAS. Considerando os grupos de animais pré-tratados com EE, H, DCM e AC (10, 30 e 100 mg/kg), nenhum dos grupos foi capaz de inibir o extravasamento de proteínas causado pela injeção de carragenina na BAS (gráfico 11).

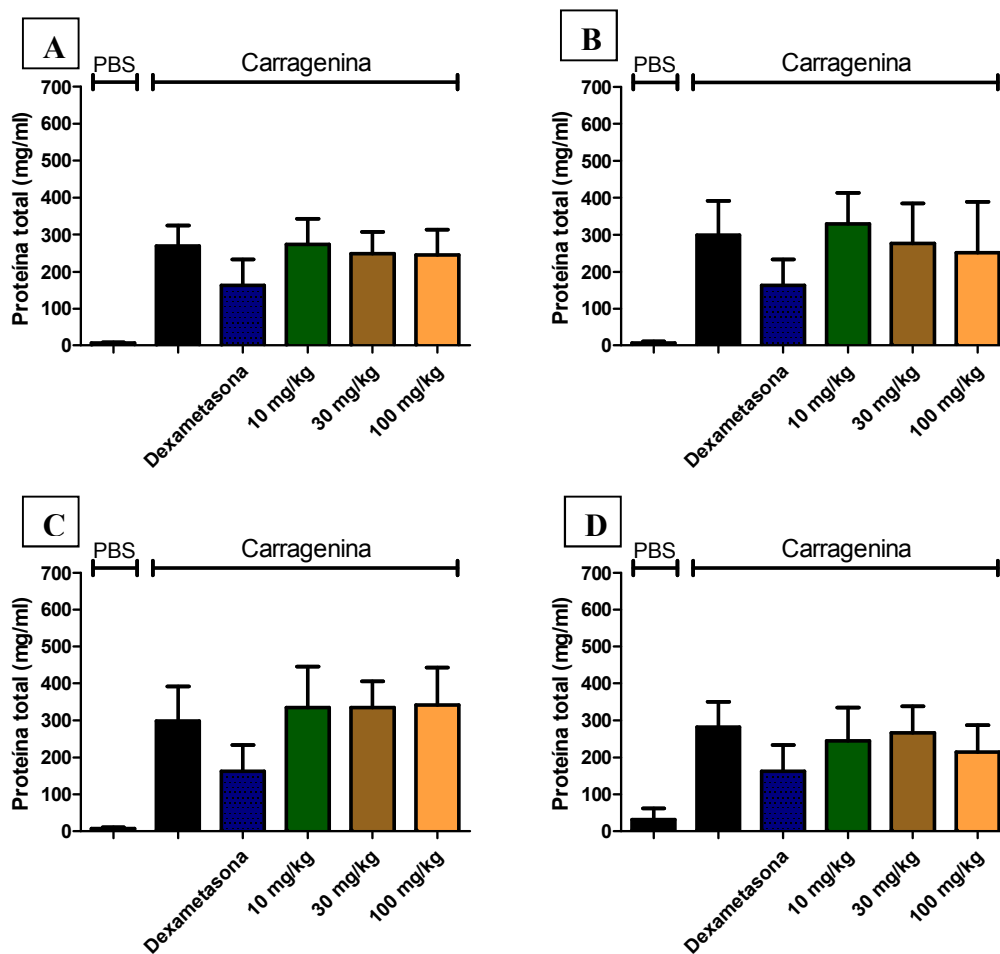


Gráfico 11: Efeito do EE (A), H (B), DCM (C) e AE (D) no extravasamento de proteínas plasmáticas induzida por carragenina na BAS. Os animais foram pré-tratados oralmente com veículo ou com o extrato etanólico e suas frações (10, 30 e 100 mg/kg), 60 min antes da injeção de carragenina na BAS ou pré-tratados i.p. com dexametasona (0,5 mg/kg) 1 hora antes da injeção de carragenina na BAS. Os resultados são expressos como média \pm d.p. da concentração de proteínas plasmáticas totais (mg/ml) (n=5-7).

5. Discussão

Neste trabalho nossos objetivos foram investigar as possíveis atividades antinociceptiva e anti-inflamatória do extrato etanólico e das frações em hexano, diclorometano e acetato de etila das folhas de *Tibouchina granulosa*.

A *T. granulosa* é uma árvore ornamental e o chá de suas folhas é usado na medicina veterinária popular para cicatrização de feridas de animais domésticos (observação pessoal; Fernandes, P.D.). A preparação do extrato bruto e suas frações foi realizada pelo nosso laboratório (LaFDI), assim como os testes farmacológicos realizados com as mesmas. As análises fitoquímicas e anatômicas das folhas, no entanto, foram executadas sob supervisão do prof. Fabio Boylan, no laboratório de farmacognosia da Escola de Farmácia e Ciências Farmacêuticas no Trinity College Dublin/Irlanda.

Para verificar se o extrato e as frações possuíam atividade analgésica central o primeiro modelo realizado neste trabalho foi o da placa quente. É comum utilizar o calor como estímulo nociceptivo em modelos de dor aguda. Os nociceptores são ativados diretamente pelo calor e seus mecanismos de ativação estão relacionados a uma atividade primária na medula espinhal, bem como a processamentos em regiões superiores do Sistema Nervoso Central (Le Bars e cols., 2001).

Os analgésicos opioides e outros fármacos com ação predominantemente central aumentam o tempo de permanência (tempo de latência) dos animais na placa quente, resultado interpretado como antinocicepção. A observação de que o extrato e as frações induziram aumento do tempo de latência dos animais na placa quente, sugere que estes análogos apresentam atividade antinociceptiva central, tendo as doses de 30 mg/kg, tanto do extrato etanólico quanto da fração em hexano, aumentado significativamente o tempo de latência, não somente em relação aos animais tratados com o veículo, mas também quando comparados aos animais tratados com a morfina. Este efeito pode ser

associado, ao menos em parte, à composição da fração em hexano, que como observamos após análise do CG/EM, possuía substâncias como α -amirina e β -amirina as quais já foram caracterizadas como agentes antinociceptivos tanto periférico, como espinhal e supraespinhal em roedores (Otuki e cols, 2005b).

Pensando em um possível mecanismo de ação analgésico do extrato e das frações, o modelo de nociceção neurogênico induzido pela capsaicina foi realizado. Estudos mostram que a nociceção induzida pela capsaicina ocorre através da ativação do receptor vaniloide TRPV1, que é um canal ionotrópico não seletivo a cátions, presentes em neurônios sensoriais primários (Caterina e cols., 1997; Palazzo e cols., 2002). A capsaicina é agente químico provocador de algesia que possui um importante papel no estudo do funcionamento das fibras aferentes sensoriais C e A δ , tendo em vista a sua ação nos nociceptores polimodais e termocetores (Pietrovski e cols., 2006). Ela provoca a liberação de neuropeptídios (substância P), aminoácidos excitatórios (glutamato), óxido nítrico (NO) e mediadores pró-inflamatórios em nervos periféricos, sendo esta informação nociceptiva transmitida para a medula espinhal (Szallasi e Blumberg, 1999).

O glutamato é o neurotransmissor mais relevante envolvido Na transmissão, desenvolvimento e manutenção da resposta nociceptiva, ele age através da ativação de iGluR ou mGluR, levando a excitação e sensibilização de nociceptores periféricos, centrais e supra-espinhais (Aanonsen e Wilcox, 1989; Budai e cols., 1995; Carlton, 2001). A injeção intraplantar de glutamato libera aminoácidos excitatórios, PGE2, NO e cininas (Beirith e cols., 2002; Sakurada e cols., 1992) e promove a ativação de fibras sensoriais, que juntos induzem a liberação de uma série de substâncias (opioides endógenos) no corno dorsal, o que também pode ativar receptores TRPV1 na medula espinhal (Julius e Basbaum, 2001; Millan, 1999).

O que se pôde observar quanto ao comportamento do EE e das frações testadas é que todos, em algum grau, apresentaram efeito antinociceptivo no modelo da lambadura de pata induzida pela capsaicina, sugerindo que o efeito antinociceptivo do extrato e das frações pode estar envolvido com os receptores TRPV1.

Em vista do que foi descrito, os resultados apresentados sugerem que o tratamento com o extrato e as frações obtidas também reduzem a resposta nociceptiva induzida pela injeção intraplantar de glutamato. Estes resultados indicam que o efeito antinociceptivo das substâncias envolve, ao menos em parte, o sistema glutamatérgico. Em conformidade com os resultados obtidos no modelo da nocicepção induzida por capsaicina, é possível que as substâncias estejam produzindo efeito antinociceptivo através da regulação de receptores TRPV1, e, portanto, contribuindo para a modulação da resposta nociceptiva.

A análise fitoquímica desse extrato e suas frações nos permitiu identificar substâncias que poderiam, pelo menos em parte, justificar as ações farmacológicas observadas. O objetivo da cromatografia é separar individualmente os diversos constituintes de uma mistura de substâncias seja para identificação, quantificação ou obtenção da substância pura para os mais diversos fins. Tal separação dá-se através da migração da amostra através de uma fase estacionária, no caso a sílica, por intermédio de um fluido (fase móvel). Após a introdução da amostra no sistema cromatográfico, os componentes da amostra se distribuem entre as duas fases e eluem mais lentamente que a fase móvel devido ao efeito retardatório da fase estacionária. O equilíbrio de distribuição determina a velocidade com a qual cada componente migra através do sistema (Argenton, A. 2010).

Os experimentos de cromatografia com fase gasosa acoplada a espectrometria de massas e de cromatografia líquida de alta eficiência mostram a presença de α e β amirina e do γ -sitosterol na fração em hexano, estigmasterol na fração em diclorometano, e também da hispidulina-7-O- β -D-glicosídeo na fração em acetato de etila. A identificação completa dessa última substância ainda está sendo realizada, porém, com isso, se sugere que a fração em acetato de etila contém uma grande quantidade de derivados fenólicos, notadamente pertencentes à classe dos flavonoides.

Para avaliar se o extrato e suas frações apresentavam efeito antinociceptivo periférico e/ou anti-inflamatório, o modelo da lambadura de pata induzida por formalina foi realizado. Foi demonstrado que a injeção de formalina pode ativar diretamente nociceptores presentes em axônios não mielinizados, como, por exemplo, fibras C, e pouco mielinizados, como as fibras A δ . Além disso, também é capaz de desgranular mastócitos, causando a liberação de histamina e heparina (Parada e cols., 2001). Esses mediadores, por sua vez, ativam os nociceptores, promovendo também a liberação de neuropeptídeos como substância P, neurocinina A, neurocinina B e CGRP, nos terminais periféricos dos aferentes primários (Santos e Calixto, 1997), assim como os aminoácidos excitatórios glutamato e aspartato (Omote e cols., 1998). Desta maneira, acredita-se que este conjunto de mediadores químicos parece ser o responsável pela nocicepção transitória observada nos primeiros cinco minutos após a injeção da formalina (Milano, 2008).

Malmberg e Yaksh (1995) descreveram que a injeção intraplantar de formalina causa um aumento significativo de glutamato e PGE₂ durante a segunda fase do processo doloroso. Portanto, o modelo da formalina é útil para detectar a dor do tipo não inflamatória e inflamatória, correspondendo a primeira e segunda fase, respectivamente.

Fármacos que causam analgesia apresentam atividade diversificada nos dois momentos do modelo da lambadura de pata induzida por formalina. Os opioides possuem ação central e inibem as duas fases. Por outro lado, fármacos com ação periférica, como os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) e glicocorticoides (AIEs), inibem somente a segunda fase (Hunskaar e cols., 1985; Hunskaar e Hole, 1987).

Os resultados deste modelo demonstraram que o extrato etanólico e as frações não foram capazes de diminuir o tempo que o animal permanecia lambendo a pata na primeira fase do experimento, sugerindo que não possuem atividade antinociceptiva periférica, logo, provavelmente não atuam em receptores opioides e/ou não intermedeiam a liberação de mediadores como serotonina, substância P, cininas, histamina e CGRP. No entanto, o extrato etanólico e as frações em hexano e diclorometano foram capazes de inibir significativamente a lambadura de pata dos animais na segunda fase do modelo, quando administradas na dose de 30 mg/kg, o que pode indicar uma inibição na formação e/ou liberação de mediadores pró-inflamatórios como citocinas, eicosanoides, cininas, glutamato e óxido nítrico (Chichorro e cols., 2004; Tassorelli e cols., 2006). Essa inibição pode ser associada à atividade das substâncias já descritas que compõem as frações, além de outras, visto que por serem extrato/frações reúnem outras substâncias que podem não ter sido caracterizadas nos experimentos realizados.

Como o extrato e algumas frações apresentaram efeito anti-inflamatório na segunda fase do modelo da lambadura de pata induzida pela formalina, decidimos realizar o modelo da migração celular para a bolsa de ar subcutânea (BAS), no intuito de avaliar se o extrato e as frações apresentavam alguma atividade neste modelo de

inflamação, que procura observar a transmigração de leucócitos para um sítio inflamado.

A BAS é um modelo de inflamação muito utilizado para a triagem de fármacos com potencial ação anti-inflamatória. Este modelo permite a avaliação de diversos parâmetros inflamatórios como, por exemplo, transmigração de leucócitos, análise de mediadores inflamatórios como citocinas, extravasamento de proteínas e produção de NO. A administração da carragenina na bolsa de ar subcutânea induz um processo inflamatório com características e curso da inflamação semelhantes ao observado na artrite reumatoide, com infiltração de leucócitos polimorfonucleares e liberação de mediadores pró-inflamatórios (Sedgwick e Lees., 1986).

Entre duas e quatro horas após a injeção da carragenina há intenso processo de rolamento de leucócitos e adesão celular. Seis horas após a injeção observa-se grande fluxo de neutrófilos e liberação de agentes quimiotáticos no sítio inflamatório (Secco e cols., 2004). Após 24 horas da injeção de carragenina ocorre o aumento de leucócitos do tipo polimorfonucleares, da atividade da enzima mieloperoxidase, aumento dos níveis dos metabólitos do NO (nitrito e nitrato), e da exsudação e liberação de citocinas pró-inflamatórias (Ferrandiz e cols., 1996; Saleh e cols., 1996; Fröde e Medeiros, 2001; Da Silva, e cols., 2004; Koo e cols., 2005).

Nossos resultados mostraram uma redução na migração leucocitária nos grupos pré-tratados com as frações. No entanto, o extrato etanólico não apresentou redução no número de leucócitos na BAS. Dentre as hipóteses que podem estar relacionadas à inibição da migração leucocitária observada nos animais tratados previamente com as frações podemos destacar a inibição da produção e/ou liberação de substâncias pró-inflamatórias relacionadas à quimiotaxia de leucócitos. Nos nossos experimentos o envolvimento de mediadores pró-inflamatórios e considerados quimiotáticos foi

estudado e podemos citar as citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IL-1 β e IFN- γ , assim como o NO.

É importante ressaltar que apesar de o extrato etanólico não ter apresentado redução na migração celular, nos testes subsequentes de quantificação de citocinas, o mesmo apresentou redução significativa na produção destes agentes pro-inflamatórios, sugerindo uma atividade anti-inflamatória no que diz respeito à inibição de algum(s) componente(s) das vias de sinalização das células em relação à produção das citocinas quantificadas.

De uma maneira geral, as frações em hexano e diclorometano não foram capazes de inibir a produção das citocinas, enquanto a fração em acetato, reduziu significativamente a produção de TNF- α e IFN- γ , mas não apresentou inibição significativa na redução da produção de IL-1 β .

Alguns estudos já demonstraram que o TNF- α é capaz de induzir a expressão de moléculas de adesão como: E-selectina, ICAM-1 e VCAM-1 em culturas de células endoteliais da microvasculatura pulmonar e dérmica humana (Jiang e cols., 2005).

Outro estudo que avaliou a expressão de algumas moléculas de adesão importantes para a firme adesão e diapedese dos leucócitos, utilizou combinações de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α , IL-1 β , e anti-inflamatórias, como IL-4 e IL-10 e constataram que essas citocinas formam uma rede complexa de comunicação, resultando em efeitos que não são determinados pela ação de uma única citocina, mas pela interrelação entre elas (Daxecker e cols., 2002). Dito isto, supõe-se que a atividade anti-inflamatória da fração em acetato de etila, a qual foi capaz de inibir a citocina TNF- α e a migração celular, pode estar associada à inibição de moléculas de adesão, via inibição de uma das citocinas responsável pela indução da produção destas moléculas, isto é, a fração pode estar atuando em um ou mais eventos celulares, inibindo

mediadores que estimulam a expressão de moléculas de adesão (como a citocina pró-inflamatória TNF- α) ou fatores de transcrição pró-inflamatórios como o NF- κ B.

O IFN- γ possui diversos efeitos imunoregulatórios, incluindo a ativação e estimulação de macrófagos a fim de que eles liberem espécies reativas de oxigênio, as quais são danosas para o organismo. Esta citocina aumenta a permeabilidade vascular, desempenhando assim um papel crucial no processo inflamatório que acompanha, por exemplo, as doenças neurodegenerativas. Outros efeitos do IFN- γ incluem a indução da produção de TNF- α e IL-1 e efeitos sinérgicos com a citocina TNF- α , especificamente, sobre a expressão de moléculas do sistema imunológico (Gately e cols., 1994). Portanto, o resultado apresentado pela fração em acetato de etila indica que além de inibir a citocina TNF- α , esta fração também é capaz de inibir a produção de IFN- γ , sugerindo um efeito anti-inflamatório sinérgico na diminuição de moléculas do sistema imunológico, ou até mesmo diminuindo a permeabilidade vascular na BAS.

Outro parâmetro analisado foi a produção de NO. Os efeitos desse mediador na resposta inflamatória são complexos e envolvem tanto quimiotaxia de leucócitos como aumento da permeabilidade vascular. Nossos resultados mostraram que o pré-tratamento oral com as frações foi capaz de inibir significativamente a produção de NO. Essa menor produção de NO pode ser consequência: 1) de um menor número de células que transmigraram para a BAS quando as frações foram administradas; 2) de no caso da administração por via oral da fração em acetato de etila, a mesma estar atuando na diminuição da produção de citocinas dentre outros mediadores, fato este demonstrado nos gráficos 7 e 9, nos quais a fração em questão foi capaz de inibir a produção de TNF- α e IFN- γ (Chichorro e cols., 2004; Tassorelli e cols., 2006) 3) da atividade da iNOS ou ainda, pode ser decorrente de alteração na expressão da enzima. No entanto, mais

experimentos se fazem necessários para comprovar a terceira hipótese, experimentos estes que mostrem a ação das frações sobre a expressão da iNOS.

Os mediadores inflamatórios liberados na BAS também são capazes de causar aumento na permeabilidade vascular (Aller e cols., 2006; Schmid-Schonbein, 2006). Sendo assim, o último parâmetro avaliado foi o extravasamento de proteínas plasmáticas. Entretanto, o extrato e as frações não foram capazes de reduzir a concentração de proteínas totais no exsudato inflamatório, sugerindo que o extrato e as frações não alteram o aumento de permeabilidade vascular gerado pelos mediadores que ainda se encontram no sítio inflamado.

Portanto, o efeito do extrato etanólico no que tange a diminuição da produção de citocinas; o efeito das frações em hexano e diclorometano na inibição da migração leucocitária, e modulação negativa na síntese de NO; e, por fim, a redução da migração de leucócitos somada a inibição da produção de citocinas e NO por parte da fração em acetato de etila, sugerem uma ação anti-inflamatória destes compostos. Os efeitos do EE e das frações H, DCM e AE podem estar associados à composição fitoquímica descrita, reforçando a atividade do flavonoide hispidulina, já que, a fração em acetato de etila aparenta ser a que melhor inibe o processo inflamatório, tanto pela via da modulação negativa da produção de mediadores pró-inflamatórios, como as citocinas TNF- α e IFN- γ e o NO, quanto pela diminuição da transmigração leucocitária para a BAS.

A fim de localizar a presença de substâncias fenólicas (como é o caso do flavonoide hispidulina-7-O-glicosídeo) nas folhas da *T.granulosa* estudos de anatomia vegetal foram realizados nesse trabalho. Além de substâncias fenólicas, pode-se observar também a presença de amido, tricomas e cristais de oxalato de cálcio, características anatômicas da espécie em estudo.

6. Conclusão

Levando em consideração os resultados obtidos com as análises fitoquímicas e farmacológicas para o extrato em etanol e as frações em hexano, diclorometano e acetato de etila de *T. granulosa*, pode-se concluir que:

- EE e as frações apresentaram efeito antinociceptivo central observado no modelo da placa quente.
- Este efeito antinociceptivo pode estar relacionado, ao menos em parte, aos receptores vanilóides (TRPV1), comprovado no modelo da lambadura de pata induzida pela capsaicina.
- O mecanismo de ação antinociceptivo também parece estar relacionado de forma direta ou indireta ao sistema glutamatérgico, visto que o extrato e as frações foram capazes de reduzir a lambadura de pata induzida pela injeção de glutamato.
- Todos os extratos testados apresentaram atividade anti-inflamatória, seja no modelo da formalina, como no modelo da migração celular, visto que EE, H e DCM inibiram o tempo de lambadura da pata induzida pela injeção de formalina na segunda fase do modelo e, além disso, as frações H, DCM e AE foram capazes de inibir a migração leucocitária no modelo da BAS, além de em algum grau terem inibido mediadores pró-inflamatórios. Assim como, o EE foi capaz de inibir todas as citocinas quantificadas neste trabalho.
- As substâncias isoladas e/ou identificadas em cada fração estudada estão intimamente associadas às atividades descritas neste trabalho. No entanto, mais experimentos farmacológicos serão necessários para que as atividades das frações possam ser completamente atribuídas às substâncias descritas.

7. Referências Bibliográficas

- AANONSEN, L.M., WILCOX, G.L. Muscimol, gamma-aminobutyric acid A receptors and excitatory aminoacids in the mouse spinal cord. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 248: 1034–1038. 1989.
- AGGARWAL, B.B.; SHISHODIA, S.; SANDUR, S.K.; PANDEY, M.K.; SETHI, G. *Inflammation and cancer: How hot is the link?* **Biochemical Pharmacology.** 72: 1605-1621. 2006.
- ALWANI, M. E.; WU, B.X.; OBEID, L.M.; HANNUN, Y.A. Bioactive sphingolipids in the modulation of the inflammatory response. **Pharmacol. Ther.** 112:171–183. 2006.
- ALLER, M.A.; ARIAS, J.L.; ARIAS, J.I.; SÁNCHEZ-PATÁN, F.; ARIAS, J. The inflammatory response: an efficient way of life. **Med. Sci. Monit.** 12:225-234. 2006.
- ARGENTON, A. *Conceitos fundamentais de Cromatografia a líquido de Alto Desempenho (HPLC).* **Minicurso CRQ-IV.** 2010.
- BALAMURUGAN, R.; DURAIANDIYAN, V.; IGNACIMUTHU, S. *Antidiabetic activity of γ sitosterol isolated from *Lippia nodiflora* L. in streptozotocin induced diabetic rats.* **European Journal of Pharmacology.** 667: 410-118. 2011.
- BANDEIRA, P.N.; LEMOS, T.L.G.; COSTA, S.M.O.; SANTOS, H.S. *Obtention of derivatives from α -and β -amyrin triterpenoid mixture: ^{13}C NMR data.* **Revs. Bras. Farmacogn.** 17(2): 204-208. 2007.
- BARKHAUSEN, T.; KRETTEK, C.; GRIENSVEN, M. *L-selectin: Adhesion, signalling and its importance in pathologic posttraumatic endotoxemia and non-septic inflammation.* **Experimental and Toxicologic Pathology.** 57: 39-52. 2005.
- BASBAUM, A.I.; BAUTISTA, D.M.; SCHERRER, G.; JULIUS, D. *Cellular and molecular mechanisms of pain.* **Cell.** 139:267-284. 2009.
- BEIRITH, A.; SANTOS, A.R.S.; CALIXTO, J.B. *Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw.* **Brain Res.** 924: 219-228. 2002.
- BERTOLINI, A.; OTTANI, A.; SANDRINI, M. *Selective COX-2 inhibitors and dual acting anti-inflammatory drugs: critical remarks.* **Curr. Med. Chem.** 9:1033-1043. 2002.
- BOBBIO, F.O.; BOBBIO, P.A.; DEGÁSPARI, C.H. *Antocyanins from *Tibouchina grandiflora*.* **Food Chemistry.** 18: 153-159. 1985.
- BOTTING, R.M. *Cyclooxygenase: Past, present and future.* **J. Therm. Biol.** 31: 208-219. 2006.
- BROOKS, J.; TRACEY, I. *From nociception to pain perception: imaging the spinal and supraspinal pathways.* **J. Anat.** 207:19-33. 2005.

- BUDAI, D. , WILCOX, G.L., LARSON, A.A. *Effects of nitric oxide availability on responses of spinal wide dynamic range neurons to excitatory aminoacids.* **Eur. J. Pharmacol.** 278: 39–47. 1995.
- BURIAN, M.; GEISSLINGER, G. *COX-dependent mechanisms involved in the antinociceptive action of NSAIDs at central and peripheral sites.* **Pharm. Ther.** 107: 139-154. 2005.
- CARLTON, S.M. *Peripheral excitatory aminoacids.* **Curr. Opin. Pharmacol.** 1: 52–56. 2001.
- CATERINA, M.J.; SCHUMACHER, M.A.; TOMINAGA, M.; ROSEN, T.A.; LEVINE, J.D.; JULIUS, D. *The capsaicin receptor, a heat-activated ion channel in the pain pathway.* **Nature.** 39:819-824. 1997.
- CESARE, P.; McNAUGHTON, P. *A novel heat-activated current in nociceptive neurons and its sensitization by bradykinin.* **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 93: 15435-15439. 1996.
- CHANDRASEKHARAN, N.V.; DAI, H.; EVANSON, N.K.; TOMSIK, J.; ELTON, T.S.; SIMMONS, D.L. *COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression.* **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 99: 13929-13931. 2002
- CHICCA, A.; MARAZZI, J.; GERTSCH, J. *The antinociceptive triterpene beta-amyrin inhibits 2-arachidonoylglycerol (2-AG) hydrolysis without directly targeting CB receptors.* **British Journal of Pharmacology.** 167: 1596–1608. 2012.
- CHICHORRO, J.G.; LORENZETTI, B.B.; ZAMPRONIO, A.R. *Involvement of bradykinin, cytokines, sympathetic amines and prostaglandins in formalin-induced orofacial nociception in rats.* **Br. J. Pharmacol.** 141:1175-1184. 2004.
- CLARK, J.M. *Uptake of colloidal thorium dioxide by the mouse connective tissue mast cell.* **Tex. Rep. Biol. Med.** 33:397-406. 1975.
- COOK, N.C. *Flavonoids – chemistry, metabolism, cardioprotective effects, and dietary sources.* **Nutr Biochem.** 7: 66-76, 1996.
- COUTURE, R.; HARRISON, M.; VIANNA, R.M.; COUTIER, F. *Kinin receptors in pain and inflammation.* **Eur. J. Pharmacol.** 429:161-176. 2001.
- CRAGG, G.M. *Natural products: A continuing source of novel drug leads.* **Biochimica et Biophysica Acta.** 1830: 670-695. 2013.
- DAXECKER, H.; RAAB, M.; MARKOVIC, S.; KARIMI, A.; ANDREA, G.; MUELLER, M.M. *Endothelial adhesion molecule expression in an in vitro model of inflammation.* **Clin. Chim. Acta** 325:171-175. 2002.

Da SILVA, M.B.; FARGES, R.C.; FRÖDE, T.S. *Involvement of steroids in anti-inflammatory effects of PK11195 in a murine model of pleurisy.* **Mediators. Inflamm.** 13:93-103. 2004.

Da SILVA, K.A.; PASZCUK, A.F.; PASSOS, G.F.; SILVA, E.S.; BENTO, A.F.; MEOTTI, F.C.; CALIXTO, J.B. *Activation of cannabinoid receptors by the pentacyclic triterpene alpha,beta-amyrin inhibits inflammatory and neuropathic persistent pain in mice.* **Pain.** 152: 1872–1887. 2011.

DIAS, D.A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. *A historical overview of natural Products in drug discovery.* 2: 303-336. 2012

D'MELLO, R.; DICKENSON, H. *Spinal cord mechanisms of pain.* **Br. J. Anaesth.** 101:8-16. 2008.

ELIIS, K.M.; FOZARD, J.R. *Species differences in bradykinin receptor-mediated responses of the airways.* **Auton. Autacoid Pharmacol.** 22:3-16. 2002.

ENDRES-BECKER, J; HEPPENSTALL, P.A; MOUSA, S. DOMINIKA, L.; OKSCHE,A.; SCHAFER, M.; STEIN, C.; ZOLLNER, C. *μ -receptor activation modulates TRPV1 currents in sensory neurons in a model of inflammatory pain.* **Mol. Pharmacol.** 71:12-18. 2007.

FERRÁNDIZ, M.L.; BUSTUS, G.; PAYÁ, M.; GUNASEGARAN, R.; ALCARAZ, M.J. *Hispidulin protection against hepatotoxicity induced by bromobenzene in mice.* **Pharmacology Letters.** 55(8): 145-150. 1994.

FERRANDIZ, M.L.; GIL, B.; SANZ, M.L.; UBEDA, A.; GONZALEZ, E.; NEGRETE, R.; PACHECO, S.; PAYÁ, M.; ALCARAZ, M.J. *Effect of bakuchiol on leukocytes function and some inflammatory responses in mice.* **J. Pharm. Pharmacol.** 48: 975-980. 1996.

FRANCIS, F.J; DRAETTA, I.; BALDINI, V.; IADEROZA, M. *New anthocyanins from Tibouchina granulosa.* **J. Amer. Soc. Hort. Sci.** 107(5): 789. 1982.

FRÖDE, T.S.; MEDEIROS, Y.S. *Myeloperoxidase and adenosine-deaminase levels in the pleural fluid leakage induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy.* **Mediators Inflamm.** 10: 223-227. 2001.

GABAY, O.; SANCHEZ, C.; SALVAT, C.; CHEVY, F.; BRETON, M.; NOURISSAT, G.; WOLF, C.; JACQUES, C.; BERENBAUM, F. *Stigmasterol: a phytosterol with potential anti-osteoarthritic properties.* **Osteoarthritis and Cartilage.** 18: 106-116. 2010.

GAO, H.; XIE, J.; HAN, Y.; JIAN, Q.; HAN, M.; WANG, C. *Hispidulin inhibits proliferation and enhances chemosensitivity of gallbladder cancer cells by targeting HIF-1 α .* **Experimental Cell Research.** 2014.

GATELY, M.K.; WARRIER, R.R.; HONASOGE, S.; CARVAJAL, D.M.; FABERTY, D.A.; CONNANGHTON, S.E.; ANDERSON, T.D.; SARMIENTO, U.; HUBBARD,

- B.R. MURPHY, M. *Administration of recombinant IL-12 to normal mice enhances cytolytic lymphocyte activity and induces production of interferon gamma in vivo.* **Int. Immunol.** 6: 157–167. 1994.
- GEREAU IV, R.W.; SLUKA, K.A.; MAIXNER, W.; SAVAGE, S.R.; PRICE, T.J.; MURINSON, B.B.; SULLIVAN, M.D.; FILLINGIN, R.B. *A pain research agenda for the 21st Century.* **The Journal of Pain.** 15: 1203-1214. 2014.
- GOMES, N.M.; REZENDE, C.M.; FONTES, S.P.; MATHEUS, M.E., FERNANDES, P.D. *Antinociceptive activity of Amazonian Copaiba oils.* **J. Ethnopharmacol.** 109: 486–492. 2007.
- GORDON, A.; SHADOW, B.; QUIJANO, C.E.; Marx, F. *Chemical characterization and antioxidant capacity of berries from Clidemia rubra (Aubl.) Mart. (Melastomataceae).* **Food Research International.** 44: 2120-2127. 2011.
- GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHONK, J.S.; TANNENBAUN, S.R. *Analysis of nitrate, nitrite and [15N] nitrate in biological fluids.* **Anal. Biochem.** 126: 131-138. 1982.
- HAEGGSTROM, J.Z.; FUNK, C.D. *Lipoxygenase and leucotriene pathways: biochemistry, biology, and roles in disease.* **Chem. Rev.** 12: 5866-5898. 2011.
- HAMILTON, J.A. *GM-CSF in inflammation and autoimmunity.* **Trends Immunol.** 23: 403-408. 2002.
- HANAFY, K.; A., KRUMENACKER.; J. S.; MURAD, F. *NO, nitrotyrosine, and cyclic GMP in signal transduction.* **Med. Sci. Monit.** 7: 801–819. 2001.
- HORI, T.; OKA, T.; HOSOI, M.; AOU, S. *Pain modulatory actions of cytokines and prostaglandin E2 in the brain .* **Ann. N. Y. Acad. Sci.** 840:269-281. 1998.
- HUNSKAAR, S.; FASMER, O.B.; HOLE, K. *Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesia.* **J.Neurosci. Methods.** 14:69-76. 1985.
- HUNSKAAR, S.; HOLE, K. *The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain.* **Pain.** 30:103-114.1987.
- IASP. *Classification of chronic pain. Descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. Prepared by the International association for the Study of Pain (IASP), Subcommittee on Taxonomy.* **Pain.** 1986. 3:216-226.
- IGNARO, L. J.; NAPOLI, C.; LOSCALZO, J. *Nitric oxide donors and cardiovascular agents modulating the bioactivity of nitric oxide.* **Circ. Res.** 90:21–28. 2002.
- ISHII, K.; MOTOYOSHI, S.; KAWATA, J.; NAKAGAWA, H.; TAKEYAMA, K. *A useful method for differential evaluation of anti-inflammatory effects due to cyclooxygenase and 5-lipoxygenase inhibitors in mice.* **Jpn. J. Pharmacol.** 65: 297-303. 1994.

IWASHINA, T.; KAMENSONO, K.; UENO, T. *Hispidulin and nepetin 4'-glucosides from Cirsium olivophyllum*. **Phytochemistry**. 51: 1109-1111. 1999.

JANCSO, G. *Selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurones induced by capsaicin: glial changes*. **Cell Tissue Res**. 195:145-152. 1978.

JIANG, Y.; XU, J.; WU, Z.; ZHONG, S.; LIU, J.; LUO, W.; CHEN, T.; QIN, Q.; DENG, P. *Characterization of cytokine/chemokine profiles of severe acute respiratory syndrome*. **Am. J. Resp. Crit. Care Med**. 171:850-857. 2005.

JOLY, A.B. *Introdução a taxonomia vegetal*. **Ed. Nacional, São Paulo**. 11: 510-512. 1993.

JU, G.; HOKFELT, T.; BRODIN, E.; FAHRENKRUG, J.; FISCHER, J.A.; FREY, P.; ELDE, R.P.; BROWN, J.C. *Primary sensory neurons of the rat showing calcitonin gene-related peptide immunoreactivity and their relation to substance P-, somatostatin-, galanin-, vasoactive intestinal polypeptide- and cholecystokinin-immunoreactive ganglion cells*. **Cell Tissue Res**. 247: 417-431. 1987.

JULIUS, D.; BASBAUM, A.I. *Molecular mechanisms of nociception*. **Nature**. 413: 203-210. 2001.

JUTEL, M.; AKDIS, M.; AKDIS, C. A. *Histamine, histamine receptors and their role in immune pathology*. **Clin. Exp. Allergy**. 39: 1786-800. 2009.

KAWABATA, A. *Prostaglandin E2 and pain – an Update*. **Biol. Pharm. Bull**. 34: 1170-1173. 2011.

KELLY, M.; HWANG, J.M.; KUBES, P. *Modulating leukocyte recruitment in inflammation*. **J. Allergy and Clin. Immunol**. 120:3-10. 2007.

KHAN, A.A.; IADAROLA, M.; YANG, H.Y.T.; DIONNE, R.A. *Expression of COX-1 and COX-2 in a clinical model of acute inflammation*. **J. Pain**. 8: 349-354. 2007.

KHASABOV, S.G; ROGERS, S.D; GHILARDI, J.R; PETERS, C.M; MANTYH, P.W; SIMONE D.A. *Spinal neurons that possess the substance P receptor are required for the development of central sensitization*. **J. Neurosci**. 22:9086-9098. 2002.

KOO, H.J.; LIM, K.H.; JUNG, H.J.; PARK, E.H. *Anti-inflammatory evaluation of gardenia extract, geniposide and genipin*. **J. Ethnopharmacol**. 2005.

KOLACZKOWSKA, E.; SCISLOWSKA-CZARNECKA, A.; CHADZINSKA, M.; PLYTYCZ, B.; ROOIJEN, N.V.; OPDENAKKER, G.; ARNOLD, B. *Enhanced early vascular permeability in gelatinase b (MMP-9)-deficient mice: putative contribution of cox-1-derived PGE2 of macrophage origin*. **Journal of Leukocyte Biology**. 80: 125-132. 2006.

KNEKT, P.; JARVINEN, R.; REUNANEM, A.; MAATELA, J. *Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study*. **BMJ**. 312: 478-481. 1996.

- KWEIFIO-OKAI, G.; DE MUNK, F.; RUMBLE, B.A.; MACRIDES, T.A.; CROPLEY, M. *Antiarthritic mechanisms of amyirin triterpenes*. **Res. Commun. Mol. Pathol. Pharmacol.** 85: 45–55. 1994.
- LAWRENCE, T.; WILLOUGHBY, D.A.; GILROY, D.W. *Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation*. **Nat. Rev. Immunol.** 2: 787-795. 2002.
- LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S.W. *Animal models of nociception*. **Pharmacol. Rev.** 53: 597-652. 2001.
- LIN, T.Y.; LU, C.W.; WANG, C.C.; LU, J.F.; WANG, S.J. *Hispidulin inhibits the release of glutamate in rat cerebrocortical nerve terminals*. **Toxicology and Applied Pharmacology.** 263: 233-243. 2012.
- LOESER, J.D.; MELZACK, R. *Pain: an overview*. **Lancet.** 353:1607-1609. 1999.
- LOWRY, J.B. *Anthocyanins of the Melastomatacea, Myrtaceae and some allied families*. **Phytochemistry.** 15: 513-516. 1975.
- MAJNO, G.; JORIS, I. *Inflammation: The actors and their language*. In: *Cells, tissues and disease: Principles of general pathology*. MAJNO, G.; JORIS. Nova York: **Oxford University Press.** 307-382. 2004.
- MALMBERG, A.B.; YAKSH, T.L. *Cyclooxygenase inhibition and the spinal release of prostaglandin E2 and amino acids evoked by paw formalin injection: a microdialysis study in unanesthetized rats*. **J. Neurosci.**15:2768-2776. 1995.
- MARCEAU, F.; REGOLI, D. *Bradykinin receptor ligands: therapeutic perspectives*. **Nat. Rev. Drug Discov.** 3: 845-852. 2004.
- MATHEUS, M.E., BERRONDO, L.F., VIEITAS, E.C., MENEZES, F.S., FERNANDES, P.D. *Evaluation of the antinociceptive properties from Brillantaisia palisotii Lindau stems extracts*. **Journal of Ethnopharmacology.** 102: 377–381. 2005.
- MARCON, R.; LUIZ, A.P.; WERNER, M.F.; FREITAS, C.S; BAGGIO, C.H.; NASCIMENTO, F.P.; SOLDI, C.; PIZZOLATTI, M.G; SANTOS, A.R. *Evidence of TRPV1 receptor and PKC signaling pathway in the antinociceptive effect of amyirin octanoate*. **Brain Res.** 1295: 76–88. 2009.
- MARTINS, R.T.; ALMEIDA, D.B.; MONTEIRO, F.M.R.; KOWACS, P.A.; RAMINA, R. *Opioid receptors to date*. **Rev. Dor.** 13(1): 75-79. 2012.
- MARTÍNEZ, F.S.; GONZÁLEX, G.J.; CULEBRAS, J.M.; TUÑÓN, M.J. *Los flavonoids: propiedades y acciones antioxidantes*. **Nutr. Hosp.** 17(6): 271-278. 2002.
- MEAGER, A. *Cytokine regulation of cellular adhesion molecule expression in inflammation*. **Cytokine & Growth Factor Reviews.** 10: 27-39. 1999.

- MEDEIROS, R.; OTUKI, M.F.; AVELLAR, M.C.; CALIXTO, J.B. *Mechanisms underlying the inhibitory actions of the pentacyclic triterpene alpha-amyrin in the mouse skin inflammation induced by phorbol ester 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate*. **European Journal of Pharmacology**. 559: 227–235. 2007.
- MEDVEDEVA, Y.V.; KIM, M.S.; USACHEV, Y.M. *Mechanisms of prolonged presynaptic Ca²⁺ signaling and glutamate release induced by TRPV1 activation in rat sensory neurons*. **J. Neurosci**. 28: 5295–5311. 2008.
- MILANO, J. Avaliação do Potencial Antinociceptivo de 5-trialometil-4,5-diidro-1h-pirazol metil Ésteres Inéditos em Camundongos. **Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Maria**. 2008.
- MILLAN, M. J. *The induction of pain: an integrative review*. **Progress Neurobiol**. 57:1-164. 1999.
- MITCHELL, R.N., COTRAN, R.S. *Acute and Chronic Inflammation*. **In: Basic Pathology**. ROBBINS, S.L.; KUMAR, V.; COTRAN, R. Eds. Pennsylvania: Saunders. 8th edition. 33-59. 2010.
- MONCADA, S.; PALMER, R.M. J.; HIGGS, E.A. *Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology*. **Pharmacol. Rev.** 43:109-142. 1991.
- MONCADA, S. HIGGS, E.A. *Molecular mechanisms and therapeutic strategies related to nitric oxide*. **Faseb J**. 9: 1319-1330. 1995.
- MURUGAN, R.; PARIMELAZHAGAN, T. *Study of anti-nociceptive, anti-inflammatory properties and phytochemical profiles of Osbeckia parvifolia Arn. (Melastomataceae)*. **Industrial Crops and Products**. 51: 360-369. 2013.
- NEEDLEMAN, P.; ISAKSON, P.C. *The discovery and function of COX-2*. **J Rheumatol**. 24: 6–8. 1997.
- NEPAL, M.; CHOI, H.J.; CHOI, B.Y.; YANG, M.S.; CHAE, J.; LI, L.; SOH, Y. *Hispidulin attenuates bone resorption and osteoclastogenesis via the RANKL-induced NF-κB and NFATc1 pathways*. **European Journal of Pharmacology**. 715: 96-104. 2013.
- NIEVES, D.; MORENO, J. J. *Role of 5-lipoxygenase pathway in the regulation of RAW 264.7 macrophage proliferation*. **Biochem. Pharmacol**. 72: 1022-1030. 2006.
- NOURSHARGH, S.; MARELLI-BERG, F. M. *Transmigration through venular walls: a key regulator of leukocyte phenotype and function*. **Trends Immunol**. 26: 158-165. 2005.
- OKUDAIRA, M.; SCHWARZ, J. *Histoplasma capsulatum infection in rat air pouch*. **Arch. Pathol**. 74: 239-243, 1962.

- OLIVEIRA, F. A.; VIEIRA-JUNIOR, H. M.; CHAVES, M. H.; ALMEIDA, F. R. C.; FLORÊNCIO, M. G.; LIMA-JUNIOR, R. C. P.; SILVA, R. M.; SANTOS, F. A.; RAO, V. S. N. *Gastroprotective and anti-inflammatory effects of resin from Protium heptaphyllum in mice and rats*. **Pharmacol. Res.** 49: 105-111. 2004.
- OLIVEIRA, F.A.; LIMA-JUNIOR, R.C.; CORDEIRO, W.M.; VIEIRA-JUNIOR, G.M.; CHAVES, M.H.; ALMEIDA, F.R.; SILVA, R.M.; SANTOS, F.A.; RAO, V.S. *Pentacyclic triterpenoids, alpha, beta-amyrins, suppress the scratching behavior in a mouse model of pruritus*. **Pharmacol. Biochem. Behav.** 78: 719–725. 2004a.
- OLIVEIRA, F.A.; VIEIRA-JUNIOR, G.M.; CHAVES, M.H.; ALMEIDA, F.R.; SANTOS, K.A.; MARTINS, F.S.; SILVA, R.M.; SANTOS, F.A.; RAO, V.S. *Gastroprotective effect of the mixture of alpha- and beta-amyrin from Protium heptaphyllum: role of capsaicin sensitive primary afferent neurons*. **Planta Med.** 70: 780–782. 2004b.
- OLIVEIRA, F.A., CHAVES, M.H., ALMEIDA, F.R., LIMA-JUNIOR, R.C., SILVA, R.M., MAIA, J.L., BRITO, G.A., SANTOS, F.A., RAO, V.S. *Protective effect of alpha- and beta-amyrin, a triterpene mixture from Protium heptaphyllum (Aubl.) March. trunk wood resin, against acetaminophen-induced liver injury in mice*. **Journal of Ethnopharmacology.** 98: 103–108. 2005.
- OMOIGUI, S. *The biochemical origin of pain – Proposing a new law of pain: The origin of all pain is inflammation and the inflammatory response*. **Medical Hypotheses.** 69: 70-82. 2007.
- OMOTE, K.; KAWAMATA, T.; NAMIKI, A. *Formalin-induced release of excitatory amino acids in the skin of the rat hindpaw*. **Brain Res.** 787: 161-164. 1998.
- OSTLUND, R. *Phytosterols in human nutrition*. **Annual Review of Nutrition.** 22: 533–549. 2002.
- OTUKI, M.F.; VIEIRA-LIMA, F.; MALHEIROS, A.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. *Topical antiinflammatory effects of the ether extract from Protium kleinii and alpha-amyrin pentacyclic triterpene*. **Eur. J. Pharmacol.** 507: 253–259. 2005a.
- OTUKI, M.F.; FERREIRA, J.; LIMA, F.V.; MEYRE-SILVA, C.; MALHEIROS, A.; MULLER, L.A.; CANI, G.S.; SANTOS, A.R.; YUNES, R.A.; CALIXTO, J.B. *Antinociceptive properties of mixture of alpha-amyrin and beta-amyrin triterpenes: evidence for participation of protein kinase C and protein kinase A pathways*. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** 313: 310-318. 2005b.
- PAL, D.; VERMA, P. *Flavonoids: A powerful and abundant source of antioxidants*. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.** 293: 95-98. 2013.
- PALAZZO, E.; NOVELLIS, V.; MARABESE, I.; CUOMO, D. *Interaction between vaniloid and glutamate receptors in the central modulation of nociception*. **Eur. J. Pharmacol.** 439:69-75. 2002.

PARADA, S.A.; TAMBELI, C.H.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. *The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced nociception.* **Neuroscience.** 4: 937-944. 2001.

PETTERSEN, C.A.; ADLER, K.B. *Airways inflammation and COPD: Epithelial neutrophil interactions.* **Chest.** 121:142-150. 2002.

PIETROVSKI, E.F.; ROSA, K.A.; FACUNDO, V.A.; RIOS, K.; MARQUES, M.C.A.; SANTOS, A.R. *Antinociceptive properties of the ethanolic extract and of the titerpene 3 β , 6 β , 16 β – trihidroxilup-20 (29)-ene obtained from the flowers of *Combretum Leprosum* in mice.* **Pharmacol. Biochem. Behavior.** 38:90-99. 2006.

QIN, N.; ZHANG, S.P.; REITZ, T.L. MEI, J.M.; FLORES, C.M. *Cloning, expression, and functional characterization of human cyclooxygenase-1 splincing variants: evidence for intron 1 retention.* **J.Pharmacol. Exp. Ther.** 315: 1298-1305. 2005.

RANKIN, J. A. *Biological mediators of acute inflammation.* **AACN Clinical.** 15: 3-17. 2004.

RAYMUNDO, L.J.R.P.; GUILHON, C.C.; ALVIANO, D.S.; MATHEUS, M.E.; ANTONIOLLI, A.R.; CAVALCANTI, S.C.H.; ALVES, P.B.; ALVIANO, C.S.; FERNANDES, P.D. *Characterisation of the anti-inflammatory and antinociceptive activities of the *Hypis pectinata* (L.) Poit essential oil.* **J. Ethnopharmacol.** 134: 725-732. 2011.

RECIO, M.C.; GINER; R.M.; MANEZ, S.; RIOS, J.L. *Structural requirements for the antiinflammatory activity of natural triterpenoids.* **Planta Med.** 61: 182–185. 1995.

REN, K.; TORRES, R. *Role of interleukin 1 β during pain and inflammation.* **Brain Res. Rev.** 60: 57-64. 2009.

REUTOV. V. P.; SOROKINA, E. G. *NO-syntase and nitric-redutase components of nitric oxide cycle.* **Biochemistry.** 7:874-884. 1998.

RINALDO-MATTHIS, A.; HAEGGSTRÖM, J. Z. *Structures and mechanisms of enzymes in the leukotriene cascade.* **Biochimie.** 92: 676-681. 2010.

ROGER, A.; NICOLL, M.D. *Introdução à farmacologia dos fármacos que agem no SNC em Farmacologia Básica e Clínica.* **Katzung, B.G. McGrawHill e Artmed.** Porto Alegre, pp. 297-308. 2010.

ROMANO, M.; FAGGIONI, R.; SIRONI, M.; SACCO,S.; ECHTENACHER, B.; Di SANTO, E.; SALMONA, M.; GHEZZI, P. *Carrageenan-induced acute inflammation in the mouse air pouch synovial model. Role of tumor necrosis factor.* **Mediators Inflamm.** 6: 32-38. 1997.

ROSSI, A.; CUZZOCREA, S.; MAZZON, E.; SERRAINO, I.; DE SARRO, A.; DUGO, L.; FELICE, M.R.; DE LOO, F.A.J.V.; DI ROSA, M.; MUSCI, G.; CAPUTI, A.P.; SAUTEBIN, L. *Regulation of prostaglandin generation in carrageenan-induced*

pleurisy by inducible nitric oxide synthase in knockout mice. Life Sci. 72: 1199-1208. 2003.

SADASIVAM, K.; KUMARESAN, R. *Theoretical investigation on the antioxidant behavior of chrysoeriol and hispidulin flavonoid compounds – A DFT study. Computational and Theoretical Chemistry.* 963: 227-235. 2010.

SAHLEY, T.L.; BERNTSON, G.G. *Antinociceptive effects of central and systemic administration of nicotine in the rat. Psychopharmacol.* 65: 279-283. 1979.

SALEH, T.S.; CALIXTO, J.B.; MEDEIROS, Y.S. *Anti-inflammatory effects of theophylline, cromolyn and salbutamol in a murine model of pleurisy. Br. J. Pharmacol.* 118: 811-819. 1996.

SANTOS, A.R.S.; CALIXTO, J.B. *Further evidence for the involvement of tachykinin receptor subtypes in formalin and capsaicin models of pain in mice. Neuropeptides.* 31: 381-389. 1997.

SASAKAWA, T.; SASAKAWA, Y.; MASUNAGA, T.; FUJITSU, T.; HIRAYAMA, Y.; OHKUBO, Y.; MUTOH, S. *FK506 suppresses E-selectin, ICAM-1 and VCAM-1 expression on vascular endothelial cells by inhibiting tumor necrosis factor a secretion from peripheral blood mononuclear cells. Cytokine.* 29: 67-71. 2005.

SAKURADA, T.; KATSUMATA, K.; TAN-NO K.; SAKURADA, S.; KISARA, K. *The capsaicin test in mice for evaluating tachykinin antagonists in the spinal cord. Neuropharmacology* 31: 1279–1285. 1992.

SCHMID-SCHONBEIN, G.W. *Analysis of inflammation. Anu. Rev. Biomed. Eng.* 8: 93-151. 2006.

SECCO, D.D.; PARON, J.A.; DE OLIVEIRA, S.H.P.; FERREIRA, S.H. *Neutrophil migration in inflammation: nitric oxide inhibits rolling, adhesion and induces apoptosis. Nitric Oxide.* 9:153-164.2004.

SEDGWICK, A. D.; LEES, P. *Studies of eicosanoid production in the air pouch model of synovial inflammation. Agents Actions.* 18: 439-446. 1986.

SETA, N.; KUWANA, M. *Human circulating monocytes as multipotential progenitors. The Keio J. Med.* 56:41-47. 2007.

SIMS, J. E.; SMITH, D. E. *The IL-1 family: regulators of immunity. Nat. Rev. Immunol.* 10:89-102. 2010.

SINGH, A. *Sitosterol as an antioxidant in frying oils. Food Chemistry.* 137: 62-67. 2012.

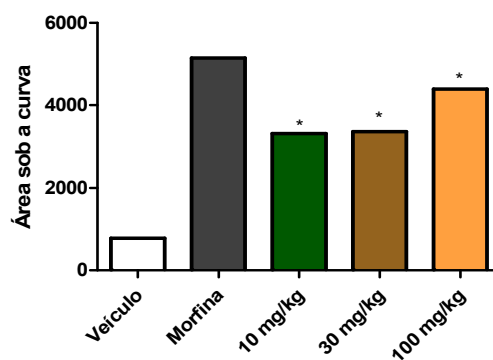
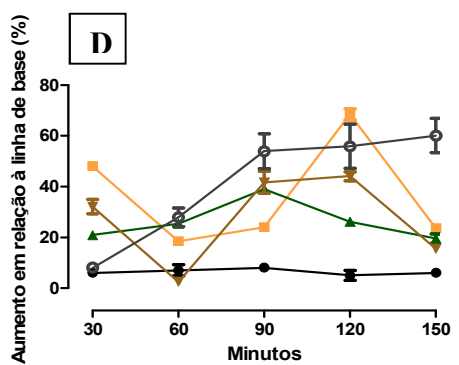
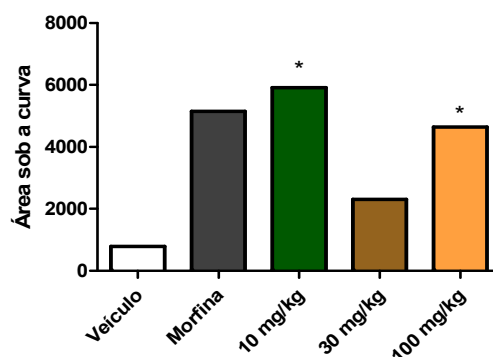
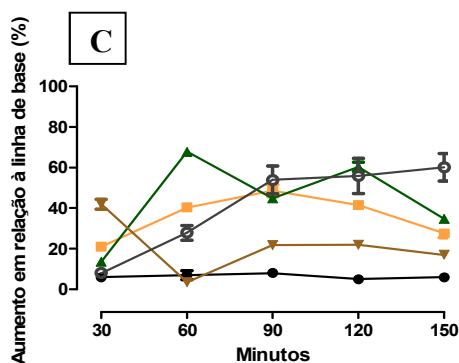
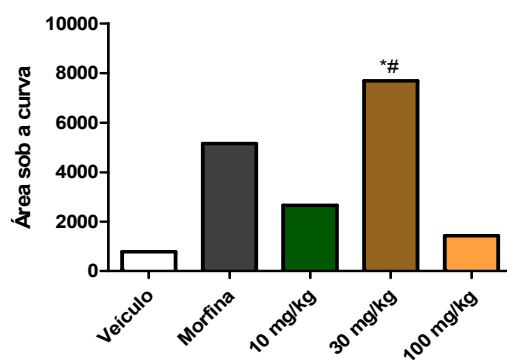
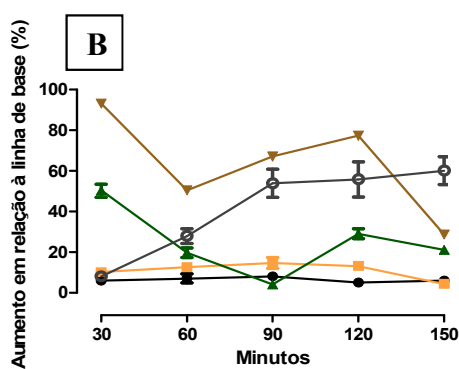
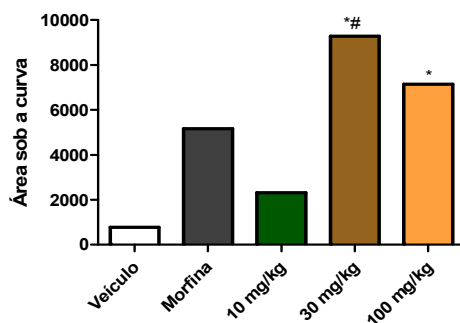
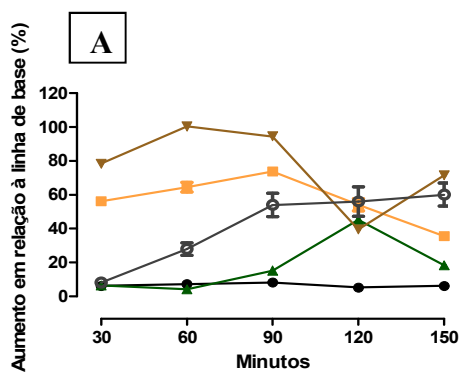
SOMMER, C.; KRESS, M. *Recent findings on how proinflammatory cytokines cause pain: peripheral mechanisms in inflammatory and neuropathic hyperalgesia. Neurosci. Lett.* 361: 184-187. 2004.

- SORKIN, L.S., WALLACE, M.S. *Acute pain mechanisms*. **Surg. Clin. North. Am.** 79:213-229. 1999.
- SPAHN, V.; FISHER, O.; ENDRES-BECKER, J.; SCHAFER, M.; STEIN, C.; ZOLLNER, C. *Opioid withdrawal increases transient receptor potential vanilloid 1 activity in a protein kinase A-dependent manner*. **Pain.** 154: 598-608. 2012.
- STABLES, M.J.; GILROY, D.W. *Old and new generation lipid mediators in acute inflammation and resolution*. **Prog Lipid Res.**1: 35-51. 2011.
- STEIN, C.; SCHÄFER, M.; MACHELSKA, H. *Attacking Pain at its Source: New Perspectives on Opioids*. **Nat. Med.** 9:1003–1008. 2003.
- STEIN, C.; LANG, L.J. *Peripheral mechanisms of opioid analgesia*. **Curr. Opin. Pharmacol.** 9:3-8. 2009.
- SUNDARRAJ, S.; THANGAM, R.; SREEVANI, V.; KAVERI, K.; GUNASEKARAN, P.; ACHIRAMAN, S.; KANNAN, S. *γ -Sitosterol from *Acacia nilotica* L. induces G2/M cell cycle arrest and apoptosis through c-Myc suppression in MCF-7 and A549 cells*. **Journal of Ethnopharmacology.** 141: 803-809. 2012.
- SUZUKI, Y.; RUIZ-ORTEGA, M.; LORENZO, O.; RUPEREZ, M.; ESTEBAN, V.; EGIDO, J. *Inflammation and angiotensin II*. **Int. J. Biochem. Cell Biol.** 35:881-900. 2003.
- SWIGLO, G.; TYRAKOWSKA, B. *Quality of commercial apple juices evaluated on the basis of the polyphenol content and the TEAC antioxidant activity*. **J. Food Sci.** 68(5): 1844-1849. 2003.
- SZALLASI, R.; BLUMBERG, P.M. *Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanisms*. **Pharmacol. Rev.** 5:159-212. 1999.
- TASSORELLI, C.; GRECO, R.; WANG, D.; SANDRINI, G.; NAPPI, G. *Prostaglandins, glutamate and nitric oxide synthase mediate nitroglycerin-induced hyperalgesia in the formalin test*. **Eur. J. Pharmacol.** 534: 103-107. 2006.
- VALLANCE, P.; LEIPER, J. *Blocking NO synthesis: how, where and why?* **Nat. Rev. Drug Discov.** 1: 939-950. 2002.
- VANEGAS, H.; SCHAIBLE, H.G. *Prostaglandin and cyclooxygenases in the spinal cord*. **Prg. Neurobiol.** 64: 327-363.2001.
- VIGIL, S. V. G.; DE LIZ, R.; MEDEIROS, Y. S.; FRÖDE, T. S. *Efficacy of tacrolimus in inhibiting inflammation caused by carrageenan in a murine model of air pouch*. **Transplant. Immunol.** 19:25-29. 2008.
- VOLP, A.C.P.V.; RENHE, I.R.T.; BARRA, K.; STRINGUETA, P.C.; *Flavonoides antocianinas: características e propriedades na nutrição e saúde*. **Rev. Bras. Nutr. Clin.** 23(2): 141-149. 2007.

- WAHL, S.M. *Transforming growth factor beta (TGF-beta) in inflammation: a cause and a cure.* **J.Clin.Immunol.** 12: 61-74. 1992.
- WALZOG, B.; GAEHTGENS, P. *Adhesion Molecules: The path to a new understanding of acute inflammation.* **News Physiol. Sciences.** 15: 107 – 113. 2000.
- WATKINS, L.R.; MAYER, D.J. *Organization of endogenous opiate and nonopiate pain control systems.* **Science.** 11:1185-1192. 1982.
- WEISS, U. *Inflammation.* **Nature.** 420: 845. 2002.
- WHITE, F.A.; BHANGOO, S.K.; MILLER, R.J. *Chemokines: integrators of pain and inflammation.* **Nat. Rev. Drug Discov.** 4: 834-844. 2005.
- WOOLF, C.J. *Central sensitization: Implications for the diagnosis and treatment of pain.* **Pain.** 152:2-15. 2010.
- WONG, M.M.; FISH, E.M. *Chemokines: Attractive mediators of the immune response.* **Sem. Immunol.** 15: 5-14. 2003.
- XU, J.; XU, X.; VERSTRAETE, W. *Adaptation of E. coli cell method for microscale nitrate measurement with the Griess reaction in culture media.* **Journal of Microbiological Methods.** 41: 23–33. 2000.
- ZAMPIERI, M.C.T; SARKIS, J.E.S; PESTANA, R.C.B; TAVARES, TAVARES, A.R.; MELLO-DE-PINNA, G.F.A. *Characterization of Tibouchina granulosa (Desr.) Cong. (Melastomatacea) as a biomonitor of air pollution and quantification of particulate matter adsorbed by leaves.* **Ecological Engineering.** 61: 316-327. 2013.

8. Anexos

Anexo 1: Modelo da placa quente



Efeito do Extrato Etanólico (A) e das frações em Hexano (B), Diclorometano (C) e Acetato de Etila (D) no modelo da placa quente.

Anexo 2: Artigos

Abaixo estão listados artigos submetidos (i) e já publicados (ii) desde 2011 até o presente momento.

i. Artigo submetido

1. **GUILHON, C. C.**, Abdul-Wahab, I. R., Boylan, F., Fernandes, P. D.
Central antinociceptive and mechanism of action of *Pereskia bleo* Kunth leaves crude extract, fractions and isolated compounds. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, n#915927, 2014.

ii. Artigos publicados

1. Abdul-Wahab, Ikarastika Rahayu; **Guilhon, Carolina Carvalho**; Fernandes, Patricia Dias; Boylan, Fabio.
Anti-nociceptive activity of *Pereskia bleo* Kunth. (Cactaceae) leaves extracts. **Journal of Ethnopharmacology**. v.144, p.741 - 746, 2012.

2. **Guilhon, C. C.**, Raymundo, Larissa J.R.P., Alviano, Daniela S., Blank, Arie F., Arrigoni-Blank, Maria F., Matheus, Maria Eline, Cavalcanti, Sócrates C.H., Alviano, Celuta S., Fernandes, Patrícia D.
Characterisation of the anti-inflammatory and antinociceptive activities and the mechanism of the action of *Lippia gracilis* essential oil. **Journal of Ethnopharmacology**. v.135, p.406 - 413, 2011.

3. Raymundo, Larissa J.R.P., **Guilhon, Carolina C.**, Alves B., Alviano, Daniela S., Cavalcanti, Sócrates C.H., Fernandes, Patricia D., Alviano, Celuta S., Antonioli, Angelo R., Matheus, Maria Eline.
Characterisation of the anti-inflammatory and antinociceptive activities of the *Hyptis pectinata* (L.) Poit essential oil. **Journal of Ethnopharmacology**. v.134, p.725 - 732, 2011.