



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTI-  
INFLAMATÓRIA DE *Mikania lindleyana* DC.: VALIDAÇÃO DO USO  
NA MEDICINA POPULAR**

Andressa Santa Brigida da Silva

BELÉM - PA

2011



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTI-  
INFLAMATÓRIA DE *Mikania lindleyana* DC.: VALIDAÇÃO DO USO  
NA MEDICINA POPULAR**

Autora: Andressa Santa Brígida da Silva  
Orientador: Prof. Dr. Pergentino José da Cunha Sousa  
Co-orientador: Prof. Dr. Wagner Luiz Ramos Barbosa

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos e Medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde como requisito final para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

BELÉM - PA  
2011

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**  
**Biblioteca do Instituto de Ciências da Saúde – UFPA**

---

Silva, Andressa Santa Brigida da.

Avaliação da Atividade Antinociceptiva e Anti-inflamatória de *Mikania lindleyana* DC: Validação do uso na medicina popular / Andressa Santa Brigida da Silva; orientador, Pergentino José da Cunha Sousa; co-orientador, Wagner Luiz Ramos Barbosa. — 2011.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF), 2011.

1. Inflamação. 2. *Mikania lindleyana*. 3. Nocicepção. I. **Título.**

CDD 22.ed. : 615.321

---

ANDRESSA SANTA BRIGIDA DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DE  
*Mikania lindleyana* DC.: VALIDAÇÃO DO USO NA MEDICINA POPULAR**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos e Medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde como requisito final para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em: 20/ 06/ 2011

---

Prof. Dr. Pergentino José da Cunha Sousa - UFPA

---

Profª Drª Marta Chagas Monteiro - UFPA

---

Prof. Dr. Saad Lahlou - UECE

BELÉM - PA

2011

Este trabalho, eu dedico a todos aqueles que sempre acreditaram e sempre apoiaram durante sua realização. A meus pais e familiares. Em especial à minha mãe, que é minha grande incentivadora.

Andressa Santa Brigida

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, a Deus, que me presenteou com este trabalho tão maravilhoso, por colocar pessoas inigualáveis em minha vida e por me abençoar sempre com tantas coisas boas.

À minha mãe, Fátima Santa Brigida, pelo amor, amizade e incentivo que sempre me ajudaram, pelo caráter a mim repassado e pela confiança em meu potencial.

Ao meu pai, Antônio, e à minha madrasta, Rita, pelo apoio e todo suporte necessário.

Aos meus irmãos Andrey, Antônio e Andrio pelos inúmeros momentos de alegria e apoio.

Ao meu ilustríssimo orientador, Prof. Dr. Pergentino José da Cunha Sousa, pela orientação, confiança, apoio e estímulo a mim depositados, e pela amizade, sem dúvida.

Ao Prof. Dr. Wagner Barbosa, pelas orientações e sugestões que foram muito importantes para a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha pela concessão de seu laboratório para realização de experimentos, contribuindo com o êxito neste trabalho.

A Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Glória Emilia Petto de Sousa pelas sugestões, pelos momentos alegres em seu laboratório e toda contribuição para este trabalho.

Ao Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes pelas idéias e pensamentos compartilhados.

Ao Prof. Sérgio Henrique Ferreira e ao Prof. Dr. Thiago Cunha pela concessão do Laboratório de Dor e por todas as reuniões do Dor on-line (DOL).

À Jozi Godoy Figueiredo por toda ajuda e amizade que foram muito úteis para este trabalho. Além disso, muitos momentos alegres.

À Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Marta Chagas Monteiro pelas sugestões e todo o apoio para este trabalho e pela disponibilidade de aceitar participar desta banca examinadora.

Ao Prof Dr. Flavio de Vasconcelos pelas sugestões que certamente foram acatadas.

Ao Prof Dr. Saad Lahlou pelas correções críticas ao artigo científico, pelas sugestões sempre pertinentes e pela disponibilidade de participar desta banca examinadora.

Aos amigos do laboratório de Farmacodinâmica, Bruno Pinheiro, Fabrício Lexopolus e Ademar Melo por toda ajuda, artigos, força física e muitos momentos alegres.

Aos amigos da Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, em especial Jeane, Luís Fábio, Taysa, Taís Gabbay, Thais Andrade, Eliane Moraes, Heitor, Michel, Dayse, Anivaldo, Alex, Cléa Tereza pelo apoio a este trabalho, pelo auxílio sempre que necessário e por muitos momentos de alegria.

Aos funcionários da Universidade Federal do Pará, em especial Sr. João Borges e Sr. Jailton, Sr<sup>a</sup> Brazilia e Cliciane, pela atenção e amizade que me dispensaram.

Aos amigos da Faculdade de Farmácia João, Nádia, Myrth, Thyago Vilhena, Tiago Leite.

Aos meus amigos Maria Beatriz, Gustavo Rosa, Karen Yumi, Cintia Sayaka, Régis Maestri.

Ao meu amigo Rafael Poloni que me deu muitas “luzes” no Laboratório de Dor da USP e contribui bastante para este trabalho.

À Cristina Setim e ao Daniel, pós-doutorandos de Farmacologia da Faculdade de Medicina USP pelas ajudas e tempo disponibilizados.

Aos técnicos da Universidade de São Paulo Ieda Squivo, Sérgio, Mirian, Juliana, Diva.

Ao José Carlos Tomaz, técnico do laboratório de química orgânica pela ajuda no espectrômetro de massas e pela amizade, além disso, pela disponibilização de seu tempo.

Ao Prof Dr. Mário Augusto Gonçalves Jardim pela identificação do material vegetal.

Aos alunos do laboratório de Farmacologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP David Malvar, Mária José, Juliano, Vinicius Sato.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Pará (FAPESPA) pelo auxílio financeiro.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de mestrado sanduíche como apoio financeiro ao

desenvolvimento científico através do PROCAD, convênio estabelecido com a Universidade de São Paulo.

Ao Instituto Evandro Chagas (IEC) pelo fornecimento dos animais de laboratório.

À Universidade Federal do Pará pelo espaço físico laboratorial, equipamentos e materiais fornecidos para realização deste trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas pela oportunidade.

À banca examinadora, pela atenção dispensada à leitura deste trabalho.

E, a todos que contribuíram para a realização desta pesquisa.



*“Há homens que lutam um dia e são bons.  
Há outros que lutam um ano e são melhores.  
Há os que lutam muitos anos e são muito bons.  
Porém, há os que lutam toda a vida.  
Esses são os imprescindíveis.”*

Bertolt Brecht

## RESUMO

### **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DE *Mikania lindleyana* DC.: VALIDAÇÃO DO USO NA MEDICINA POPULAR**

*Mikania lindleyana* (Asteraceae), popularmente conhecida como sucuriçu, é uma espécie nativa da região amazônica, cujo chá das folhas é a principal forma de uso popular para tratamento de gastrite, infecção, dor e inflamação. Para validar a forma e a alegação de uso decidiu-se avaliar a toxicidade aguda e as atividades antinociceptiva e anti-inflamatória do extrato bruto aquoso liofilizado de *Mikania lindleyana* devidamente identificada (EAML), bem como investigar sua composição química. Na análise fitoquímica do EAML detectou-se a presença de saponinas, proteínas, aminoácidos, fenóis, taninos, ácidos orgânicos e flavonóides. Por cromatografia em camada delgada (CCD) foram observadas zonas de fluorescência azul características de ácido *o*-cumárico. Por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (CLAE-DAD-EM) foram encontrados compostos altamente glicosilados. O EAML na dose de 5000mg/kg não provocou morte nos animais. No teste de contorções abdominais, o EAML (nas doses 125, 250, 500, 750, 1000 e 1500mg/kg) promoveu redução no número de contorções de maneira significativa e dose-dependente. A dose efetiva mediana (DE<sub>50</sub>) de 692,6 mg/kg não prolongou o tempo de latência sobre a placa quente. No teste de formalina, o EAML reduziu o tempo no qual os animais permaneceram lambendo a pata injetada com formalina nas duas fases sendo este efeito revertido pelo antagonista opióide naloxona. A dose de 692,6 mg/kg inibiu a formação de eritema, mas não o edema provocado por dextrana. A mesma dose inibiu a formação do edema por carragenina a partir da 2ª hora e reduziu a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal. Estes resultados sugerem que o EAML, nas doses utilizadas, apresenta atividade antinociceptiva na qual pode haver a participação do sistema opióide e, apresenta atividade anti-inflamatória que pode ser atribuída à ação sobre mediadores inflamatórios, como PGs, e, ainda sobre moléculas de adesão, cuja participação de citocinas pode ser crucial.

**Palavras chave:** *Mikania lindleyana*, atividade anti-inflamatória, atividade antinociceptiva, DE<sub>50</sub>, DL<sub>50</sub>, extrato aquoso.

## ABSTRACT

### ANTINOCICEPTIVE AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY EVALUATION OF *Mikania lindleyana* DC.: VALIDATION OF POPULAR USE IN MEDICINE

*Mikania lindleyana* DC. (Asteraceae), popularly named sucuriçu, is a common plant in Brazilian Amazonia. Ethnopharmacological studies show a diversity of uses of this species such in treatment of gastritis, infection, pain and inflammation. To validate the claim form and use was decided to study the acute toxicity and the antinociceptive and anti-inflammatory activities in experimental animal models and the chemical composition of lyophilized crude aqueous extract of *Mikania lindleyana* (AEML). The phytochemical screening of AEML showed the presence of saponins, proteins, amino acids, phenols, tannins, organic acids and flavonoids. On the thin layer chromatography (TLC) blues fluorescence characteristics of the coumaric acid were identified. The analysis on high-performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry (HPLC-DAD-MS) seems compounds highly glycosylated. The dose 5000mg/kg of EAML did not cause death in animals. The AEML, at doses 125, 250, 500, 750, 1000 and 1500mg/kg, significantly inhibited (in a dose-dependant way) the number of contortions induced by acetic acid on writhing test. The median effective dose (ED<sub>50</sub>) of 692.6 mg/kg did not prolong the latency-time in the hot plate. The AEML showed activity in both first and second phase of formalin-induced licking response decreasing of the lick paw of mice, where this effect was reversed by the opioid antagonist naloxone. The AEML was able to inhibit the erythema formation when compared to control group, but did not inhibit the paw edema formation induced by dextran. The AEML inhibited the paw edema carrageenan-induced from 2<sup>nd</sup> hour and reduced neutrophil migration to peritoneal cavity. Our results indicate that AEML demonstrate an antinociceptive effect with probable involvement of the opioid system, and anti-inflammatory activity through inhibition of production of inflammatory mediators as PGs, and also on adhesion molecules with involvement of cytokines.

**Key words:** *Mikania lindleyana*, anti-inflammatory activity, antinociceptive activity, ED<sub>50</sub>, LD<sub>50</sub>, aqueous extract

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Imagem ilustrativa da espécie <i>Mikania lindleyana</i>	25
<b>Figura 2</b>	Interação entre leucócitos e células endoteliais durante alteração vascular	31
<b>Figura 3</b>	Fluxograma de obtenção do extrato aquoso liofilizado de <i>Mikania lindleyana</i>	55
<b>Figura 4</b>	CCD em sílica da fração metanólica do EAML	69
<b>Figura 5</b>	Cromatograma obtido por CLAE-DAD-EM do EAML (UV 320nm)	70
<b>Figura 6</b>	Efeito do pré-tratamento oral com o EAML (125, 250, 500, 750, 1000 e 1500 mg/kg, colunas cinzas) ou indometacina (Indo; 5 mg/kg, coluna preta) no teste de contorções abdominais induzido por ácido acético em camundongos	71
<b>Figura 7</b>	Determinação da Dose Efetiva Mediana (DE <sub>50</sub> ) do EAML	73
<b>Figura 8</b>	Efeito do EAML (692,6 mg/kg, v.o) ou morfina (10 mg/kg, s.c) sobre o estímulo nociceptivo térmico ( $50 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ) induzido em camundongos	74
<b>Figura 9</b>	Influência do pré-tratamento de naloxona (Nal, s.c) na ação antinociceptiva de morfina (Mor, s.c) e do EAML v.o na 1ª (dor neurogênica, 0-5 min) e 2ª fase (dor inflamatória, 15-30 min) na nocicepção induzida por formalina 1% em camundongos.	75
<b>Figura 10</b>	Efeitos do pré-tratamento oral com o EAML (692,6 mg/kg, coluna cinza) ou dexametasona (Dexa, 10 mg/kg, coluna preta) no teste de edema de orelha induzido por óleo de cróton em camundongos	77
<b>Figura 11</b>	Efeito do EAML sobre o edema de pata induzido por dextransa em ratos	78
<b>Figura 12</b>	Efeito do EAML sobre o edema de pata induzido por Cg em ratos	79
<b>Figura 13</b>	Efeito do EAML sobre a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida pela administração de Cg em ratos	80
<b>Figura 14</b>	Efeito do EAML sobre o rolamento leucocitário no endotélio	81

vascular do mesentério de camundongos induzido pela administração de Cg i.p.

**Figura 15** Efeito do EAML sobre a adesão de leucócitos ao endotélio vascular do mesentério de camundongos induzido pela administração de Cg 82

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Prospecção fitoquímica do EAML	67
<b>Tabela 2</b>	Efeito do EAML sobre o estímulo nociceptivo induzido pela injeção intraperitoneal de ácido acético 0,6% em camundongos	103
<b>Tabela 3</b>	Efeito do EAML sobre o estímulo térmico induzido pela placa quente em camundongos	103
<b>Tabela 4</b>	Efeito do EAML sobre o estímulo nociceptivo induzido pela injeção intraplantar de formalina 1% em camundongos na primeira fase	104
<b>Tabela 5</b>	Efeito do EAML sobre o estímulo nociceptivo induzido pela injeção intraplantar de formalina 1% em camundongos na segunda fase	104
<b>Tabela 6</b>	Efeito do EAML sobre o estímulo irritante induzido pela aplicação tópica de óleo de croton em camundongos	105
<b>Tabela 7</b>	Efeito do EAML sobre o edema de pata induzido por dextrana em ratos	105
<b>Tabela 8</b>	Efeito do EAML sobre o edema de pata induzido por Cg em ratos	106
<b>Tabela 9</b>	Efeito do EAML sobre a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida pela administração de Cg em ratos	106
<b>Tabela 10</b>	Efeito do EAML sobre o rolamento leucocitário no endotélio vascular do mesentério de camundongos induzido pela administração i.p. de Cg	107
<b>Tabela 11</b>	Efeito do EAML sobre a adesão de leucócitos ao endotélio vascular do mesentério de camundongos induzido pela administração i.p. de Cg	107

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>5-HT</b>	5-Hidroxiptamina (serotonina)
<b>AA</b>	Ácido araquidônico
<b>AINEs</b>	Anti-inflamatórios não-esteroidais
<b>ANOVA</b>	Análise de variância <i>one way</i>
<b>ASIC</b>	Canal iônico ácido-sensível
<b>Bk</b>	Bradicinina
<b>C5a</b>	Quinto componente do sistema complemento ativado
<b>cav.</b>	Cavidade
<b>CCD</b>	Cromatografia em Camada Delgada
<b>Cg</b>	Carragenina
<b>CGRP</b>	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
<b>CLAE</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência
<b>COX</b>	Ciclooxigenase
<b>COX 1</b>	Ciclooxigenase 1
<b>COX 2</b>	Ciclooxigenase 2
<b>DE<sub>50</sub></b>	Dose Efetiva Mediana
<b>DGR</b>	Gânglio da raiz dorsal
<b>DL<sub>50</sub></b>	Dose Letal Mediana
<b>EAML</b>	Extrato aquoso de <i>Mikania lindleyana</i>
<b>e.p.m</b>	Erro Padrão da Média
<b>GABA</b>	Ácido gama-aminobutírico
<b>GC</b>	Glicocorticoide
<b>i.p</b>	Intraperitoneal
<b>IASP</b>	Associação Internacional para o Estudo da Dor
<b>ICAM-1</b>	Moléculas de adesão intercelular-1
<b>IL-1</b>	Interleucina 1
<b>IL-1<math>\beta</math></b>	Interleucina 1 beta
<b>IL-6</b>	Interleucina 6
<b>IL-8</b>	Interleucina 8
<b>LTB<sub>4</sub></b>	Leucotrieno B <sub>4</sub>

<b>NGF</b>	Fator de Crescimento Neural
<b>NLR</b>	Receptor NOD-like
<b>NO</b>	Óxido nítrico
<b>NOS</b>	Óxido nítrico sintase
<b>iNOS</b>	Óxido nítrico sintase induzida
<b>OECD</b>	Organisation for Economic Cooperation and Development
<b>PAF</b>	Fator de agregação de plaquetas
<b>PBS</b>	Tampão salina fosfato
<b>PGE<sub>2</sub></b>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
<b>PGF<sub>2</sub></b>	Prostaglandina F <sub>2</sub>
<b>PGI<sub>2</sub></b>	Prostaciclina
<b>PLA<sub>2</sub></b>	Fosfolipase A <sub>2</sub>
<b>PKC</b>	Proteína quinase C
<b>PMN</b>	Polimorfonucleares
<b>s.c</b>	Via subcutânea
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>TLR</b>	Receptor Toll-like
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de Necrose Tumoral alfa
<b>TRPV1</b>	Receptor Vanilóide de Potencial transitório tipo 1
<b>v.o.</b>	Via oral
<b>VCAM</b>	Molécula de adesão vascular



## ÍNDICE

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>18</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>20</b>
<b>2.1 Aspectos Botânicos da espécie <i>M.lindleyana</i></b> .....	<b>21</b>
2.1.1 CLASSIFICAÇÃO BOTÂNICA .....	21
2.1.2 FAMÍLIA ASTERACEAE .....	21
2.1.3 GÊNERO MIKANIA.....	22
2.1.4 A ESPÉCIE <i>MIKANIA LINDLEYANA</i> .....	25
<b>2.2 Anatomofisiopatologia da Dor</b> .....	<b>26</b>
2.2.1 NOCICEPÇÃO E NOCICEPTORES .....	27
2.2.2 PROCESSAMENTO DA DOR .....	28
<b>2.3 Inflamação: Papel fisiológico</b> .....	<b>30</b>
2.3.1 EVENTOS CELULARES E VASCULARES DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA .....	30
2.3.2 MEDIADORES E EFETORES DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA .....	33
2.3.2.1 Histamina.....	33
2.3.2.2 Serotonina.....	34
2.3.2.3 Bradicininina .....	35
2.3.2.4 Sistemas .....	35
2.3.2.5 Eicosanóides.....	36
2.3.2.6 Fator de ativação de plaquetas.....	37
2.3.2.7 Citocinas .....	38
2.3.2.8 Quimiocinas .....	39
2.3.2.9 Óxido nítrico.....	40
<b>2.4 Fármacos utilizados no tratamento da dor e inflamação</b> .....	<b>41</b>
<b>2.5 Modelos animais de avaliação das atividades antinociceptiva e anti- inflamatória</b> .....	<b>43</b>
<b>3 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>49</b>
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	<b>50</b>
<b>4.1 Objetivo geral</b> .....	<b>50</b>
<b>4.2 Delineamento experimental</b> .....	<b>50</b>
<b>5 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>52</b>
<b>5.1 Fármacos, Reagentes e Soluções</b> .....	<b>52</b>

5.1.1 ANÁLISE FITOQUÍMICA .....	52
5.1.2 AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA .....	52
<b>5.2 Equipamentos e Aparelhos .....</b>	<b>53</b>
5.2.1 ANÁLISE FITOQUÍMICA .....	53
5.2.2 AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA .....	53
<b>5.3 Material vegetal .....</b>	<b>54</b>
5.3.1 OBTENÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO .....	54
5.3.2 PREPARAÇÃO DO EXTRATO .....	54
5.3.3 FRACIONAMENTO DO EXTRATO .....	56
<b>5.4 Análise Fitoquímica .....</b>	<b>56</b>
<b>5.5 Métodos Cromatográficos .....</b>	<b>56</b>
5.5.1 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA .....	56
5.5.2 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA COM ESPECTROMETRIA DE MASSAS .....	57
<b>5.6 Avaliação Farmacológica .....</b>	<b>57</b>
5.6.1 ANIMAIS .....	57
5.6.2 DROGAS E TRATAMENTOS .....	58
5.6.3 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA .....	58
5.6.4 ESTUDO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO EAML <i>IN VIVO</i> .....	59
5.6.4.1 Atividade analgésica periférica .....	59
5.6.4.2 Determinação da Dose Efetiva Mediana (DE <sub>50</sub> ) .....	60
5.6.4.3 Teste da Placa Quente .....	60
5.6.4.4 Teste da Formalina .....	61
5.6.5 ESTUDO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO EAML <i>IN VIVO</i> .....	61
5.6.5.1 Dermatite em orelha induzida pelo óleo de croton .....	61
5.6.5.2 Edema de pata induzido por dextrana .....	62
5.6.5.3 Edema de pata induzido por Cg .....	63
5.6.5.4 Peritonite induzida por Cg .....	64
5.6.5.5 Microscopia intravital .....	65
<b>5.7 Análise Estatística .....</b>	<b>66</b>
<b>6 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>67</b>
<b>6.1 Caracterização dos Metabólitos Secundários de <i>M.lindleyana</i> .....</b>	<b>67</b>
6.1.1 ANÁLISE FITOQUÍMICA .....	67
<b>6.2 Métodos Cromatográficos .....</b>	<b>68</b>

6.2.1 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA .....	68
6.2.2 CROMATOGRAFIA LIQUIDA ACOPLADA COM ESPECTROMETRIA DE MASSAS.....	69
<b>6.3 Ensaios Farmacológicos .....</b>	<b>71</b>
6.3.1 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE .....	71
6.3.2 ESTUDO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO EAML <i>IN VIVO</i> .....	71
6.3.2.1 Avaliação da atividade analgésica periférica através do teste de contorções abdominais.....	71
6.3.2.2 Determinação da DE <sub>50</sub> .....	72
6.3.2.3 Teste da Placa Quente .....	74
6.3.2.4 Teste da Formalina .....	75
6.3.3 ESTUDO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO EAML <i>IN VIVO</i> .....	76
6.3.3.1 Dermatite em orelha induzida pelo óleo de croton.....	76
6.3.3.2 Edema de pata induzido por dextrana .....	78
6.3.3.3 Edema de pata induzido por Cg.....	79
6.3.3.4 Peritonite induzida por Cg.....	80
6.3.3.5 Microscopia intravital .....	81
<b>7 CONCLUSÕES .....</b>	<b>84</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>85</b>
<b>APÊNDICE- Tabelas de Resultados Farmacológicos.....</b>	<b>102</b>

## 1 INTRODUÇÃO

A relação com o ambiente faz com que diferentes culturas humanas absorvam uma grande variedade de conhecimentos e costumes do meio em que vivem. Estes conhecimentos vão evoluindo e com o passar do tempo são incorporados aos padrões de cada grupo populacional através de gerações. O caso mais representativo e discutido em nível global, na atualidade, é o uso dos produtos naturais advindos dos conhecimentos de povos tradicionais como índios ou populações ribeirinhas. Neste caso, as atenções são maiores para aqueles povos que habitam regiões tropicais, onde a variedade de opções naturais se apresenta em maiores proporções, como no caso da Amazônia Brasileira (PINTO e MADURO, 2003).

No Brasil, o uso dos produtos originados do conhecimento tradicional na medicina popular é datado desde muito antes da colonização. Os índios usavam tais produtos para a cura de doenças ou para fazer “poções” que ajudavam a manter o espírito purificado. Na Amazônia, a utilização destes produtos por grupos indígenas ainda hoje possui um valor significativo (DI STASI et al, 2002).

As tradições populares de uso de plantas medicinais na Amazônia representam um importante ponto de encontro entre permanências e rupturas culturais, estabelecidas desde os primeiros contatos intertribais e interétnicos e consolidados no entrecruzamento das principais matrizes presentes no processo de formação do povo brasileiro. Ao longo do tempo em que se estreitou o contato com as sociedades ocidentais, o conhecimento fitoterápico dos povos amazônicos passou a incorporar saberes e práticas civilizados oriundos da medicina popular européia (SANTOS, 2000).

Tentando aliar o conhecimento cultural com a realidade atual, pesquisas científicas, em diferentes partes do mundo, vêm sendo realizadas no sentido de verificar a atividade farmacológica ou a eficácia de produtos naturais no tratamento de diversas doenças (FOGLIO et al, 2006). Neste contexto, muitas doenças de origem inflamatória como reumatismo, asma, aterosclerose poderiam ser tratadas ou controladas com produtos de origem vegetal (CALIXTO, 2004).

Muitos compostos ativos já foram isolados de plantas (morfina, codeína, quinina) e são amplamente utilizados no tratamento de doenças. Logo, a descoberta

de novos fármacos, a partir de plantas medicinais, se torna cada vez mais importante (BALUNAS e KINGHORN, 2005). Os produtos naturais são uma importante fonte para o desenvolvimento de novos fármacos com muitos novos produtos em estudos clínicos. Em função disto, várias metodologias de seleção estão sendo desenvolvidas para aprimorar o conhecimento sobre os produtos naturais para serem utilizados na descoberta de novos fármacos (HARVEY, 2008).

Com o objetivo de se descobrir novos compostos com atividade biológica, muitas pesquisas são voltadas para levantamentos etnofarmacêuticos, os quais constituem uma importante metodologia para o estudo de vegetais empregados na medicina popular. Estes estudos surgiram como estratégia na investigação de plantas medicinais, combinando informações adquiridas junto a usuários da flora medicinal com estudos químicos e farmacológicos. Além disso, este método permite formular hipóteses sobre a atividade farmacológica e o composto responsável pela ação terapêutica relatada (ELISABETSKY, 2003).

A espécie utilizada neste estudo, *Mikania lindleyana*, é muito comum na região amazônica, onde é utilizada popularmente como anti-inflamatório (BERG, 1982). Outras espécies de *Mikania* como *M.glomerata* e *M.laevigata* já foram citadas na farmacopéia brasileira como anti-inflamatórios naturais (BOLINA et al, 2009) e são vendidas comercialmente como medicamento.

Em um levantamento etnofarmacêutico realizado recentemente no município de Igarapé-Miri/Pará, o chá preparado a partir das folhas de *M.lindleyana* foi bastante citado pela população local para o tratamento de úlceras, inflamação em geral e como analgésico (BARBOSA et al, 2009). Dentro do gênero *Mikania*, algumas espécies possuem atividades anti-inflamatória e antinociceptiva comprovadas, como *M. laevigata*, *M.involucrata* (SUYENAGA et al, 2002) e *M.scandens* (HASAN et al, 2009). Assim, um estudo sobre esta espécie nativa da região amazônica poderá validar o seu uso popular e tornar esta espécie um alvo promissor para o tratamento de doenças de origem inflamatória e dolorosa.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

Nos últimos anos, tem surgido um maior interesse pelos fitoterápicos devido à aceitação da visão holística que atribui o surgimento de muitas doenças complexas como diabetes, doença do coração, câncer e distúrbios psiquiátricos, a uma combinação de fatores genéticos, ambientais e comportamentais. Além disso, o aparecimento de resistência a antibióticos também pode ser considerado um fator que tem levado a um maior interesse por estes compostos (RASKIN et al, 2002).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2002, cerca de 80% da população mundial, dos países em desenvolvimento, utilizam a medicina tradicional para os cuidados primários de saúde. O restante da população mundial (20%), residente em países desenvolvidos, faz uso de produtos naturais e de medicamentos derivados destes produtos (GALLOTE e RIBEIRO, 2005).

Há muitos exemplos históricos em que o produtos naturais, além de serem utilizados como medicamento, podem também ajudar a revelar um aspecto inovador da fisiologia. Por exemplo, os glicosídeos digitálicos da dedaleira mostraram papel da sódio-potássio-ATPase; muscarina, nicotina e tubocurarina ajudaram a explorar os diferentes tipos de receptores de acetilcolina. Além disso, recentemente, há um grande interesse na busca sistemática de pequenas moléculas inibidoras de etapas essenciais nos processos bioquímicos, que é chamado de genética química (HARVEY, 2008).

Ainda existe certa resistência quanto ao uso de medicamentos fitoterápicos, sendo que esta abordagem tende a mudar a partir do momento em que estes começarem a apresentar os testes completos de qualidade, segurança e eficácia exigidos pelas legislações vigentes (MORAES et al, 2003; SIANI et al, 2003).

Atualmente, há muitos candidatos promissores a medicamentos em processo de desenvolvimento que são de origem natural. Os inconvenientes técnicos associados à pesquisa de produtos naturais têm diminuído, e não há melhor oportunidade para explorar a atividade biológica, como na atualidade. Com a crescente aceitação de que a diversidade de produtos naturais está bem adaptada para fornecer suporte para futuros medicamentos, haverá evolução da utilização de novos produtos naturais e bibliotecas químicas, com base de dados de produtos naturais, na descoberta de fármacos (HARVEY, 2008).

O Brasil pode se inserir neste cenário como uma das maiores biodiversidades do mundo, com uma imensa quantidade de produtos para serem explorados, os quais podem ser utilizados na descoberta de novos produtos de interesse farmacêutico. Neste contexto, um melhor conhecimento sobre as espécies brasileiras, principalmente, da região amazônica, como a espécie em estudo, *M. lindleyana*, poderá levar a descoberta de um novo fitoterápico.

## **2.1 Aspectos Botânicos da espécie *M.lindleyana***

### 2.1.1 CLASSIFICAÇÃO BOTÂNICA

- Reino: Plantae
- Divisão: Magnoliophyta
- Classe: Magnoliopsida
- Ordem: Asterales
- Família: Asteraceae
- Tribo: Eupatorieae
- Gênero: *Mikania*
- Espécie: *Mikania lindleyana*

### 2.1.2 FAMÍLIA ASTERACEAE

A família Asteraceae, também conhecida como Compositae, é uma das maiores famílias botânicas do planeta. Esta família compreende cerca de 1000 gêneros e cerca de 25000 espécies conhecidas. No Brasil, esta família é representada por aproximadamente 300 gêneros e 2000 espécies (SOUZA e LORENZI, 2005; DEL-VECHIO-VIEIRA et al, 2009). As plantas da família podem ser encontradas em diversas regiões do mundo, mas são comumente localizadas na região sudoeste dos EUA, no México, Brasil, ao longo dos Andes, no mediterrâneo e nas regiões sul, sudoeste e central da Ásia e da Austrália (BREMER, 1994).

Os membros desta família são ervas, arbustos, raramente arvoretas, folhas sem estípula, simples ou compostas, alternadas ou opostas, raramente verticiladas ou aparentemente uma roseta (BERG, 1982). Os aspectos relativos às folhas são importantes na determinação da tribo e do gênero, tais como: posição (alternadas ou compostas) e enervação, pois grande parte das plantas possuem folhas trinervadas (BREMER, 1994).

Quimicamente, a família apresenta como principais constituintes poliacetilenos, terpenóides, flavonóides e cumarinas (BREMER, 1994). E, já foram relatadas várias atividades biológicas para as plantas da família, como por exemplo: espasmolítica, anti-inflamatória, colerética, antimicrobiana, citotóxica, antitumoral, diurética, anti-helmíntica (HEINRICH et al, 1998), analgésica (LORENZI e MATOS, 2002).

Dentre os gêneros da família Asteraceae, podemos destacar o gênero *Mikania* que é um dos poucos dentro desta família que alcançaram sucesso nas terras baixas da região Amazônica, área considerada inadequada para a maioria dos membros desta família (RITTER e WAECHTER, 2004).

### 2.1.3 GÊNERO MIKANIA

O gênero *Mikania*, criado por Willdenow em 1803 (ROQUE et al, 1988), pode ser considerado o maior gênero dentro da família Asteraceae, com cerca de 430 espécies distribuídas por todo o continente americano (KING e ROBINSON, 1987; BREMER, 1994). Está distribuído por todo o Brasil, onde foram registradas 142 espécies endêmicas e 27 cosmopolitas (BREMER, 1994; KING e ROBINSON, 1987).

De acordo com Holmes (1996), o hábito trepador foi importante para a grande representatividade do gênero *Mikania* na região Amazônica, ocupando principalmente áreas úmidas de bordas de rios e lagos.

As espécies do gênero *Mikania* são herbáceas ou arbustivas, frequentemente volúveis, com folhas inteiras ou partidas (BERG, 1982) e com variadas inflorescências (carimbosas, tirsóides). A delimitação das espécies é complexa, devido as várias espécies serem altamente polimórficas (HERZ, 1986).



Muitas propostas já foram feitas para divisão do gênero *Mikania*. Nesse sentido, Barroso (1958) propôs uma divisão do gênero *Mikania* em cinco seções, considerando os caracteres: forma da folha, hábito da espécie (ereto, volúvel ou decumbente) e tipo de inflorescência. Holmes (1996) propôs uma nova divisão em duas seções (*Summikania* e *Mikania*) considerando agora o padrão de maturação do capítulo e a localização das brácteas subinvolucrais. Inicialmente, Herz (1986) propôs uma divisão do gênero em dois grupos com base na composição química, onde o complexo *M.scandens* apresentaria como marcadores químicos dilactonas sesquiterpênicas altamente oxigenadas do tipo mikanolídeo, e o grupo das outras *Mikania*s que não apresentariam estes marcadores. Entretanto em 1998, Herz ao descobrir que algumas espécies do grupo *M.scandens* produzem exclusivamente outras classes de lactonas, afirmou que estas dilactonas não poderiam ser mais consideradas marcadores químicos deste grupo.

O gênero *Mikania* é conhecido por produzir flavonóides, terpenos, lactonas sesquiterpênicas, diterpenos e cumarinas (BUDEL et al, 2009). Muitos compostos já foram isolados a partir das espécies estudadas, como terpenos, incluindo monoterpenos, diterpenos, e lactonas sesquiterpênicas (ROQUE et al, 1988; CUENCA et al, 1991; VILEGAS et al 1997; LOBITZ et al, 1998; OHKOSHI et al, 1999; VENEZIANI et al, 1999; CHAVES e OLIVEIRA, 2003; NUNEZ et al, 2004; OHKOSHI et al, 2004; KRAUTMANN et al, 2007; OLIVEIRA et al, 2007; SOARES et al, 2007; PEDROSO et al, 2008; REIS et al, 2008; BOLINA et al, 2009; MAIA e ANDRADE, 2009; MENDES et al, 2009; TONZIBO et al, 2009; FERREIRA e OLIVEIRA, 2010), cumarinas (OHKOSHI et al, 1999; CELEGHINI et al, 2001; BIAVATTI, et al, 2004; CASTRO et al, 2006; MUCENEEKI et al, 2009), flavonóides (OHKOSHI et al, 1999; AGUINALDO et al, 2003; WEI et al, 2004; SOUZA et al, 2006) e lignanas (CUENCA et al, 1991).

O gênero *Mikania* possui várias aplicações, muitas espécies são utilizadas popularmente como expectorante, contra febre, reumatismo, problemas do sistema respiratório, para o tratamento de cólicas e desordens intestinais, mordidas de cobra (KING e ROBINSON, 1987; KISSMANN e GROTH, 1992), como anti-inflamatório, antiespasmódico, antireumático (ROQUE et al, 1988). Economicamente além do potencial terapêutico, espécies do gênero também protegem o solo contra a erosão em áreas desprovidas de outras plantas (KISSMANN e GROTH, 1992).

Várias atividades farmacológicas já foram reportadas na literatura. *M. glomerata* pode ser considerada a espécie mais estudada com atividades anti-diarréica (SALGADO et al, 2005), anti-oftídica (MAIORANO et al, 2005), atividade contra *Candida albicans* (DUARTE et al, 2005), atividade anti-alérgica (FIERRO et al, 1999), contra estresse oxidativo causado por exposição ao carvão mineral (FREITAS et al, 2008). Estudos também mostraram atividade antimicrobiana para *M. glomerata*, *M. laevigata* (YATSUDA et al, 2005; DUARTE et al, 2007) e *M. lanuginosa* (SILVA et al, 2002). Atividade antioxidante para *M. scadens* também já foi reportado na literatura (HASAN et al, 2009). A atividade anti-ulcerogênica de *M. cordata* (PAUL et al, 2000) e *M. laevigata* (BIGHETTI et al, 2005). Atividade anti-inflamatória para *M. glomerata* (FIERRO et al, 1999; DOS SANTOS et al, 2006; FREITAS et al, 2008) e *M. laevigata* (SUYENAGA et al, 2002; DOS SANTOS et al, 2006; FREITAS et al, 2008; ALVES et al, 2009). E, atividade analgésica para *M. cordata* (AHMED et al, 2001), *M. scadens* (HASAN et al, 2009).

Apesar de algumas espécies de *Mikania* serem consagradas pelo seu uso na medicina popular como a *M. glomerata* (guaco), que está descrita na Farmacopéia Brasileira 1ª edição e na RE nº 89, que se refere à lista de registro simplificado de fitoterápicos (BOLINA et al, 2009), o gênero *Mikania* foi pouco estudado no Brasil menos de 12% do total de espécies do gênero foram quimicamente estudadas e somente cerca de 3% foram submetidas a ensaios biológicos para avaliação de suas atividades (RITTER e MIOTTO, 2005).

Portanto, estudos fitoquímicos e farmacológicos são necessários para o melhor conhecimento químico e terapêutico, contribuindo para a quimiotaxonomia do gênero e possibilitando no futuro o desenvolvimento de novos fitoterápicos e fitofármacos. Além disso, a validação desta espécie como fitoterápico anti-inflamatório poderá levar à sua inclusão na Farmacopéia Brasileira tornando-a um recurso terapêutico.

Entre as espécies que necessitam ser estudadas temos a *M. lindleyana*, uma planta nativa da Amazônia que é utilizada localmente como anti-inflamatório e analgésico natural, sobre o qual existem poucos estudos tratando de sua composição química e atividades anti-inflamatória e analgésica.

#### 2.1.4 A ESPÉCIE *MIKANIA LINDLEYANA*

*Mikania lindleyana* DC. é uma espécie da família Asteraceae nativa da região amazônica. É conhecida popularmente como sucurijú ou sucurijuzinho (BERG, 1982) e habita principalmente locais úmidos e áreas próximas de rios (NASCIMENTO et al, 2003).

De acordo com um estudo etnofarmacêutico feito no município de Igarapé-Miri no interior do Estado do Pará, Brasil, esta espécie é usada como anti-inflamatório, analgésico, cicatrizante, no tratamento de hepatite, de úlceras crônicas, varicoses e dermatoses diversas (BARBOSA et al, 2009) e o chá das folhas desta espécie é a principal forma de uso (PINTO, 2008), sendo o suco ou emplastro aplicados diretamente das folhas também formas de uso (BERG, 1982).

*M. lindleyana* é um arbusto volúvel, glabro, com folhas inteiras, ovadas ou deltóides com 3-6 cm de comprimento e 3-4,5 cm de largura, glabras com ápice acuminado e base truncada, atenuada. Capítulos corimboso-tirsóides, com brácteas involucrais, ovado-oblongas, escamosas com ápice acuminado, corola infundibuliforme, sendo o limbo do mesmo comprimento do tubo. Aquênio cilíndrico, globoso, com 30-40 setas duas vezes mais longas que o fruto propriamente dito (BERG, 1982), como mostrado na figura 1.



**Figura 1:** Imagem ilustrativa da espécie *Mikania lindleyana*.  
Fonte: Arquivo pessoal.

O uso contínuo e compulsório desta espécie vegetal no combate ou alívio de doenças como dermatoses, hepatites, inflamação, úlcera gástrica crônica e varicose

motivou a determinação da composição inorgânica desta espécie por Martins e col. (2009). Neste estudo, determinou-se o conteúdo de minerais no chá de folhas do sucupijú (*M. lindleyana*) obtendo-se consideráveis índices para cálcio, magnésio, ferro, cobre e zinco, demonstrando para esta espécie um potencial nutricional.

A abordagem fitoquímica do extrato hidroalcoólico de *M. lindleyana* mostrou a presença de alcalóides, flavonóides, taninos, esteróides e terpenóides (MENDES et al, 2002). Além disso, a análise do óleo essencial por cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massa (CG-EM) identificou a presença dos terpenos  $\alpha$ -felandreno, limoneno, germacreno D,  $\alpha$ -tujeno,  $\alpha$ -pineno, mirceno,  $\beta$ -cariofileno (MAIA e ANDRADE, 2009).

*M.lindleyana* é uma espécie que possui poucos estudos sobre sua composição química, bem como suas atividades farmacológicas. Logo, torna-se necessário uma melhor abordagem acerca de suas atividades farmacológicas, como na dor e inflamação, bem como de sua composição química.

## **2.2 Anatomofisiopatologia da Dor**

Dor é uma experiência humana singular influenciada por diversos elementos como emoção, cognição, memória e o próprio meio social. Embora haja a divisão da dor em termos anatômicos, fisiológicos e farmacológicos, muitos fatores estão envolvidos na dor e exigem uma abordagem multifatorial para estudar a analgesia (FARQUHAR-SMITH, 2007).

A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) conceitua a dor como “uma experiência sensorial e emocional desagradável, relacionada com lesão tecidual real ou potencial, ou descrita em termos que sugerem tal dano”. Com a presença de dois componentes: a sensação dolorosa propriamente dita ou nocicepção e a reatividade emocional à dor (LOESER e TREEDE, 2008).

Pode-se classificar a dor em aguda ou crônica do ponto de vista do tempo em que a dor permanece. A dor aguda tem função de alerta e pode ser de curta duração e segue-se à lesão tecidual, desaparecendo quando cessa o que a provocou e a crônica é aquela que persiste além do tempo necessário para a cura da lesão (CARVALHO, 1999).

O tipo de lesão ou mediadores envolvidos também pode dividir a dor como dor nociceptiva, dor inflamatória e dor disfuncional. A dor nociceptiva serve de alerta e é mediada por fibras de limiar elevado em neurônios sensoriais primários que conduzem o estímulo em vias nociceptivas ao sistema nervoso central, normalmente, ocorre em resposta a danos e continua apenas quando ocorre permanência dos mesmos (JULIUS e BASBAUM, 2001).

No aspecto inflamatório, a dor pode ocorrer em resposta à lesão tecidual e resposta inflamatória subsequente, através de mudanças que ocorrem na tentativa de proteger o corpo contra um estímulo potencialmente nocivo e envolve a participação de mediadores inflamatórios no local da lesão. Estes mediadores incluem bradicinina, substância P, prostaglandinas, fatores de crescimento, óxido nítrico (NO), citocinas, quimiocinas que podem ser chamados de substâncias algogênicas (LINLEY, 2010).

A dor disfuncional pode ser considerada uma condição causada por um mau funcionamento do aparelho somatosensorial, e ocorre em situações nas quais não há identificação de estímulo nocivo, na ausência de inflamação detectável ou por danos ao sistema nervoso. Pode ser incluído dentro deste tipo de dor, a dor neuropática que é uma síndrome adaptativa, com acúmulo progressivo da dor em resposta a estímulos repetidos, com dispersão espacial, e redução do limiar de dor (COSTIGAN et al, 2009).

Quando se refere a dor, alguns distúrbios podem estar relacionados, como a Alodinia, que é um tipo de dor causada por estímulos que normalmente não provocam dor; a Hiperalgisia que corresponde a uma resposta aumentada em função de sensibilização primária ou secundária do local da lesão; Hiperestesia que é uma maior sensibilidade à estimulação e Disestesia que é uma sensação anormal desagradável seja espontânea ou provocada (FARQUHAR-SMITH, 2007).

### 2.2.1 NOCICEPÇÃO E NOCICEPTORES

Nocicepção é o sistema fisiológico para a percepção da dor e, adverte de dano iminente. A sinalização da dor é feita ao longo do eixo periférico por receptores de limiar elevado, e nos centros cerebrais ocorre a discriminação entre estímulos

potencialmente prejudiciais de estímulos inócuos (DIB-HAJJ et al, 2010).

Estes nociceptores estão localizados em neurônios sensoriais primários e conduzem o estímulo em vias nociceptivas ao sistema nervoso central (SNC) (WOOLF e MA, 2007). As fibras sensoriais que conduzem as sensações sentidas periféricamente podem ser classificadas de acordo com características anatômicas e fisiológicas. As fibras mielinizadas A $\beta$  que possuem grande diâmetro detectam sensações inócuas aplicadas à pele, músculos e articulações e, portanto, não contribuem para a dor. Os nociceptores propriamente ditos que respondem a estímulos nódicos térmicos, mecânicos e químicos são os nociceptores polimodais não-mielinizados C que são ativados por muitos tipos de danos teciduais, e estão associados com dor prolongada e conduzem a dor lenta. Outra classe de nociceptores são as fibras mielinizadas A $\delta$  que são ativadas por sensibilização mecânica e térmica e conduzem a dor rápida (FARQUHAR-SMITH, 2007).

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

### 2.2.2 PROCESSAMENTO DA DOR

As informações geradas, na forma de potencial de ação, são conduzidas por neurônios aferentes primários que fazem sinapse com neurônios de segunda ordem localizados no gânglio da raiz dorsal (DRG) na medula espinhal, mais precisamente

nas lâminas I e II (substância gelatinosa), local onde os nociceptores têm seus corpos celulares. Nestas circunstâncias, os neurônios de segunda ordem se tornam sensibilizados, também chamado de sensibilização central (LAMOTTE et al., 1992).

Os neurônios localizados na medula espinhal, principalmente na lâmina II ou substância gelatinosa (SG), também chamados de interneurônios inibitórios, têm a função de inibir a dor (WOOLF e SALTER, 2000). Porém se não conseguirem, a informação dolorosa, na forma de potencial de ação ascende através de diferentes tratos nervosos específicos até a convergência com populações de neurônios no núcleo posterior ventral do tálamo, onde ocorre a sinalização de estímulos nociceptivos. Essa informação neural se projeta, então, do tálamo para áreas sensoriais do córtex cerebral, região onde as várias submodalidades, como qualidade, intensidade, localização e o seu aspecto afetivo emocional, são integrados na experiência da percepção (VOGT et al., 1996).

A neuromodulação da dor é o último passo do processamento do estímulo nociceptivo. Este evento representa alterações que ocorrem no sistema nervoso central em resposta ao estímulo nocivo, e, permite que sinais de danos recebidos na periferia, pelo corno dorsal da medula espinhal, sejam seletivamente inibidos. Desta maneira, sinais de danos que deveriam ultrapassar a medula para os centros superiores não serão mais transmitidos.

O sistema de modulação da dor consiste, de inter-neurônios inibitórios, presentes nas camadas superficiais da medula espinhal e tratos neuronais descendentes, os quais podem inibir a transmissão do sinal de dor (YAKSH, 2006), e elementos neuronais presentes no tronco encefálico, tálamo, estruturas subcorticais, córtex cerebral e, possivelmente, sistema nervoso periférico (XIE et al, 2009).

O sistema supressor é composto por neurotransmissores como endorfinas, encefalinas e serotonina, além de opióides endógenos. A ativação do controle inibitório descendente pode ter a participação de estruturas corticais, como córtex cingulado anterior, córtex insular, córtex somatosensorial primário e secundário e córtex orbito-ventrolateral. Estas regiões atuam aumentando a síntese dos neurotransmissores, os quais pelos tratos descendentes se projetam à substância cinzenta da medula espinhal e tratos ascendentes para estruturas encefálicas exercendo atividade inibitória sobre os componentes do sistema nociceptivo (CARVALHO e LEMÔNICA, 1998).

## 2.3 Inflamação: Papel fisiológico

A inflamação é um processo regulatório iniciado como consequência de lesão tecidual ou infecção. A principal função da inflamação é eliminar o estímulo patogênico para remover o tecido danificado com o objetivo de restaurar a homeostase (SOEHNLEIN e LINDBOM, 2010).

A resposta inflamatória é um processo de reparo, em que há a destruição, diluição do agente iniciador e uma série de eventos que tentam curar e reconstituir o dano tecidual. Durante o reparo, o tecido lesionado é substituído (regeneração) por células parenquimatosas, com preenchimento no local da lesão por tecido fibroso (cicatrização) ou, mais comumente, pela combinação dos dois processos (ROBBINS e COTRAN, 2005).

### 2.3.1 EVENTOS CELULARES E VASCULARES DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA

A resposta inflamatória aguda provocada por infecção ou lesão tecidual envolve o recrutamento de componentes do sangue (leucócitos) para o local da infecção ou lesão. Esta resposta é, geralmente, desencadeada por receptores do sistema imune inato, como os receptores “Toll-like” (TLRs), receptores “NOD-like” (NLRs), todos localizados em células residentes (ROCK e KONO, 2008).

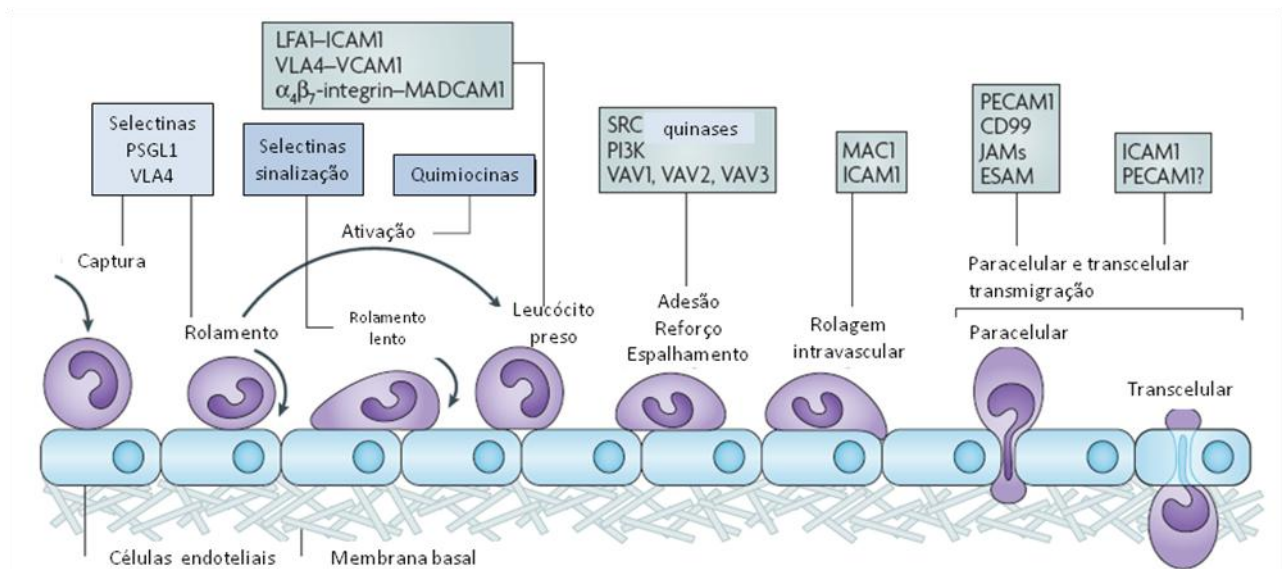
Os eventos vasculares relacionados com a fase aguda da inflamação incluem vasodilatação das pequenas arteríolas, resultando em aumento do fluxo sanguíneo, aumento da permeabilidade e extravasamento de líquido. A vasodilatação pode ser mediada por histamina, prostaglandinas ( $PGE_2$ ), prostaciclina ( $PGI_2$ ) que podem atuar junto com citocinas no aumento da permeabilidade (RANG et al, 2007).

O líquido extravasado durante o processo inflamatório é formado por produtos de cascatas proteolíticas (sistema complemento, sistema de coagulação, sistema fibrinolítico e sistema de cininas). Este exsudato inflamatório local é constituído de proteínas do plasma e leucócitos (principalmente neutrófilos). Os leucócitos que, normalmente, ficam restritos aos vasos sanguíneos, com o aumento da



permeabilidade, vão ter acesso, através da vênulas pós-capilares, ao local da infecção (ou dano) (ROCK e KONO, 2008).

A ativação do endotélio dos vasos sanguíneos permite a transmigração de neutrófilos, porém hemácias não conseguem atravessar o endotélio (EMING et al, 2007). Estes leucócitos oriundos do sangue passam para o tecido inflamado através de um processo que se apresenta em seis eventos: marginação, rolamento, ativação, adesão, diapedese com penetração através da membrana basal dos pericitos (transmigração através do endotélio) e quimiotaxia (migração no tecido intersticial em resposta ao estímulo quimiotático) (LEY et al, 2007) (Figura 2).



**Figura 2:** Interação entre leucócitos e células endoteliais durante alteração vascular. Adaptado de LEY et al, 2007.

A adesão e transmigração de leucócitos são produzidas pela interação de moléculas de adesão de células endoteliais com receptores de quimiocinas e integrinas em leucócitos, que ocorre na superfície endotelial, bem como nos espaços extravasculares (EMING et al, 2007). Mediadores quimiotáticos e certas citocinas medeiam este processo modulando a expressão superficial destas moléculas de aderência. Os receptores de aderência envolvidos pertencem a quatro famílias moleculares: selectinas, imunoglobulinas, integrinas e glicoproteínas. As selectinas são lectinas que interagem com açúcares e/ou glicoproteínas, são responsáveis pela adesão de leucócitos ao endotélio vascular na cascata precoce de eventos que levam aos processos de inflamação. Compreendem a E-selectina que é confinada

ao endotélio; a P-selectina presente no endotélio e nas plaquetas; e L-selectina presentes em muitos tipos de leucócitos (KAKKAR, 2004).

As glicoproteínas de membrana tais como a molécula de adesão vascular-1 (VCAM-1) e a molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) são exemplos de moléculas de adesão que fazem parte da superfamília das imunoglobulinas. VCAM-1 é expressa em células endoteliais ativadas por citocinas, como fator de necrose tumoral-alfa (TNF- $\alpha$ ), por exemplo, enquanto ICAM-1 é expresso por uma variedade de células hematopoiéticas e não hematopoiéticas, incluindo células T e B, células dendríticas, macrófagos, fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais. Integrinas constituem o principal grupo de moléculas de adesão, presentes em muitas células, cujo domínio citoplasmático se liga ao citoesqueleto. Elas são proteínas heterodiméricas compostas de duas cadeias polipeptídicas,  $\alpha$  e  $\beta$ , ligadas não covalentemente (SIMON e GREEN, 2005).

No tecido alvo, os neutrófilos tornam-se ativados, ou pelo contato direto com patógenos ou por meio da ação de citocinas secretadas pelas células residentes, e tentam combater agentes invasores liberando o conteúdo tóxico de seus grânulos, que incluem espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS), proteinase 3, catepsina G e elastase. Estes efetores altamente potentes não discriminam entre o agente agressor e células do hospedeiro, portanto, danos ao tecido do hospedeiro são inevitáveis (NATHAN, 2002).

A resposta inflamatória aguda pode resultar na eliminação dos agentes infecciosos, seguido por uma resolução e fase de reparação, que é mediada principalmente por macrófagos residentes ou recrutados dos tecidos. As lipoxinas (mediadores lipídicos) exercem papel importante na resolução da inflamação através da interrupção da produção de prostaglandinas pró-inflamatórias e inibição do recrutamento de neutrófilos e, ao contrário, promovem o recrutamento de monócitos, que removem as células mortas e inicia-se a remodelação do tecido (SERHAN et al, 2008). Além destes mediadores, protectinas (SCHWAB et al, 2007) e resolvinas (uma outra classe de mediadores lipídicos) (XU et al, 2010) também contribuem para a resolução da inflamação. Os fatores de crescimento produzidos por macrófagos, também têm um papel crucial na resolução da inflamação, pois estão envolvidos no início de reparo tecidual (SERHAN et al, 2008).

Durante a resposta inflamatória aguda, se não houver eliminação do patógeno, o processo inflamatório persiste e adquire novas características. O

infiltrado de neutrófilos é substituído por macrófagos e, em caso de infecção também por células-T. Se o efeito combinado destas células ainda é insuficiente, um estado inflamatório crônico segue e envolve a formação de granulomas e tecido linfóide terciário. As características deste estado inflamatório podem variar dependendo da classe de células T efectoras (T-auxiliar, T-citotóxico) que estão presentes. Além de patógenos persistente, a inflamação crônica pode resultar de outras causas de dano tecidual, como resposta auto-imune ou corpos estranhos não degradados (MEDZHITOV, 2008).

### 2.3.2 MEDIADORES E EFETORES DA RESPOSTA INFLAMATÓRIA

O processo inflamatório envolve uma série de mediadores, além de células e enzimas, responsáveis pelo desenvolvimento da resposta inflamatória. Dentre eles, pode-se destacar a histamina, serotonina, cininas, óxido nítrico, neuropeptídeos, produtos do ácido araquidônico (WARD, 2004).

#### 2.3.2.1 Histamina

A histamina é um dos mediadores pré-formados liberados primeiramente no processo inflamatório através da desgranulação de mastócitos e basófilos por ação de mediadores inflamatórios como substância P, interleucina-1 (IL-1) e fator de crescimento neural (NGF). A histamina liberada ativa receptores histaminérgicos promovendo aumento da permeabilidade a íons cálcio ( $Ca^{2+}$ ) em neurônios sensoriais e a consequente liberação de neuropeptídeos, bem como de prostaglandinas por células endoteliais o que pode levar à hiperalgesia e outros efeitos pró-inflamatórios (DRAY, 1995).

A histamina foi isolada pela primeira vez há cerca de 100 anos por *Sir Henry Dale* e colaboradores através de vários experimentos nos quais descobriram que a esta substância possuía efeito estimulante no músculo liso do intestino e no trato respiratório, causando vasoconstrição, aumento da contratilidade cardíaca e induzia

a “Síndrome do Choque” quando injetada em animais (DALE e LAIDLAW, 1910; 1919 *apud* PARSONS e GANELLIN, 2006). No entanto, em 1927, Best et al isolaram a histamina de amostras de fígado e pulmões humanos afirmando que esta amina seria um componente natural do organismo (PARSONS e GANELLIN, 2006).

A histamina é sintetizada a partir de histidina por ação da enzima histidina decarboxilase. No organismo, ela se liga a quatro classes de receptores histamínicos, todos são receptores acoplados à proteína G (NEUMANN et al, 2010). Os receptores H<sub>1</sub> promovem constrição de músculo liso, exceto em vasos sanguíneos e promovem vasodilatação. Os receptores H<sub>2</sub> estimulam a secreção gástrica e cardíaca. Os receptores H<sub>3</sub> agem como autoreceptores pré-sinápticos e inibem a síntese e liberação de histamina em neurônios histaminérgicos no SNC. Este receptores também agem como hetero-receptores em neurônios não histaminérgicos modulando a liberação de outros neurotransmissores como 5-hidroxitriptamina (5-HT), dopamina, acetilcolina, noradrenalina e ácido  $\gamma$ -aminobutírico (GABA) no SNC e periférico. E, a última classe são os receptores H<sub>4</sub> que são expressos, preferencialmente, em células do sistema imune e mastócitos e induzem a quimiotaxia de eosinófilos, mastócitos, linfócitos T, células dendríticas e basófilos (PARSONS e GANELLIN, 2006).

A histamina desempenha um papel importante em doenças alérgicas e autoimunes. Dos seus quatro receptores, os receptores H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub> e H<sub>4</sub> mostram ter ação sobre inflamação e respostas imunes e podem ser usados como alvos no tratamento de doenças imunes e inflamatórias (YU et al, 2010).

### 2.3.2.2 Serotonina

Serotonina ou 5-hidroxitriptamina (5-HT) é uma amina sintetizada a partir do triptofano por ação da enzima triptofano sintetase. Esta reação ocorre principalmente em células enterocromafins intestinais, mas pode ocorrer em plaquetas humanas, mastócitos de ratos, mas não de humanos, e sistema nervoso central (BISCHOFF et al, 2009).

Em tecidos periféricos, 5-HT é liberada por mastócitos e plaquetas simultaneamente à histamina por desgranulação induzida por mediadores, como

substância P. Esta amina é reponsável por produzir hiperalgesia por ação direta em receptores de 5-HT em neurônios aferentes sensoriais primários. 5-HT possui ações semelhantes às da histamina, ou seja, vasoconstrição inicial, e juntamente com outros mediadores, vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular (KOPP, 1998).

#### 2.3.2.3 Bradicinina

A bradicinina é uma cinina formada durante um processo inflamatório em função da ativação da cascata proteolítica de produção deste mediador, na qual há a liberação de bradicinina a partir de  $\alpha$ -globulinas denominadas cininogênios por ação de calicreínas sobre estes. A bradicinina é um importante mediador envolvido tanto na etapa inicial quanto no progresso de um processo inflamatório (AHLUWALIA e PERRETTI, 1999).

É um autacóide (hormônio local) que atua localmente produzindo dor, vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e síntese de prostaglandinas. Seus efeitos endógenos estão relacionados com dois receptores, o receptor  $B_1$  que é induzido durante processo inflamatório e o receptor  $B_2$  expresso constitutivamente. Na inflamação, os receptores  $B_1$  presentes em macrófagos desencadeiam a produção de IL-1 e de TNF- $\alpha$ . Além disso, podem levar a hipersensibilização de fibras nociceptivas e podem levar à hiperalgesia com estimulação da liberação de substância P e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina por neurônios nociceptivos (GOODMAN e GILMAN, 2006).

#### 2.3.2.4 Sistemas

O sistema complemento é um componente do sistema imune inato com papel de defesa do hospedeiro à infecções por patógenos e ao dano celular. A ativação do complemento está envolvida na patogênese de muitas doenças inflamatórias e imunológicas, como sepse, artrite reumatóide, esclerose múltipla, asma. A ativação

do complemento leva à produção de proteínas do complemento, especialmente C3a e C5a que são responsáveis por promover e perpetuar as reações inflamatórias. Dos produtos do complemento, o C5a é um dos mais potentes peptídeos inflamatórios com uma gama de ações, sendo muito importante na quimiotaxia de neutrófilos e tem atividade quimiotática, também, para monócitos e macrófagos, está envolvido com fagocitose, liberação de grânulos de enzimas, tem ação vasodilatadora, mostrou ter ação na modulação da liberação de citocinas por vários tipos de células, reduz a apoptose de neutrófilos, aumenta a expressão de moléculas de adesão em neutrófilos e ativa a cascata de coagulação (GUO e WARD, 2005).

O sistema de coagulação é um importante componente no processo inflamatório. É ativado após o aumento da permeabilidade vascular, e como consequência leva à ativação do sistema plasmina, o que pode ativar componentes do sistema complemento. Uma característica importante é tornar possível a formação de polipeptídeos vasoativos e cininas (WILLOUGHBY, 1972).

#### 2.3.2.5 Eicosanóides

São os mediadores e moduladores mais importantes da reação inflamatória e regulam diversos processos celulares. O principal precursor dos eicosanóides em mamíferos é o ácido araquidônico que é produzido por ação da enzima fosfolipase A2 sobre fosfolípidos de membrana. O ácido araquidônico pode ser metabolizado por diversas vias, as duas principais vias de metabolização são: via das ciclooxigenases e via das lipoxigenases (FUNK, 2001).

Pela via das ciclooxigenases, o ácido araquidônico é convertido em endoperóxido  $\text{PGH}_2$  ou  $\text{PGG}_2$  pelas ciclooxigenases (COX-1 e COX-2). Estes endoperóxidos sofrem rápida isomerização para formar  $\text{PGE}_2$ ,  $\text{PGI}_2$ ,  $\text{PGD}_2$ ,  $\text{PGF}_{2\alpha}$  e  $\text{TXA}_2$  por isomerases ou sintases (SCHOLICH e GEISSLINGER, 2006).

Existe no organismo humano, duas principais isoformas de ciclooxigenase, a COX-1 que é expressa constitutivamente e age como regulador homeostático e a COX-2 que é induzida principalmente por estímulos inflamatórios (RANG et al, 2007).

A classe das Prostaglandinas do tipo E é a mais importante no processo inflamatório. Este mediador lipídico é uma molécula pequena que age localmente e é rapidamente inativada. O papel de  $PGE_2$  como mediador pró-inflamatório inclui vasoconstrição, aumento da permeabilidade vascular, dor, vasodilatação e edema.  $PGD_2$  está envolvida com a resolução do processo inflamatório por ativar a regulação transcricional de enzimas que degradam eicosanóides e estimula a produção de lipoxinas (SERHAN et al, 2008).

Os leucotrienos (LTs) são mediadores muito importantes no processo inflamatório. São sintetizados a partir do ácido araquidônico por enzimas chamadas lipoxigenases, principalmente 5-lipoxigenase. O principal leucotrieno envolvido com a resposta inflamatória aguda é o leucotrieno  $B_4$  ( $LTB_4$ ) o qual está relacionado com o controle do fluxo sanguíneo, vasodilatação e aumento da permeabilidade, além de ter ações quimiotáticas para neutrófilos e macrófagos (FUNK, 2001).

Outro mediador produzido pela via das lipoxigenases são as lipoxinas (LXs), as quais são sintetizadas a partir de 15-lipoxigenase. Estas representam um grupo de derivados do ácido araquidônico que agem interferindo com ações na microvasculatura com propriedades vasorregulatórias antagonizando o efeito dos  $LTB_4$ . Além destes efeitos, elas diminuem a adesão de leucócitos por moléculas de adesão (HEDQVIST et al, 2000), e infiltração de eosinófilos, portanto, tem propriedades anti-inflamatórias (SERHAN et al, 2008).

### 2.3.2.6 Fator de ativação de plaquetas (PAF)

O PAF é um peptídeo biologicamente ativo que é liberado por trombina e pela maioria das células inflamatórias e exerce seus efeitos em concentrações muito baixas. Pode agir em diferentes células e é considerado um importante mediador de fenômenos alérgicos e inflamatórios agudos e crônicos (GOODMAN e GILMAN, 2006).

O PAF é capaz de produzir uma variedade de sinais e sintomas da inflamação, como vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, hiperalgesia, pode funcionar como agente quimiotático para neutrófilos e monócitos, e ainda pode

ativar PLA<sub>2</sub> iniciando a síntese de eicosanóides (ADAMSON et al, 2003).

### 2.3.2.7 Citocinas

Citocinas são proteínas de baixo peso molecular produzidas por diferentes tipos de células do sistema imune como células T, macrófagos e células dendríticas. A produção delas ocorre por diferentes estímulos, como agentes infecciosos, tumores ou estresse. As citocinas em comunicação com outras células promovem a indução ou regulação da resposta imune (ROCHMAN et al, 2009).

As citocinas possuem características comuns. Uma mesma citocina pode ser produzida por mais de um tipo celular. E, além disso, pode ter diferentes efeitos, dependendo das condições do ambiente em que se encontra o que é chamado de pleiotropismo. Outra característica é quando diferentes citocinas podem exercer a mesma função (redundância). O efeito sinérgico ou antagônico das citocinas ocorre quando as mesmas potencializam ou inibem o efeito de outras, respectivamente. Porém, a maioria das citocinas exerce efeitos parácrinos, com ação sobre células presentes nas proximidades das células produtoras das mesmas ou efeitos autócrino o qual é a ação sobre o tipo celular que a produz. Além disso, algumas citocinas exercem efeitos endócrinos, agindo sobre células presentes em outros locais que não os da célula produtora da própria (BILATE, 2007).

O efeito das citocinas se dá após a ligação a receptores específicos expressos na superfície da célula-alvo, desencadeando a transdução de sinais no interior da célula. Estes receptores quando ligados à citocinas ativam proteína JAKs (*Janus kinase*) que fosforilam resíduos de tirosina, gerando sítios para a ligação dos fatores de transcrição STAT (*signal transducers and activators of transcription*). Após a fosforilação da tirosina, STAT é dissociado das subunidades do receptor e é então translocado da membrana para o núcleo onde induz a transcrição de genes específicos (RANG et al, 2007).

As atividades fisiológicas das citocinas são inúmeras, porém se destacam a ativação da resposta imune celular e humoral, regulação da hematopoiese e controle da proliferação e diferenciação celular. As citocinas também desempenham papel



fundamental na diferenciação de linfócitos T e na ativação de seus diferentes subtipos (BILATE, 2007).

Dentre as principais citocinas que participam ativamente do processo inflamatório, destacam-se o TNF- $\alpha$  e a IL-1 $\beta$ . O TNF- $\alpha$  é uma citocina produzida e liberada principalmente por macrófagos e é considerada um dos principais mediadores inflamatórios (BROWN et al, 2010). A IL-1 $\beta$  é a principal citocina envolvida na inflamação, sendo sintetizada principalmente por monócitos e macrófagos. IL-1 $\beta$  age sinergicamente com TNF- $\alpha$  ativando a resposta inflamatória, aumentando a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais e nos leucócitos e promovendo a diapedese leucocitária na resposta inflamatória aguda (BARKSBY et al., 2007).

#### 2.3.2.8 Quimiocinas

As quimiocinas são pequenos polipeptídeos (90-130 resíduos de aminoácidos) que fazem parte de um subgrupo de citocinas. As quimiocinas controlam a adesão, quimiotaxia e ativação de vários tipos de leucócitos. As quimiocinas desempenham papel fundamental na resposta inflamatória, recrutando células inflamatórias para o local da lesão por quimiotaxia. As quimiocinas também controlam e atuam em diversos processos biológicos como hematopoiese, angiogênese e metástase de tumores (PRUENSTER et al, 2009).

A ação das quimiocinas é mediada por receptores transmembranais acoplados a proteína G. A maioria dos receptores se liga a mais de uma quimiocina, além disso, uma mesma quimiocina pode ligar-se a mais de um receptor. Após a ligação destas em seu receptor, ocorre a ativação de proteínas G, iniciando uma cascata de transdução de sinais que gera segundos mensageiros como AMPc (adenosina monofosfato cíclico), IP3 (inositol trifosfato) e cálcio. As vias de transdução de sinais iniciadas pelas quimiocinas promovem a ativação de integrinas nos leucócitos, levando a adesão à parede do endotélio, geração de radicais livres por fagócitos, liberação de histamina dos basófilos, e ativação de proteases de neutrófilos. Assim como as citocinas, as quimiocinas também estão envolvidas na diferenciação de linfócitos T helper-1 (Th1) e T helper-2 (Th2) (BILATE, 2007).

### 2.3.2.9 Óxido nítrico

O óxido nítrico (NO) é um radical livre gasoso que regula funções celulares em condições fisiológicas e patológicas, incluindo o relaxamento vascular, a inibição da agregação plaquetária, a neurotransmissão, as atividades antimicrobiana e anti-tumoral dos macrófagos, entre outras (LIU et al, 2002).

O NO é sintetizado a partir do metabolismo do aminoácido L-arginina mediado pela enzima óxido nítrico sintase (NOS). Esta reação ocorre através de uma oxidação na porção N-terminal do aminoácido liberando NO e L-citrulina. Três isoformas de NOS já foram identificadas: duas delas são constitutivas e estão presentes nos tecidos neuronal (nNOS) e endotelial (eNOS) e são chamadas de NOS constitutivas (cNOS), enquanto a terceira isoforma é expressa após indução por mediadores pró-inflamatórios, endotoxinas bacterianas entre outros, e é chamada de óxido nítrico sintase induzida (iNOS) (KOLIOS et al, 2004).

O processo de liberação do NO é o resultado de uma série de eventos oxidativos e redutores, envolvendo um grande número de cofatores. O NO gerado se difunde pelas células e ativa a guanilato ciclase solúvel que, por sua vez, promove a formação da guanosina monofosfato cíclica (GMPc). O aumento da concentração de GMPc, resulta no relaxamento das células musculares e na inibição da agregação plaquetária e na adesão dos leucócitos. Em processos infecciosos, a ação citotóxica do NO consiste principalmente na liberação de espécies reativas de oxigênio, como o ânion superóxido, formando o peroxinitrito (DUSSE et al, 2003).

Em estados fisiológicos, o NO atua como agente protetor, mas quando é liberado em quantidades excessivas, pode contribuir para lesão tecidual. O NO está relacionado a diversas doenças, como artrite reumatóide, esclerose múltipla e sepse, condições nas quais o aumento na produção de NO promove lesão tecidual e contribui para a progressão da doença (JEAN-BAPTISTE, 2007).

## 2.4 Fármacos utilizados no tratamento da dor e Inflamação

Diferentes classes de fármacos são utilizadas para o controle e tratamento de dor e inflamação na terapêutica e exercem seus efeitos por diferentes mecanismos. Neste trabalho um destaque maior será dado aos opióides e aos fármacos anti-inflamatórios esteroidais e não-esteroidais (AINEs).

Os peptídeos opióides, como a morfina, são derivados de uma espécie de papoula chamada *Papaver somniferum* (LE MERRER et al, 2009). Os efeitos biológicos destes são mediados por receptores ( $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\kappa$ ) expressos no SNC (cérebro e medula espinhal) e na periferia (LANG et al, 2010). Estes receptores são associados com uma gama de respostas fisiológicas e psicológicas desencadeadas por ligantes endógenos e exógenos. Peptídeos opióides e receptores são conhecidos pelos seus potentes efeitos analgésicos, pelos efeitos sedativos e hipnóticos, tendência a produzir dependência psíquica e física, e produção de tolerância, sendo estes dois últimos fatores limitantes para uso em tratamentos prolongados (CROFFORD, 2010).

A naloxona é um antagonista opióide puro, que pode reverter a ação dos agonistas (morfina) bem como a de alguns agonistas/ antagonistas e agonistas parciais. A naxolona não costuma produzir nenhum efeito quando não compete com fármaco opióide. A meia-vida de eliminação curta da naloxona (cerca de 1 hora) implica em uma duração de ação menor que a da maioria dos agonistas com que a mesma vai competir (GOZZANI, 1994).

Outra classe, bastante utilizada no controle da dor e da inflamação em todo o mundo, são os AINES, como a indometacina. Estes atuam no organismo inibindo as duas isoformas de ciclooxigenase, a expressa constitutivamente COX-1 e a induzida COX-2 (TAKEUCHI et al, 2010). A inibição destas enzimas acarreta na redução dos níveis de prostaglandinas e tromboxanos produzidos durante um processo inflamatório. A maioria dos AINES são derivados de ácidos, como o ácido acetilsalicílico que deriva do ácido salicílico, a indometacina que deriva do ácido acético, em função disso eles competem com o ácido araquidônico pelo sítio ativo da COX (BURIAN e GEISLINGER, 2005).

O maior interesse dos AINES, ao inibirem a produção de prostaglandinas, é reduzir a quantidade de PGE<sub>2</sub>, que está envolvida na sensibilização periférica e

central durante processamento nociceptivo, e está associada com hiperalgesia e alodinia. Esta ação faz com que seja inibida a síntese de outros prostanóides. Conseqüentemente, o efeito analgésico está associado com complicações como problemas gastrintestinais, úlceras, problemas renais, hipertensão, asma ou ainda aumento de risco cardiovascular (SCHOLICH e GEISLINGER, 2006).

Outra classe bastante utilizada na terapêutica são os glicocorticóides (GC), como a dexametasona, os quais são prescritos devido serem potentes anti-inflamatórios e imunossupressores. Estes atuam em praticamente todos os órgãos e tecidos e agem nas fases iniciais e tardias da inflamação por mecanismos de transativação ou transrepressão gênica (AUPHAN et al, 1995).

O mecanismo de ação dos GC pode ser genômico no qual o GC se liga a receptores protéicos específicos, os receptores de GC (RGC), que são proteínas citoplasmáticas, membros da superfamília de receptores nucleares. Por este mecanismo de ação, o complexo glicocorticóide-receptor ativado sofre transformação estrutural e se torna capaz de penetrar no núcleo celular, no qual se liga a regiões promotoras de certos genes, induzindo a síntese não somente de proteínas anti-inflamatórias (IL-10), mas também de proteínas que atuam no metabolismo sistêmico, como proteínas que promovem gliconeogênese. Este processo é chamado de transativação (GOSSYE et al, 2009).

Os GC podem atuar sobre fatores de transcrição, alterando a expressão dos genes-alvo, mecanismo genômico chamado de transrepressão, em que monômeros de moléculas de GC e receptores de GC interagem com fatores de transcrição, como a proteína ativadora 1 (AP-1) e o fator nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) por interação proteína-proteína e promovem efeito inibitório de suas funções. Por essa via, por exemplo, a síntese de mediadores é diminuída como de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , interleucina 6 (IL-6), IL-1 e prostaglandinas, moléculas de adesão, PLA2 e componentes do complemento. O mecanismo não genômico está relacionado com a produção de proteínas com ação anti-inflamatória no citoplasma, como, por exemplo, a Anexina 1 (ANTI et al, 2008).

Apesar destas classes de substâncias apresentarem excelentes propriedades terapêuticas e serem amplamente utilizadas, seu uso produz importantes reações adversas. Em função disso, a busca por substâncias com menos efeitos indesejáveis e com maior seletividade de ação anti-inflamatória e/ou analgésica tem ganhado importância. Neste sentido, investigações envolvendo plantas ganham

papel de destaque uma vez que vários medicamentos, utilizados na terapêutica, são derivados diretos ou sintetizados a partir de substâncias isoladas de plantas.

## **2.5 Modelos Animais de Avaliação das Atividades Antinociceptiva e Anti-Inflamatória**

Muitos modelos animais de avaliação das atividades antinociceptiva e anti-inflamatória são utilizados para avaliar a eficácia de novos fármacos para o tratamento de doenças inflamatórias e dolorosas, bem como estudar seus mecanismos de ação e, de medicamentos já utilizados na terapêutica, mas que não têm o mecanismo de ação farmacológica ainda totalmente esclarecido (WALKER et al, 1999).

A dor não pode ser monitorada em animais, porém ela pode ser estimada por avaliação das respostas de animais a estímulos nociceptivos. Os testes nociceptivos incluem os mais variados estímulos seja elétrico, mecânico, químico, térmico (LE BARS et al, 2001). Neste trabalho, utilizou-se modelos aplicando-se estímulo químico, como o teste de contorções abdominais no qual o estímulo nocivo é o ácido acético na concentração de 0,6%; o teste da placa quente no qual o estímulo térmico é o agente nócico e o teste da formalina em que o formaldeído, agente irritante, é utilizado na concentração de 1%.

O teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético sugerido por Koster e col. (1959), é um modelo de dor visceral ocasionada pela administração i.p. de ácido acético na concentração de 0,6% (LE BARS et al, 2001). Este modelo de dor é muito utilizado para avaliar efeitos antinociceptivos periféricos de natureza anti-inflamatória, uma vez que o ácido acético, na concentração utilizada, induz a dor indireta resultado de uma inflamação aguda no peritônio (IKEDA et al, 2001).

O ácido acético é um agente flogístico que provoca irritação na membrana do peritônio e como consequência desencadeia uma série de movimentos estereotipados como contração da parede abdominal, rotação do corpo e extensão das patas traseiras (LE BARS et al, 2001). Nesse modelo de nocicepção, macrófagos e mastócitos sinalizam a presença de material estranho, liberando citocinas e mediadores inflamatórios clássicos (prostaglandinas, histamina,

serotonina e bradicinina). A hiperalgesia é provocada pela liberação de TNF- $\alpha$ , interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e interleucina 8 (IL-8) por macrófagos e mastócitos residentes na cavidade peritoneal (RIBEIRO et al, 2000). Estas citocinas liberadas pelas células residentes medeiam as contorções, principalmente, através da produção de produtos da ciclooxigenase (prostaglandinas) e mediadores simpatomiméticos, os mediadores finais de hiperalgesia (BRITO et al 2001).

O teste da placa quente é um modelo utilizado para verificar o envolvimento do sistema central no efeito antinociceptivo de drogas. Este teste indica a resposta ao estímulo térmico, o qual é associado à neurotransmissão central (HUNSKAAR et al., 1986). O estímulo nócico que caracteriza este teste, o calor, é frequentemente utilizado em modelos de dor aguda (ANTONIOLLI; VILLAR, 2003), o qual ativa nociceptores (fibras A $\delta$  e C) fazendo a condução do impulso ao corno dorsal da medula espinhal, e posteriormente aos centros corticais (PIETROVSKI, 2004).

O comportamento estereotípico do animal sobre a placa, “sapatear” ou lambe as patas, são considerados respostas supraespinhais em resposta ao estímulo térmico, e a latência para o aparecimento desta resposta é cronometrada em segundos (LE BARS, 2001). Anker (1974), avaliando analgésicos análogos à morfina, demonstrou que a placa quente a 55 °C produzia resultados falsos negativos, o que mascarava a atividade de analgésicos menos potentes como ácido acetilsalicílico ou paracetamol e sugeriu o uso de temperaturas inferiores (em torno de 50 °C). Por este motivo neste trabalho utilizamos a placa quente à temperatura de 50  $\pm$  0,5 °C.

O teste da formalina, primeiramente introduzido por Dubuisson e Dennis (1977), é um dos modelos mais bem estabelecidos e empregados experimentalmente para o estudo de mecanismos nociceptivos (CHICHORRO et al, 2004). A injeção intraplantar de formalina (solução de formaldeído a 1%) na pata induz uma resposta dividida em duas fases, uma fase curta que pode ser devido à estimulação química direta dos nociceptores, enquanto a segunda fase é dependente da mecanismos periféricos. Entre uma fase e outra tem o período de quiescência (LE BARS, 2001).

A primeira fase que ocorre nos primeiros 5 min após a injeção de formalina é também chamada de fase neurogênica. Ela ocorre em função da ativação direta de fibras aferentes nociceptivas mielinizadas e não mielinizadas, principalmente, fibras C pelo agente nócico (ABBOTT et al, 1995). Nesta fase pode haver a participação

de substância P e Bk facilitando a neurotransmissão da dor (VANEGAS e SCHAIBLE, 2004).

A segunda fase (15 a 30 min), é também chamada de fase inflamatória. Esta fase envolve um período de sensibilização durante o qual ocorrem fenômenos inflamatórios, com o envolvimento de mediadores da inflamação como PGs, serotonina, histamina e Bk. A origem central ou periférica da segunda fase tem sido objeto de debate (TJOLSEN et al., 1992). Para alguns, a segunda fase é desencadeada pela ativação neuronal durante a primeira fase (CODERRE et al. 1993). No entanto, esta hipótese parece improvável, visto que o formaldeído provoca atividade bifásica em fibras aferentes (MCCALL et al., 1996; PUIG e SORKIN, 1996), mais ainda porque o bloqueio da primeira fase por substâncias com ações rápidas (por exemplo, lidocaína por via s.c.) não elimina a segunda fase (DALLEL et al., 1995). Assim, a segunda fase não pode ser interpretada como uma consequência da primeira, mas claramente provém de mecanismos periféricos (LE BARS et al, 2001).

A contribuição de Bk, citocinas, aminas simpatomiméticas e metabólitos do AA para uma ou as duas fases da formalina já está bem estabelecido (CHICHORRO et al, 2004). Analgésicos opióides mostram atividade nas duas fases do teste. Em contraste, os AINEs como a indometacina mostram atividade apenas na segunda fase (HUNSKAAR e HOLE, 1987; LE BARS, 2001).

Para avaliar a atividade anti-inflamatória foram utilizados os modelos clássicos de inflamação como eritema de orelha, edema de pata provocado por carragenina (Cg) e/ou dextrana, peritonite induzida por Cg e microscopia intravital.

O teste de eritema em orelha de camundongos induzido por óleo de cróton é um modelo útil para avaliar a atividade anti-inflamatória tópica e é sensível tanto para drogas anti-inflamatórias esteroidais e não-esteroidais (TUBARO et al., 1985). A aplicação tópica do óleo de cróton induz uma resposta inflamatória cutânea, caracterizada por intensa vasodilatação e formação de edema, seguido do aumento da espessura da orelha em consequência do extravasamento celular que atinge o pico máximo na sexta hora. Tubaro e col. (1985) demonstraram que na cinética do processo inflamatório induzido pelo óleo de croton, no pico máximo do edema ocorre intensa infiltração celular, sendo que as principais células que participam neste processo são neutrófilos e macrófagos.

O óleo de cróton pode ser extraído de várias espécies, a principal é *Croton tigilium* (Euforbiaceae). Os efeitos irritantes e de promoção de tumor se devem aos

ésteres de forbol que são compostos policíclicos derivados do óleo de cróton, o principal é o TPA (12-O-tetradecanoil-forbol-13-acetato). Esta ação irritante se deve à ativação de proteínas quinases C (PKC) (EL-MEKKAWY et al, 2000), que estão envolvidas com a transdução de sinal e desenvolvimento de processos de muitas células e tecidos, produzindo uma variedade de efeitos biológicos no organismo (GOEL et al, 2007). Entre os efeitos estão o aumento da permeabilidade vascular, com indução da síntese de metabólitos do AA e da expressão da COX-2, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e da molécula de adesão ICAM-1 (CHI et al, 2003).

O modelo de edema de pata induzido por dextrana é um modelo útil para avaliar o efeito anti-inflamatório de substâncias úteis no tratamento da urticária, edema pulmonar e outros tipos de reações anafiláticas. O edema de pata induzido por este polissacarídeo está relacionado com a desgranulação de mastócitos, e consequentemente leva à liberação de histamina e serotonina, as quais contribuem para aumentar a permeabilidade vascular e o extravasamento de fluido (BASTOS et al, 2001). O líquido extravasado é caracterizado por apresentar poucas proteínas e com ausência de acúmulo de neutrófilos (LO et al, 1982).

A inflamação induzida por Cg no modelo de edema de pata é amplamente utilizada para avaliar novos compostos com atividade anti-inflamatória (CAREY et al, 2010), além de avaliar a contribuição dos mediadores envolvidos nas alterações vasculares associadas com inflamação aguda (CRISAFULLI et al, 2006). Este polissacarídeo induz edema caracterizado pela presença de exsudato rico em proteínas e com grande quantidade de neutrófilos e metabólitos do AA (LO et al., 1982), outros mediadores inflamatórios (histamina, 5-HT, cininas) (WILLIS, 1969 *apud* CARVALHO et al, 1999), além do sistema complemento (DI ROSA et al, 1971).

De acordo com Di Rosa e col. (1971), a inflamação induzida por Cg compreende três etapas. Na primeira etapa (0-90 minutos) ocorre intensa vasodilatação e aumento da permeabilidade com liberação de histamina e 5-HT. Na segunda etapa (90-150 minutos) há liberação de cininas que induzem aumento da permeabilidade do endotélio vascular sanguíneo. E, na última etapa (150-360 minutos), há a liberação de prostaglandinas, período caracterizado por intensa migração de leucócitos, principalmente polimorfonucleares. Todos os mediadores liberados são dependentes do sistema complemento (FERREIRA et al., 2004).

Além disso, Rocha et al (2006) investigaram a contribuição da produção de TNF- $\alpha$  para a resposta inflamatória (edema e migração de neutrófilos) causada pela



injeção intraplantar de carragenina na pata de camundongos e demonstraram que esta citocina pró-inflamatória tem um importante papel na gênese deste processo inflamatório. TNF- $\alpha$  é uma potente citocina pró-inflamatória que possui vários efeitos, incluindo a ativação de células inflamatórias, indução de várias proteínas inflamatórias, citotoxicidade (FELDMANN e SAKLATVALA, 2001; HADDAD, 2002; HOPKINS, 2003), estimula a expressão do gene da oxido nítrico sintase induzida (iNOS) em certos tipos de células, também induz a quimiotaxia de neutrófilos e linfócitos T e a expressão de moléculas de adesão (SHIN et al, 2010).

Outro meio utilizado para avaliar a atividade anti-inflamatória do EAML através da resposta do mesmo à migração de células inflamatórias (neutrófilos) para o local da lesão foi o teste da peritonite induzida por Cg em ratos. Este é um modelo caracterizado por aumento no transporte de solutos entre o plasma e a membrana porosa, além da paralela migração celular que ocorre no peritônio. Essas alterações devem-se à vasodilatação dos capilares na membrana peritoneal e pela abertura dos poros nos microvasos, causados por mediadores celulares e inflamatórios, como neutrófilos e PGE<sub>2</sub>, respectivamente (PAULINO et al, 2008).

Os polimorfonucleares são as principais células a migrarem para a cavidade peritoneal, na fase inicial da resposta inflamatória, neste modelo experimental (LAWRENCE et al., 2002; HATTORI et al, 2010). Os neutrófilos possuem moléculas de adesão (VCAM-1, ICAM-1 e E-selectina), as quais são expressas após indução por citocinas, como TNF- $\alpha$ , e estão em abundância para ligação rápida a receptores nas células endoteliais ativadas durante a inflamação (LEE et al 2010). A interação de neutrófilos recrutados no sítio da inflamação com células residentes, mediadores inflamatórios locais e/ou matriz extracelular, pode levar à produção de vários outros mediadores, incluindo citocinas, quimiocinas, enzimas, espécies de oxigênio e nitrogênio e metaloproteases, que podem ampliar a resposta inflamatória (ALVES 2009).

Com o objetivo de comprovar a atividade do EAML sobre a migração de leucócitos, foi realizado o teste de microscopia intravital. Este tem por objetivo avaliar na microcirculação mesentérica, por meio de videomonitoramento *in vivo*, as interações entre os leucócitos e a parede dos vasos sanguíneos (vênulas) no local da inflamação (GRANGER e KUBES, 1994).

A especificidade molecular dos leucócitos tendo como alvo os locais de inflamação é mediada pelas lectinas de membranas, selectinas, integrinas, e a

superfamília de imunoglobulinas, que devido à correlação destas com os mecanismos de interação e adesividade entre diversas moléculas, leucócitos e células endoteliais, são conhecidas como moléculas de adesão. (SIMON e GREEN, 2005).

O recrutamento de leucócitos polimorfonucleares (PMN) livres para o local da inflamação ou infecção é o passo fundamental para resposta imune inata do organismo. A migração de PMNs para estes locais é visto como um processo de várias etapas com envolvimento sequencial de diferentes moléculas de adesão com PMNs e células endoteliais (CE) de superfície. Este processo é iniciado pela ligação PMN-selectina e rolamento ao longo das CE de superfície, seguido por firme adesão dependente de integrinas, antes do extravasamento de PMNs para o espaço tecidual. Esta cascata de eventos moleculares altamente regulada é ditada por propriedades hemodinâmicas, mecânicas e cinéticas de moléculas de adesão participantes (PAWAR et al, 2008).

Muitas técnicas utilizadas para triagem de atividade antinociceptiva e anti-inflamatória são gerais e independem do composto estudado, como o teste de contorções abdominais. Na maioria das vezes, não se chega ao mecanismo de ação definitivo da substância ou extrato estudado, necessitando de técnicas mais avançadas. Porém, estes testes primários são de grande importância e representam etapas iniciais para caracterização farmacológica de novos compostos capazes de interferir no curso da inflamação (LAPA et al, 2003).

### 3 JUSTIFICATIVA

As pesquisas voltadas para plantas medicinais que são usadas popularmente para tratar diversos distúrbios, entre os quais a dor e a inflamação, podem comprovar seus usos populares além de levar a descoberta de compostos que possam ter atividade biológica. Além disso, o uso de extratos padronizados e com ação comprovada pode beneficiar a população com menos recursos devido seu baixo custo, contribuiria para a descoberta de novos compostos de interesse terapêutico ou base para a síntese de moléculas com potencial para a indústria farmacêutica e para inserção da espécie como recurso terapêutico oficial.

Neste sentido, os estudos oriundos deste trabalho, seguido de estudos pré-clínicos, poderão levar à obtenção de um fitoterápico.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo geral

Avaliar as atividades antinociceptiva e anti-inflamatória do extrato aquoso de *Mikania lindleyana* (EAML), bem como identificar os constituintes presentes no mesmo.

### 4.2 Delineamento experimental

#### 4.2.1 RELACIONADOS À COMPOSIÇÃO QUÍMICA

- Identificar as classes de metabólitos secundários presentes no EAML;
- Identificar o principal marcador presente no EAML por Cromatografia em camada delgada (CCD), Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) e por Cromatografia líquida acoplada com espectrometria de massa (CLAE-DAD-EM);

#### 4.2.2 RELACIONADOS À TOXICIDADE

- Avaliar a toxicidade aguda e determinar a dose letal mediana (DL<sub>50</sub>) do EAML em camundongos;

#### 4.2.3 RELACIONADOS À ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA

- Determinar a dose efetiva mediana (DE<sub>50</sub>) do EAML;

- Avaliar a possível atividade antinociceptiva do EAML em modelos experimentais de estímulos químicos (contorção abdominal e formalina) e térmico (placa quente);

#### 4.2.4 RELACIONADOS À ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA

- Analisar os efeitos anti-inflamatórios do EAML nos modelos: edema de pata induzido por dextrana em ratos, edema de pata induzido pela carragenina (Cg) em ratos, dermatite induzida pelo óleo de cróton em camundongos.
- Avaliar a atividade do extrato na migração de neutrófilos pelo teste da peritonite induzida por Cg em ratos, e sobre o rolamento e adesão de leucócios pelo teste de microscopia intravital em camundongos.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 Fármacos, reagentes e soluções

#### 5.1.1 ANÁLISE FITOQUÍMICA

- Acetonitrila P.A (Vetec, RJ)
- Ácido acético P.A (Vetec, RJ)
- Álcool butílico P.A (Isofar, RJ)
- Álcool metílico P.A (Isofar, RJ)
- Água ultra pura
- Álcool etílico P.A (Isofar, RJ)
- Éter etílico (Synth, SP)
- Hidróxido de Potássio (Vetec, RJ)
- Tolueno (Isofar, RJ)

#### 5.1.2 AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA

- Acetona (Farmax)
- Ácido Acético Glacial P.A (Vetec Química Fina Ltda, RJ, Brasil)
- Água destilada
- Carragenina Lambda (Sigma Chemical, CO., USA)
- Corante pancrômico de Rosenfeld
- Cloridrato de ketamina (Vetanarcol, Argentina)
- Cloridrato de naloxona (Cristália, Rio de Janeiro, Brasil)
- Cloridrato de xilazina (Rompun, Bayer, Brasil)
- Dexametasona (Aché, SP, Brasil)
- Dextrana (Sigma Chemical, CO., USA)
- Formaldeído P.A (Vetec Química Fina Ltda, RJ, Brasil)
- Indometacina (Sigma Chemical, CO., USA)
- Óleo de cróton (Sigma Chemical, CO., USA)

- Pizotifeno (Novartis, Rio de Janeiro, Brasil)
- Salina Tamponada com fosfato (PBS)
- Solução fisiológica de cloreto de sódio 0,9%
- Solução de Turk (Ácido acético e violeta de genciana-Isofar)
- Sulfato de morfina (Cristália, Rio de Janeiro, Brasil)
- Tribromoetanol (Sigma Chemical, CO., USA);

## 5.2 Equipamentos e aparelhos

### 5.2.1 ANÁLISE FITOQUÍMICA

- Agitador magnético mod. Q26122 (Quimis)
- Balança analítica mod. FA-2104N (Bioprecisa)
- Bomba de vácuo mod. MA 057 (Marconi)
- Capela mod. Q-216-12 (Quimis)
- Câmara de análise de fluorescência por luz ultravioleta mod. ENF260C/FE (Spectroline)
- Espectrômetro de massas Mod. ULTRATOF<sub>Q</sub> - ESI-TOF Mass Spectrometer (Bruker Daltonics, Billerica, MA, EUA).
- Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência Mod. Prominence (SHIMADZU)
- Estufa mod. MD 1.2 (Medicate)
- Evaporador rotativo mod R3000 (Buchi)
- Liofilizador (Labconco)
- Moinho de facas
- Refrigerador -70°C
- Ultrassom mod. Maxiclean 1450 (Unique)

### 5.2.2 AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA

- Balança analítica mod. – FA2104N (Bioprecisa)

- Balança para pesagem dos animais mod. ID-1500 (FILIZOLA)
- Câmara de Neubauer
- Centrífuga
- Microscópio óptico
- Microscópio intravital mod Tec DNS 550HS (Nikon)
- Placa quente mod. 35100 (Ugo Basile, Varese, Itália)
- Pletismômetro mod. 7140 (Ugo Basile, Varese, Itália)
- Espectrofotômetro
- Estufa de CO<sub>2</sub>

### 5.3 Material vegetal

#### 5.3.1 OBTENÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO

O material vegetal foi adquirido no Mercado de Ervas do Ver-o-Peso de Belém/PA, coletado no Distrito de Icoaraci no mês de abril de 2009. Um exemplar da espécie foi caracterizado pelo Dr. Mário Augusto Gonçalves Jardim, por comparação com uma exsicata autêntica de *Mikania lindleyana* que está armazenada no Herbário do Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém/PA sob o número MG188973.

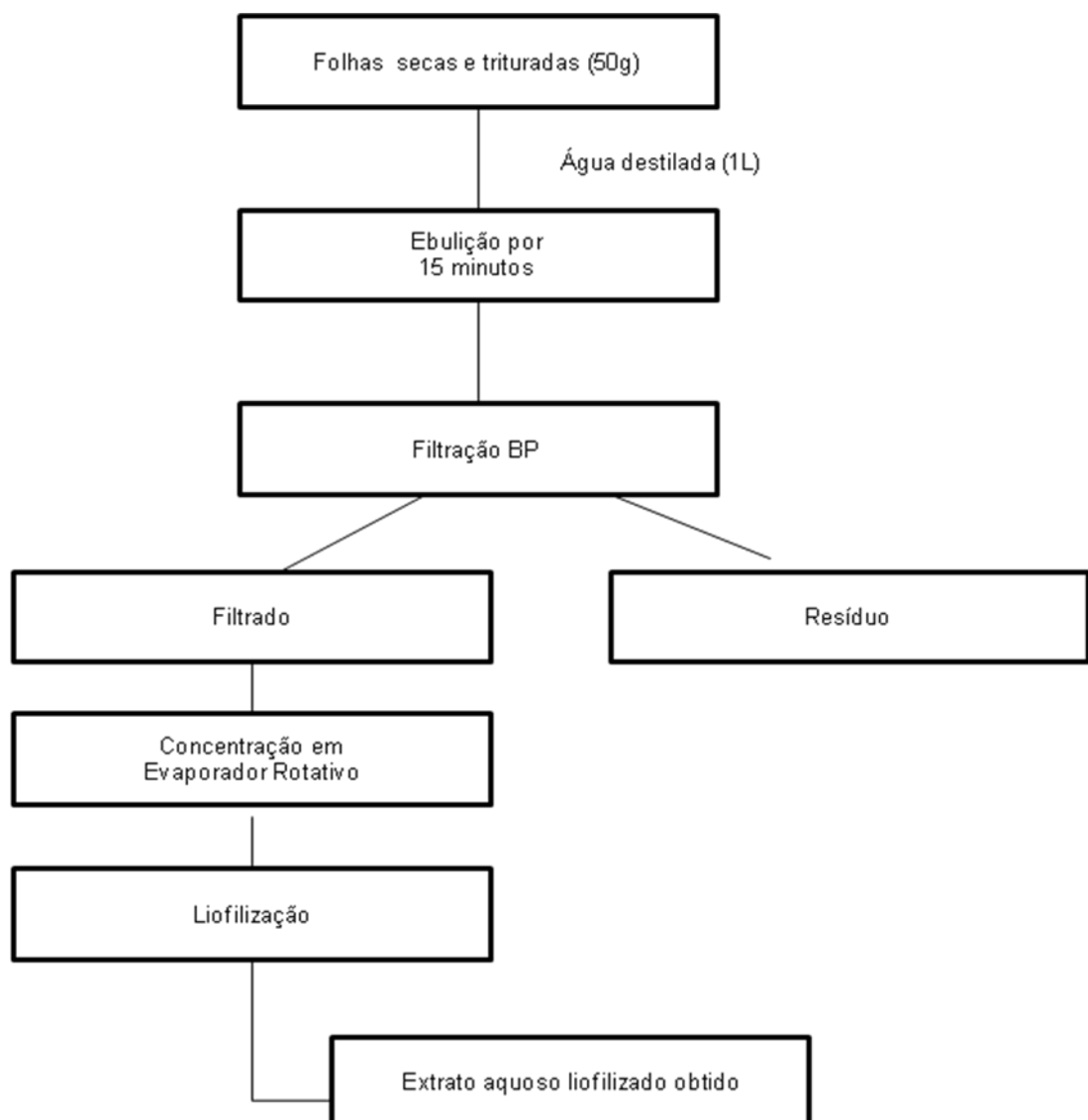
#### 5.3.2 PREPARAÇÃO DO EXTRATO

Para a preparação do extrato aquoso, as folhas foram lavadas com álcool 70%, e colocadas para secar em temperatura ambiente em local ventilado por um período de três dias. Após este período, as folhas foram levadas a estufa de ventilação a 40°C. O material seco foi triturado em moinho de facas e o pó obtido foi utilizado para a preparação do extrato com rendimento de 7%.

O extrato foi preparado de acordo com a Farmacopéia Brasileira 1ª ed. (1926) seguindo o método para preparação de decoctos com adaptações. Por este processo, 50 gramas do material vegetal seco e triturado foram mantidos em contato



com 1000 mL de água ultrapura em ebulição por um período de 15 minutos em béquer de vidro enrolado com filme PVC, a fim de tentar evitar a evaporação do solvente. Após 15 minutos o extrato foi filtrado utilizando-se kitassato, funil de Buchner e papel de filtro. O filtrado foi transferido para um balão de fundo redondo, de 100 mL, e concentrado em Evaporador Rotativo em banho Maria sb baixa pressão a 50°C. O extrato concentrado foi colocado em um recipiente e levado a freezer em temperatura de -70°C. Após congelamento, foi liofilizado. O extrato seco obtido forneceu um rendimento foi de 24% (11g), como mostrado na figura 3.



**Figura 3:** Fluxograma de obtenção do extrato aquoso liofilizado de *Mikania lindleyana*.

### 5.3.3 FRACIONAMENTO DO EXTRATO

O extrato aquoso liofilizado (500 mg) foi fracionado por partição com metanol. A fração metanólica obtida foi concentrada e analisada por CCD sobre gel de sílica, procedimento descrito adiante.

## 5.4 Análise fitoquímica

A prospecção fitoquímica foi feita de acordo com BARBOSA et al, 2001. O teste foi feito para saponinas espumidicas, açúcares redutores, polissacarídeos, fenóis, taninos, proteínas, aminoácidos, glicosídeos cardíacos, catequinas, derivados benzoquinonas, sesquiterpenolactonas e outras lactonas, e flavonóides utilizando reagentes como lugol, solução alcoólica de  $\text{FeCl}_3$ , solução aquosa de ninidrina a 1%, solução aquosa de vanilina a 1%, cloridrato de hidroxilamina a 10%,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  a 25%, e magnésio.

## 5.5 Métodos Cromatográficos

### 5.5.1 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD)

A análise qualitativa por cromatografia em camada delgada por ascensão unidimensional foi realizada utilizando-se cromatoplaça de gel de sílica (Merk®) com espessura de 250 $\mu\text{m}$  e como fase móvel tolueno-éter (1:1) saturado com ácido acético 10%. Aplicou-se cerca de 1-10  $\mu\text{L}$  do analito (fração metanólica do EAML) e separadamente solução de cumarina (Sigma). Após desenvolvimento, o cromatograma foi examinado sob luz ultravioleta (365nm) antes e após nebulização com solução etanólica de hidróxido de potássio 5% (WAGNER e BLADT, 2001).

## 5.5.2 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA COM ESPECTROMETRIA DE MASSA (CLAE-DAD-EM)

As amostras foram preparadas por solubilização de 10 mg de EAML em 2 mL de água, após filtração sobre filtro Millex® (0,45 µm, 13 mm de diâmetro), o filtrado foi analisado pelo equipamento que utilizou-se uma coluna ODS (C-18 4,6 x 250mm) (Shimadzu), como fase móvel uma solução aquosa de ácido acético a 2% v/v (a fase A) e acetonitrila (88%), metanol (10%) e acético ácido (2%) v/v (a fase B). A eluição foi realizada seguindo o gradiente: 0-20 min, 18-30% da fase B; 20-40 min, 30-45% da fase B; 40-60 min, 45-100% da fase B; 60-65 min, coluna de lavagem. O fluxo foi de 1 mL/min. As condições do espectrômetro de massas utilizadas foram: 1000 varreduras por segundo, voltagem do capilar 4500 V, gás nebulizador nitrogênio, temperatura do gás 180 °C; fluxo do gás 7 L/min, o intervalo do espectro foi de 2 s e pressão do gás nebulizador, 3 bar. O detector UV-DAD foi ajustado para registro entre 200 e 600 nm, e o cromatograma em UV escolhido foi em 320 nm. As massas foram identificadas no modo de ionização positivo (GOBBO-NETO e LOPES, 2008)

## 5.6 Avaliação Farmacológica

### 5.6.1 ANIMAIS

Foram utilizados camundongos Swiss machos (*Mus musculus*) adultos pesando entre 25-40g e ratos (*Rattus norvegicus*) linhagem Wistar pesando entre 200 e 300g provenientes do Instituto Evandro Chagas (Belém), os quais foram alojados na sala de acomodação da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Pará (UFPA). Eles foram colocados em gaiolas e mantidos sob condições normais de temperatura (25-30°C) e ciclo claro/escuro de 12h com acesso a água e ração *ad libitum*. Antes da realização de cada teste, os animais foram deixados em jejum de 8 horas apenas com água *ad libitum*. E, antes da realização de cada teste foi necessário um período de uma hora, no mínimo, para ambientação dos animais.

Os cuidados e o manuseio dos animais estão conforme o parecer FAR 001-

10-CEPAE/UFPA.

Os experimentos conduzidos na USP- Ribeirão Preto tiveram os animais provenientes do Biotério Central da Universidade de São Paulo obedecendo aos padrões exigidos.

### 5.6.2 DROGAS E TRATAMENTOS

O EAML foi dissolvido em água destilada e administrado sempre por via oral (v.o.). Os grupos controles foram tratados apenas com o veículo, água destilada v.o. Os controles positivos utilizados nos diferentes experimentos foram indometacina (5 ou 10mg/kg, v.o.); dexametasona, nas doses de 1 ou 10mg/kg, por v.o. ou subcutânea (s.c.), respectivamente; pizotifeno (0,5mg/kg, v.o.), sulfato de morfina (4 ou 10mg/kg, s.c.), naloxona (0,4 mg/kg, s.c.) todos solubilizados em solução salina. As drogas utilizadas nos experimentos como ácido acético 0,6%, formaldeído 1%, Cg e dextrana também foram solubilizados em solução salina. O óleo de cróton 2,5% foi solubilizado em acetona. Os anestésicos xilazina (10 mg/kg), quetamina (30 mg/kg) e tribromoetanol (250 mg/kg) também foram solubilizados em solução salina. As soluções administradas por v.o tinham volumes fixos de 1 mL/10g para camundongos e 1mL/100g para ratos. As administrações feitas na região intraplantar apresentavam volumes fixos de 20µL/pata para camundongos e 100 µL/pata para ratos.

### 5.6.3 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA

Para avaliação da toxicidade aguda foi adotado o guia OECD 425-GUIDELINE FOR TESTING OF CHEMICALS (2001) adaptado. Neste teste, foram utilizados camundongos machos *Mus musculus* em grupos de 10 animais que pesavam entre 20-30 gramas, em jejum de 12 h. Um grupo recebeu por v.o, através de cânula orogástrica, uma dose única de EAML de 5000mg/kg e outro grupo apenas o veículo (água). Em seguida, foram observados por 4 h para possíveis

alterações comportamentais as quais, quando ocorreram, foram anotadas. Este período pode ser considerado crítico para manifestação de sinais de toxicidade.

Segundo o teste descrito por Malone e Robichaud (1962) os parâmetros comportamentais observados foram: atenção, alerta, analgesia, atividade motora espontânea, locomoção, falta de apetite, apatia, resposta ao tato, secreção nasal, piloereção, estereotipia, agressividade, ataxia, sudorese, micção, diarreia e convulsão.

Após o período de 4 h, os animais foram levados à sala de acomodação, onde tiveram acesso à água e ração *ad libitum*, e foram observados por um período de 14 dias. Caso algum dos animais viesse a óbito, o número de animais seria anotado para calcular-se uma possível dose letal mediana (DL<sub>50</sub>) através de testes estatísticos.

#### 5.6.4 ESTUDO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO EAML *IN VIVO*

##### 5.6.4.1 Atividade analgésica periférica

O teste de contorções abdominais seguiu o modelo proposto por Koster e colaboradores (1959). Neste teste, as contorções abdominais foram induzidas em camundongos através da administração de ácido acético 0,6% v/v por via intraperitoneal (i.p.) em volume de 0,1 mL para cada 10 g de peso do animal. As contorções abdominais consistem em movimentos estereotipados como contração da parede abdominal, rotação do corpo e extensão das patas traseiras.

Todos os grupos com número de 10 animais foram pré-tratados por v.o 60 min antes da administração de ácido acético. Os grupos foram tratados com EAML nas doses de 125, 250, 500, 750, 1000 e 1500 mg/kg. Um grupo foi tratado com o controle positivo indometacina (5mg/kg) e o grupo controle com água (0,1ml/10g). A intensidade da nocicepção foi quantificada como o número total de contorções abdominais durante o período de observação de 20 min iniciando-se 10 min após a administração do ácido acético. Os animais, durante o tempo de observação, foram contidos em funis de vidro com diâmetro de aproximadamente 22 cm.

#### 5.6.4.2 Determinação da DE<sub>50</sub>

Para o cálculo da DE<sub>50</sub>, utilizou-se as doses aplicadas no teste de contorções abdominais e suas correspondentes porcentagens de inibição. Através do Teste de regressão linear utilizando o programa estatístico GraphPad Prisma versão 5.0, foi possível determinar a DE<sub>50</sub> bem como encontrar a equação da reta e o coeficiente de correlação linear.

O objetivo deste trabalho, ao utilizar uma DE<sub>50</sub>, é, na verdade uma tentativa de se reduzir o número de animais utilizados na realização de cada teste, visto que os órgãos de regulamentação para o uso de animais de laboratório preconizam a utilização do princípio dos 3 Rs (*replacement, reduction, refinement*) são voltadas para uma redução cada vez maior do número de animais de laboratório na realização de experimentos.

#### 5.6.4.3 Atividade analgésica central

O modelo utilizado foi estabelecido por MacDonald et al. (1946)- Teste da placa quente. Os camundongos foram colocados sobre uma placa quente (Ugo Basile, Itália), previamente aquecida a  $50 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ , e foi anotado o tempo, em segundos, em que o animal levou para manifestar alguma reação em resposta ao estímulo térmico. Esta reação é esterotípica e consiste em saltar ou lambear qualquer uma das patas.

Este teste foi realizado em três grupos. O grupo do EAML foi tratado com a DE<sub>50</sub> 692,6 mg/kg v.o. n=10. Outro grupo foi tratado com o veículo 0,1 mL/10g v.o. n=10 e, o grupo que foi tratado com o controle positivo morfina (10 mg/kg n=10) por via s.c. Imediatamente após o tratamento, a resposta foi avaliada nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 min. O tempo máximo que cada animal permaneceu sobre a placa (tempo de corte ou “cut-off”) foi de 40 s, para evitar lesão na pata do animal.

#### 5.6.4.4 Teste da Formalina

Para o teste da Formalina, o modelo seguido foi o descrito por Hunskaar e Hole (1987) no qual camundongos machos receberam 20 $\mu$ L de formalina (formaldeído a 1%) na região intraplantar da pata posterior direita. Logo após a injeção de formalina, os animais foram colocados individualmente dentro de funil de vidro com diâmetro de aproximadamente 22cm. Durante 30 minutos foi cronometrado o tempo em que os animais permaneceram lambendo a pata na qual foi injetada formalina, sendo este período considerado como indicativo de dor. Este período foi dividido em dois momentos, a primeira fase que caracteriza a dor neurogênica, ocorre nos primeiros 5 min após a injeção da formalina e a segunda fase que caracteriza a dor inflamatória, entre 15 a 30 min., representando a resposta tônica à dor, acompanhada de uma resposta inflamatória relacionada à liberação de mediadores inflamatórios (HUNSKAAR e HOLE, 1987). Entre uma fase e outra ocorre o período chamado de quiescência em que não há manifestação de estímulos.

O grupo do EAML na dose 692,6 mg/kg foi tratado, por v.o, 1h antes da injeção de formalina. O grupo controle foi tratado com o veículo (água), 1h antes. Um grupo foi tratado com o controle positivo morfina (4 mg/kg s.c.) 30 min antes e um grupo tratado apenas com naloxona (0,4 mg/kg s.c.) 15 min antes.

Objetivando verificar a participação do sistema opióide no efeito antinociceptivo do EAML, o teste foi feito com a presença do antagonista opióide naloxona (0,4 mg/kg s.c.). Os camundongos foram pré-tratados com naloxona (0,4 mg/kg s.c.) 15 min antes do EAML (692,6 mg/kg v.o) e morfina (4mg/kg s.c.). Todos os grupos foram constituídos por 10 animais.

#### 5.6.5 ESTUDO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO EAML *IN VIVO*

##### 5.6.5.1 Dermatite em orelha de camundongos induzida pelo óleo de cróton

Para verificar a atividade anti-inflamatória tópica do EAML, foi realizado o teste da dermatite em orelha, de acordo com o modelo descrito por Tubaro e colaboradores (1985). A indução da dermatite ocorreu com aplicação de 20µL de uma solução 2,5% de óleo de cróton em acetona (v/v) na superfície interna da orelha direita dos camundongos. Na orelha esquerda, foi aplicado o mesmo volume (20µL) de acetona. Para a aplicação do óleo de cróton, os camundongos tiveram que ser anestesiados com cloridrato de quetamina mais cloridrato de xilazina (3:1, i.p).

Foram utilizados três grupos de animais, os quais foram tratados por v.o uma hora antes da aplicação do óleo de cróton. Um grupo foi tratado com o EAML (692,6 mg/kg). Outro com o controle positivo dexametasona (0,5 mg/kg) e o grupo controle tratado com o veículo (água).

A avaliação da resposta inflamatória foi feita em balança analítica após 6 h da aplicação do estímulo. Os camundongos foram sacrificados por deslocamento cervical e um tampão (amostra de 6 mm de diâmetro) foi retirado de cada orelha com auxílio de punch de biópsia. A diferença entre o peso das orelhas esquerda (controle) e orelha direita (estimulada), expressa o tamanho do edema formado em mg. Todos os grupos foram constituídos por 10 animais.

#### 5.6.5.2 Edema de pata induzido por dextrana

O modelo de edema de pata induzido por dextrana em ratos é um modelo bastante utilizado para investigação de novas drogas anti-inflamatórias. Este modelo baseia-se na variação do volume das patas traseiras de ratos após a aplicação do estímulo inflamatório.

Neste teste, o modelo seguido foi o descrito por Carvalho e colaboradores, (1999). No qual foram utilizados três grupos de animais e todos foram pré-tratados por v.o uma hora antes da aplicação do agente inflamatório (dextrana 1%). Um grupo recebeu o EAML na dose de 692,6 mg/kg, outro grupo recebeu o controle positivo pizotifeno (0,5 mg/kg), e o grupo controle (água) um volume final de 0,1 mL para cada 100 g de peso do animal. Todos os grupos foram constituídos de cinco animais.



O estímulo (dextrana) foi feito com injeção de 100 µL de solução de dextrana 1% na região intraplantar da pata direita e o mesmo volume de solução salina na pata esquerda de cada animal. O desenvolvimento do edema foi avaliado com auxílio de pletismômetro (Ugo Basile, Itália) e foi medido imediatamente após a administração de dextrana e solução salina, tempo zero, e em intervalos regulares de 30 minutos, durante duas horas após aplicação do estímulo inflamatório. A diferença entre as patas direita e esquerda em cada tempo corresponde ao edema formado em mililitros.

#### 5.6.5.3 Edema de pata induzido por Cg

O modelo de edema de pata induzido por Cg em ratos é um dos mais usados para investigação de novas drogas anti-inflamatórias. Este modelo baseia-se na variação do volume das patas traseiras de ratos após a aplicação do estímulo inflamatório (Winter et al, 1962).

Neste teste, foram utilizados três grupos e todos foram pré-tratados por v.o uma hora antes da aplicação do agente inflamatório (Cg). O grupo do EAML foi tratado com a dose de 692,6 mg/kg, outro grupo recebeu o controle positivo indometacina (10 mg/kg), e o grupo controle (água) um volume final de 0,1 mL para cada 100 g de peso do animal. Todos os grupos foram constituídos de quatro animais.

O estímulo foi feito com injeção de 100 µL de solução de Cg (100µg/pata) na região intraplantar da pata direita e o mesmo volume de solução salina na pata esquerda de cada animal. O desenvolvimento do edema foi avaliado com auxílio de pletismômetro (Ugo Basile, Itália), o qual foi medido imediatamente após a administração de Cg e solução salina em intervalos regulares de 1 h, durante 4 h. A diferença entre as patas direita e esquerda em cada tempo corresponde ao edema formado em mililitros.

#### 5.6.5.4 Avaliação do efeito do EAML sobre a migração de neutrófilos para cavidade peritoneal induzida por Cg

Para este teste foram utilizados quatro grupos de ratos. Um grupo foi tratado com EAML (692,6 mg/kg) v.o 1h antes; outro grupo com o controle positivo dexametasona (1mg/kg) i.p. 30 min. e dois grupos receberam solução salina (0,1ml/100g) v.o. 1 hora antes. Os animais receberam por via i.p. Cg (300 µg por cavidade (cav.)) dissolvida em 3 mL de salina estéril ou apenas salina estéril (3 mL i.p.). Todos os grupos foram constituídos por 4 animais.

A migração celular foi avaliada 4 h após a injeção do estímulo. Para tanto, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical, e injetou-se 10 mL de PBS heparinizado (1 mL/1000 mL de PBS) na cavidade peritoneal. Os abdomens dos animais foram levemente massageados e, através de uma incisão foram coletados os fluidos peritoneais para serem realizadas as contagens de células totais e diferenciais.

A contagem total e diferencial dos leucócitos foi realizada conforme metodologia descrita anteriormente por SOUZA e FERREIRA (1985). Neste procedimento, 20 µL do fluido coletado de cada animal foram diluídos em 380 µL do reagente de Turk e posteriormente usados para a contagem total de leucócitos em câmara de Neubauer. A contagem diferencial das células foi realizada através de esfregaços corados em lâminas, para tanto, parte do exsudato foi levado à centrifuga a 1000 rpm durante 10 min, após este processo, o sobrenadante foi resuspenso em 0.4 mL de uma solução de albumina a 3% em PBS p/v. Os esfregaços celulares foram feitos em lâmina própria e corados pelo corante pancrômico de Rosenfeld, e as células contadas através de microscópio óptico, usando-se objetiva de imersão em óleo. Foram contadas 100 células em cada lâmina, diferenciando-as em: neutrófilos, eosinófilos e linfócitos. O número de células diferenciadas foi calculado pelo percentual encontrado em relação ao número total de células. Os resultados estão expressos como média ± e.p.m. (erro padrão da média) do número de células x 10<sup>6</sup>/mL de fluido peritoneal.

#### 5.6.5.5 Efeito do EAML sobre rolamento e adesão dos leucócitos induzidos por Cg na microcirculação mesentérica

A avaliação do rolamento e adesão dos leucócitos ao endotélio vascular foi realizada por microscopia intravital através de procedimentos previamente descritos (BAEZ, 1969; FORTES et al., 1991). Camundongos receberam EAML na dose de 692,6 mg/kg v.o. ou salina, 1 h antes do estímulo inflamatório Cg i.p. (500 µg/cav.). Após 3 horas, os animais foram anestesiados com injeção i.p. de solução salina contendo 250 mg/kg de tribromoetanol. Através de uma incisão lateral cutânea na cavidade abdominal, o mesentério foi exteriorizado para a observação da microcirculação *in situ*. Os animais foram mantidos sobre uma placa aquecida (37 °C), dotada de área transparente, sobre a qual o tecido foi fixado. A preparação foi mantida úmida e aquecida por irrigação com solução salina a 37 °C. A placa aquecida foi mantida sobre o charriot de um microscópio óptico tri-ocular, ao qual estava acoplado um fototubo, com sistema de lentes ampliadoras superpostas, um monitor de computador e um vídeo que permite a projeção e gravação de imagem com aumento final de 3400 vezes (BAEZ, 1969).

Os vasos selecionados para o estudo foram vênulas pós-capilares com diâmetro variando 10 a 18 µm. Após o estímulo inflamatório Cg (3h), foi avaliado o rolamento dos leucócitos e o número destes aderidos ao endotélio durante 5 min em uma extensão de 10 µm de vênula. Esta extensão é definida na tela do monitor: 10 µm no tecido correspondem a 3,4 cm na tela (FORTES et al., 1991), portanto os resultados foram expressos em rolamento celular/10 µm/min e células aderidas/10 µm<sup>2</sup>. Foram considerados os leucócitos que permaneceram aderidos ao endotélio vascular por mais de 30 s (GRANGER e KUBES, 1994). Duas determinações numéricas foram feitas por animal, estimando-se o resultado como média de ambos.

## 5.7 Análise Estatística

Todos os resultados foram expressos como média  $\pm$  e.p.m. (erro padrão da média) e n representa o número de animais. Nos testes de contorções abdominais, placa quente, dermatite induzida por óleo de cróton, edema de pata por dextrana e Cg e peritonite foi utilizado análise de variância (ANOVA) uma via ou duas vias, seguido de teste de Bonferroni quando apropriado. No teste da formalina e microscopia intravital os grupos foram comparados por teste “t” de Student não pareado. Valores com hipótese de nulidade menor que 5% ( $P < 0,05$ ) foram considerados estatisticamente significantes. E, para o cálculo da  $DE_{50}$  foi utilizado o teste de regressão linear. O programa utilizado foi o GraphPad Prisma versão 5.0.

## 6 Resultados e Discussão

### 6.1 Caracterização dos Metabólitos Secundários de *M.lindleyana*

#### 6.1.1 ANÁLISE FITOQUÍMICA

A prospecção fitoquímica do EAML mostrou resultado positivo para saponinas espumílicas, ácidos orgânicos, proteínas, aminoácidos, fenóis, taninos e flavonóides (Tabela 1).

**Tabela 1:** Prospecção fitoquímica do EAML

Classes de Metabólitos	EAML
Saponinas espumílicas	+
Ácidos orgânicos	+
Açúcares redutores	-
Polissacarídeos	-
Proteínas e Aminoácidos	+
Fenóis e taninos	+
Flavonóides	+
Glicosídeos cardíacos	-
Catequinas	-
Benzoquinonas, Nafquinonas	-
Sesquiterpenolactonas	-
Alcalóides	-
Purinas	-

No presente estudo foram detectados flavonóides, ácidos orgânicos, saponinas espumílicas, fenóis, taninos, proteínas e aminoácidos. Estes resultados se assemelham aos relatados por Mendes e colaboradores (2002) que, estudando o extrato hidroalcoólico a partir das folhas encontraram alcalóides, flavonóides, taninos, esteróides e triterpenóides, porém obtiveram resultado negativo para saponinas. Alguns compostos comuns aos dois estudos, como os flavonóides, possuem atividade anti-inflamatória e antinocicepiva bem descrita na literatura

(MADA et al, 2009; CAREY et al, 2010).

Em um estudo prévio, o óleo essencial de *M.lindleyana* apresentou os seguintes compostos terpênicos: os monoterpenos  $\alpha$ -felandreno, limoneno,  $\alpha$ -tujeno,  $\alpha$ -pineno, mirceno, e os sesquiterpenos germacreno D, óxido de cariofileno,  $\beta$ -cariofileno e cedr-8(15)-en-9- $\alpha$ -ol (MAIA e ANDRADE, 2009). Compostos monoterpênicos estão envolvidos com a atividade anti-inflamatória e antinociceptiva (HIM et al, 2008; DUNG et al, 2009). Na literatura, os sesquiterpenos, principalmente lactônicos, possuem atividades antinociceptiva e anti-inflamatória comprovadas (VALÉRIO et al, 2007; SALLAM et al, 2010).

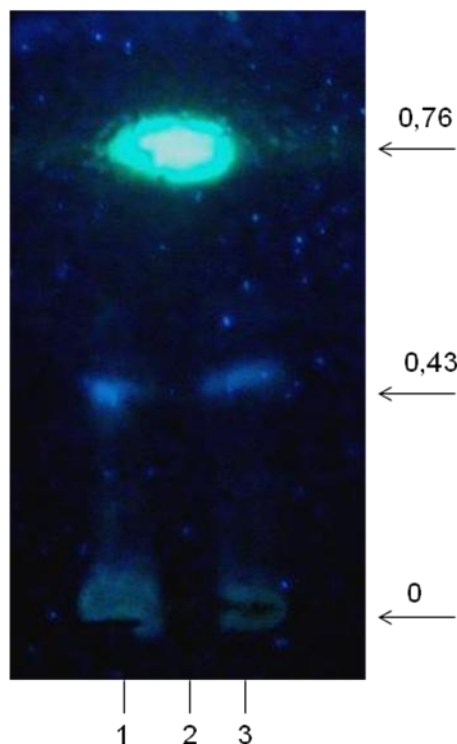
O Gênero *Mikania* é conhecido por ser constituído por flavonóides, cumarinas e compostos terpênicos como lactonas sesquiterpênicas, diterpenos, também são comumente encontrados monoterpenos, outros sesquiterpenos e triterpenos (BUDEL et al, 2009).

A abordagem fitoquímica é um teste preliminar, sendo necessários estudos subsequentes para elucidar a composição química do aquoso da espécie *M.lindleyana*, como o teste de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE).

## 6.2 Métodos Cromatográficos

### 6.2.1 CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA

A análise do perfil cromatográfico, por cromatografia em camada delgada, indica a presença de uma fluorescência azul-esverdeada com Rf de 0,43 característico de ácido ó-cumarico na amostra de EAML. A análise do padrão de cumarina mostrou uma fluorescência verde, com Rf 0,76, característica da cumarina 1,2-benzopirona (BOLINA et al, 2009) (Figura 4).



**Figura 4:** CCD em sílica da fração metanólica do EAML. Eluente Éter:Tolueno (1:1) saturado com ácido acético 10%. Revelador: solução alcoólica de KOH 5% sob luz UV 365nm. 1= Fr met EML, 2= cumarina padrão (Sigma) e 3=extrato hidroalcoólico de *M.lindleyana*.

Classicamente, os ácidos *o*-cumáricos são precursores da cumarina simples (1,2-benzopirona) (Figura 5). Acredita-se que estes ácidos, por um processo de lactonização do vegetal, podem levar a produção de cumarinas. Estes podem ser considerados marcadores do gênero *Mikania*. Na literatura, consta o isolamento deste ácido a partir de *M.glomerata* e *M.laevigata*, bem como relato de atividade anti-inflamatória no modelo de pneumonite alérgica estudando-se o extrato aquoso de *M.laevigata* (DOS SANTOS, 2006).

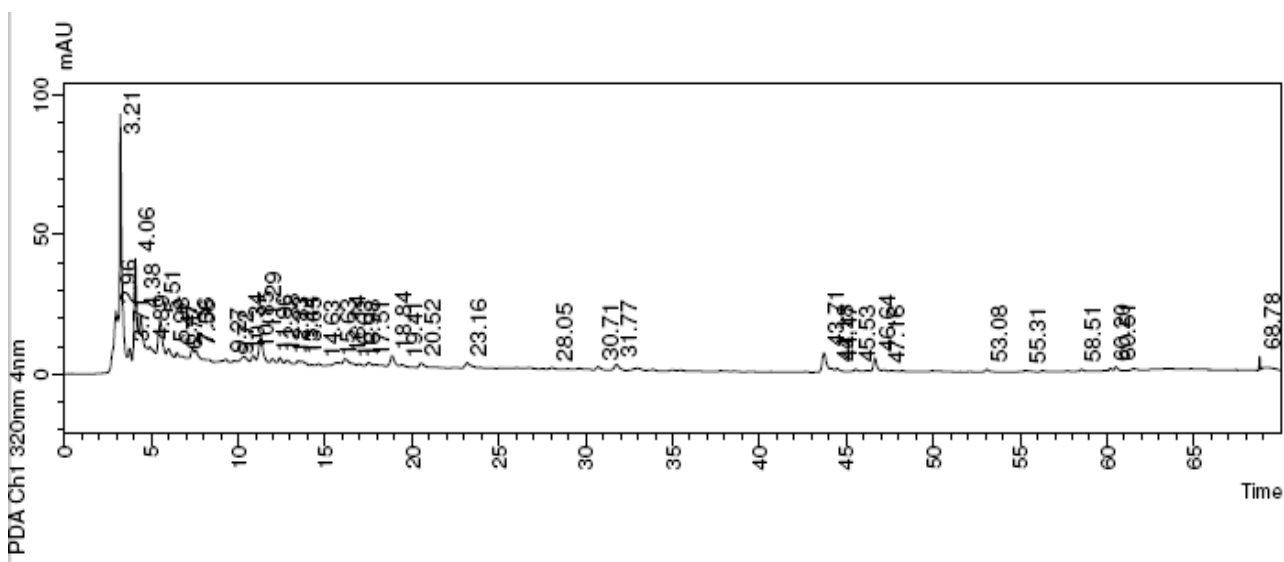
O perfil cromatográfico obtido por CCD foi determinado com a finalidade de se conhecer a composição qualitativa da espécie *M.lindleyana*. Estudos mais refinados que levem à quantificação e identificação do constituinte majoritário e/ou princípio ativo são necessários para elucidar a composição química desta espécie.

## 6.2.2 CROMATOGRAFIA LÍQUIDA ACOPLADA COM ESPECTROMETRIA DE MASSAS

A partir dos resultados obtidos nas análises em CLAE-DAD-EM (Figura 5), no modo de ionização positivo, conforme descrito no item 5.5.2, pode-se observar que a maioria dos constituintes do EAML desenvolveu-se nos primeiros momentos da corrida, o que pode ser explicado pela alta polaridade do extrato, uma vez que o mesmo foi extraído tendo apenas água como solvente.

Os espectros obtidos por CLAE-DAD-EM não foram satisfatórios. Os picos cromatográficos ficaram pouco resolvidos, impossibilitando a leitura e interpretação dos dados. Porém, pode-se observar que as diversas substâncias encontradas foram compostos altamente glicosilados que apresentaram baixa absorvância.

Compostos glicosilados conferem polaridade a determinado composto. Muitos metabólitos secundários com a presença de compostos glicosilados e baixa absorvância já foram descritos na literatura. Entre eles, os compostos fenólicos, como flavonóides (KRAUZE-BARANOWSKA e CISOWSKI 1995; KITE et al, 2011), cumarinas (LEMMICH, 1996; AKAK et al, 2010). Flavonóides que também foram encontrados na prospecção fitoquímica do mesmo extrato e que já têm atividade anti-inflamatória bastante citada na literatura. Cumarinas, que são os principais marcadores deste gênero, também já tem atividade anti-inflamatória bastante citada na literatura (CHENG et al, 2004; ALVES et al, 2009).



**Figura 5:** Cromatograma obtido por CLAE-DAD-MS do EAML (UV 320 nm).



## 6.3 Ensaios farmacológicos

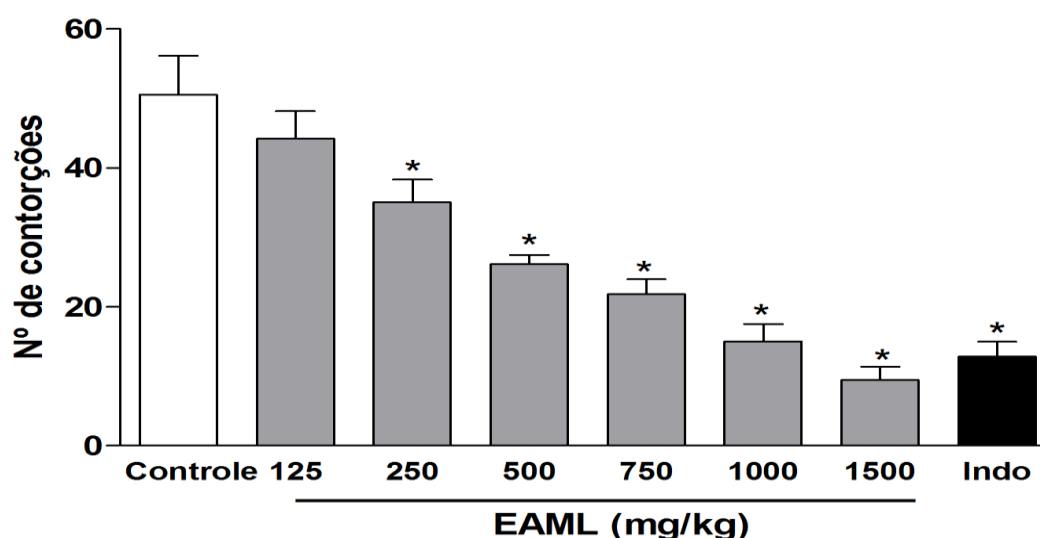
### 6.3.1 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE

Na avaliação da toxicidade aguda, não foi possível determinar a dose letal mediana (DL<sub>50</sub>), pois a dose limite de 5000mg/kg não provocou morte em nenhum dos animais estudados durante o período de observação de 14 dias. Este fato classifica esta substância como pertencente aos agentes xenobióticos de classe 5 (pouco tóxica), visto que a OECD 425 (2001) preconiza que agentes xenobióticos administrados v.o que apresentem DL<sub>50</sub> entre 2000-5000mg/kg sejam considerados de baixa toxicidade.

No entanto, mudanças nos parâmetros comportamentais como sedação e depressão da mobilidade, de acordo com o teste hipocrático de Malone e Robichaud (1962) foram observadas nos animais após receberem o tratamento. Estes sintomas foram mais acentuados nas primeiras horas após o tratamento.

### 6.3.2 ESTUDO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DO EAML *IN VIVO*

#### 6.3.2.1 Avaliação da atividade antinociceptiva periférica através do teste de contorções abdominais



**Figura 6:** Efeito do pré-tratamento oral com o EAML (125, 250, 500, 750, 1000 e 1500 mg/kg, colunas cinzas) ou indometacina (Indo; 5 mg/kg, coluna preta) no teste de contorções abdominais induzido por ácido acético em camundongos. Cada valor representa média  $\pm$  EPM (n = 10 por grupo). \*P < 0,05, ANOVA *one way* seguido por teste de Bonferroni quando comparado ao grupo controle (pré-tratamento oral com salina 0,9%, coluna branca).

O EAML nas doses de 125, 250, 500, 750, 1000 e 1500mg/kg foi capaz de reduzir em 12,55, 30,69, 48,30, 56,87, 70,30 e 81,31%, respectivamente, o número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético 0,6% i.p de maneira significativa e dose-dependente ( $P < 0,05$ , ANOVA) quando comparado com o grupo controle (Figura 6 e Tabela 2). A indometacina (5mg/kg), um fármaco anti-inflamatório não-esteroidal que foi utilizado como controle positivo neste teste, promoveu diminuição em aproximadamente 74,65% do número de contorções abdominais quando comparado ao grupo controle.

Na literatura, outras espécies de *Mikania* já foram relatadas pela capacidade de reduzir o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético. O extrato de *M.cordata* e quatro sesquiterpenos isolados da mesma espécie tiveram atividade significativa em reduzir o número de contorções (AHMED et al, 2001). O extrato hidroalcoólico de *M.scandens* também reduziu de maneira significativa o número de contorções abdominais (HASAN et al, 2009).

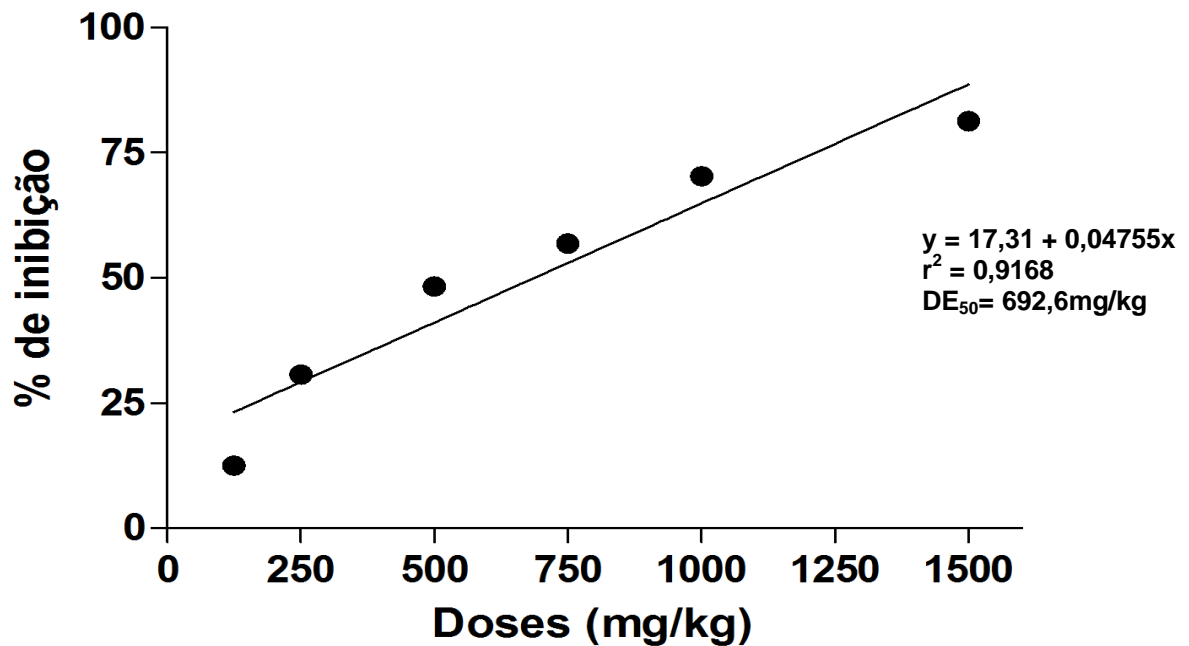
Este teste é vantajoso, pois permite avaliar efeitos até de analgésicos fracos. Porém, não é específico, pois outras substâncias que não têm nenhuma ação analgésica, por exemplo, bloqueadores adrenérgicos, anti-histamínicos, relaxantes musculares, inibidores da monoaminaoxidase, e neurolépticos podem apresentar atividade neste teste (LOUX et al, 1978 *apud* LE BARS et al, 2001).

A atividade do EAML neste teste não é conclusiva, apenas indica que o mesmo possui atividade antinociceptiva de origem anti-inflamatória. A especificidade de ação do mesmo pode ser reforçada através da realização de testes posteriores, como o teste da placa quente e teste da formalina. Embora o teste de contorções tenha uma baixa especificidade, existem estudos que correlacionam valores de doses obtidos para roedores neste teste com doses de analgésicos em utilizadas em humanos (DUBINSKY et al, 1987).

#### 6.3.2.2 Determinação da DE<sub>50</sub>

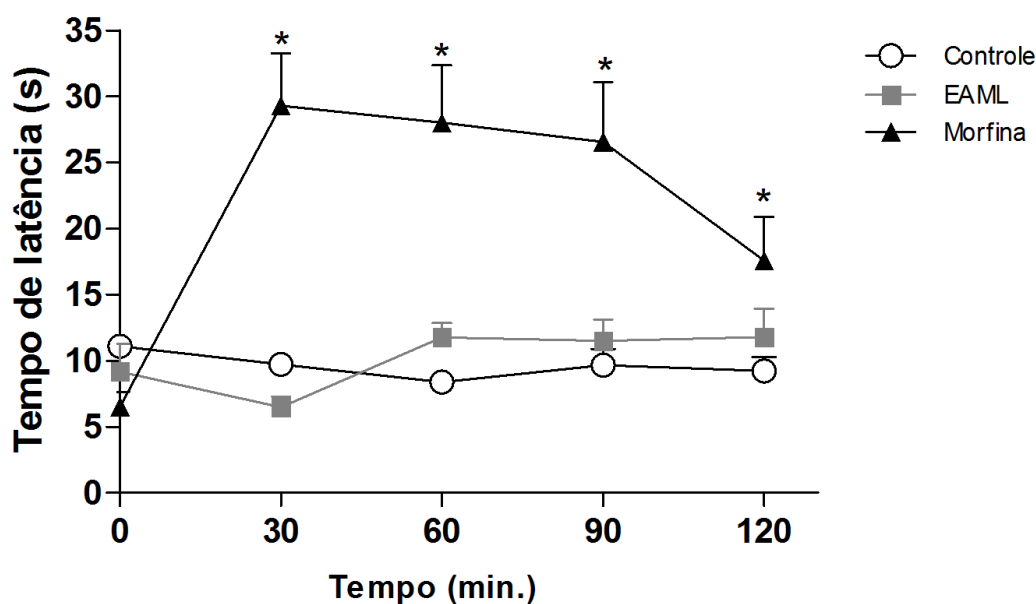
O tratamento com EAML, no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético 0,6% i.p, promoveu redução significativa ( $P < 0,05$ ) no número de contorções. A partir deste, foi possível determinar a dose efetiva mediana (DE<sub>50</sub>) de

692,6 mg/kg em camundongos. O coeficiente de correlação linear  $r^2 = 0,9168$  calculado através da equação da reta  $y = 17,31 + 0,04755x$  indica que há correlação entre os grupos como mostra a Figura 7. Esta dose ( $DE_{50}$ ) calculada em camundongos foi utilizada nos testes subsequentes.



**Figura 7:** Determinação da dose efetiva mediana ( $DE_{50}$ ) do EAML em camundongos ( $n=10$ ). O eixo das abscissas representa as doses utilizadas (125, 250, 500, 750, 1000 e 1500 mg/kg) e o eixo das ordenadas corresponde ao percentual de inibição correspondente às doses utilizadas do EAML em escala logarítmica.  $r^2$  é o coeficiente de correlação linear e a equação da reta calculada foi  $y = 17,31 + 0,04755x$  (Teste de regressão linear, GraphPad Prisma 5.0).

### 6.3.2.3 Avaliação da atividade antinociceptiva central através do teste da Placa Quente



**Figura 8:** Efeito do EAML (692,6 mg/kg, v.o) ou morfina (10 mg/kg, s.c) sobre o estímulo nociceptivo térmico ( $50 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ) induzido em camundongos. Cada valor representa a média  $\pm$  EPM ( $n = 10$  animais por grupo). \*  $P < 0,05$  por ANOVA seguido por teste de Bonferroni comparado ao grupo controle (pré-tratado oralmente com veículo).

O EAML na dose de 692,6 mg/kg v.o. não aumentou de maneira significativa ( $P > 0,05$ , ANOVA) o tempo de latência dos camundongos sobre a placa quente em todos os tempos avaliados, quando comparado com o grupo controle, como mostrado na Figura 8 (e Tabela 3). Enquanto a morfina, que foi utilizada como controle positivo, aumentou a latência dos animais na placa nos tempos 30, 60 e 90 e 120 minutos (200,82%, 233,73%, 173,71% e 90,67 %, respectivamente).

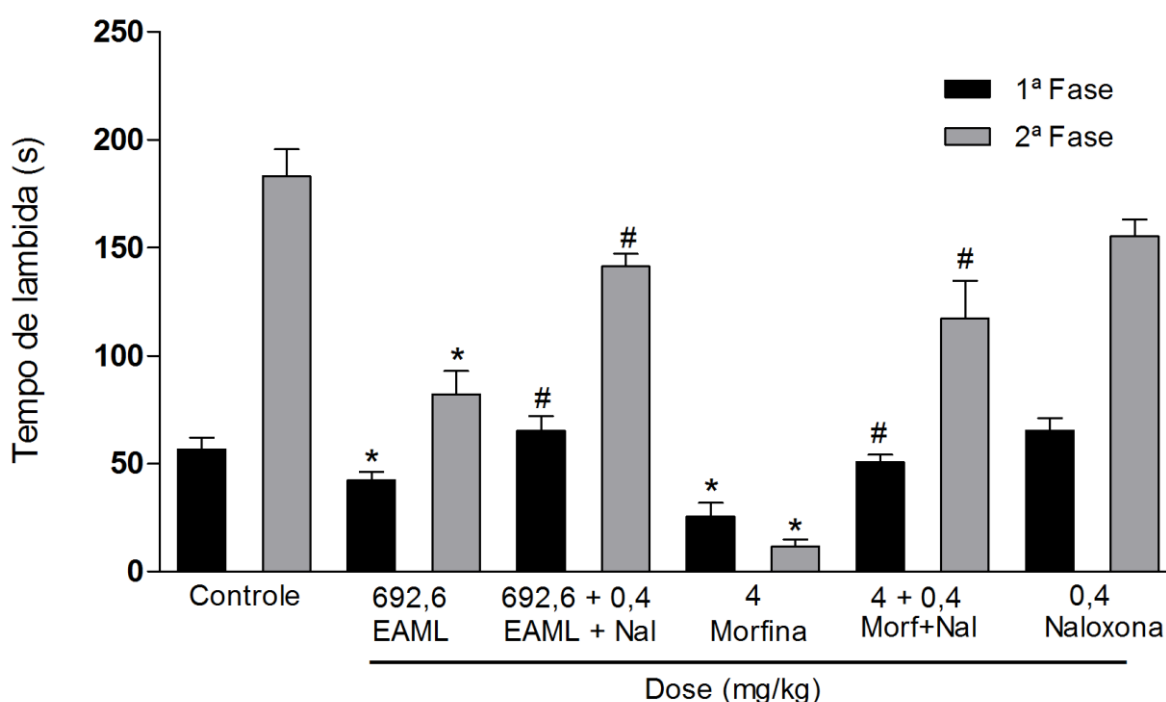
A morfina exerce seus efeitos supra-espinhais através de receptores expressos no SNC (cérebro e medula espinhal) e na periferia (CROFFORD, 2010). Estes receptores são associados com uma gama de eventos psicológicos e fisiológicos que são diretamente relacionados à abertura de canais de potássio, visto que, a condutância aumentada a íons  $\text{K}^+$  leva à hiperpolarização da membrana, o que reduz a excitabilidade neuronal (HAESELER et al, 2006).

Assim, os resultados obtidos sugerem que o efeito antinociceptivo do EAML não envolve um mecanismo de ação central. Na literatura, um estudo sobre o

extratológico hidrometanólico da espécie *M.scandens* mostrou atividade antinociceptiva central do mesmo a partir dos primeiros 30 minutos (HASAN et al, 2009).

A diferença entre os resultados obtidos neste trabalho com o de Hasan e col. (2009) pode ser explicada pela diferença de polaridade entre os dois extratos estudados (aquoso e metanólico, respectivamente). Uma vez que, a extração do EAML foi feita por decocção. Este processo extrativo que utiliza apenas água como solvente gera como produto final um extrato tipicamente polar, logo seus constituintes não conseguem atravessar a barreira hematocefálica, impedindo que haja atividade a nível central.

#### 6.3.2.4 Teste de Formalina



**Figura 9:** Influência do pré-tratamento de naloxona (Nal, s.c) na ação antinociceptiva de morfina (Mor, s.c) e do EAML v.o na 1ª (dor neurogênica, 0-5 min) e 2ª fase (dor inflamatória, 15-30 min) na nocicepção induzida por formalina 1% em camundongos. Cada valor representa média  $\pm$  EPM (n = 10 por grupo). \* $P < 0,05$ , teste “t” de Student quando comparado ao grupo controle (pré-tratamento oral com veículo). #  $P < 0,05$  significante quando comparado agonista versus agonista mais antagonista (Teste “t” de student).

O EAML, na dose de 692,6 mg/kg, reduziu de maneira significativa ( $P < 0,05$ ) o tempo de lambida em relação ao grupo controle nas duas fases do teste (Figura 9 e Tabela 4 e 5) em 25,26% e 55,1%, respectivamente. A morfina (4 mg/kg),

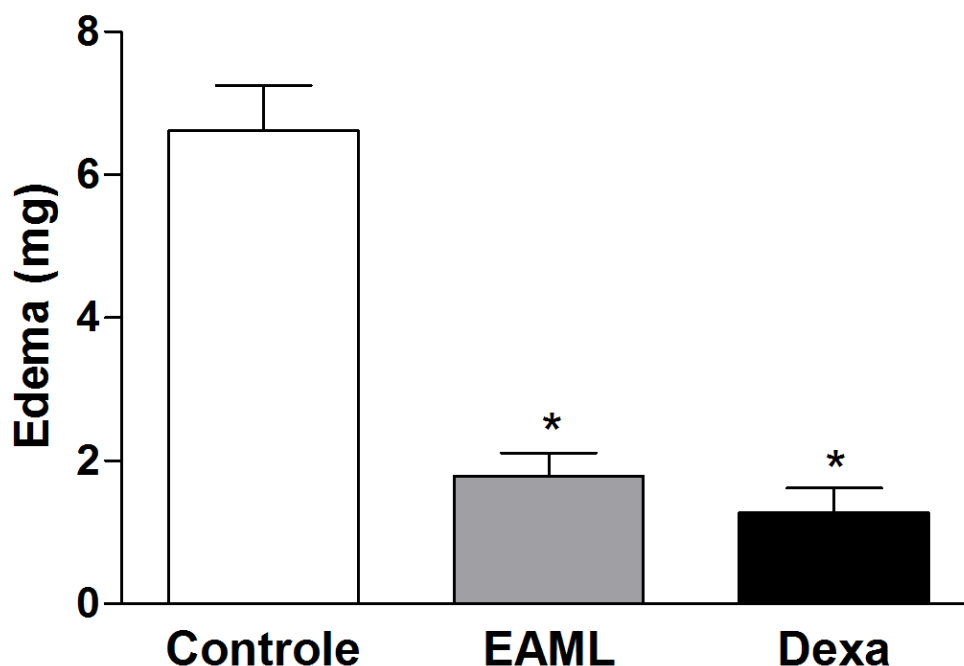
analgésico opióide utilizado como controle positivo, também reduziu de maneira significativa ( $P < 0,05$ ) as duas fases do teste em 54,77% e 93,66%, respectivamente (Figura 9 e Tabelas 4 e 5). Ainda neste teste, a naloxona (0,4 mg/kg) reverteu o efeito do EAML e da morfina tanto na primeira fase quanto na segunda fase do teste.

Tendo em vista que a injeção intraplantar de formalina (solução de formaldeído a 1%) na pata induz uma resposta dividida em duas fases distintas (fase neurogênica e inflamatória) (LE BARS, 2001), os resultados sugerem que o EAML induz ação atinocéptica por ação direta sobre fibras aferentes nociceptivas na qual receptores opióides podem estar envolvidos, além disso, a inibição de mediadores inflamatórios como as prostaglandinas não pode ser descartada.

Os resultados obtidos neste teste não estão de acordo com aqueles obtidos no teste da placa quente, onde o EAML não mostrou atividade. Esta diferença de resultados pode ser em função da alta polaridade do extrato que impediu sua passagem para a barreira hematoencefálica. Os resultados obtidos são indicativos de atuação na dor neurogênica e inflamatória, porém testes de inflamação foram feitos para confirmar a atividade de origem inflamatória vista no teste da formalina.

### 6.3.3 ESTUDO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA DO EAML *IN VIVO*

#### 6.3.3.1 Teste da Dermatite induzida pelo óleo de cróton



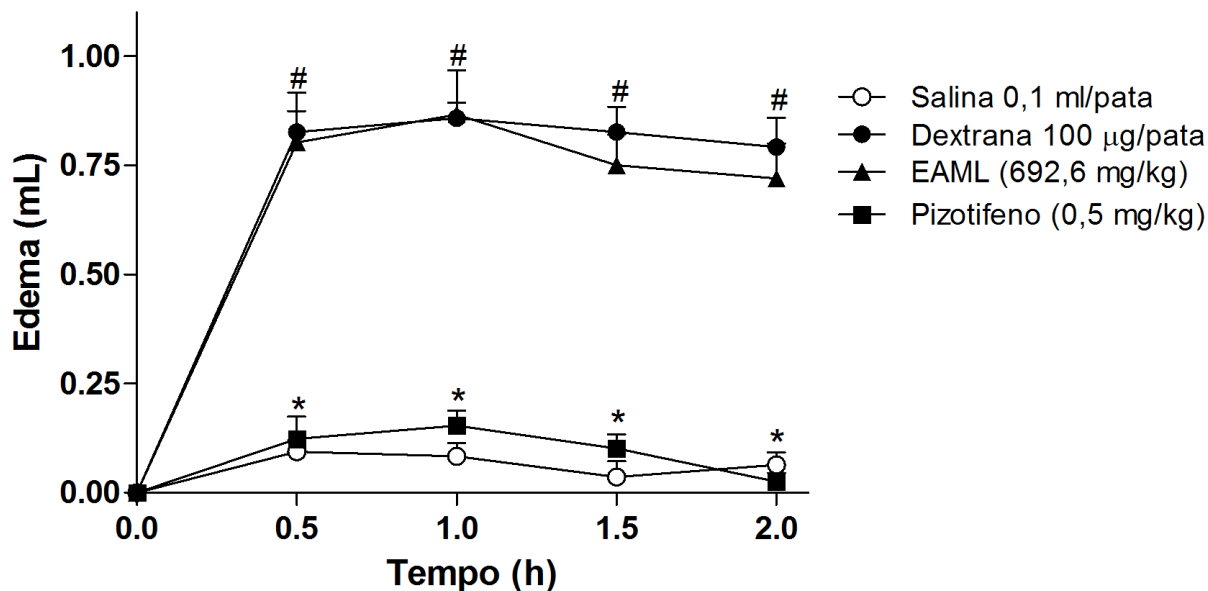
**Figura 10:** Efeitos do pré-tratamento oral com o EAML (692,6 mg/kg, coluna cinza) ou dexametasona (Dexa, 10 mg/kg, coluna preta) no teste de edema de orelha induzido por óleo de cróton em camundongos. Cada valor representa média  $\pm$  EPM (n= 10 por grupo). \*  $P < 0,05$ , significativo em relação ao grupo controle (Teste ANOVA uma via, seguido de Teste de Bonferroni).

Neste estudo, o grupo tratado com EAML na dose de 692,6 mg/kg inibiu a formação do eritema induzido pelo óleo de cróton em 72,96% em relação ao grupo controle (Figura 10 e Tabela 6) e a dexametasona (10mg/kg), fármaco anti-inflamatório esteroideal utilizado como controle positivo, inibiu em 80,82% em relação ao grupo controle.

Tendo em vista que o edema na orelha de camundongo induzido pelo óleo de croton tem a participação de mediadores produzidos pela ação da ciclooxigenase, principalmente  $PGE_2$  (INOUE et al, 1989) liberados por citocinas, como  $IL-1\beta$ ,  $TNF-\alpha$  (SHIN et al, 2010), pode-se sugerir que o EAML atue na redução da liberação destes mediadores inflamatórios, impedindo, assim, a geração destes efetores da resposta inflamatória, já que inibiu significativamente a formação do edema.

Estes resultados corroboram com os testes anteriores (teste de contorção e formalina) onde o EAML foi capaz de reduzir tanto as contorções abdominais quanto o tempo de lambida da pata, mostrando que o mesmo possui atividade anti-inflamatória.

## 6.3.3.2 Edema de pata induzido por dextrana



**Figura 11:** Efeito do EAML sobre o edema de pata induzido por dextrana em ratos. Cada ponto das retas representa a média  $\pm$  E.P.M (n=5). O eixo das abscissas representa o tempo em horas. O eixo das ordenadas representa o volume do edema em milímetros; \*  $P < 0,05$ , significativo em relação ao grupo controle que recebeu dextrana na pata; #,  $P < 0,05$ , significativo em relação ao grupo que recebeu salina na pata (ANOVA *two way*, Teste de Bonferroni).

Neste modelo de edema, o EAML, na dose de 692,6 mg/kg, não reduziu de maneira significativa ( $P > 0,05$ , ANOVA) o volume das patas dos animais quando comparado com o grupo controle em nenhum dos tempos avaliados. Porém, o controle positivo pizotifeno (0,5 mg/kg), um antagonista de receptores histaminérgicos e serotoninérgicos (MAZAL e RACHMILEWITZ, 1980), foi capaz de impedir o desenvolvimento do edema em 85,54%, 82,56%, 87,95% e 96,25% nos tempos 30, 60, 90 e 120 min, respectivamente (Figura 11 e Tabela 7), quando comparado com o grupo controle.

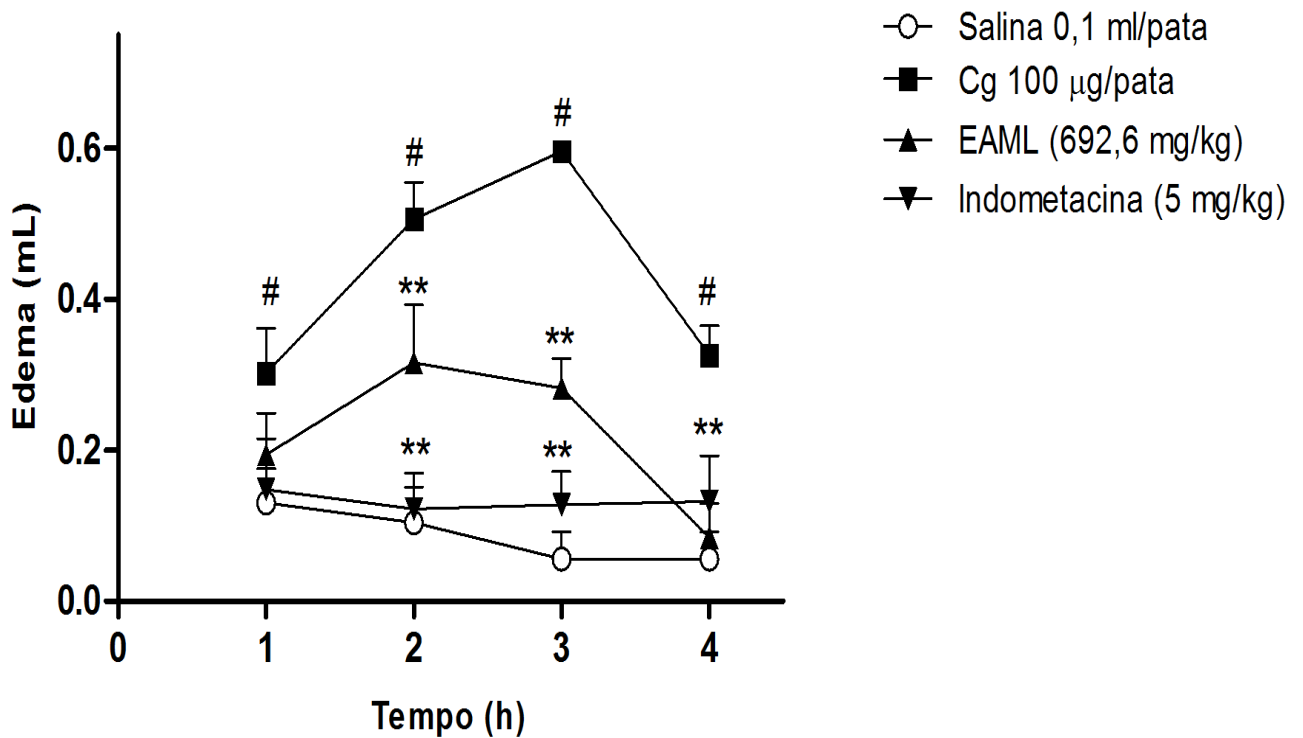
De acordo com o resultado obtido no qual o EAML não foi capaz de inibir a formação do edema e tendo em vista que a gênese do processo inflamatório induzido por dextrana tem a participação de mediadores como histamina serotonina, pode-se sugerir que o extrato não exerça sua ação anti-inflamatória por via histaminérgica ou serotoninérgica.

Este resultado pode reforçar ainda mais a hipótese de que o EAML esteja exercendo sua atividade anti-inflamatória via ação sobre prostaglandinas, que está



de acordo com os resultados obtidos no teste da dermatite induzida por óleo de cróton.

### 6.3.3.3 Edema de Pata induzido por Cg



**Figura 12:** Efeito do EAML sobre o edema de pata induzido por carragenina em ratos. Os valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M (n=5). O eixo das abscissas representa os tempos avaliados. O eixo das ordenadas representa o volume de edema formado em mililitros; \*  $P < 0,05$ , significante em relação ao grupo controle que recebeu Cg na pata; #,  $P < 0,05$ , significante em relação ao grupo que recebeu salina na pata (ANOVA *two way*, Teste de Bonferroni).

Em nosso estudo, o EAML, na dose utilizada de 692,6 mg/kg, foi capaz de impedir a formação do edema em 39,22%, 53,3% e 75,76% nos tempos 2, 3 e 4 h. A indometacina, fármaco anti-inflamatório que atua inibindo COX, foi capaz de inibir o desenvolvimento do edema em 76,47%, 78,33% e 60,6% na segunda, terceira e quarta hora, respectivamente (Figura 12 e Tabela 8).

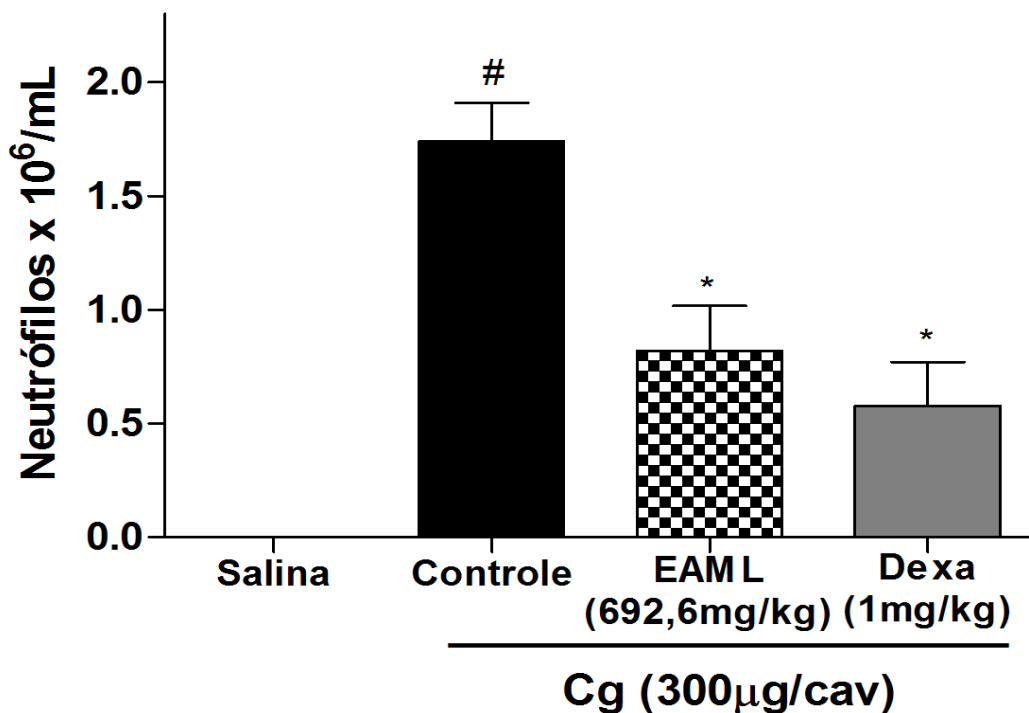
Estes resultados sugerem que o EAML possa interferir na produção de cininas, como bradicinina, e sobre metabólitos do ácido araquidônico, em especial, as prostaglandinas de acordo com o modelo sugerido por Di Rosa e col (1971). Além

disso, esta atividade pode ser dependente de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$  como sugerido por Rocha e col. (2006).

Outras espécies de *Mikania* já apresentaram atividade anti-edematogênica utilizando Cg como agente flogístico. Os decoctos de *M. laevigata* e *M. involucrata* reduziram de maneira significativa a formação do edema induzido por Cg (SUYENAGA et al, 2002).

Os resultados obtidos neste teste reforçam a hipótese de que a ação do EAML seja via inibição de produtos da COX, corroborando com os resultados anteriores de formalina e eritema.

#### 6.3.3.4 Peritonite em ratos induzida por Cg



**Figura 13:** Efeito do EAML sobre a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida pela administração de carragenina em ratos. Os valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M de n=4. O eixo das abscissas representa os grupos de substâncias utilizadas. O eixo das ordenadas representa o número de neutrófilos; \*  $P < 0,05$ , significativa em relação ao grupo controle (Cg); #,  $P < 0,05$  significativa em relação ao grupo salina (ANOVA one way, Teste de Bonferroni).

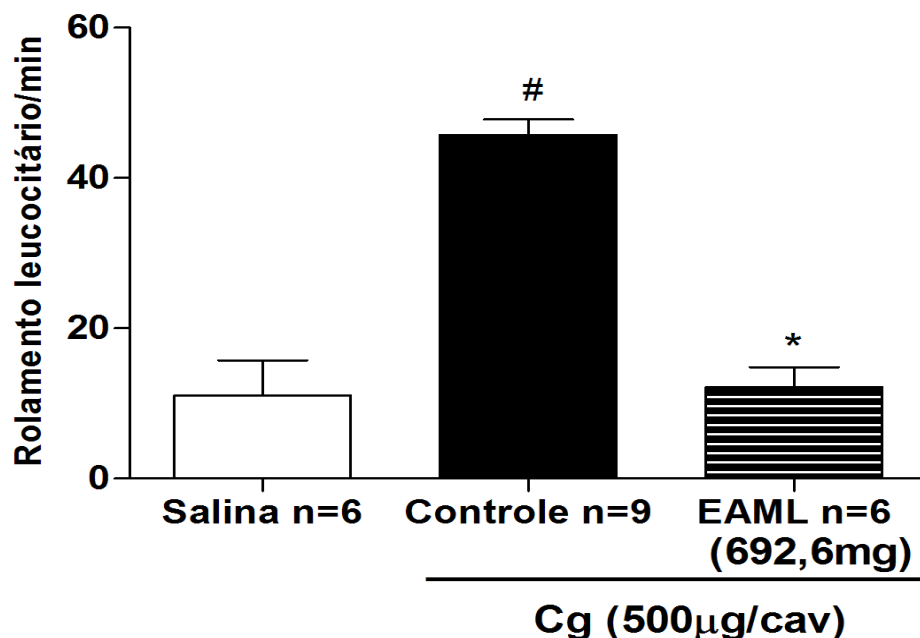
Neste teste, a administração i.p. de Cg (300  $\mu$ g/cav.) induziu de forma significativa uma intensa migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal, quando comparado ao grupo que recebeu apenas salina (3 mL i.p.). A migração foi inibida em 52,83% nos animais tratados com EAML (692,6 mg/Kg v.o), bem como nos animais tratados com o fármaco padrão dexametasona (1mg/kg i.p) em que a

inibição foi de 65,52% (Figura 13, Tabela 9).

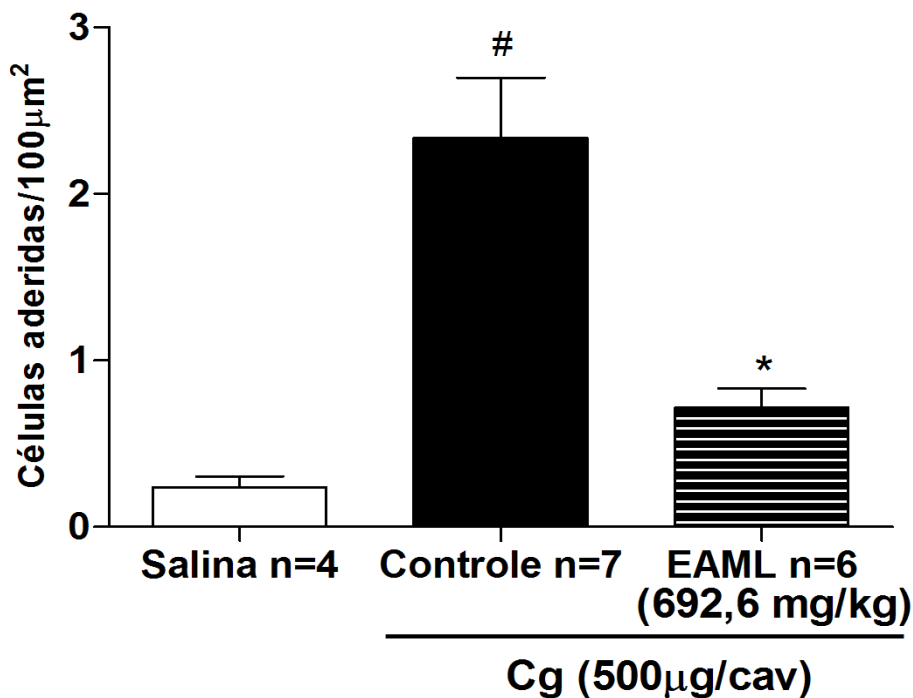
Estes resultados sugerem que o EAML possa interferir na migração de leucócitos, principalmente neutrófilos, durante o processo inflamatório, o que pode ser devido à ação sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias, TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , as quais vão agir sobre moléculas de adesão induzindo a expressão das mesmas.

Outras espécies de *Mikania* apresentaram atividade em reduzir a migração de leucócitos utilizando carragenina como agente flogístico. Alves et al (2009) demonstraram que a atividade anti-inflamatória do extrato hidroalcoólico de *M.laevigata*, bem como do principal constituinte deste extrato, cumarina, em reduzir a migração de neutrófilos no teste da peritonite induzida por carragenina era por um mecanismo dependente de citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ) no local da inflamação.

#### 6.3.3.5 Avaliação do rolamento e adesão de leucócitos ao endotélio vascular do mesentério peritoneal de camundongos por microscopia intravital



**Figura 14:** Efeito do EAML sobre o rolamento leucocitário no endotélio vascular do mesentério de camundongos induzido pela administração de carragenina i.p. Os valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M (n=6-9). O eixo das abscissas representa os grupos de substâncias utilizadas. O eixo das ordenadas representa o nº de leucócitos/min; \*  $P < 0,05$ , significante em relação ao grupo controle Cg; #, significante em relação ao grupo salina (Teste "t" de Student).



**Figura 15:** Efeito do EAML sobre a adesão de leucócitos ao endotélio vascular do mesentério de camundongos induzido pela administração de carragenina. Os valores estão expressos como média  $\pm$  E.P.M (n=4-7). O eixo das abscissas representa os grupos de substâncias utilizadas. O eixo das ordenadas representa o nº de leucócitos aderidos/100 mm<sup>2</sup>; \*  $P < 0,05$ , significante em relação ao grupo controle Cg; #, significante em relação ao grupo salina (Teste “t” de Student).

Neste teste, a administração de Cg (500  $\mu$ g/cav) i.p. induziu um aumento significativo do rolamento e adesão de leucócitos no endotélio vascular do mesentério (vênulas mesentéricas pós-capilares; *in vivo*) quando comparado ao grupo que recebeu apenas salina i.p. O tratamento com EAML (692,6 mg/kg v.o), 1h antes dos animais receberem o estímulo inflamatório (Cg), produziu redução significativa ( $P < 0,05$ ) do rolamento (inibição 73,47%, Figura 14, Tabela 10) e da adesão (inibição de 69,66%) de leucócitos ao endotélio (Figura 15, Tabela 11).

Na literatura, Alves et al (2009) demonstraram que o extrato hidroalcoólico de *M.laevigata* foi capaz de reduzir o rolamento e adesão leucocitária no teste de microscopia intravital utilizando camundongos, similar aos resultados deste trabalho.

Este resultado confirmam a ação do EAML sobre a migração de leucócitos, principalmente, neutrófilos e permite formular a hipótese de que um dos mecanismos para que o EAML possa estar inibindo a transmigração celular para cavidade peritoneal seja via inibição de citocinas as quais atuam aumentando a expressão de moléculas de adesão/rolamento com leucócitos circulantes, assim como no modelo

de peritonite induzida por Cg. No entanto, a etapa e a/as citocinas ou molécula(s) de adesão envolvidas no efeito do EAML precisam ser elucidadas, pois ainda não está clara a etapa que está sendo inibida para que não haja a interação moléculas de adesão com leucócitos ou o rolamento destes.

## 7 CONCLUSÕES

Neste trabalho foi demonstrado que o extrato aquoso de *M.lindleyana* possui baixa toxicidade e é rico em fenóis, taninos, proteínas, aminoácidos, saponinas, flavonóides, derivados de cumarinas e compostos glicosilados que parecem conferir as atividades antinociceptiva e anti-inflamatória envolvendo o sistema opióide, prostaglandinas (PGE<sub>2</sub>) e cininas (bradicinina), além de uma possível interferência sobre a produção de citocinas. Estudos mais profundos são necessários para determinar os mecanismos de ação do extrato de *M. lindleyana*, porém os resultados obtidos comprovam o seu uso popular.

## REFERÊNCIAS

- ABBOTT, F. V.; FRANKLIN, K. B. J.; WESTBROOK, R. F. The formalin test: scoring properties of the first and second phases of the pain response in rats. **Pain**, vol 60, p.91-102, 1995.
- ADAMSON, R. H.; ZENG, M.; ADAMSON, G. N.; LENZ, J. F.; CURRY, F. E. PAF- and bradykinin-induced hyperpermeability of rat venules is independent of actin-myosin contraction. **American Journal Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, vol 285, p.406 - 417, 2003.
- AGUINALDO, A. M.; PADOLINA, W. G.; ABE, F.; YAMAUCHI, T. Flavonoids from *Mikania cordata*. **Biochemical Systematics and Ecology**, vol 31, p.665–668, 2003.
- AHLUWALIA, A.; PERRETTI, M. B<sub>1</sub> receptors as a new inflammatory target? Cold this B the 1?. **Tips**, vol 20, 1999.
- AHMED, M.; RAHMAN, M. T.; ALIMUZZAMAN, M.; SHILPI, J. A. Analgesic sesquiterpene dilactone from *Mikania cordata*. **Fitoterapia**, vol 72, p.919-921, 2001.
- AKAK, C. M.; DJAMA, C. M.; NKENGFACK, A. E.; TU, P.; LEI, L. New coumarin glycosides from the leaves of *Diospyros crassiflora* (Hiern). **Fitoterapia**, vol 81, p. 873–877, 2010.
- ALVES, C. F.; ALVES, V. B. F.; DE ASSIS, I. P.; CLEMENTE-NAPIMOGA, J. T.; UBER-BUCEK, E.; DAL-SECCO, D.; CUNHA, F. Q.; REHDER, V. L. G.; NAPIMOGA, M. H. Anti-inflammatory activity and possible mechanism of extract from *Mikania laevigata* in carrageenan-induced peritonitis. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, vol. 61, nº 8, p.1097-1104, 2009.
- ANKIER, S. I. New hot plate tests to quantify antinociceptive and narcotic antagonist activities. **European Journal of Pharmacology**, vol 27, nº 1, p. 1-4, 1974.
- ANTI, S. M. A.; GIORGI, R. D. N.; CHAHADE, W. H. Glicocorticóides (GC) e as doenças reumáticas do idoso: considerações gerais. **Temas de Reumatologia Clínica**, vol 9, nº 3, p.87-95, 2008.
- ANTONIOLLI, A. R.; VILLAR, J. C. **Atividade antinociceptiva e toxicidade aguda do extrato aquoso de *Vitex agnus-castus* L.** Anais do seminário de Pesquisa FAP-SE, 2003.
- AUPHAN, N.; DIDONATO, J. A.; ROSETTE, C.; HELMBERG, A.; KARIN, M. Immunosuppression by Glucocorticoids: Inhibition of NF- $\kappa$ B Activity Through Induction of I $\kappa$ B Synthesis. **Science**, vol 270, p.285-290, 1995.
- BAEZ, S. Simultaneous measurements of radi and wall thickness of microvessels in the anesthetized rat. **Circulation Research**, vol 25, p. 315-329, 1969.

BALUNAS, M. J.; KINGHORN, A. D. Drug discovery from medicinal plants. **Life Sciences**, vol 78, p.431-441, 2005.

BARBOSA, W. L. R.; QUIGNARD, E.; TAVARES, I. C. C.; PINTO, L. N.; OLIVEIRA, F. Q.; OLIVEIRA, R. M. **Manual para Análise Fitoquímica e Cromatográfica de Extratos Vegetais**. Revista Científica da UFPA. Vol 4. 2002. < > Acesso em 04/05/2009.

BARBOSA, W. L. R.; PINTO, L. N.; SILVA, W. B.; FERNANDES, J. G. S.; SOLER, O. **Etnofarmácia: Fitoterapia popular e Ciência Farmacêutica**. NUMA/ UFPA. Belém, 2009. p.124.

BARKSBY, H. E.; LEA, S. R.; PRESHAW, P. M.; TAYLOR, J. J. The expanding family of interleukin-1 cytokines and their role in destructive inflammatory disorders. **British Society for Immunology: Clinical and Experimental Immunology**, vol 149, p.217-225, 2007.

BARROSO, G. M. **Mikaniae do Brasil**. Rio de Janeiro, Arquivos do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, vol. 16, 1958.

BASTOS, J. K.; CARVALHO, J.C.T; SOUZA, G.H.B.; PEDRAZZI, A.H.P.; SARTI, S.J. Antiinflammatory activity of cubein, a ligand from the leaves of *Zanthoxylum maranjillo* Griseb. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 75, p. 279-282, 2001.

BERG, M. E. V. **Plantas medicinais na Amazônia: Contribuição ao seu conhecimento sistemático**. CNPQ/PTO, Belém, p.191, 1982.

BIAVATTI, M. W.; KOERICH, C. A.; HENK, C. H.; ZUCATELLI, E.; MARTINELLI, F. H.; BRESOLIN, T. B.; LEITE, S. N. Coumarin Content and Physicochemical Profile of *Mikania laevigata* Extracts. **Verlag der Zeitschrift für Naturforschung**, vol 59c, p.197-200, 2004.

BIGHETTI, A. E.; ANTÔNIO, M. A.; KOHN, L. K.; REHDER, V. L. G.; FOGGIO, M. A.; POSSENTI, A.; VILELA, L.; CARVALHO, J. E. Antiulcerogenic activity of a crude hydroalcoholic extract and coumarin isolated from *Mikania laevigata* Schultz Bip. **Phytomedicine**, vol 12, p.72–77, 2005.

BILATE, A. M. B. Inflamação, proteínas de fase aguda, citocinas e quimiocinas. **Temas de Reumatologia Clínica**, vol 8, nº 3, p.86-90, 2007.

BISCHOFF, S. C.; MAILER, R.; PABST, O.; WEIER, G.; SEDLIK, W.; LI, Z.; CHEN, J. J.; MURPHY, D. L.; GERSHON, M. D. Role of serotonin in intestinal inflammation: knockout of serotonin reuptake transporter exacerbates 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid colitis in mice. **American Journal Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, vol 296, p.685–695, 2009.

BOLINA, R. C.; GARCIA, E. F.; DUARTE, M. G. R. Estudo comparativo da composição química das espécies vegetais *Mikania glomerata* Sprengel e *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, vol 19, nº 1B, p.294-298, 2009.



BREMER, K. **Asteraceae: Cladistics and Classification**. Portland, Timber Press, Inc., 1994.

BRITO, G. A. C.; SARAIVA, N. R. S.; FALCÃO, J. L. A. A.; VALE, M. L.; LIMA, A. A.M.; CUNHA, F. Q.; RIBEIRO, R. A. Dual effect of cAMP on the writhing response in mice. **European Journal of Pharmacology**, vol 416, p.223–230, 2001.

BROWN, D. M.; DICKSON, C.; DUNCAN, P.; AL-ATTILI, F.; STONE, V. Interaction between nanoparticles and cytokine proteins: impact on protein and particle functionality. **Nanotechnology**, vol 21, p.9, 2010.

BUDEL, J. M.; DUARTE, M. R.; KOSCIUV, I.; MORAIS, T. B.; FERRARI, L. P. Contribuição ao estudo farmacognóstico de *Mikania laevigata* Sch. Bip. ex Baker (guaco), visando o controle de qualidade da matéria-prima. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, vol 19, nº 2B, p.545-552, 2009.

BURIAN, M.; GEISSLINGER, G. COX-dependent mechanisms involved in the antinociceptive action of NSAIDs at central and peripheral sites. **Pharmacology and Therapeutics**, vol 107, p.139-154, 2005.

CALIXTO, J. B.; CAMPOS, M. M.; OTUKI, M. F.; SANTOS, A. R. S. Anti-inflammatory compounds of plant origin: part I phenolic compounds. **Planta Medica**, vol 70, p.93-103, 2004.

CAREY, M. W.; RAO, N. V.; KUMAR, B. R.; MOHAN, G. K. Anti-inflammatory and analgesic activities of methanolic extract of *Kigelia pinnata* DC flower. **Journal of Ethnopharmacology**, vol 130, p.179-182, 2010.

CARVALHO, J. C. T.; SANTOS, L. S.; VIANA, E. P.; DE ALMEIDA, S. S. M. S.; MARCONATO, E.; RODRIGUES, M.; FERREIRA, L. R.; VAN DE KAMP, A. Anti-inflammatory and Analgesic Activities of the Crude Extracts from Stem Bark of *Bauhinia Guianensis*. **Pharmaceutical Biology**, vol. 37, nº 4, p.281-284, 1999.

CARVALHO, J. C. T.; SERTIE, J. A. A.; BARBOSA, M. V. J.; PATRICIO, K. C. M.; CAPUTO, L. R. G.; SARTI, S. J.; FERREIRA, L. P.; BASTOS, J. K. Anti-inflammatory activity of the crude extract from the fruits of *Pterodon emarginatus* Vog. **Journal of Ethnopharmacology**, vol 64, p.127–133, 1999.

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

CARVALHO, W. A.; LEMÔNICA, L. Mecanismos Centrais de Transmissão e de Modulação da Dor: Atualização Terapêutica. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, vol 48, nº 3, p.221-241, 1998.

CASTRO, E. M.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V.; MALTA, M. R.; CARDOSO, M. G.; SILVA, F. A. M. Coumarin Contents in Young *Mikania glomerata* Plants (Guaco) under Different Radiation Levels and Photoperiod. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, vol 25, nº 3, p.387-92, 2006.

CELEGHINI, R. M. S.; VILEGAS, J. H. Y.; LANÇAS, F. M. Extraction and Quantitative HPLC Analysis of Coumarin in Hydroalcoholic Extracts of *Mikania glomerata* Spreng. ("guaco") Leaves. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, vol. 12, nº 6, p.706-709, 2001.

CHAVES, J. S.; OLIVEIRA, D. C. R. Sesquiterpene Lactones and other Chemical Constituents of *Mikania hoehnei* R. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, vol. 14, nº 5, p.734-737, 2003.

CHENG, J.; CHEN, M.; WALLACE, D.; TITH, S.; ARRHENIUS, T.; KASHIWAGI, H.; ONO, Y.; ISHIKAWA, A.; SATO, H.; KOZONO, T.; SATO, H.; NADZAN, A. M. Discovery and structure–activity relationship of coumarin derivatives as TNF- $\alpha$  inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, vol 14, p. 2411–2415, 2004.

CHI, Y. S.; LIM, H.; PARK, H.; KIM, H. P. Effects of wogonin, plant flavone from *Scutellaria radix*, on skin inflammation: in vivo regulation of inflammation-associated gene expression. **Biochemical Pharmacology**, v 66, p.1271-1278, 2003.

CHICHORRO, J. G.; LORENZETTI, B. B.; ZAMPRONIO, A. R. Involvement of bradykinin, cytokines, sympathetic amines and prostaglandins in formalin-induced orofacial nociception in rats. **British Journal of Pharmacology**, vol 141, p.1175-1184, 2004.

CODERRE, T. J.; FUNDYTUS, M. E.; MCKENNA, J. E.; DALAL, S.; MELZACK, R. The formalin test: a validation of the weighted-scores method of behavioural pain rating. **Pain**, vol 54, p.43–50, 1993.

COSTIGAN, M.; SCHOLZ, J.; WOOLF, C. Neuropathic pain: a maladaptative response of the nervous system to damage. **Annual Review of Neuroscience**, vol 32, p.1-32, 2009.

COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. Robbins e Cotran. **Patologia. Bases patológicas das doenças**. 7ª edição. Rio de Janeiro, Elsevier, p.1592, 2005.

CRISAFULLI, C.; MAZZONN, E.; MUIA, C.; BELLA, P.; ESPOSITO, E.; MELI, R.; CUZZOCREA, S. Effects of combination of melatonin and dexamethasone on acute lung injury in a mice model of carrageenan-induced pleurisy. **Journal of Pineal Research**, vol 41, p.228–237, 2006.

CROFFORD, L. J. Adverse Effects of Chronic Opioid Therapy for Chronic Musculoskeletal Pain. **Nature Reviews Rheumatology**, vol 6, p.191-197, 2010.

CUENCA, M. D. R.; CATALAN, C. A. N.; DIAZ, J. G.; HERZ, W. Monoterpenes and Lignans from *Mikania saltensis*. **Journal of Natural Products**, vol 54, nº 4, p.1162-1164, 1991.

DALE, H. H.; LAIDLAW, P. P. The physiological actions of b-aminazolethylamine. **Journal Physiology**, vol 41, p.318–344, 1910.

DALE, H. H.; LAIDLAW, P. P. Histamine shock. **Journal Physiology**, vol 52, p.355-390, 1919.

DALLEL, R.; RABOISSON, P.; CLAVELOU, P.; SAADE, M.; WODA, A. Evidence for a peripheral origin of the tonic nociceptive response to subcutaneous formalin. **Pain**, vol 61, p.11–16, 1995.

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

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

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

DI STASI, L. C.; OLIVEIRA, G. P.; CARVALHAES, M. A.; QUEIROZ-JUNIOR, M.; TIEN, O. S.; KAKINAMI, S. H.; REIS, M. S. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. **Fitoterapia**, vol 73, p.69-91, 2002.

DOS SANTOS, S. C.; KRUEGER, C. L.; STEIL, A. A.; KREUEGER, M. R.; BIAVATTI, M. W.; WISNIEWSKI, J. A. LC characterisation of guaco medicinal extracts, *Mikania laevigata* and *M. glomerata*, and their effects on allergic pneumonitis. **Planta Médica**, vol 72, nº 8, p.679-684, 2006.

DRAY, A. Inflammatory mediators of pain. **British Journal of Anaesthesia**, vol 75, p.125-131, 1995.

DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V. L. G.; DELARMELINA, C. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, vol 97, p.305–311, 2005.

DUARTE, M. C. T.; LEME, E. E.; DELARMELINA, C.; SOARES, A. A.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. **Journal of Ethnopharmacology**, vol 111, p.197–201, 2007.

DUBINSKY, B.; GEBRE-MARIAM, S.; CAPETOLA, R. J.; ROSENTHALE, M. E. The analgesic drugs: human therapeutic correlates of their potency in laboratory animal models of hyperalgesia. **Agents Actions**, vol 20, p.50–60, 1987.

DUBUISSON, D.; DENNIS, S. G. Formalin Test - Quantitative Study of Analgesic Effects of Morphine, Meperidine, and Brain-Stem Stimulation in Rats and Cats. **Pain**, 4, nº 2, p.161–174, 1977.

DUNG, N. T.; BAJPAI, V. K.; YOON, J. I.; KANG, S. C. Anti-inflammatory effects of essential oil isolated from the buds of *Cleistocalyx operculatus* (Roxb.) Merr and Perry. **Food and Chemical Toxicology**, vol 47, p.449–453, 2009.

DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. G. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. Rio de Janeiro, vol 39, nº 4, p.343-350, 2003.

ELISABETSKY, E. Etnofarmacologia. **Ciência e Cultura**, vol 55, nº 3, p. 35-36, 2003.

EL-MEKKAWY, S.; MESELHY, M.R.; NAKAMURA, N.; HATTORI, M. Anti-HIV-1 phorbol esters from seeds of *Croton tiglium*. **Phytochemistry**, vol 53, p.457-464, 2000.

EMING, S. A.; KRIEG, T.; DAVIDSON, J. M. Inflammation in Wound Repair: Molecular and Cellular Mechanisms. **Journal of Investigative Dermatology**, vol 127, p.514–525, 2007.

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

FARMACOPÉIA DOS ESTADOS UNIDOS DO BRASIL. 1ª edição. São Paulo. Cia Editora Nacional, p. 270, 1926.

FELDMANN, M.; SAKLATVALA, J. Cytokine Reference: Proinflammatory cytokines. 1ª edição, p.291–305, 2001.

FERREIRA, F. P.; OLIVEIRA, D. C. R. New constituents from *Mikania laevigata* Shultz Bip. ex Baker. **Tetrahedron Letters**, vol. 51, p. 6856–6859, 2010.

FERREIRA, M. A. D.; NUNES, O. D. R. H.; FONTENELE, J. B.; PESSOA, O. D. L.; LEMOS, T. L. G.; VIANA, G. S. B. Analgesic and anti-inflammatory activities of a fraction rich in oncocalyxone A isolated from *Auxemma oncocalyx*. **Phytomedicine**, vol 11, p.315–322, 2004.

FIERRO, I. M.; SILVA, A. C. B.; LOPES, C. S.; MOURA, R. S.; BARJA-FIDALGO, C. Studies on the anti-allergic activity of *Mikania glomerata*. **Journal of Ethnopharmacology**, vol 66, p.19-24, 1999.

FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; SOUSA, I. M. O.; RODRIGUES, R. A. F. Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. **Multiciência: Construindo a História dos Produtos Naturais**, vol 7, 2006.

FORTES, Z. B.; FARSKY, S. P.; OLIVEIRA, M. A.; GARCIA-LEME, J.; Direct vital microscopic study of defective leukocyte-endothelial interaction in diabetes mellitus. **Diabetes**, vol 40, nº 10, p. 1267-1273, 1991.

FREITAS, T. P.; SILVEIRA, P. C.; ROCHA, L. G.; REZIN, G. T.; ROCHA, J.; CITADINI-ZANETTE, V.; ROMÃO, P. T.; DAL-PIZZOL, F.; PINHO, R. A.; ANDRADE, V. M.;

STRECK, E. L. Effects of *Mikania glomerata* Spreng. and *Mikania laevigata* Schultz Bip. ex Baker (Asteraceae) Extracts on Pulmonary Inflammation and Oxidative Stress Caused by Acute Coal Dust Exposure. **Journal of Medicinal Food**, vol 11, nº 4, p.761-766, 2008.

FUNK, C. D. Prostaglandins and Leukotrienes: Advances in Eicosanoid Biology. **Science**, vol 294, p.1871-1875, 2001.

GALLOTE, D. C.; RIBEIRO, L. F. Ethnobotanic account of plants from the medicinal garden of Escola Superior Sao Francisco de Assis- ESFA. 2005. Disponível em <http://www.naturezaonline.com.br>.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Online Identification of Chlorogenic Acids, Sesquiterpene Lactones, and Flavonoids in the Brazilian Arnica *Lychnophora ericoides* Mart. (Asteraceae) Leaves by HPLC-DAD-MS and HPLC-DAD-MS/MS and a Validated HPLC-DAD Method for Their Simultaneous Analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol 56, p.1193–1204, 2008.

GOEL, G.; MAKKAR, H.P.S.; FRANCIS, G.; BECKER, K. Phorbol esters: structure, biological activity and toxicity in animals. **International Journal of Toxicology**, vol 26, p.279-288, 2007.

GOODMAN e GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 11ª edição. McGraw-Hill. Rio de Janeiro, 2006.

GOSSYE, V.; ELEWAUT, D.; BOUGARNE, N.; BRACKE, D.; CALENBERGH, S. V.; HAEGEMAN, G.; DE BOSSCHER, K. Differential Mechanism of NF- $\kappa$ B Inhibition by Two Glucocorticoid Receptor Modulators in Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts. **Arthritis e Rheumatism**, vol 60, nº 11, p.3241-3250, 2009.

GOZZANI, J. L. Opioids and Antagonists. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, vol 44, nº 1, p.65-73, 1994.

GRANGER, D. N.; KUBES, P. The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. **Journal of Leukocyte Biology**, vol. 55, p 642-675, 1994.

GUO, R.; WARD, P. A. Role of C5a in Inflammatory Responses. **Annual Reviews Immunology**, vol 23, p.821-852, 2005.

HADDAD, J. J. Cytokines and related-receptor mediated signalling pathways. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, vol 297, p.700-713, 2002.

HAESLER, G.; FOADI, N. A.; AHRENS, J. A.; DENGLER, R. B.; HECKER, H. C.; LEUWER, M. D. Tramadol, fentanyl and sufentanil but not morphine block voltageoperated sodium channels. **Pain**, vol 126, p.234–244, 2006.

HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**, vol 13, nº 19/20, p.894-901, 2008.

HASAN, S. M. R.; JAMILA, M.; MAJUMDER, M. M.; AKTER, R.; HOSSAIN, M. M.; MAZUMBER, M. E. H.; ALAM, M. A.; JAHANGIR, R.; RANA, M. S.; ARIF, M.; RAHMAN, S. Analgesic and Antioxidant Activity of the Hydromethanolic Extract of *Mikania scandens* (L.) Willd. Leaves. **American Journal of Pharmacology and Toxicology**, vol 4, n° 1, p.1-7, 2009.

HATTORI, H.; SUBRAMANIAN, K. K.; SAKAI, J.; JIA, Y.; LIA, Y.; PORTER, T. F.; LOISON, F.; SARRAJ, B.; KASORN, A.; JO, H.; BLANCHARD, C.; ZIRKLE, D.; MCDONALD, D.; PAI, S.; SERHAN, C. N.; LUO, H. R. Small-molecule screen identifies reactive oxygen species as key regulators of neutrophil chemotaxis. **PNAS**, vol 107, n° 8, p.3546–3551, 2010.

HEDQVIST, P.; GAUTAM, N.; LINDBOM, L. Interactions between Leukotrienes and Other Inflammatory Mediators/Modulators in the Microvasculature. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, vol 161, p.117-119, 2000.

HEINRICH, M.; ROBLES, M.; WEST, J. E.; MONTELLANO, B. R. O.; RODRIGUEZ, E. Ethnopharmacology of Mexican Asteraceae (Compositae). **Annual Reviews Pharmacology Toxicology**, vol 38, p.539-565, 1998.

HERZ, W. Constituents of *Mikania* species. **New trends in Natural Products Chemistry**, vol 26, p.143-154, 1986.

HERZ, W. Terpenoid chemistry of *Mikania* species. **Journal Indian Chemical Society**, vol 75, n° 10-12, p. 559-564, 1998.

HIM, A.; OZBEK, H.; TUREL, I.; ONER, A. C. Antinociceptive Activity of Alpha-pinene and Fenchone. **Pharmacologyonline**, vol 3, p.363-369, 2008.

HOLMES, W. C. **A proposed sectional classification for Mikania (Eupatorieae)**. In: Compositae: Systematics. Proceedings of the International Compositae Conference, Royal Botanic Gardens, vol 1, p. 621-626, 1996.

HOPKINS, S. J. The pathological role of cytokines. **Legal Medicine**, vol 5, p.45-47, 2003.

HUNSKAAR, S.; BERGE, O.G.; HOLE, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. **Journal of Neuroscience Methods**, vol 14, p. 69-76, 1987.

HUNSKAAR, S.; BERGE, O.G.; HOLE, K. A modified hot-plate test sensitive to mild analgesics. **Behavioural Brain Research**, vol. 21, p.101-108, 1996.

IKEDA, Y.; UENO, A.; NARABA, H.; OH-ISHI, S. Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanoids in the acid-induced writhing responses of mice. **Life Science**, vol 69, p.2911–2919, 2001.

INOUE, H.; MORI, T.; SHIBATA, S.; KOSHIHARA, Y. Modulation by glycyrrhetic acid derivatives of TPA-induced mouse ear oedema. **British Journal Pharmacology**, vol 96, p.204-210, 1989.

JEAN-BAPTISTE, E. Cellular Mechanisms in Sepsis. **Journal of Intensive Care Medicine**, vol 22, p.63-72, 2007.

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

KAKKAR, A.K.; LEFER, D.J. Leukocyte and endothelial adhesion molecule studies in knockout mice. **Current Opinion in Pharmacology**, vol 4, p.154-158, 2004.

KING, R. M.; ROBINSON, H. The genera of the Eupatorieae (Asteraceae). Lawrence, **Allen Press**, vol 22, p. 418-426, 1987.

KISSMANN, K. G.; GROTH, D. **Plantas Infestantes e Nocivas**. São Paulo, BASF Brasileira S. A., 1992.

KITE, G. C.; ROWE, E. R.; LEWIS, G. P.; VEITCH, N. C. Acylated flavonol tri- and tetraglycosides in the flavonoid metabolome of *Cladrastis kentukea* (Leguminosae). **Phytochemistry**, vol 1, p 01-13, 2011

KOEHN, F. E.; CARTER, G. T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, vol 4, nº 3, p.206– 220. 2005.

KOLIOS, G.; VALATAS, V.; WARD, S. G. Nitric oxide in inflammatory bowel disease: a universal messenger in an unsolved puzzle. **Immunology**, vol 113, p.427-437, 2004.

KOPP, S. The influence of Neuropeptides, Serotonin, and Interleukin 1B on Temporomandibular Joint Pain and Inflammation. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, vol 56, p.189-191, 1998.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; DEBEER, E. J. M. Acetic acid for analgesic screening. **Fed. Proc**, vol 18, p.412, 1959.

KRAUTMANN, M.; RISCALA, E. C.; BURGUEÑO-TAOPIA, E.; MORA-PERZ, Y.; CATALAN, C. A. N.; JOSEPH-NATHAN, P. C-15-Functionalized Eudesmanolides from *Mikania campanulata*. **Journal of Natural Products**, vol 70, p.1173-1179, 2007.

KRAUZE-BARANOWSKA, M.; CISOWSKI, W. Flavone c-glycosides from *Bryonia alba* and *B. dioica*. **Phytochemistry**, vol. 39, nº. 3, p.727-729, 1995.

LAMOTTE, R. H.; SHAIN, D.; SIMONE, D. A.; TSAI, E. F. Neurogenic hyperalgesia: Psychophysical studies of underlying mechanisms. **Journal of Neurophysiology**, vol 66, p.190-211, 1991.

LANG, L. J.; PIERER, M.; STEIN, C.; BAERWALD, C. Opioids in rheumatic diseases. **Annals of the New York Academy of Sciences**, vol 1193, p.111–116, 2010.

LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; LANDMAN-LIMA, M. T. R.; CASTRO, M. S. A.; LIMA, T. C. M. **Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais**. Gráfica Metrópole. Porto alegre, 2003. Sociedade Brasileira de Plantas Medicinais.

LAWRENCE, T.; WILLOUGHBY, D. A.; GILROY, D. W. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. **Nature Reviews Immunology**, vol 2, p. 787-795, 2002.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. W. Animal models of nociception. **Pharmacological Reviews**, vol 53, p.597-652, 2001.

LEE, Y. J.; HWANG, S. M.; YOON, J. J.; LEE, S. M.; KYUNG, E. H.; KIM, J. S.; KANG, D. G.; LEE, H. S. Inhibitory Effect of *Thuja orientalis* on TNF- $\alpha$ - induced Vascular Inflammation. **Phytotherapy Research**, vol. 24, p. 1489–1495, 2010.

LE MERRER, J.; BECKER, J. A. J.; BEFORT, K.; KIEFFER, B. L. Reward Processing by the Opioid System in the Brain. **Physiology Reviews**, vol 89, p.1379–1412, 2009.

LEMMICH, J. Monoterpene and coumarin glucosides of *Cnidium silaifolium*. **Phytochemistry**, vol. 41, nº 5, p.1337 -1340, 1996.

LEY, K.; LAUDANNA, C.; CYBULSKY, M. I.; NOURSHARGH, S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. **Nature Reviews Immunology**, vol 7, p. 678-689, 2007.

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

LIU, B.; GAO, H.; WANG, J.; JEOHN, G.; COOPER, C. L.; HONG, J. Role of Nitric Oxide in Inflammation-Mediated Neurodegeneration. **Annals of the New York Academy of Sciences**, vol 962, p.318–331, 2002.

LO, T. N.; ALMEIDA, A. P.; BEAVEN, M. A. Dextran and Carrageenan Evoke Different Inflammatory Responses in Rat with Respect to Composition of Infiltrates and Effect of Indomethacin. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, vol 221, nº 1, 1982.

LOBITZ, G. O.; TAMAYO-CASTILLO, G.; POVEDA, L.; MERFORT, I. Kaurene Diterpenes from *Mikania vitifolia*. **Phytochemistry**, vol. 49, nº 3, p.805-809, 1998.

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

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil**. Instituto Plantarum, Nova Odessa, 2002.



LOUX, J. J.; SMITH, S.; SALEM, H. Comparative analgesic testing of various compounds in mice using writhing techniques. **Arzneim Forsch**, vol 28, p.1644–1647, 1978.

MaCDONALD, A. D.; WOOLFE, G.; BERGEL, F.; MORRISON, A. L.; RINDERKNECHT, H.; Analgesic action of pethidine derivatives and related compounds. **British journal of pharmacology**, vol 1, p.4-14, 1946.

MADA, S. R.; METUKURI, M. R.; BURUGULA, L.; REDDANNA, P.; KRISHNA, D. R. Antiinflammatory and Antinociceptive Activities of Gossypin and Procumbentin-Cyclooxygenase-2 (COX-2) Inhibition Studies. **Phytotherapy Research**, vol 23, p.878–884, 2009.

MAIA, J. G. S.; ANDRADE, E. H. A. Database of the Amazon aromatic plants and their essential oils. **Química Nova**, vol 32, nº3, p.595-622, 2009.

MAIORANO, V. A.; MARCUSSI, S.; DAHER, M. A. F.; OLIVEIRA, C. Z.; COUTO, L. B.; GOMES, O. A.; FRANÇA, S. C.; SOARES, A. M.; PEREIRA, P. S. Antiophidian properties of the aqueous extract of *Mikania glomerata*. **Journal of Ethnopharmacology**, vol 102, p.364–370, 2005.

MALONE, M. H.; ROBICHAUD, R. C. A Hippocratic screen for pure or crude drug materials. **Lloydia**, vol 25, p.320-332, 1962.

MARTINS, A. S.; ALVES, C. N.; LAMEIRA, O. A.; SANTOS, A. S.; MÜLLER, R. C. S. Avaliação de minerais em plantas medicinais amazônicas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, vol 19, nº 2B, p.621-625, 2009.

MAZAL, S.; RACHMILEWITZ, E. A. The effect of an antiserotonin agent pizotifen on platelet aggregability in migraine patients. **Journal of Neurology, Neurosurgery, and Psychiatry**, vol 43, p.1137-1140, 1980.

MCCALL, W. D.; TANNER, K. D.; LEVINE, J. D. Formalin induces biphasic activity in C-fibers in the rat. **Neuroscience Letters**, vol 208, p.45–48, 1996.

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

MENDES, B.; VENÂNCIO, C. M. N.; JARDIM, M. A. G.; SILVA, J. C. Informações fitoterápicas e composição química de *Mikania lindleyana* DC. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmácia**, vol 83, nº 1/4, p.27-29, 2002.

MENDES, C. C.; SANDES, L. Q.; CRUZ, F. G.; ROQUE, N. F. New (9 $\beta$ H)-Lanostanes and Lanostanes from *Mikania aff. jeffreyi* (Asteraceae). **Chemistry and Biodiversity**, vol 6, p.1463-1470, 2009.

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

MUCENEEKI, R. S.; AMORIM, C. M.; CESCO, T. G.; BIAVATTI, M. W.; BRESOLIN, T. M. B. A Simple and Validated LC Method for the Simultaneous Determination of Three Compounds in *Mikania laevigata* Extracts. **Full Short Communication** Publicação online, 7 de fevereiro de 2009.

NASCIMENTO, D. C.; PEREIRA, B. A. F.; TEIXEIRA, J. R. M. Efeito de *Mikania lindleyana* DC. na memória: Estudo experimental em ratos. **Revista Paraense de Medicina**, vol 2, p.6-11, 2003.

NATHAN, C. Catalytic Antibody Bridges Innate and Adaptive Immunity. **Science**, vol 298, p.2143-2144, 2002.

NEUMANN, D.; BEERMANN, S.; SEIFERT, R. Does the Histamine H<sub>4</sub> Receptor Have a Pro- or Anti-Inflammatory Role in Murine Bronchial Asthma?. **Pharmacology**, vol 85, p.217–223, 2010.

NUNEZ C. V.; AMÊNDOLA, M. C.; LAGO, J. H. G.; ROQUE, N. F. Diterpene acids from *Mikania* sp. Nov (Asteraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, vol 32, p.233–237, 2004.

OECD – Organization of Economic Co-operation and development. **OECD 425** - The Revised Up-and-Down Procedure: A Test Method for Determining the Acute Oral Toxicity of Chemicals. NIH Publication. N<sup>o</sup> 02-4501, p. 1-4, 2001 CD-ROM 1-2.

OHKOSHI, E.; MAKINO, M.; FUJIMOTO, Y. Studies on the Constituents of *Mikania hirsutissima* (Compositae). **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, vol 47, n<sup>o</sup> 10, p.1436-1438, 1999.

OHKOSHI, E.; KAMO, S.; MAKINO, M.; FUJIMOTO, Y. *ent*-Kaurenoic acids from *Mikania hirsutissima* (Compositae). **Phytochemistry**, vol 65, p.885–890, 2004.

OLIVEIRA, P. A.; GREGORIO, L. E.; OLIVEIRA, D. C. R. Comparative Analysis of Sesquiterpene Lactones from *Mikania cordifolia* collected from three different locations. **Chemistry of Natural Compounds**, vol. 43, n<sup>o</sup> 2, 2007.

PARSONS, M. E.; GANELLIN, C. R. Histamine and its receptors. **British Journal of Pharmacology**, vol 147, p.127–135, 2006.

PAUL, R. K.; JABBAR, A.; RASHID, M. A. Antiulcer activity of *Mikania cordata*. **Fitoterapia**, vol 71, p.701-703, 2000.

PAULINO, N.; ABREU, S. R. L.; UTO, Y.; KOYAMA, D.; NAGASAWA, H.; HORI, H.; DIRSCH, V. M.; VOLLMAR, A. M.; SCREMIN, A.; BRETZ, W. A. Anti-inflammatory effects of a bioavailable compound, Artepillin C, in Brazilian propolis. **European Journal of Pharmacology**, vol. 587, p.296–301, 2008.

PAWAR, P.; JADHAV, S.; EGGLETON, C. D. KONSTANTOPOULOS, K. Roles of cell and microvillus deformation and receptor-ligand binding kinetics in cell rolling. **American Journal Physiology - Heart and Circulatory Physiology**, vol 295, p.1439–1450, 2008.

PEDROSO, A. P. D.; SANTOS, S. C.; STEIL, A. A.; DESCHAMPS, F.; BARISON, A.; CAMPOS, F.; BIAVATTI, M. W. Isolation of syringaldehyde from *Mikania laevigata* medicinal extract and its influence on the fatty acid profile of mice. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, vol 18, nº 1, p.63-69, 2008.

PIETROVSKI, E. F. **Avaliação da atividade antinociceptiva do extrato etanólico e de princípios ativos das flores de *Combretum Leprosum* Mart.** Dissertação de Mestrado em Farmacologia - Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004, p. 20, 47.

PINTO, A. A. C; MADURO, C. B. Produtos e subprodutos da medicina popular comercializados na cidade de Boa Vista, Roraima. **Acta Amazônica**, vol 33, nº 2, p.281-290, 2003.

PINTO, L.N. **Plantas medicinais utilizadas em comunidades do município de Igarapé-Miri, Pará:** etnofarmácia do município de Igarapé-Miri – Pa. Dissertação de Mestrado em Ciências Farmacêuticas - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Pará, Belém, 2008.

PRUENSTER, M.; MUDDE, L.; BOMBOSI, P.; DIMITROVA, S.; ZSAK, M.; MIDDLETON, J.; RICHMOND, A.; GRAHAM, G. J.; SEGERER, S.; NIBBS, R. J. B.; ROT, A. The Duffy antigen receptor for chemokines transports chemokines and supports their promigratory activity. **Nature Immunology**, vol 10, nº1, p.101-108, 2009.

PUIG, S.; SORKIN, L. S. Formalin-evoked activity in identified primary afferent fibers: systemic lidocaine suppresses phase-2 activity. **Pain**, vol 64, p.345–355, 1996.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. **Farmacologia**, 6ª edição. Elsevier. Rio de Janeiro, 2007.

RASKIN, I.; RIBNICKY, D.M.; KOMARNYTSKY, S.; NEBOJSA, I.; POULEV, A.; BORISJUK, N.; BRINKER, A.; MORENO, D.A.; RIPOLL, C.; YAKOBY, N.; O'NEAL, J.M.; CORNWELL, T.; PASTOR, I.; FRIDLENDER, B. Plants and human health in the twenty-first century. **TRENDS in Biotechnology**, vol 20, p.522-531, 2002.

REIS, A. A.; FERRAZ, T. L.; MARTINS, D.; CRUZ, F. G.; GUEDES, M. L. S.; ROQUE, N. F. Preliminary studies on the volatile constitution of *Mikania* species. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, vol 18, p.683-685, 2008.

REN, K.; DUBNER, R. Interactions between the immune and nervous systems in pain. **Nature Medicine**, vol.16, nº 11, p.1267-1276, 2010.

RIBEIRO, R. A.; VALE, M. L.; THOMAZZI, S. M.; PASCHOALATO, A. B. P.; POOLE, S.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **European Journal of Pharmacology**, vol 387, p.111–118, 2000.

RITTER, M. R.; MIOTTO, S. T. S. Taxonomia de *Mikania* Willd. (Asteraceae) no Rio

Grande do Sul, Brasil. **Hoehnea**, vol 32, nº 3, p.309-359, 2005.

RITTER, M. R.; WAECHTER, J. L. Biogeografia do gênero *Mikania* Willd. (Asteraceae) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Acta Botânica Brasileira**, vol 18, nº 3, p.643-652, 2004.

ROCHA, A. C. C.; FERNANDES, E. S.; QUINTA, N. L. M.; CAMPOS, M. M.; CALIXTO, J. B. Relevance of tumour necrosis factor- $\alpha$  for the inflammatory and nociceptive responses evoked by carrageenan in the mouse paw. **British Journal of Pharmacology**, vol 148, p. 688–695, 2006.

ROCHMAN, Y.; SPOLSKI, R.; LEONARD, W. J. New insights into the regulation of T cells by  $\gamma$ c family cytokines. **Nature Reviews Immunology**, vol 9, p.480-490, 2009.

ROCK, K. L.; KONO, H. The Inflammatory Response to Cell Death. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, vol 3, p.99-126, 2008.

ROQUE, N. F.; VILEGAS, W.; GIANELLA, T. L.; KNUDSEN, F. S.; RONDELLA, G. P.; TORRES, L. M. B.; FERRO, V. O.; OLIVEIRA, F. Compostos medicinais do Brasil: Estudo Químico de *Solidago microglossa*, *Mikania triangularis*, *M.diversifolia*, *M.smilacina*, *M.microleptis* e *Wedelia padulosa*. **Supl. Acta Amazônica**, v 18, nº 2, p 473-476, 1988.

SALGADO, H. R. N.; RONCARI, A. F. F.; MOREIRA, R. R. D. Antidiarrhoeal effects of *Mikania glomerata* Spreng. (Asteraceae) leaf extract in mice. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, vol 15, nº 3, p.205-208, 2005.

SALLAM, A. A.; HITOTSUYANAGI, Y.; MANSOUR, E. S.; AHMED, A. F.; GEDARA, S.; FUKAYA, H.; TAKEYA, K. Sesquiterpene Lactones from *Daucus glaber*. **Helvetica Chimica Acta**, vol 93, p.48-57, 2010.

SANTOS, F. S. D. **Tradições populares de usos de plantas medicinais na Amazônia**. História, Ciência, Saúde- Manguinhos, vol 6, 919-939, 2000.

SCHOLICH, K.; GEISLINGER, G. Is mPGES-1 a promising target for pain therapy?. **Trends in Pharmacological Sciences**, vol 27, nº 8, 2006.

SCHWAB, J. M.; CHIANG, N.; ARITA, M.; SERHAN, C.N. Resolvin E1 and protectin D1 activate inflammation-resolution programmes. **Nature**, vol. 447, p.869–874, 2007.

SERHAN, C. N.; CHIANG, N.; VAN DIKE, T. E. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. **Nature Reviews Immunology**, vol 8, p.349-361, 2008.

SHIN, S.; JOO, S. S.; PARK, D.; JEON, J. H.; KIM, T. K.; KIM, J. S.; PARK, S. K.; HWANG, B.; KIM, Y. Ethanol extract of *Angelica gigas* inhibits croton oil-induced inflammation by suppressing the cyclooxygenase-prostaglandin pathway. **Journal of Veterinary Sciences**, vol 11, nº 1, 43-50, 2010.

SIANI, A.C. **Desenvolvimento tecnológico de fitoterápicos**: plataforma

metodológica. Rio de Janeiro: Scriptorio, 2003. São Paulo: Manole, 2002.

SILVA, R. Z.; RIOS, E. M.; SILVA, M. Z.; LEAL, L. F.; YUNES, R. A.; MIGUEL, O. G.; CECHINEL FILHO, V. Investigação Fitoquímica e Avaliação da Atividade Antibacteriana da *Mikania lanuginosa* DC. (Asteraceae). **Visão Acadêmica**, vol 3, nº 2, p.59-64, 2002.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. 2007. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ª edição. Porto Alegre. Editora da UFRGS. Florianópolis. Editora da UFSC, p. 537-556.

SIMON, S.I.; GREEN, C.E. Molecular mechanics and dynamics of leukocyte recruitment during inflammation. **Annual Review of Biomedical Engineering**, vol 7, p.151-185, 2005.

SOARES, A. P.; NASCIMENTO, A. M.; TALEB-CONTINI, S. H.; OLIVEIRA, D. C. R. Constituents of *Mikania lasiandrae*. **Chemistry of Natural Compounds**, vol. 43, nº 6, p.708-709, 2007.

SOEHNLEIN, O.; LINDBOM, L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. **Nature Reviews Immunology**, vol 10, p.427-439, 2010.

SOUZA, G. E. P.; FERREIRA, S. H. Blockade by antimacrophage serum of the migration of PMN neutrophils into the inflamed peritoneal cavity. **Inflammation Research**, vol 17, nº 1, p. 97-103, 1985.

SOUZA, J. M.; TALEB-CONTINI, S. H.; OLIVEIRA, D. C. R. Phytochemical study of *Mikania pseudohoffmanianna* G. M. Barroso ex W. C. Holmes. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol 42, nº 2, 2006.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. Instituto Plantarum, Nova Odessa, 2005.

SUYENAGA, E. S.; RECHE, E.; FARIAS, F. M.; SCHAPOVAL, E. E. S.; CHAVES, C. G. M.; HENRIQUES, A. T. Antiinflammatory Investigation of some species of *Mikania*. **Phytotherapy Research**, vol 16, p.519-523, 2002.

TAKEUCHI, K.; TANAKA, A.; KATO, S.; AMAGASE, K.; SATOH, H. Roles of COX inhibition in pathogenesis of NSAID-induced small intestinal damage. **Clinica Chimica Acta**, vol 411, p.459-466, 2010.

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

TONZIBO, Z. F.; BROU, A. F.; KOFFI, A. M.; CHALCHAT, J. C. Geographic Variation in the Leaves Oils Composition of *Mikania Cordata* (Burm.f.) B. L. Robinson from Côte d'Ivoire. **European Journal of Scientific Research**. vol.38, nº 4, p.572-576, 2009.

TUBARO, A.; DRI, P.; DELBELLO, G.; ZILLI, C., DELLA LOGGIA, R. The Croton oil ear test revisited. **Agents Actions**, vol 17, p.347– 349, 1985.

VALÉRIO, D. A. R.; CUNHA, T. M.; ARAKAWA, N. S.; LEMOS, H. P.; COSTA, F. B.; PARADA, C. A.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q.; VERRI JR, W. A. Anti-inflammatory and analgesic effects of the sesquiterpene lactone budlein A in mice: Inhibition of cytokine production-dependent mechanism. **European Journal of Pharmacology**, vol 562, p.155–163, 2007.

VANEGAS, H.; SCHAIBLE, H. Descending control of persistent pain: inhibitory or facilitatory?. **Brain Research Reviews**, vol 46, p.295-309, 2004.

VENEZIANI R. C. S.; OLIVEIRA, D. C. R. Constituents of *Mikania glomerata* Sprengel. **Biochemical Systematics and Ecology**, vol 27, p.99-102, 1999.

VERDI, L. G.; BRIGHENTE, I. M. C.; PIZZOLATTI, M. G. Gênero *Baccharis* (Asteraceae): Aspectos Químicos, Econômicos e Biológicos. **Química Nova**, vol 28, nº 1, p.85-94, 2005.

VILEGAS, J. H. Y.; MARCHI, E.; LANÇAS, F. M. Determination of Coumarin and Kaurenoic Acid in *Mikania glomerata* ('Guaco') Leaves by Capillary Gas Chromatography. **Phytochemical Analysis**, vol 8, p.74–77, 1997.

VOGT, B. A.; DERBYSHIRE, S.; JONES, A. K. P. Pain Processing in Four Regions of Human Cingulate Cortex Localized with Co-registered PET and MR Imaging. **European Journal of Neuroscience**, vol. 8, p 1461-1473, 1996.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis**: A thin layer chromatography atlas. 2ª edição. Library of Congress Cataloging-in-Publication Data. p.126-147, 2001.

WALKER, K.; FOX, A. J.; URBAN, L. A. Animal models for pain research. **Molecular Medicine Today**, vol 5, p.319-320, 1999.

WARD, P. A. The Dark Side of C5a in Sepsis. **Nature Reviews Immunology**, vol 4, p 133-142, 2004.

WEI, X.; HUANG, H.; WU, P.; CAO, H.; YE, W. Phenolic constituents from *Mikania micrantha*. **Biochemical Systematics and Ecology**, vol 32, p.1091–1096, 2004.

WHITE, J. P. M.; CIBELLI, M.; FIDALGO, A. R.; PAULE, C. C.; NOORMOHAMED, F.; URBAN, L.; MAZE, M. NAGY, I. Role of Transient Receptor Potential and Acid-sensing Ion Channels in Peripheral Inflammatory Pain. **Anesthesiology**, vol 112, p.729 – 741, 2010.

WILLIS, A. L. Parallel assay of prostaglandin-like activity in rat inflammatory exudate by means of cascade superfusion. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, vol 21, p.126–128, 1969.

WILLOUGHBY, D. A. The Inflammatory Response. **Journal of Dental Research**, vol

51, p.226-227, 1972.

WINTER, C. A; RISELY, E. A; NUSS, G. W. Carrageenan-induced edema in the hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drugs. **Proc Soc Exp Biol Med**, vol 111, p.544–547, 1962.

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

WOOLF, C. J.; MA, Q. Nociceptors: Noxious Stimulus Detectors. **Neuron**, vol 55, p.353-364, 2007.

XIE, Y.; HUO, F.; TANG, J. Cerebral cortex modulation of pain. **Acta Pharmacologica Sinica**, vol 30, n° 1, p.31–41, 2009.

XU, Z.; ZHANG, L.; LIU, T.; PARK, J. Y.; BERTA, T.; YANG, R.; SERHAN, C. N.; JI, R. Resolvins RvE1 and RvD1 attenuate inflammatory pain via central and peripheral actions. **Nature Medicine**, Advance Online Publication, p.1-7, 2010.

YAKSH, T. L. Calcium Channels As Therapeutic Targets in Neuropathic Pain. **The Journal of Pain**, vol 7, n° 1, p.13-30, 2006.

YATSUDA, R.; ROSALEN, P. L.; CURY, J. A.; MURATA, R.M.; REHDER, V. L. G.; MELO, L. V.; KOO, H. Effects of *Mikania* genus plants on growth and cell adherence of mutans streptococci. **Journal of Ethnopharmacology**, vol 97, p.183–189, 2005.

YU, B.; SHAO, Y.; ZHANG, J.; DONG, X. L.; LIU, W. L.; YANG, H.; LIU, L.; LI, M. H.; YUE, C. F.; FANG, Z. Y.; ZHANG, C.; HU, X. P.; CHEN, B. C.; WU, Q.; CHEN, Y.W.; ZHANG, W.; WAN, J. Polymorphisms in human histamine receptor H4 gene are associated with atopic dermatitis. **British Journal of Dermatology**, vol 162, p 1038–1043, 2010.

## **APÊNDICE – Tabelas de Resultados Farmacológicos**



**Tabela 2: Efeito do EAML sobre o estímulo nociceptivo induzido pela administração intraperitoneal de ácido acético 0,6% em camundongos.**

Grupos (n=10)	Dose (mg/Kg)	Número de contorções (20 minutos)	% de inibição
Controle	-	50,5 ± 5,63	-
EAML	125	44,17 ± 3,97	12,55
EAML	250	35 ± 3,29	30,69*
EAML	500	26,11 ± 1,36	48,30***
EAML	750	21,78 ± 2,19	56,87***
EAML	1000	15 ± 2,52	70,30***
EAML	1500	9,44 ± 1,94	81,31***
Indometacina	5	12,80 ± 2,17	74,65***

Cada valor representa a média ± E.P.M e n= n° de animais. \*, (P < 0,05) significante em relação ao controle. \*\*\*, (P < 0,001) significante em relação ao grupo controle (ANOVA, teste de Bonferroni)

**Tabela 3: Efeito do EAML sobre o estímulo térmico induzido pela placa quente em camundongos.**

Grupo	Dose (mg/Kg)	Tempo (minutos)				
		0	30	60	90	120
Controle (n=10)	-	11,11 ± 0,37	9,74 ± 0,55	8,39 ± 0,42	9,7 ± 1,2	9,22 ± 1,06
EAML (n=10)	692,6	9,16 ± 2,12	6,49 ± 0,82	11,78 ± 1,08	11,5 ± 1,61	11,81 ± 2,13
Morfina (n=10)	10	6,51 ± 1,14	29,3 ± 3,93*	28 ± 4,36*	26,55 ± 4,53*	17,58 ± 3,28*

O tempo de latência foi avaliado em segundos. Cada valor representa a média ± E.P.M e n= n° de animais. \*, (P < 0,05) significante em relação ao controle (ANOVA, Teste de Bonferroni).

**Tabela 4: Efeito do EAML sobre o estímulo nociceptivo induzido pela injeção intraplantar de formalina 1% em camundongos na 1ª fase do teste da formalina.**

Grupos (n=10)	Dose (mg/Kg)	Tempo de lambida (s) (0-5 minutos)	% de inibição
Controle	-	56,6 ± 5,41	-
EAML	692,6	42,3 ± 3,88	25,26 <sup>n.s</sup>
Morfina	4	25,67 ± 6,14	54,7 <sup>*</sup>
Naloxona	0,4	65,30 ± 5,79	-15,37 <sup>n.s</sup>
Morfina + Naloxona	4 + 0,4	50,70 ± 3,53 <sup>#</sup>	-
EAML + Naloxona	692,6 + 0,4	65,30 ± 6,68	-

Cada valor representa a média ± E.P.M e n= n<sup>o</sup> de animais. \*, (P < 0,05) significativa em relação ao grupo controle. #, (P < 0,05) significativa quando comparado agonista mais antagonista versus agonista. n.s, estatisticamente não significativa quando comparado com o controle (Teste "t" de Student)

**Tabela 5: Efeito do EAML sobre o estímulo nociceptivo induzido pela injeção intraplantar de formalina 1% em camundongos na 2ª fase do teste da formalina.**

Grupo (n=10)	Dose (mg/kg)	Tempo de lambida (s) (15-30 minutos)	% de inibição
Controle	-	183,1 ± 12,62	-
EAML	692,6	82,20 ± 10,69	55,11 <sup>*</sup>
Morfina	4	11,67 ± 3,28	93,63 <sup>*</sup>
Naloxona	0,4	148,62 ± 8,78	18,83 <sup>n.s</sup>
Morfina + Naloxona	4 + 0,4	117,30 ± 17,37 <sup>#</sup>	-
EAML + Naloxona	692,6 + 0,4	141,40 ± 5,69 <sup>#</sup>	-

Cada valor representa a média ± E.P.M e n=n<sup>o</sup> de animais. \*, (P < 0,05) significativa em relação ao controle. #, (P < 0,05) significativa quando comparado agonista mais antagonista versus agonista. n.s, estatisticamente não significativa quando comparado com o controle (Teste "t" de Student).

**Tabela 6: Efeito do EAML sobre o estímulo irritante induzido pela aplicação tópica de óleo de cróton em camundongos.**

Grupo (n=10)	Dose (mg/kg)	Tamanho do edema (mg)	% de inibição
Controle	-	6,62 ± 0,63	-
EAML	692,6	1,79 ± 0,32*	72,96*
Dexametasona	10	1,27 ± 0,35*	80,82*

Cada valor representa a média ± E.P.M e n= n° de animais. \*, (P < 0,05) significativa em relação ao controle (ANOVA, teste de Bonferroni)

**Tabela 7: Efeito do EAML sobre o edema de pata induzido pela injeção intraplantar de dextrana 1% em ratos.**

Grupos (n=5)	Dose (mg/Kg)	Tempo (minutos)				
		0	30	60	90	120
Salina	-	0	0,09 ± 0,03	0,08 ± 0,03	0,04 ± 0,04	0,06 ± 0,03
Controle (Dextrana)	-	0	0,83 ± 0,09 <sup>#</sup>	0,86 ± 0,04 <sup>#</sup>	0,83 ± 0,06 <sup>#</sup>	0,80 ± 0,07 <sup>#</sup>
EAML	692,6	0	0,80 ± 0,07	0,87 ± 0,10	0,75 ± 0,07	0,72 ± 0,08
Pizotifeno	0,5	0	0,12 ± 0,05 *	0,15 ± 0,03 *	0,10 ± 0,03 *	0,03 ± 0,02 *

O tamanho do edema foi medido em ml. Cada valor representa a média ± E.P.M e n= n° de animais. \*, (P < 0,05) significativa em relação ao controle; <sup>#</sup>, (P < 0,05) significativa em relação ao grupo salina (ANOVA, Teste de Bonferroni).

**Tabela 8: Efeito do EAML sobre o edema de pata induzido pela injeção intraplantar de carragenina em ratos.**

Grupos (n=5)	Dose (mg/Kg)	Tempo (horas)				
		0	1	2	3	4
Salina	-	0	0,13 ± 0,04	0,10 ± 0,05	0,06 ± 0,04	0,06 ± 0,04
Controle (Cg)	-	0	0,30 ± 0,06 <sup>#</sup>	0,51 ± 0,05 <sup>#</sup>	0,60 ± 0,01 <sup>#</sup>	0,33 ± 0,04 <sup>#</sup>
EAML	692,6	0	0,19 ± 0,05	0,31 ± 0,08 <sup>*</sup>	0,28 ± 0,04 <sup>*</sup>	0,08 ± 0,05 <sup>*</sup>
Indometacina	5	0	0,15 ± 0,07	0,12 ± 0,05 <sup>*</sup>	0,13 ± 0,04 <sup>*</sup>	0,13 ± 0,06 <sup>*</sup>

O tamanho do edema foi medido em ml. Cada valor representa a média ± E.P.M e n= n<sup>o</sup> de animais. \*, (P < 0,05) significativa em relação ao controle; #, (P < 0,05) significativa em relação ao grupo salina (ANOVA, Teste de Bonferroni).

**Tabela 9: Efeito do EAML sobre a migração de neutrófilos no peritônio de ratos induzida por Cg**

Grupo (n=4)	Dose (mg/kg)	N <sup>o</sup> de neutrófilos x 10 <sup>6</sup> /mL	% de inibição
Salina	-	0	-
Controle (Cg)	-	1,74 ± 0,17 <sup>#</sup>	-
EAML	692,6	0,82 ± 0,20 <sup>*</sup>	52,83 <sup>*</sup>
Dexametasona	10	0,60 ± 0,20 <sup>*</sup>	65,52 <sup>*</sup>

Cada valor representa a média ± E.P.M e n= n<sup>o</sup> de animais. \*, (P < 0,05) significativa em relação ao controle; #, (P < 0,05) significativa em relação ao grupo salina (ANOVA, teste de Bonferroni)

**Tabela 10: Efeito do EAML sobre o rolamento leucocitário induzido pela injeção i.p. de Cg em camundongos.**

Grupo	Dose (mg/kg)	Rolamento de Leucócitos/min	% de inibição
Salina (n=6)	-	11,03 ± 4,67	-
Controle Cg (n=9)	-	45,73 ± 2,03 <sup>#</sup>	-
EAML (n=6)	692,6	12,13 ± 2,67 <sup>*</sup>	73,47 <sup>*</sup>

Cada valor representa a média ± E.P.M e n= n° de animais. \*, ( $P < 0,05$ ) significativa em relação ao controle; <sup>#</sup>, ( $P < 0,05$ ) significativa em relação ao grupo salina (Teste "t" de Student)

**Tabela 11: Efeito do EAML sobre a aderência de leucócitos ao endotélio vascular de camundongos após a injeção i.p. de Cg em camundongos.**

Grupo	Dose (mg/kg)	Células aderidas/100 $\mu\text{m}^2$	% de inibição
Salina (n=4)	-	0,24 ± 0,06	-
Controle Cg (n=7)	-	2,34 ± 0,36 <sup>#</sup>	-
EAML (n=6)	692,6	0,71 ± 0,12 <sup>*</sup>	69,66 <sup>*</sup>

Cada valor representa a média ± E.P.M e n= n° de animais. \*, ( $P < 0,05$ ) significativa em relação ao controle; <sup>#</sup>, ( $P < 0,05$ ) significativa em relação ao grupo salina (Teste "t" de Student)