



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes

Daniele Corrêa Fernandes

Isolamento de substâncias do extrato e frações de *Echinodorus macrophyllus* (Kunth) Mich. com atividade antinociceptiva e estudo de seus mecanismos de ação

Rio de Janeiro

2014

Daniele Corrêa Fernandes

Isolamento de substâncias do extrato e frações de *Echinodorus macrophyllus* (Kunth) Mich.com atividade antinociceptiva e estudo de seus mecanismos de ação

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-Graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro.

Orientadora: Prof^a. Dra. Marsen Garcia Pinto Coelho

Rio de Janeiro

2014

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/BIBLIOTECA CB-A

F363 Fernandes, Daniele Corrêa.

Isolamento de substâncias do extrato e frações de *Echinodorus macrophyllus (Kunth) Mich.* com atividade antinociceptiva e estudo de seus mecanismos de ação / Daniele Corrêa Fernandes – 2014.
106 f.

Orientadora: Marsen Garcia Pinto Coelho.

Tese (Doutorado) - Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Pós-graduação em Biociências.

1. Alismataceae - Química. 2. Analgesia - Teses. 3. Plantas medicinais - Teses. 4. Extratos vegetais - Farmacocinética. 5. Plantas medicinais - Uso terapêutico. 6. Folhas de Planta - Química. I. Coelho, Marsen Garcia Pinto. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 582.536.15

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Daniele Corrêa Fernandes

**Isolamento de substâncias do extrato e frações de *Echinodorus macrophyllus*
(Kunth) Mich. com atividade antinociceptiva e estudo de seus
mecanismos de ação**

Tese apresentada, como requisito parcial para
obtenção do título de Doutor, ao Programa de
Pós-Graduação em Biociências, da Universidade
do Estado do Rio de Janeiro.

Aprovada em 28 de março de 2014.

Banca Examinadora:

Prof.^a Dra. Marsen Garcia Pinto Coelho (Orientadora)
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Kátia Costa de Carvalho Sabino
Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes - UERJ

Prof.^a Dra. Naomi Kato Simas
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Prof.^a Dra. Ana Luisa Palhares de Miranda
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2014

DEDICATÓRIA

Esta tese é dedicada a cada sorriso, abraço, beijos, carinhos, conforto, apoio, confiança e Amor, que recebi de Todos vocês nos últimos quatro difíceis anos.

AGRADECIMENTOS

À DEUS, pois sem ELE, eu nada conseguiria.

À minha mãe Neida (*in memoriam*) e meu pai Claudemiro (*in memoriam*), que plantaram as sementes e observam o desenvolver de suas duas filhas e iluminam o caminho da nossa Giulia.

À minha irmã, por ser presente, sempre me incentivando, puxando minha orelha e aconselhando, quando necessário e também quando não.

À Giulia, minha sobrinha/afilhada, que me chama de Dadi e faz meu coração feliz.

À Giovanna e Marco Dell`Osa pelo carinho e apoio.

À professora Marsen Garcia Pinto Coelho pela orientação, pelo conhecimento, pelo incentivo, carinho e dedicação, pela confiança depositada, por tudo o que aprendi ao longo desse trabalho nestes anos especiais e ao seu colo sempre acolhedor.

Às minhas primas Mércia e Andréa, minha madrinha Neide, tia Suely, tio Celso, tia Nice, tio Edinho e à família Corrêa pelo apoio e carinho.

À família Oliveira, por todo caloroso aconchego, que recebi entre os seus, me transformando em mais uma sobrinha, neta e prima.

À família Valadão, que por intermédio de Elenir e Joel, zelam por mim e meu lar.

Às amigas Amanda Chaves, Fabiana Pinto e Cintia Souza pela imensa paciência e carinho.

Ao Carlos Eduardo Belardo, que transportou trezentos camundongos, sem reclamar.

Aos Professores Kátia Sabino, Graça Justo, Leosvaldo Velozo, Sérgio Dalmau (*in memoriam*) e Márcia Paes pelos seus valiosos conselhos e sugestões.

Aos funcionários Beto, Paulinho, Shirley e Gustavo pelas sugestões, pela paciência, pela contribuição ao meu aprendizado e realização de experimentos.

Aos amigos Fernanda e Thiago, que tornaram possível uma Bióloga que sempre trabalhou *in vivo*, entrar neste mundo de, qualquer coisa/qualquer da cultura de células (*in vitro*) e realmente aprender e completar a mim, como profissional da ciência.

Aos amigos, Girlaine, Gleison, Mariana, Nathalia, Wanderson, Helena, Raphael pela ajuda em algum momento do desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos Monica, Patrícia Reis, Natalia, Maurício, Francis, Jéssica, Leandro, Cris, Amanda Lima, Sandra, Arthur e Eduardo, pela amizade e momentos descontraídos.

Aos amigos Ivan e Fernanda por momentos agradáveis.

Aos amigos Cristina e Bauer que contribuíram muito no início do desenvolvimento das análises fitoquímicas desde o início.

Aos amigos do LAB-PLAN e LAB-MIT, que sempre me recebem de coração aberto e Eduardo, por facilitar a elucidação de parte da fitoquímica do chapéu de couro.

Aos amigos do LAB-MUT, que sempre me socorreram em algum momento de apuro.

Aos vizinhos do LAB-Bioquímica Toxicológica, por causa destes amigos, nunca faltou açúcar em meu café ou chá.

Aos vizinhos do LAB-Genoma, que me cederam seu espaço e equipamento em um momento de crise em nosso laboratório de cultura de células.

As Prof.^a Dra. Angela de Castro Resende, Prof.^a Dra. Naomi Kato Simas, Prof.^a Dra. Ana Luisa Palhares de Miranda, Dra. Ivana Correa Ramos Leal e Dra. Kátia Costa de Carvalho Sabino por aceitarem com satisfação integrar a banca de avaliação deste trabalho.

Aos Dr. Raimundo Corrêa e Dr. Luiz Sérgio de Lima Gomes, agradeço pela atenção, cuidados e carinho no percurso do viver.

Ao Instituto Vital Brazil, pela colaboração em suas doações para realização de vários estudos em nosso laboratório.

À FAPERJ, por conceder-me a bolsa de doutorado.

À CAPES e CNPq e FAPERJ, pelo fomento para realização deste trabalho.

À UERJ e PPGGB, por tornar possível o desenvolvimento desta tese.

Enfim, quero agradecer a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

É melhor ser alegre que ser triste
Alegria é a melhor coisa que existe
É assim como a luz no coração
Mas pra fazer um samba com beleza
É preciso um bocado de tristeza
É preciso um bocado de tristeza
Senão, não se faz um samba não...

Vinicius de Moraes

RESUMO

FERNANDES, Daniele Corrêa. *Isolamento de substâncias do extrato e frações de Echinodorus macrophyllus (Kunth) Mich. com atividade antinociceptiva e estudo de seus mecanismos de ação*. 2014. 106 f. Tese (Doutorado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

Neste estudo avaliou-se o potencial antinociceptivo do extrato hexânico (EHEm), do extrato aquoso (EAEm) e frações (Fr) de folhas de *Echinodorus macrophyllus* (Kunth) Mich., conhecido no Brasil como “chapéu de couro”, em diferentes respostas nociceptivas geradas por um produto químico ou por estímulo nocivo térmico e realizar a análise fitoquímica. O EAEm foi obtido por infusão em água destilada (50 g p.s./L, 100°C), seguido de filtração e liofilização. O EAEm foi fracionado em Sephadex LH-20, gerando as frações Fr20 e Fr40. Os perfis cromatográficos das frações foram analisados por HPLC-DAD em coluna de fase reversa C18. O perfil cromatográfico do EHEm foi analisado por GC-MS utilizando-se coluna DB 5 (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). Utilizou-se camundongos Swiss Webster machos (2 a 4 meses de idade (n=5/grupo)) para os ensaios biológicos (CEUA 05/2009 e 07/2013). O efeito antinociceptivo do EHEm, EAEm, Fr20 e Fr40 foi verificado utilizando-se os modelos de hiperalgesia induzida por injeção intraperitoneal (i.p.) de ácido acético, formalina e de imersão da cauda em banho a 50°C. O tratamento (v.o.) com o EAEm e EHEm apresentou maior inibição no número de contorções de 75% e 52%, respectivamente na dose de 25 mg/kg. A Fr20 (5 mg/kg) inibiu 39% das contorções e o tratamento com a Fr40 (25 mg/kg) apresentou uma inibição de 96%, quando comparados ao controle. O tratamento com dipirona inibiu em média 51% as contorções induzidas por ácido acético em relação ao grupo controle. No modelo de imersão da cauda em banho a 50°C, o tratamento com EAEm não apresentou atividade antinociceptiva. Neste modelo, o EHEm mostrou atividade antinociceptiva no tratamento com a dose de 50 mg/kg nos tempos 60 e 90 min e a Fr20 aumentou o tempo de latência 90 min após tratamento com as três doses administradas (25, 50 e 100 mg/kg), quando comparados com o controle. A morfina utilizada como droga padrão, apresentou efeito antinociceptivo após o tratamento (i.p.) em todos os tempos analisados (30 a 180 min). No ensaio do MTT utilizando células NEURO-2A, o EAEm apresentou a maior inibição da atividade redutora mitocondrial (ARM) em função da concentração (IC50 de 36,15 µg/mL). O EHEm apresentou uma redução da ARM atingindo 49% na concentração de 100 mg/mL e a morfina apresentou redução máxima de 23% da ARM. A fração Fr20 apresentou inibição de 38,1% da ARM e a Fr40 não interferiu na ARM da maioria das concentrações testadas. Os mecanismos precisos envolvidos na resposta antinociceptiva da fração Fr40 de *E. macrophyllus* não estão completamente compreendidos, mas pela presença de flavonoides e outros compostos aromáticos, sugere-se a possível contribuição do NO e ativação adrenérgica. A análise dos compostos da Fr40 por HPLC-DAD e co-injeção de padrões, além de TLC identificou isovitexina e isoorientina nesta fração.

Palavras-chave: *Echinodorus macrophyllus*. Nocicepção. Fracionamento biomonitorado. Fitoquímica. Mecanismo de ação.

ABSTRACT

FERNANDES, Daniele Corrêa. *Isolation of substances from extract and fractions of *Echinodorus macrophyllus* (Kunth) Mich. with antinociceptive activity and study of their mechanisms of action.* 2014.106 f. Tese (Doutorado em Biociências) - Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

In this study we evaluated the antinociceptive potential of the hexane extract (HEEm), aqueous extract (AEEEm) and fractions (Fr) from the leaves of *Echinodorus macrophyllus* (Kunth) Mich., known in Brazil as "chapéu de couro", in different nociceptive responses generated by a chemical or thermal noxious stimulus and perform phytochemical analysis. The AEEEm was obtained by infusion in distilled water (50 g d.w./L, 100°C), followed by filtration and lyophilization. The AEEEm was fractionated on Sephadex LH-20, generating Fr20 and Fr40 fractions. The chromatographic profiles of fractions were analyzed by HPLC-DAD in a reverse phase C18 column. The chromatographic profile of HEEm was analyzed by GC-MS using a DB 5 (30 m x 0.25 mm x 0.25 µm) column. We used Swiss Webster mice (2- 4 months of age (n= 5/group)) for biological tests (CEUA 05/2009 e 07/2013). The antinociceptive effects of HEEm, AEEEm, Fr20 and Fr40 were evaluated using hyperalgesia models induced by intraperitoneal (i.p.) injection of acetic acid, formalin test and tail immersion in a bath at 50°C. Treatment (p.o.) with AEEEm and HEEm showed higher inhibition of the contortions number of 75% and 52% respectively at a dose of 25 mg/kg. The Fr20 (5 mg/kg) inhibited 39% of the contortions, and Fr40 treatment (25 mg/kg) showed 96% inhibition when compared to control. Treatment with dipyrone inhibited contortions induced by acetic acid by 51% on average in relation to the control group. In the tail immersion model in a bath at 50°C, treatment with AEEEm showed no antinociceptive activity. In this model, the HEEm showed antinociceptive activity by treatment with 50 mg/kg, at 60min and 90 min and the Fr20 increased the latency time, 90 min after treatment with the three doses (25, 50 and 100 mg/kg), when compared with the control. Morphine, used as standard drug showed antinociceptive effect after treatment (i.p.) in all time analyzed (30-180 min). In the MTT assay with NEURO-2A cells, AEEEm exhibited the higher inhibition of the mitochondrial reducing activity (MRA) in a concentration dependent manner (IC₅₀ of 36.15 mg/mL). HEEm showed MRA reduction reaching 49% at 100 mg/mL concentration and morphine exhibited maximum reduction of 23%. Fr20 fraction showed inhibition of 38.1% of MRA, and FR40 did not interfere with MRA in most concentrations tested. The precise mechanisms involved in the antinociceptive response of the Fr40 fraction from *E. macrophyllus* are not completely understood, but the presence of flavonoids and other aromatic compounds, suggests the possible contribution of NO adrenergic activation. By the analysis of the Fr40 compounds by HPLC-DAD and standards co-injection, and TLC evaluation isovitexin and isoorientin were identified in this fraction.

Keywords: *Echinodorus macrophyllus*. Nociception. Bioguided fractionation. Phytochemistry. Action mechanism.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Fatores que alteram quantitativa e qualitativamente os metabólitos secundários.....	22
Figura 2 -	Principais vias do metabolismo secundário e suas interligações	24
Figura 3 -	Prancha botânica de <i>E. macrophyllus</i>	28
Figura 4 -	Fotografia de <i>Echinodorus macrophyllus</i> (chapéu de couro).....	28
Figura 5 -	Estrutura química do equinodol (1) e do ácido equinóico (2).....	30
Figura 6 -	Estrutura química de derivados Clerodano.....	30
Figura 7 -	Estrutura química das equinofilinas.....	31
Figura 8 -	Estrutura química das chapecoderinas.....	31
Figura 9 -	Estrutura química dos equinodolídeos.....	32
Figura 10 -	Classificação da dor	37
Figura 11 -	Esquema comparativo entre os tipos de Dor.....	39
Figura 12 -	Sistema modulatório descendente Dor.....	41
Figura 13 -	Pontos de bloqueio dos fármacos analgésicos.....	43
Figura 14 -	Efeito do tratamento com EAEm e EHEm no modelo de contorção abdominal induzido por ácido acético.....	57
Figura 15 -	Efeito do tratamento com Fr20 e Fr40 no modelo de contorção abdominal induzido por ácido acético.....	58
Figura 16 -	Efeito do tratamento com o EAEm e EHEm no modelo de formalina.....	59
Figura 17 -	Efeito do tratamento com a Fr20 e a FR40 no modelo de formalina.....	61
Figura 18 -	Efeito do tratamento com EHEm e EAEm no modelo de imersão da cauda em banho 50°C.	62
Figura 19 -	Efeito do tratamento com Fr20 e Fr40 no modelo de imersão da cauda em banho a 50°C.....	63

Figura 20 - Efeito citotóxico do EAEm, EHEm e morfina sobre neuroblastoma da linhagem NEURO-2A.....	65
Figura 21 - Efeito citotóxico da Fr20 e Fr40 sobre neuroblastoma da linhagem NEURO-2A.....	66
Figura 22 - Cromatograma do EHEm obtido por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrômetro de massas (GC-MS).....	70
Figura 23 - Análise por HPTLC do extrato EAEm e suas frações	71
Figura 24 - Cromatogramas do EAEm e frações obtidos por HPLC-DAD a 340 nm.....	72
Figura 25 - Cromatogramas por HPLC-DAD a 340 nm da Fr40 na ausência ou com co-injeção de isovitexina.....	75
Figura 26 - Cromatogramas por HPLC-DAD a 340 nm da Fr40 na ausência ou com co-injeção de vitexina.....	76
Figura 27 - Cromatogramas por HPLC-DAD a 340 nm da Fr40 na ausência ou com co-injeção de rutina.....	78
Figura 28 - Cromatogramas por HPLC-DAD a 340 nm da Fr40 na ausência ou com co-injeção de orientina.....	80
Figura 29 - Cromatogramas por HPLC-DAD a 340 nm da Fr40 na ausência ou com co-injeção de isoorientina.....	81
Figura 30 - Comparação do EAEm e frações com padrões de flavonoides por TLC.....	82

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 -	Indicações de uso das plantas medicinais pela ANVISA.....	20
Quadro 2 -	Classe de compostos fenólicos em plantas.....	25
Quadro 3 -	Estrutura química de algumas classes de flavonoides.....	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Rendimento dos extratos e das frações de <i>E. macrophyllus</i>	56
Tabela 2 -	Avaliação do mecanismo opiáceo da Fr40 no modelo de contorções abdominais induzidas pelo HAC.....	67
Tabela 3 -	Avaliação do mecanismo adrenérgico da Fr40 no modelo de contorções abdominais induzidas pelo HAC.....	68
Tabela 4 -	Efeito da Fr40 no modelo de contorções abdominais induzidas pelo HAC avaliando o mecanismo de inibição da guanilato ciclase.....	68
Tabela 5 -	Efeito da Fr40 no modelo de contorções abdominais induzidas pelo HAC avaliando o mecanismo de inibição da NO sintase neuronal.....	69
Tabela 6 -	Identificação dos constituintes do extrato hexânico de <i>E. macrophyllus</i> por GC-MS.....	70
Tabela 7 -	Análise comparativa do EAEm e suas frações Fr20 e Fr40 quanto ao tempo de retenção e área relativa dos picos dos cromatogramas obtidos por HPLC	73
Tabela 8 -	Comparação dos dados dos cromatogramas da FR40 antes e após a co-injeção de vitexina e isovitexina.....	77
Tabela 9 -	Comparação dos dados dos cromatogramas da FR40 antes e após a co-injeção de rutina.....	79
Tabela 10 -	Comparação dos dados dos cromatogramas da FR40 antes e após a co-injeção de orientina e isoorientina.....	82
Tabela 11	Valores de Rf das Frações de EAEm obtidos por TLC.....	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

7-NI	7-nitroindazol
13C-NMR	Ressonância nuclear magnética de C
AINEs	Anti-inflamatórios não esteroides
ANS	Agência Nacional de Saúde
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ARM	Atividade redutora mitocondrial
bioNEQs	Novas entidades químicas bioativas
CEUA-IBRAG	Comitê de Ética do IBRAG para uso de animais-UERJ
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
EAE _m	Extrato aquoso de <i>Echinodorus macrophyllus</i>
ECO 92	Conferência das Nações Unidas sobre o Meio Ambiente e Desenvolvimento
EHE _m	Extrato hexânico de <i>Echinodorus macrophyllus</i>
FBRAS	Farmacopeia Brasileira
Fr	Fração
GC	Cromatografia gasosa
GMP _c	Monofosfato cíclico de guanosina
HPLC-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplado ao detector de fotodiodo
HTS	Bioensaios em larga escala
IL-1 β	Interleucina 1Beta
IL-8	Interleucina 8
i.p.	Intraperitoneal
IV	Infravermelho

MS	Espectrometria de massas
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
NEQ	Novas Entidades Químicas
NMR	Ressonância magnética nuclear
NP	ácido difenilbórico aminoetiléster – “natural product
NO	Óxido nítrico
ODQ	1H-[1,2,4]oxadiazolo-[4,3-a]quinoxali-1-ona
OMS	Organização Mundial da Saúde
p.c.	Peso corporal
PEG	Polietileno glicol 400
PGE ₂	Prostaglandinas E2
PNs	Produtos Naturais
SFB	Soro fetal bovino
s.c.	Subcutâneo
SP	Substância P
STT	Trato espinotalâmico contralateral
SUS	Sistema Único de Saúde
TGI	Trato gastrointestinal
TLC	Cromatografia de camada delgada
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
T _R	Tempo de retenção
UV	Radiação ultravioleta
v.o.	Via oral
SW	<i>Swiss Webster</i>

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO.....	18
1	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	19
1.1	Produtos naturais: plantas medicinais.....	19
1.2	Metabolismo secundário.....	22
1.3	Família Alismataceae.....	27
1.4	<i>Echinodorus macrophyllus</i>.....	27
1.5	Fitoquímica.....	33
1.6	O papel dos produtos naturais no desenvolvimento de novos medicamentos.....	34
1.7	Nocicepção (Dor)	36
1.7.1	<u>Descrição dos tipos de dor</u>.....	37
1.8	Algesia, analgesia e analgésicos.....	40
1.9	Resposta Antinociceptiva.....	42
2	OBJETIVOS.....	44
2.1	Geral.....	44
2.2	Específico.....	44
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	45
3.1	Material.....	45
3.1.1	<u>Material Vegetal</u>.....	45
3.1.2	<u>Animais</u>.....	45
3.1.3	<u>Material descartável, reagentes, soluções, vidrarias especiais e material cromatográfico</u>.....	45
3.1.4	<u>Equipamentos e software</u>.....	47
3.2	Métodos.....	48
3.2.1	<u>Obtenção dos extratos</u>.....	48
3.2.2	<u>Fracionamento do EAEm</u>.....	48
3.2.3	<u>Cromatografia em camada delgada de alta eficiência (HPTLC)</u>.....	49
3.2.4	<u>Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de fotodiodo (HPLC-DAD)</u>	49
3.2.5	<u>Análise por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS)</u>	50

3.2.6	<u>Cultura da linhagem celular Neuro-2A</u>	50
3.2.7	<u>Ensaio de citotoxicidade – Teste de redução do MTT</u>	51
3.2.8	<u>Modelo de hiperalgesia induzida por injeção intraperitoneal (i.p.) de ácido acético</u>	52
3.2.9	<u>Modelo de formalina (injeção intraplantar de agente irritante)</u>	52
3.2.10	<u>Modelo de imersão da cauda em banho a 50°C</u>	53
3.2.11	<u>Estudo do mecanismo opiáceo</u>	53
3.2.12	<u>Estudo do mecanismo adrenérgico</u>	54
3.2.13	<u>Estudo do mecanismo envolvendo a via NO-GMPc</u>	54
3.2.14	<u>Análise estatística</u>	55
4	RESULTADOS	56
4.1	Rendimento da obtenção do EAEm, EHEm e OEEm	56
4.2	Estudos <i>in vivo</i>	56
4.2.1	<u>Modelo de hiperalgesia induzida por injeção intraperitoneal (i.p.) de ácido acético</u>	56
4.2.2	<u>Modelo de formalina (injeção intraplantar de agente irritante)</u>	59
4.2.3	<u>Modelo de imersão da cauda em banho a 50°C</u>	60
4.3	Estudos <i>in vitro</i>	64
4.3.1	<u>Ensaio de citotoxicidade – Teste de redução do MTT</u>	64
4.4	Estudo do mecanismo de ação	64
4.4.1	<u>Avaliação do mecanismo opiáceo</u>	64
4.4.2	<u>Avaliação do mecanismo adrenérgico</u>	67
4.4.3	<u>Avaliação do mecanismo de inibição da guanilato ciclase</u>	67
4.4.4	<u>Avaliação do mecanismo de inibição da NO sintase neuronal</u>	69
4.5	Análises fitoquímicas	69
4.5.1	<u>Perfil cromatográfico EHEm por GC-MS e identificação de seus constituintes</u>	69
4.5.2	<u>Cromatografia em camada delgada de alta eficiência (HPTLC)</u>	70
4.5.3	<u>Perfis cromatográficos do EAEm, Fr20 e Fr40 por HPLC-DAD</u>	71
4.5.4	<u>Perfil cromatográfico da Fr40 por HPLC-DAD com co-injeções de padrões</u>	73
4.5.4.1	Co-injeção de isovitexina.....	75
4.5.4.2	Co-injeção de vitexina.....	75

4.5.4.3	Co-injeção de rutina.....	75
4.5.4.4	Co-injeção de orientina.....	75
4.5.4.5	Co-injeção de isoorientina.....	77
4.5.5	<u>Comparação do EAEm e suas frações por HPTLC utilizando padrões de flavonoides.....</u>	79
	DISCUSSÃO.....	84
	CONCLUSÃO.....	93
	REFERÊNCIAS	95

INTRODUÇÃO

Os produtos naturais são candidatos promissores para a identificação de princípios ativos de medicamentos e ainda continuam a ter um papel importante no futuro do desenvolvimento de programas para aquisição de pequenos compostos orgânicos (Newman e Cragg, 2012). Enquanto o processo industrial típico de descoberta de uma droga faz uso de plataformas de bioensaios, de médio e alto rendimento de triagem, para encontrar compostos promissores para um alvo particular, a etnofarmacologia caminha no sentido oposto; a eficácia das plantas medicinais é posta à prova no laboratório. O etnofarmacologista tenta compreender a base farmacológica de plantas culturalmente importantes. Esta abordagem é atualmente empregada para estudar as farmacopéias da Medicina Tradicional Chinesa (MTC), nas farmacopéias europeias, ou as plantas medicinais a partir de inúmeros grupos étnicos tradicionais. Assim, tipicamente etnofarmacologistas utilizam as hipóteses de trabalho derivados de trabalho de campo antropológico, planta, ou seja, extrato X é usado no contexto cultural Z para curar doenças A-D. Portanto, a etnofarmacologia é uma pesquisa transdisciplinar (Etkin e Elisabetsky, 2005), tocando em áreas como a antropologia cultural, etnobiologia e como o nome indica, farmacologia (Gertsch, 2009).

1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1 Produtos naturais: plantas medicinais

Os produtos naturais (PNs) têm sido investigados e utilizados para aliviar doenças desde os primórdios da história humana. No início dos anos de 1900, antes da "Era sintéticos", 80% de todos os medicamentos eram obtidos de raízes, cascas e folhas. Naquele tempo, extratos fluidos estavam em voga. Um quilo de material botânico bruto era percolado com um litro de álcool, costumeiramente. "Dê uma colher de chá disto antes das refeições", o médico de família diria, talvez, acrescentando um emplastro de mostarda ou cataplasmas vegetais, que não fariam nenhum mal. Cada família tinha seu chá favorito e tônicos. Confiante, a humanidade tinha colocado sua fé na crença de que para cada mal existente, havia uma cura nas plantas do campo e florestas (McChesney *et al.*, 2007).

O uso de plantas medicinais em tratamentos diversos, é caracterizado pela utilização da planta como medicamento, em uma variedade de produtos farmacêuticos sem isolamento das suas substâncias ativas (Sousa *et al.*, 2010; Tan *et al.*, 2010).

O uso mundial de fitoterápicos tem crescido profusamente (Buck e Michel, 2000; Agra *et al.*, 2007; Azaizeh *et al.*, 2010) e as plantas medicinais têm alcançado um elevado valor econômico (Akerlele, 1988) e são um dos principais recursos na produção de drogas (Zárate *et al.*, 2001), como aspirina, digitoxina, morfina, quinina e pilocarpina (Butler, 2004).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 80% dos habitantes do mundo continuam a contar com a medicina tradicional e seus produtos (Grover e Yadav, 2004; Prakash e Gupta, 2005; Gutiérrez *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2008; Tomczyka *et al.*, 2009; Ijeoma *et al.*, 2011; Okokon *et al.*, 2011).

Atualmente, o Brasil é um dos dez maiores consumidores de medicamentos à base de plantas. Cerca de 30% das drogas comercializadas e registradas pela Agência Nacional de Saúde (ANS) são classificadas como fitoterápicos (Petrovick *et al.*, 1999), incluindo extratos obtidos a partir de vegetais (tinturas, óleos essenciais, extrato de fluidos e corantes), bem como preparações galênicas (Seidl, 2002).

Alguns estados brasileiros, já introduziram plantas medicinais ao sistema público de saúde (Souza Brito Souza e Brito, 1993; Calixto, 2000; Wayland, 2001,

2003), e de acordo com dados oficiais do Sistema Único de Saúde (SUS), em 2010, a fitoterapia foi introduzida no SUS em dezesseis Federações Brasileiras (Ministério da Saúde, 2011).

A adição de espécies, incluindo *E. macrophyllus*, nas edições mais recentes da Farmacopeia Brasileira (FBRAS), estimula o seu uso na produção de medicamentos, como mostra o Quadro 1 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Esta situação aponta para a necessidade urgente de estudos ecológicos e de conservação para essas espécies, já que a maior parte das plantas comercializadas no Brasil é colhida direto de áreas selvagens e sem controle pela população, resultando em numerosas extinções locais (Brandão *et al.*, 2010).

Quadro 1- Indicações de uso das plantas medicinais pela ANVISA

Atenção:											
<p>As doses abaixo são para adultos. As plantas medicinais não devem ser usadas em crianças menores de 3 anos, gestantes e mulheres que estejam amamentando. Nas crianças de 3 a 7 anos deve-se usar 25% das doses indicadas abaixo Nas crianças entre 7 e 12 anos e nos idosos acima de 70 anos deve-se usar 50% das doses indicadas abaixo.</p>											
As alegações terapêuticas consideram apenas as formas de preparo e usos específicos aqui tratados, ficando excluídas desta resolução ações farmacológicas e indicações terapêuticas que, embora relevantes pelo uso tradicional, ou subsidiadas por estudos científicos, requeiram formas de preparação ou uso não previstas nesta Resolução.											
Nomenclatura botânica	Nomenclatura popular	Parte utilizada	Forma de utilização	Posologia e modo de usar	Via	Uso	Alegações	Contra indicações	Efeitos adversos	Informações adicionais em embalagem	Referências
	cidreira, Cidreira						suave				GUPTA et al, 1995 IEPA, 2005 MATOS et al, 2001 MATOS, 1997a MATOS, 1997b MATOS, 1998 MATOS, 2000 MELO-DINIZ et al., 1998 PROPLAM, 2004 SIMOES et al. 1998 VIANA et al, 1998 BARBOSA et al, 2009 LUZ NETTO, 1998
<i>Cynara scolymus</i>	Alcachofra	Folhas	Infusão: 2 g (1 colher sobremesa) em 150ml. (xíc chá)	Utilizar 1 xícara chá 3 x ao dia	Oral	A	Dispepsia (distúrbios da digestão)	Não deve ser utilizado por pessoas com doenças da vesícula biliar. Usar cuidadosamente em pessoas com hepatite grave, falência hepática e câncer benéfico	O uso pode provocar flatulência (gases), fraqueza e sensação de fome	-----	GARCIA et al, 1999 MATOS, 2000 PROPLAM, 2004 WICHTL, 2003 MILLS & BONE, 2004 CARDOSO, 2009
<i>Echinodorus macrophyllus</i>	Chapéu de couro	Folhas	Infusão: 1 g (1 colher chá) em 150 ml. (xíc de chá)	Utilizar 1 xícara chá 3 x ao dia	Oral	A	Edemas (inchaço) por retenção de líquidos e processos inflamatórios	Não deve ser utilizado por pessoas portadoras de insuficiência renal e cardíaca	Não utilizar doses acima da recomendada pois pode causar diarreia	Pode interagir com medicamentos anti-hipertensivos, causando queda da pressão	AMARAL et al., 2005 PROPLAM, 2004 GILBERT et al, 2005

Fonte: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/d595840047457ee08aa8de3fbc4c6735/tabela+drogas+vegetais.pdf?MOD=AJPERES>. Acesso: 10/02/2014.

Alguns estudos têm investigado as razões pelas quais as pessoas usam plantas medicinais (Harnack *et al.*, 2001; Yoon *et al.*, 2004; Albuquerque *et al.*, 2007). O primeiro uso geralmente ocorre em casa sem supervisão médica, e caso os sintomas não desapareçam, o paciente busca o cuidado de um profissional. Outro motivo para seu uso ocorre quando a medicação prescrita por um médico é muito cara ou está indisponível (Calixto, 2000; Ribeiro *et al.*, 2005; Van Andel *et al.*, 2010).

Práticas integrativas e complementares também fazem parte do Programa de Sistema de Saúde Oral e foram os temas de publicação de relatórios desde o início de 1980. A regulamentação governamental nº. 971 reforça o uso de medicamentos no SUS.

Com a aprovação da Política Nacional de Plantas Medicinais e regulamentação de fitoterápicos nº. 5813 (22 de junho de 2006), além da adoção de uma Política Nacional de Práticas Integrativas e Práticas Complementares no SUS, tem crescido a preocupação no Brasil em relação as plantas medicinais e seu uso adequado como medicamentos.

A ampliação das opções terapêuticas oferecidas aos usuários do SUS inclui o acesso a plantas medicinais, fitoterápicos e serviços relacionados. Segurança, eficácia e qualidade são estratégias importantes para a melhoria da saúde e para, inclusão social dos fitoterápicos (Ministério da Saúde do Brasil, 2006; República Federativa do Brasil de 2011).

O Brasil, no entanto, não faz uso satisfatório de sua biodiversidade e do conhecimento popular, no que diz respeito à investigação e ao desenvolvimento de fitoterápicos; sozinho possui em torno de 20-22% de todos os micro-organismos e plantas existentes na biodiversidade mundial. Entretanto, é estimado que vinte e cinco mil espécies de plantas tenham sido objeto de alguma investigação científica.

Apesar disto o país não utiliza bem seus recursos em prol do seu crescimento e estas riquezas estão se perdendo ano após ano, com a depredação dos recursos naturais (Calixto, 2005).

A destruição acelerada do rico ecossistema botânico brasileiro, também contribuiu para uma perda gradual do conhecimento sobre as plantas nativas utilizadas na medicina tradicional, incluindo aquelas encontradas em áreas da Mata Atlântica e Amazônia, onde ocorre acelerada ocupação do espaço (Amorozo, 2002; Begossi *et al.*, 2002; Di Stasi e Hiruma-Lima, 2002; Shanley e Luz, 2003; Brandão *et al.*, 2004; Shanley e Rosa, 2005). A perspectiva negativa na conservação de

espécies nativas em alguns lugares do Brasil destaca a necessidade urgente em recuperar informações sobre o uso de espécies vegetais nativas e promover estudos sobre sua ecologia e conservação (Giulietti *et al.*, 2005; Michalski *et al.*, 2008).

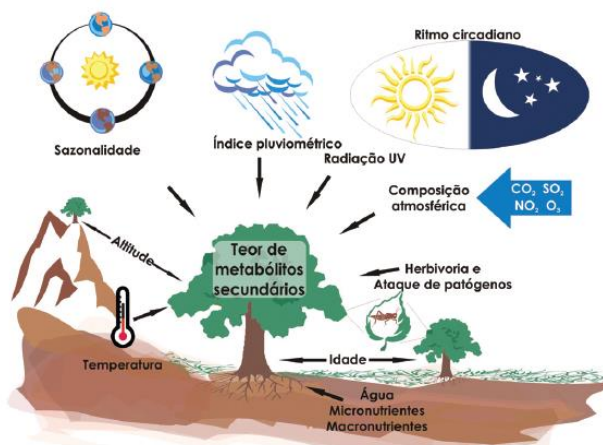
1.2 Metabolismo secundário

O estilo de vida fotoautotrófico de plantas depende da disponibilidade de luz, água e ar, bem como do acesso equilibrado à pelo menos, quatorze elementos do solo (Marschner *et al.*, 2012) e limitando-se o fornecimento de um (ou mais) destes recursos ambientais, leva-se ao estresse abiótico (Watanabe *et al.*, 2010).

Dependendo da natureza do estresse, diferentes partes do metabolismo são afetados e a adaptação ao estresse requer reajuste da homeostase molecular, celular e de todo o vegetal. Além disso, os mecanismos de proteção têm que ser desenvolvidos, independentemente da natureza do estresse e os processos adaptativos são realizados ao longo do crescimento da planta (Watanabe *et al.*, 2010).

O estresse abiótico, observado na Figura 1, estimula os distúrbios na homeostase do vegetal (Schlüter *et al.*, 2013), sendo responsável por produzir um grande número de metabólitos secundários, assim chamados, porque não estão diretamente envolvidos em processos primários de crescimento básico e desenvolvimento (Wink, 2010).

Figura 1 - Fatores que alteram quantitativa e qualitativamente os metabólitos secundários



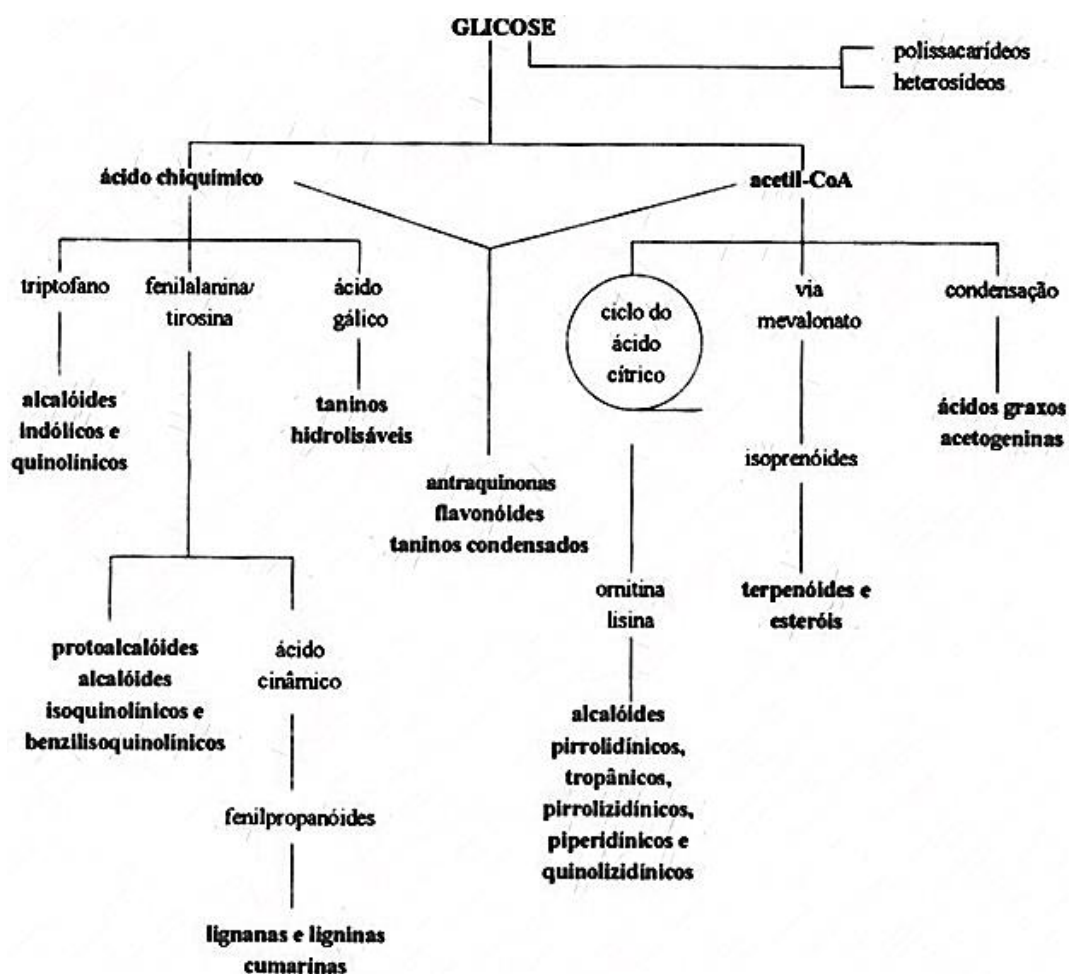
Fonte: adaptado de Gobbo-Neto e Lopes, 2007, acesso: 10/02/2014.

Os compostos naturais de plantas determinam o sabor e gosto de legumes, podem ter efeitos benéficos ou prejudiciais sobre a saúde de seres humanos ou animais após a ingestão e fornecer uma base importante para a pesquisa farmacêutica. Muitos produtos naturais do metabolismo vegetal desempenham um importante papel na interação das plantas com o seu ambiente biótico, onde eles podem servir como atrativos para polinizadores ou dispersores de semente, na defesa contra inimigos naturais ou como aleloquímicos contra os concorrentes. Dezenas de milhares de metabólitos secundários de plantas já foram descritos. Por exemplo, em torno de vinte e um mil alcaloides, vinte e dois mil terpenoides, cinco mil flavonoides e taninos são conhecidos, mas esta é provavelmente apenas uma fração do que está presente na natureza (Wink, 2010). As associações genótipo-metabólito são sensíveis às interações ambientais e a associação genótipo-ambiente deve ser considerada nos estudos do genoma selvagem, quando se analisa quantitativa e qualitativamente estes metabólitos (Chan, *et al.*, 2010).

A origem de todos os metabólitos secundários pode ser resumida a partir do metabolismo da glicose, através da via de dois intermediários principais, o ácido chiquímico e o acetato como pode ser visto no esquema da Figura 2. O ácido chiquímico origina os aminoácidos aromáticos, precursores da maioria dos metabólitos secundários. Já os derivados do acetato podem ser classificados segundo as seguintes vias: ciclo do ácido cítrico via mevalonato e produto da condensação do acetato (Bruneton *et al.*, 2007).

Neste estudo, os produtos do metabolismo secundário de interesse são os compostos fenólicos, que têm um grande espectro de atividade biológica (Gardana *et al.*, 2007; Medana *et al.*, 2008; Chirinos *et al.*, 2009).

Figura 2 - Principais vias do metabolismo secundário e suas interligações.



Fonte: Adaptado de Simões *et al.*, 2007.

Quimicamente, os compostos fenólicos são definidos como substâncias que possuem anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluindo seus grupos funcionais (Lee *et al.*, 2005). Possuem estrutura variável e com isso, são multifuncionais e podem ser categorizados como mostra o Quadro 2 (Angelo e Jorge, 2007). Existem cerca de cinco mil fenóis, e dentre eles, destacam-se os flavonoides apresentados no Quadro 3 (Giada, 2013).

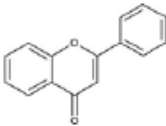
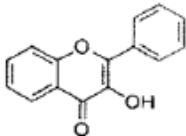
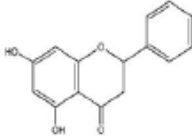
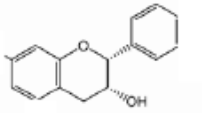
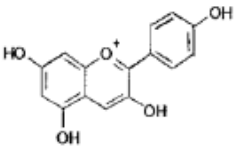
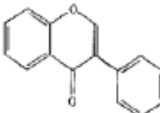
Quadro 2 - Classe de compostos fenólicos em plantas

Classe	Estrutura	Exemplos
Fenólicos simples, benzoquinonas	C_6	Catecol, hidroxiquinona 2,6-Dimethoxy benzoquinona
Ácidos fenólicos hidroxibenzoicos	C_6-C_1	Gálico, salicílico
Acetofenol, ácidos fenilacéticos	C_6-C_2	Benzaldeído 3-acetil-6-metoxi Ácidos fenilacéticos p-hidroxifenilacético
Ácidos hidroxicinâmicos, fenilpropanoides, cumarina	C_6-C_3	Cafeico, ferúlico Miristicina, eugenol Umbeliferona, aesculetin Bergonon Euenin
Nafitoquinonas	C_6-C_4	Juglone, plumbagina
Xantonas	$C_6-C_1-C_6$	Mangiferina
Estilbenos, antraquinonas	$C_6-C_2-C_6$	Resveratrol Emodina
Flavonoides, isoflavonoides	$C_6-C_3-C_6$	Quercetina, cianidina Genisteína
Lignanas, neolignanas	$(C_6-C_3)_2$	Pinoresinol
Biflavonoides	$(C_6-C_3-C_6)_2$	Amentoflavona
Ligninas Melaninas catecol	$(C_6-C_3)_n$ $(C_6)_n$	
Taninos condensados	$(C_6-C_3-C_6)_n$	

Fonte: Angelo e Jorge, 2007.

É importante ressaltar que a natureza tem feito química combinatória por eras, não apenas uma década ou duas e a selecção dos produtos a partir dessa biblioteca combinatória têm vantagens biológicas específicas (McChesney *et al.*, 2007). Como disse Aristóteles, "A natureza não faz nada sem propósito ou inutilmente".

Quadro 3 - Estrutura química de algumas classes de flavonoides.

Flavonoides	Estrutura Básica
Flavona	
Flavonol	
Flavanona	
Flavanol	
Antocianidina	
Isoflavona	

Fonte: Adaptado de Giada, 2013.

Segundo Stewart e Stewart (2008), chás, não seriam muito saborosos, sem os compostos fenólicos naturais e dados da literatura descrevem sobre as propriedades destes compostos como antioxidantes. Tais infusos, de uvas, *cranberries*, mirtilos e o consumo de legumes, como brócolis, cebola, espinafre e couve, executam a função de suplementar a dieta com compostos fenólicos. Os relatos destes autores sugerem que estes funcionam, pelo menos em parte, como uma opção contra as espécies reativas. Esta qualidade dos fenólicos presume-se, que seja por reações de estabilização de radicais livres (uma molécula contendo um elétron desemparelhado).

Os radicais livres podem causar danos celulares por oxidação lipídica, proteica e a ácidos nucleicos. Assim, a neutralização de radicais livres por

compostos fenólicos naturais se presume ser a base molecular para pelo menos alguns dos seus benefícios para a saúde (Stewart e Stewart, 2008).

Compostos fenólicos, tais como o éster fenético do ácido cafeico e curcumina, diminuem significativamente a taxa de formação de tumores em ratos suscetíveis a tumores intestinais. A cúrcuma (família do gengibre) é amplamente utilizada como um tempero em molhos e contém grandes quantidades de curcumina, que segundo a literatura possui atividade antitumoral, antioxidante, anti-amiloide, anti-inflamatória e impede erros na síntese de proteínas, que estão associadas com a forma de fibrose cística mais comum (Stewart e Stewart, 2008).

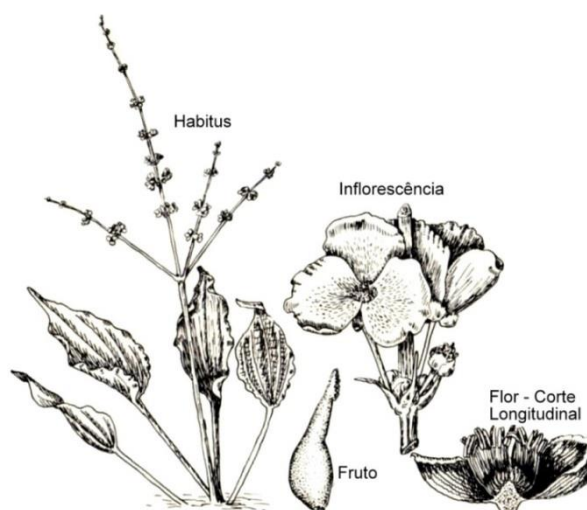
1.3 Família Alismataceae

A família Alismataceae consiste de 11 gêneros e de 75 espécies aproximadamente. O *Echinodorus* (26 espécies) e o *Sargittaria* (25 espécies) são os dois gêneros mais estudados. Outros gêneros possuem cada um, menos de dez espécies. Espécies desta família servem de abrigo ou ninhos para aves canola e peixes do pântano. Seus tubérculos, bem como outras partes vegetativas e frutos, também servem como alimentos para muitas espécies de animais selvagens (Haynes e Holm-Nielsen, 1994).

1.4 *Echinodorus macrophyllus*

O *Echinodorus macrophyllus* (Kunth) Mich. pertencente à família Alismataceae e é uma planta de hábitos aquáticos nativa do continente americano (Figuras 3-4). É também chamado de chá-mineiro, chá-de-campanha, erva-do-pântano e erva-do-brejo. Esta planta ereta pode atingir de 1 a 1,5 m de altura, com flores hermafroditas bastante numerosas. Ocorre principalmente nas margens de rios, lagos, canais de drenagem e baixadas pantanosas (Rataj, 1978). Existem mais de 40 espécies catalogadas de *Echinodorus*, porém apenas duas são utilizadas na medicina tradicional: a *E. grandiflorus* e a *E. macrophyllus*, ambas conhecidas no Brasil como “chapéu de couro”.

Figura 3 - Prancha botânica de *E. macrophyllus*.



Fonte: Adaptado de: Joly, 2002.

Figura 4 - Fotografia de *Echinodorus macrophyllus* (chapéu de couro).



Fonte: www.mizunomori.ip/zukan/suisei/a016.html, acesso: 10/02/2014.

Uma bebida refrigerante preparada a partir das folhas do chapéu de couro é muito apreciada nos estados do sudeste do Brasil. Ambas as espécies têm sido usadas como diurético, depurativo, anti-inflamatório, antiartrítico, antirreumático, antissifilítico, uricosúrico, antinefrítico, antilitíase, laxativo, além de serem empregadas também nas afecções hepáticas, como redutor do colesterol e preventivo da aterosclerose, entre outros usos (Lopes *et al.*, 2000; Soares, 2002; Carvalho *et al.*, 2008).

Já em modelos experimentais de nocicepção, como o teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético, o tempo de lambida da pata induzida por formalina e edema de pata induzido por carragenina, o extrato metanólico dos rizomas de *E. grandiflorus* apresentou uma potente atividade antinociceptiva e anti-inflamatória (Dutra *et al.*, 2006).

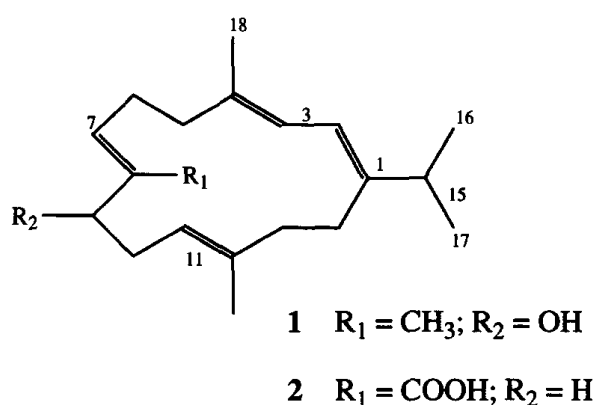
O estudo toxicológico do extrato aquoso de *E. macrophyllus*, realizado por Lopes e colaboradores (2000) mostrou ausência de atividade mutagênica (*Salmonella/microsoma*) ou efeitos citotóxicos sobre linhagens de células epiteliais renais e hepatoma. Entretanto, o tratamento de camundongos durante seis semanas promoveu uma diminuição do peso corporal, alterações plasmáticas sugestivas de toxicidade hepática subclínica e atividade genotóxica para os rins, na maior dose testada, embora não fossem observadas alterações na dose humana recomendada. Estas observações nos levaram a iniciar os estudos com extratos de *E. macrophyllus* com o objetivo de avaliar o potencial imunoinflamatório, assim como possíveis efeitos tóxicos dos preparados da planta e seus derivados. Além disso, nossos resultados mostraram um potencial anti-inflamatório agudo do extrato aquoso, quando testado no modelo de edema de patas induzido por Carragenina, iniciando-se o fracionamento do extrato aquoso de *Echinodorus macrophyllus* (EAEm) biomonitorado quanto a esta atividade, gerando uma tese de mestrado (Castro, 2006). O efeito antiedematogênico observado neste modelo sugere que a atividade anti-inflamatória pode resultar de sua atuação na ação da histamina e/ou serotonina, cininas e por último, prostaglandinas, principalmente do tipo PGE₂. O EAEm, no modelo de bolha de ar estéril (Castro, 2004) bloqueou claramente a inflamação. Foi observado um efeito na vasodilatação, com diminuição significativa do volume do exsudato inflamatório e da quantidade de proteínas dentro da cavidade. Também houve significativa redução do número de leucócitos dentro da bolha, sugerindo uma forte interferência na sinalização dos mediadores inflamatórios gerados neste modelo.

O EAEm e suas frações mostraram também um efeito anti-inflamatório neurogênico quando monitorado pelo modelo de edema de orelha induzido por xilol, o que sugere o bloqueio da liberação de neurotransmissores como Substância P (SP) e Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) (Fernandes, 2006; 2010). O desenvolvimento desta tese foi realizado a partir da maceração das folhas

em hexano e infusão em água, visando o fracionamento das frações ativas de *Echinodorus macrophyllus* biomonitorado por testes *in vivo* e *in vitro*.

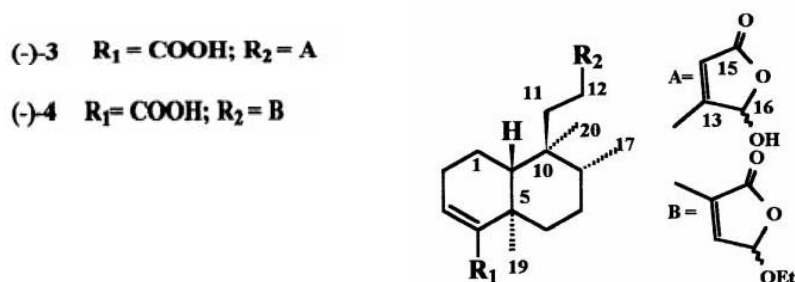
Por meio de estudo fitoquímico da *E. grandiflorus* foi isolado o equinodol por Manns e Hartman (1993), o ácido equinoico (Figura 5), por Tanaka e colaboradores (1997), e um novo derivado de clerodano (Figura 6) por Costa e colaboradores (1999). Não foram estudados os efeitos biológicos desses compostos.

Figura 5 - Estrutura química do equinodol (1) e do ácido equinoico (2)



Fonte: Tanaka *et al.*, 1997.

Figura 6 - Estrutura química de derivados Clerodano



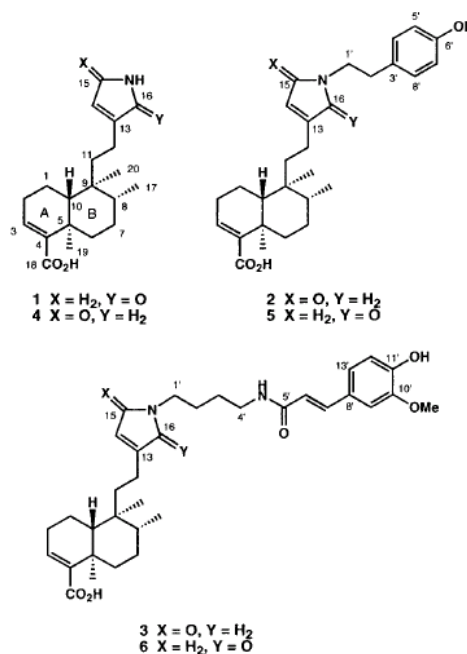
Legenda: Clerodano - (-)-3 ácido [(-)-16-hidróxiclerodano-3,13-dien-16,15-oliden-18-óico;(-)-4(4 α ,6 α ,8 α)1-carbóxi-5(S)-[2(2,5-diidro-5-hidróxi-2-oxo-4-furani)etil-5,6,8 α -trimetil-,4,4 α ,5,6,7,8,8 α -octahidro-naftaleno]

Fonte: Costa *et al.*, 1999.

A fitoquímica parcial da *E. macrophyllus* foi determinada a partir de uma extração metanólica por Kobayashi e colaboradores (2000) [A, B, e C], que isolaram seis novos diterpenoides clerodanos contendo nitrogênio, equinofilinas A-F (Figura 7), um novo diterpenoide tipo labdano-seco, chapecoderina A (Figura 8), e dois

novos diterpenoides tipo labdano rearranjados, chapecoderinas B e C (Figura 8). Shigemori e colaboradores (2002), isolaram também a partir de extrato metanólico, novos diterpenoides cembranos, equinodolídeos A e B (Figura 9) e também encontraram o ácido equinoico. Hagiwara e colaboradores (2001) realizaram a primeira síntese total de chapecoderina A. Nenhum efeito biológico desses compostos foi testado.

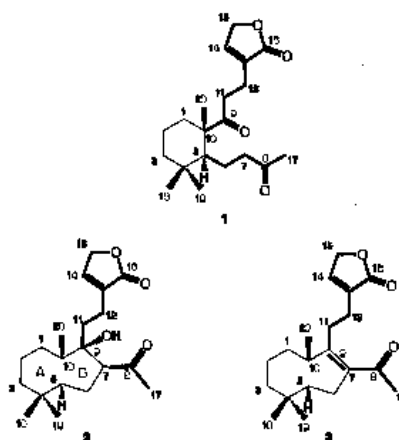
Figura 7 - Estrutura química das equinofilinas.



Legenda: Equinofilinas A(5), B(6), C(1), D(2), E(3), F(4).

Fonte: (Kobayashi *et al.*, 2000 [B]).

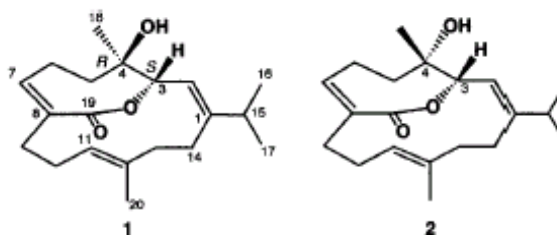
Figura 8 - Estrutura química das chapecoderinas.



Legenda: Chapecoderinas A (1), B (2) e C (3).

Fonte: (Kobayashi *et al.*, 2000 [C]).

Figura 9 - Estrutura química dos equinodolídeos.



Legenda: equinodolídeos A (1) e B (2)

Fonte: (Shigemori *et al.*, 2002).

O estudo toxicológico do extrato aquoso de *E. macrophyllus* foi realizado por Lopes e colaboradores (2000), em que foi avaliada a mutagenicidade do extrato aquoso num ensaio de atividade mutagênica (linhagens TA97a, TA98, TA100 e TA102), com ou sem ativação metabólica. Nenhuma atividade mutagênica pôde ser detectada em qualquer linhagem usando o extrato liofilizado numa concentração acima de 50 mg/placa. Além disso, nenhum efeito citotóxico foi observado quando o extrato bruto (acima de 7,5 mg/mL) foi testado em cultura de células de rim normal e hepatoma em crescimento exponencial.

A toxicidade foi também avaliada em camundongos *Swiss Webster*, machos, após seis semanas de ingestão contínua do extrato aquoso na água de beber. No final do tratamento, todos os animais revelaram um déficit de peso corporal. Análises bioquímicas do plasma revelaram algumas pequenas alterações indicando toxicidade hepática subclínica. Efeitos genotóxicos nas células do fígado, rins e sangue foram avaliados por ensaio de cometa, sendo negativo para as células do fígado e do sangue. As análises de DNA das células do rim detectaram alguma atividade genotóxica para as maiores doses testadas do extrato de *E. macrophyllus*, liofilizado e bruto. Por outro lado, a dose de 23 mg/kg, que é equivalente a dose diária recomendada para humanos, não revelou qualquer efeito genotóxico, indicando que o uso desta planta é apropriado para o organismo humano quanto aos aspectos analisados (Lopes *et al.*, 2000).

1.5 Fitoquímica

Nos últimos anos tem-se verificado um grande avanço científico envolvendo os estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais, que visam obter novos compostos com propriedades terapêuticas. Isto pode ser claramente observado pelo aumento de trabalhos publicados nesta área, tanto em congressos como em periódicos nacionais e internacionais, além do surgimento de novos periódicos específicos sobre produtos naturais ativos, como *Phytomedicine*, *Phytochemical Analysis*, *Natural Product Letter*, etc. (revisado por Cechinel e Yunes, 1998).

Com o desenvolvimento de novas técnicas espectroscópicas, novas estruturas químicas estão sendo identificadas e o potencial terapêutico de substâncias como: flavonoides, taninos, alcaloides, triterpenos, sesquiterpenos, ligninas, etc. está sendo avaliado e foram comprovadas ações farmacológicas. Muitas dessas substâncias têm grande probabilidade de virem a ser aproveitadas como agentes medicinais.

Quando se procura obter substâncias ativas de plantas, um dos principais aspectos que deve ser observado consiste nas informações da medicina popular. Outros aspectos que devem ser levados em consideração são as informações botânico-taxonômicas e químico-taxonômicas.

A preparação de extratos é feita geralmente por percolação (método de extração a frio), Soxhlet (método de extração a quente) ou extração ácido-base. A extração via percolação é o processo de extração por solventes preferencialmente utilizados por apresentar menor risco de reações químicas, na formação de artefatos, decorrentes da ação combinada entre solventes e temperaturas elevadas (utilizadas pelo sistema Soxhlet). Na extração ácido-base utilizam-se processos de partição entre solventes aquosos ácidos ou básicos e solventes orgânicos imiscíveis com água (éter, clorofórmio (CHCl_3), acetato de etila (AcOEt)). Para uma única extração (a frio ou a quente) usa-se geralmente um solvente polar (metanol (MeOH) ou etanol (EtOH)); para mais de uma extração utiliza-se três tipos de solventes: apolar (hexano ou éter de petróleo), de polaridade moderada (CHCl_3 ou diclorometano (CH_2Cl_2)) e polar (MeOH ou EtOH). No entanto, devido aos protocolos internacionais que condenaram o uso de solventes clorados, proibindo sua produção, estes solventes já não devem ser mais utilizados para a preparação de

extratos, sendo portando, mais indicado, uma única extração utilizando MeOH ou EtOH (Maciel *et al.*, 2002).

Segundo Maciel e colaboradores (2002), dentre as várias metodologias descritas para a preparação de extratos vegetais, visando o isolamento de seus constituintes químicos, um dos métodos que consideramos ser o mais adequado para análise químico-farmacológica é a preparação de um extrato hidroalcoólico (etanol/água 50/50, v/v). Este extrato é análogo às tinturas realizadas na cultura popular onde se misturam as partes ativas das plantas com bebidas alcoólicas. Caso o extrato apresente efeitos biológicos de interesse, deve-se proceder a um método sistemático de estudo. Neste caso o solvente mais adequado para obtenção do extrato bruto é o metanol, pois possibilita a extração de um maior número de compostos. Posteriormente, este extrato deve ser submetido a um processo de partição líquido-líquido, com solventes de polaridade crescentes.

Uma ferramenta importante para a identificação rápida e eficiente de misturas consiste no uso de cromatografia gasosa ou cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas, onde grande parte dos componentes de uma mistura pode ser identificada e quantificada. O uso em conjunto de técnicas espectrais, como ultravioleta (UV), infravermelho (IV), ressonância nuclear magnética (NMR) ^1H e ^{13}C aliado ao uso de técnicas sofisticadas de NMR (NOE, COSY, HETCOR, INADEQUATE, etc.) tem permitido propor com segurança a estrutura molecular de substâncias naturais. Além disso, o uso de difração de raios-X, quando possível, possibilita avaliar a estereoquímica real destas substâncias (revisado por Cechinel e Yunes, 1998).

Outras técnicas cromatográficas como as cromatografias em papel e em camada delgada (TLC) são bastante utilizadas na identificação, purificação e isolamento de compostos como, por exemplo: antocianinas, flavonóis e ácidos fenólicos (Angelo e Jorge, 2007).

1.6 O papel dos produtos naturais no desenvolvimento de novos medicamentos

Com o desenvolvimento de novas técnicas de bioensaio, métodos de biotecnologia, estudos fitoquímicos biomonitorados, seleção de transferência automática e métodos de alto desempenho analítico, foram introduzindo novos

conceitos e possibilidades do desenho racional de medicamentos e da descoberta de drogas (Viegas *et al.*, 2006).

Avanços tecnológicos em metabolômica, transcriptômica e genômica facilitaram a detecção de genes que contribuem para a diversificação do metabolismo secundário das plantas. Ferramentas estatísticas de genética molecular de populações podem ajudar a avaliar se os genes ou regiões genômicas correspondem à uma assinatura de seleção ou responder à questões tais como, se novos compostos são de origem adaptativa (Kroymann, 2011).

Das 877 Novas Entidades Químicas - pequenas moléculas - (NEQ) introduzidas entre 1981 e 2002, cerca de metade (49%) eram oriundas de produtos naturais, análogos semissintéticos de produtos naturais ou compostos sintéticos com farmacóforo a base de produtos naturais (Koehn *et al.*, 2005).

De acordo com Ganesan (2008), de 1981 a junho de 2006 foram registrados um total de 1184 novas entidades químicas (NEQs) aprovadas. Destas, 52% tinham alguma ligação com produtos naturais, sendo 18% biológicas e 30% puramente sintética. Em um período de 25 anos (1981-2006) de pesquisas e investimentos no campo dos PNs, 24 compostos obtiveram sucesso no mercado farmacêutico de fitoterápicos.

Visto que um pequeno número de novos compostos com alguma relação com produtos naturais vencia as etapas pré-clínicas e clínicas, chegando ao mercado como medicamentos, a indústria farmacêutica investiu em aprimorados métodos de pesquisa para elaboração de novas entidades químicas bioativas (bioNEQs), com efetiva potência terapêutica (Yunes e Cechinel, 2001).

Koehn e Carter em 2005 descrevem em seu trabalho, que na década de 90 houve um declínio nos investimentos no campo de pesquisa com PNs. Isto se deve a alguns fatos como:

- 1) a introdução dos bioensaios em larga escala (*high-throughput screening*, HTS) contra alvos moleculares definidos;
- 2) ao desenvolvimento da Química Combinatória que oferecia uma ampla biblioteca química;
- 3) aos avanços na biologia molecular, celular e genômica, o que aumentou o número de alvos moleculares e diminuiu o tempo na descoberta de uma droga;

4) o declínio na prioridade das empresas farmacêuticas na área das doenças infecciosas, que é uma área voltada tradicionalmente para os PNs;

5) as incertezas deixadas pela convenção ECO 92 em relação à captação de material biológico.

Em 2003, Feher e Schmidt examinaram meticulosamente os compostos produzidos por meio de química combinatória, sinteticamente e bibliotecas de PNs em relação aos parâmetros para uma droga ter sucesso farmacológico. Este estudo revelou diferenças consideráveis entre a arquitetura química dos PNs e dos compostos produzidos por química combinatória. As conclusões finais do estudo comparativo mostraram que os PNs apresentaram as seguintes características: poucas rotações no esqueleto químico, com poucas insaturações e anéis aromáticos; muitos estereocentros; composição molecular com poucos átomos de nitrogênio e enxofre e mais de oxigênio; capacidade de ligações com hidrogênios, atuando com mais aceptores e substancialmente mais doadores; baixo peso molecular; e ação lipofílica (Hübel *et al.*, 2008). Tais características facilitam a assimilação das substâncias com origem nos PNs em comparação com as substâncias sintéticas (Harvey, 2008).

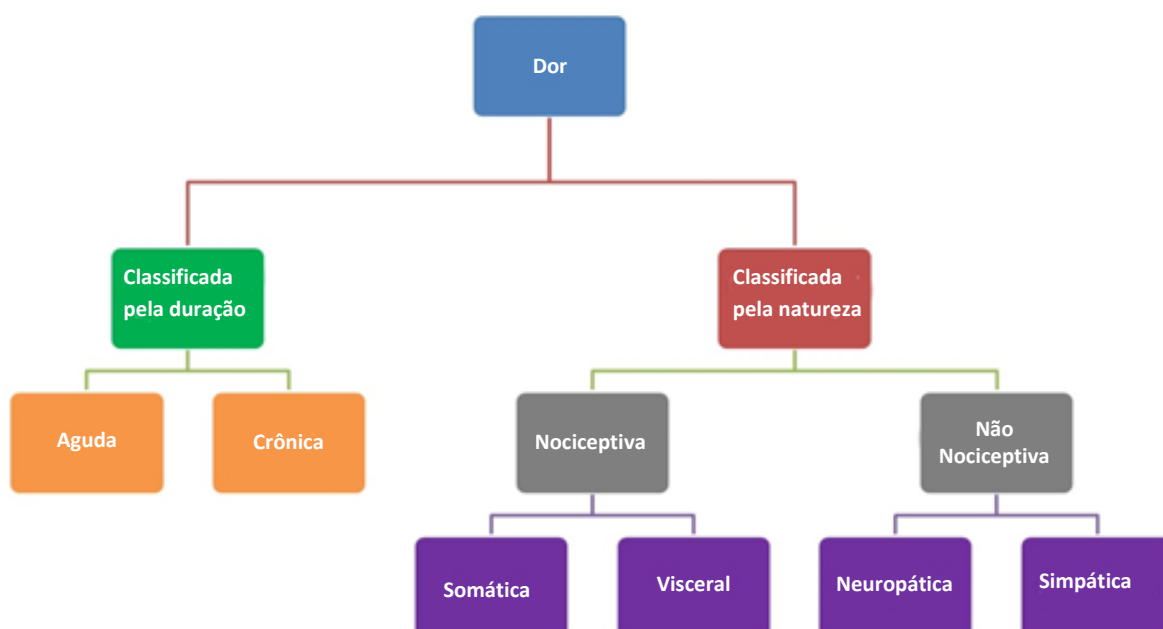
Em geral os PNs cobrem os variados parâmetros de propriedades para o sucesso de uma droga. Já em relação aos compostos das bibliotecas produzidos por métodos combinatórios, ora atendem a algumas das características, mas sempre esbarram principalmente no alto peso molecular, ação lipofílica e presença de nitrogênio e enxofre em sua composição (Hübel *et al.*, 2008).

1.7 Nociceção (Dor)

A dor é uma experiência consciente, uma interpretação da entrada nociceptiva influenciada pelas memórias, emocionais, fatores patológicos, genéticos e cognitivos. A dor resultante não está necessariamente relacionada linearmente com a unidade de percepção nociceptiva e nem tem exclusivamente a função vital de proteção. A dor é, portanto, uma experiência altamente subjetiva, como ilustrado pela definição dada pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (Merksey e Bogduk, 1994): "Uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a dano tecidual real ou potencial, ou descrito em termos de tal dano".

De acordo com o tempo de duração e natureza da dor, elas podem ser classificadas como apresentado na Figura 10.

Figura 10 – Classificação da dor



Fonte: <http://www.fastbleep.com/medical-notes/other/15/31/511>, acesso: 10/02/2014.

1.7.1 Descrição dos tipos de dor

A dor aguda consiste num estímulo nocivo breve que leva à ativação do sistema nociceptivo, porém seu funcionamento permanece sem maiores modificações e dentro dos limites fisiológicos. Para o estudo da dor aguda existem

diversos modelos experimentais *in vivo*, como o teste de formalina e contorções em camundongos (Le Bars *et al.*, 2001).

A dor crônica persiste por mais de três meses e consiste num processo patológico, que afeta fisiologicamente o indivíduo. Este é um dos maiores problemas de saúde, detectado pelos médicos no mundo desenvolvido. Ela afeta cerca de 20% da população adulta, especialmente mulheres e idosos. Para o estudo da dor crônica há, por exemplo, o modelo de artrite em ratos, que afeta o sistema nervoso central ou periférico (Le Bars *et al.*, 2001; Breivik *et al.*, 2006).

A dor inflamatória está associada com os danos de tecido e infiltração das células do sistema imunológico e à dor patológica (Reilly e Shy, 2009).

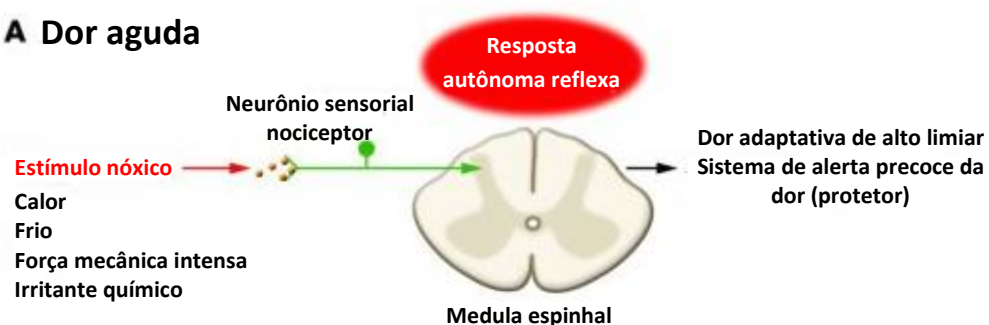
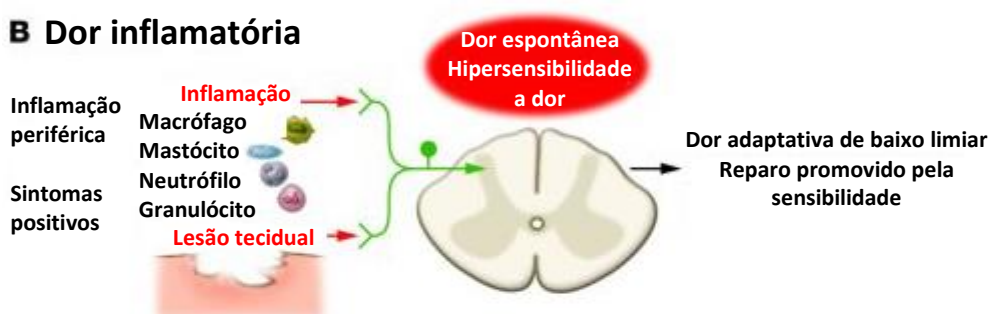
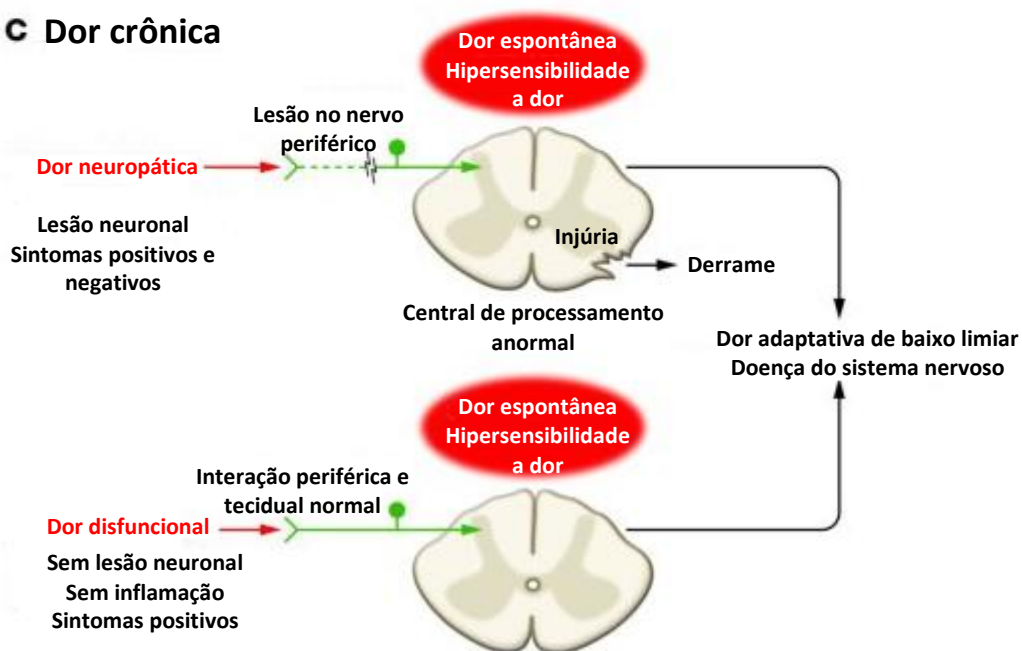
A dor neuropática, é um tipo de dor crônica e intensa, que caracteriza-se por afetar a via sensorial sem que haja uma lesão tecidual periférica ou pela sua função anormal (dor disfuncional, como na fibromialgia, síndrome do intestino irritável, cefaléia do tipo tensional (Netto, 2009).

Uma visão esquemática dos tipos de dor está representada na Figura 11.

Entre os brasileiros a dor crônica acomete 30 a 40% da população e constitui a principal causa de absenteísmo, licenças médicas, aposentadorias por doença, indenizações trabalhistas e baixa produtividade no trabalho (Ministério da Saúde (BR), Ato Portaria Nº 19/GM, 2002). Enquanto a gestão e tratamento da dor aguda é razoavelmente boa, as necessidades dos que sofrem de dor crônica são em grande parte insatisfatórias, criando uma enorme carga emocional e financeira para portadores, cuidadores e sociedade. Por ano, estima-se que o custo da dor crônica para a Europa é EU 200 bilhões e para os EUA mais de US\$ 150 bilhões. Melhorias na nossa capacidade de diagnosticar a dor crônica e desenvolver novos tratamentos são necessárias, mas para isso precisamos de leituras mais concretas e menos subjetivas da experiência da dor (Tracey e Mantyh, 2007).

A modulação do estímulo doloroso se dá por ativação dos neurônios aferentes nociceptivos primários, representados pelas fibras A- δ e C.

Figura 11 - Esquema comparativo entre os tipos de Dor

A Dor aguda**B Dor inflamatória****C Dor crônica**

Fonte: Adaptado de: Woolf, 2010.

Estas são fibras sensoriais de elevado limiar, projetadas da periferia para o corno dorsal da medula onde ativam grande número de neurônios internunciais de segunda ordem e neurônios de projeção da medula, alguns dos quais são ativados exclusivamente por estímulos nócicos (nociceptivos específicos) e outros por estímulos de baixa intensidade (neurônios de larga faixa dinâmica ou multirreceptivos).

As fibras C não mielinizadas terminam nas lâminas I, II e V do corno dorsal, enquanto as fibras mielinizadas A- δ terminam nas lâminas I e II e também penetram mais profundamente nas lâminas V e X (Bonica *et al.*, 1990). Além do nociceptor periférico e do corno dorsal, a informação nociceptiva ascende ao tálamo, trato espinotalâmico contralateral (STT) seguindo para a medula e o tronco cerebral através de um trato espinoreticular (espinoparabraquial) e espinomesencefálico (Figura 12). Estes setores têm diferentes finalidades relacionadas com a origem das suas duas lâminas no corno dorsal e com o destino central final (Dostrovsky e Craig, 2006).

1.8 Algesia, analgesia e analgésicos

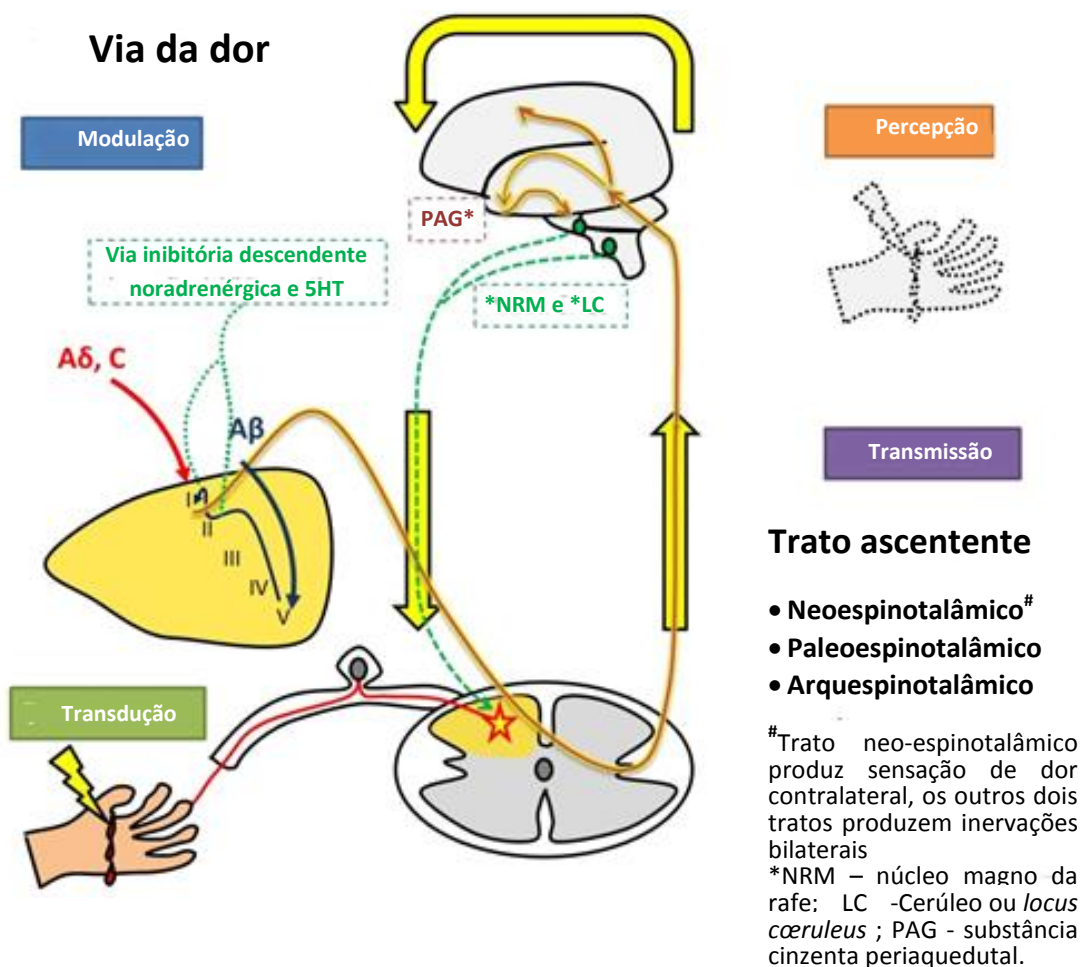
Independentemente de sua natureza ou causa, a dor não tratada adequadamente apresenta efeitos lesivos, além do sofrimento que causa ao doente. A analgesia efetiva da dor pode resultar em uma recuperação mais rápida e resultados melhores no tratamento (Minnerman *et al.*, 2006).

A algesia significa sensibilidade à dor, que é uma sensação desagradável e mal definida provocada por estímulo interno ou externo. Analgesia é um estado onde a dor não é sentida, apesar de o estímulo doloroso permanecer presente (Saça *et al.*, 2010).

Os fármacos que aliviam a dor como sintoma são nomeados analgésicos, mas não afetam sua causa, estes dividem-se em dois grupos:

- Analgésicos opioides – narcóticos semelhantes à morfina, fentanil e tramadol.
- Analgésicos não opioides – não narcóticos semelhantes à aspirina, dipirona sódica, antipiréticos e anti-inflamatórios (Minnerman *et al.*, 2006; Tripathi, 2006).

Figura 12- Sistema modulatório descendente da dor.



Fonte: http://www.fastbleep.com/assets/notes/image/15694_1.jpg, acesso 10/2/2014.

Os opioides incluem elementos que aliviam dores moderadas a severas, visceral ou somática, devido a ações mediadas por receptores da superfície celular e são definidos como compostos isolados a partir do ópio (morfina e codeína) que atuam nos receptores opioides. Muitos opioides são administrados por via parenteral, embora eles sejam absorvidos pelo trato gastrointestinal (TGI). Porém alguns opioides, como a morfina e o antagonista naloxona, sofrem extenso metabolismo de primeira passagem hepática, reduzindo sua eficácia terapêutica na administração oral. Os opioides são metabolizados especialmente no fígado, onde geralmente se transformam em compostos polares mais ativos ou inativos. O perfil

farmacocinético dos opioides é o principal determinante de seu uso terapêutico (Tracey e Mantyh, 2007).

De acordo com a ação no receptor, os opioides classificam-se em:

- Agonista – morfina, meperidina, alfaprodina, fentanil, alfentanil, sufentanil, fenoperidina, codeína, hidromorfona, oximorfona, metadona e heroína.
- Antagonista – naloxona e naltrexona.
- Agonista parcial – buprenorfina.
- Agonista/Antagonista (agonista k/antagonista m) – nalbufina, nalorfina, levalorfan, pentazocina, butorfanol e dezocina (Minnerman *et al.*, 2006; Tripathi, 2006).

O problema clínico mais sério no uso de opioide é a depressão respiratória, que chega a ser a principal causa de morte por intoxicação. A depressão respiratória leve, causada por doses terapêuticas é normal e de pouca consequência clínica (Tripathi, 2006).

Os analgésicos não opioides incluem os fármacos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) representados pela aspirina e acetaminofeno. Esses compostos aliviam dores leves a moderadas e possuem características antipiréticas e anti-inflamatórias (menos o acetaminofeno). São usados para tratar dores de estruturas não tegumentares como cefaleia, mialgia e outras dores pós-operatórias, como antitérmico e promovem alívio da dor associada à inflamação.

Entre os efeitos adversos no uso do AINEs o mais comum são alterações no TGI, sendo clinicamente significativos se tomado cronicamente, podendo resultar em ulcera péptica em 15% a 25% dos pacientes (Gozzani, 1994).

Como mostrado na Figura 13, os fármacos analgésicos clássicos atuam em diversos sítios da via descendente da dor.

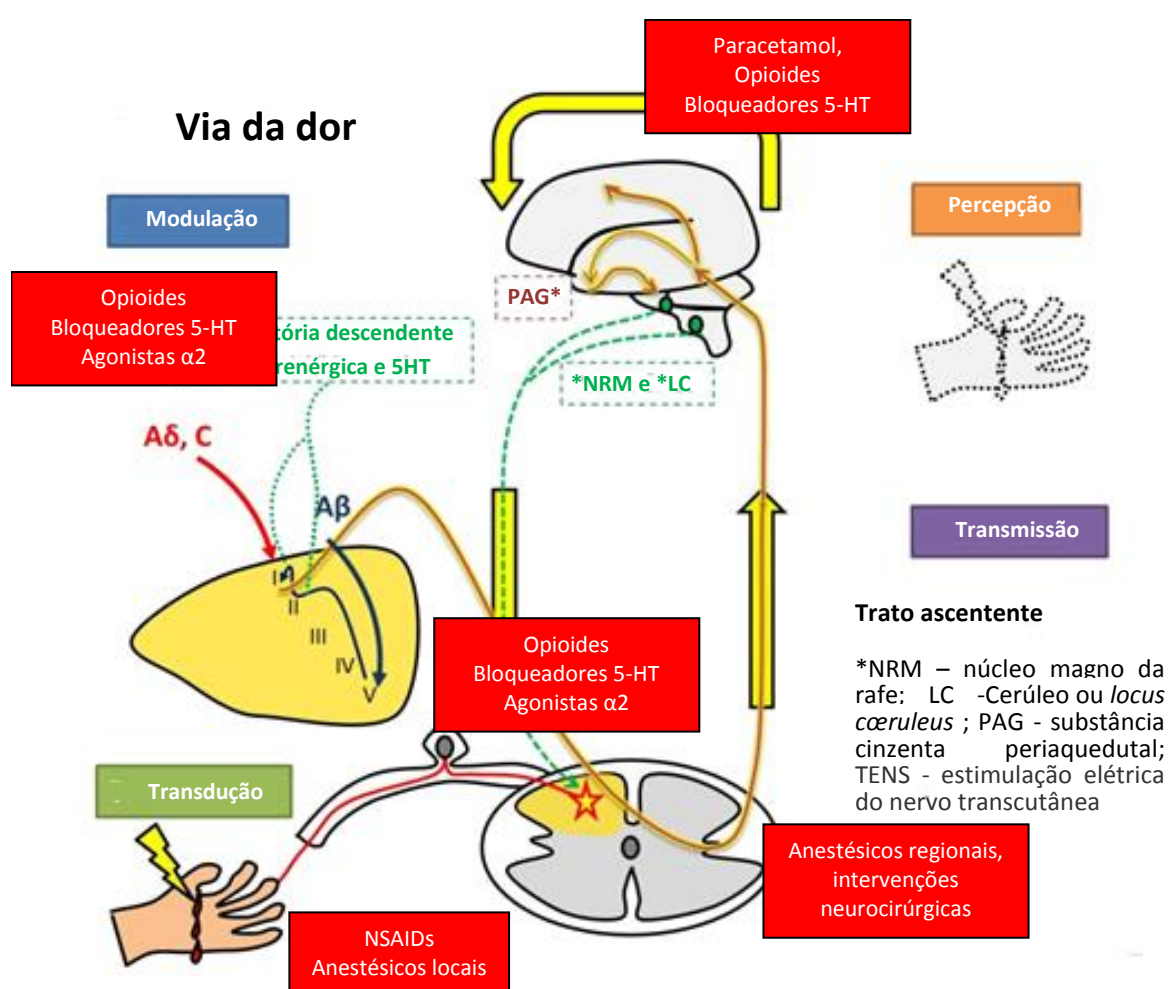
1.9 Resposta Antinociceptiva

Na fisiologia da nocicepção está envolvida uma complexa interação de estruturas do sistema nervoso central, extensões da pele, vísceras e tecidos musculares e ósseos para o córtex cerebral. A fisiologia da dor crônica mostra alterações no caminho normal fisiológico, causando hiperalgesia e alodinia. Após a integração com a medula espinhal, a informação nociceptiva é transmitida a

estruturas talâmicas que alcançam o córtex somatossensorial (Riedel e Neeck, 2001).

Neste estudo intencionou-se avaliar algumas vias de ação antinociceptiva utilizando modelos experimentais para melhor compreensão do mecanismo de redução da dor da(s) fração(ões) mais ativa(s) de *E. macrophyllus*.

Figura 13. Pontos de bloqueio dos fármacos analgésicos



Fonte: http://www.fastbleep.com/assets/notes/image/15694_1.jpg, acesso 10/2/2014.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

O projeto visa a análise e o fracionamento de extratos obtidos de folhas de *Echinodorus macrophyllus* biomonitorado por modelos de nocicepção *in vivo* e ensaio de viabilidade celular.

2.2 Específicos

- Realizar o fracionamento de extrato(s) de *Echinodorus macrophyllus* por método cromatográfico;
- Biomonitorar o fracionamento quanto ao potencial antinociceptivo (modelos *in vivo*);
- Identificar a(s) molécula(s) com atividade(s) farmacológica(s) por métodos cromatográficos com uso de padrões;
- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* sobre células de origem neural (NEURO-2A);
- Estudar os mecanismos de ação das frações ativas utilizando modelos *in vivo*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Material vegetal

O *Echinodorus macrophyllus* foi adquirido no distribuidor de Plantas Medicinais (Alcântara – Rio de Janeiro), tendo sido coletado em Nova Friburgo (07/1999), Rio de Janeiro, seguido de posterior secagem e trituração. O material foi então, ensacado, lacrado e mantido em freezer a – 5°C. A planta foi identificada no Herbário Bradeanum da UERJ (Rio de Janeiro – Brasil), onde uma exsicata foi depositada sob o número HB84807.

3.1.2 Animais

Os animais utilizados neste estudo são camundongos machos de 3-4 meses, pesando 25-35 g da linhagem *Swiss Webster* (SW) criados no Biotério do Departamento de Bioquímica da Universidade do Estado do Rio de Janeiro e mantidos em caixas plásticas apropriadas, em temperatura controlada (24°C), com ciclo de luminosidade de 12 h sendo alimentados com água e ração *ad libitum* ou doados pelo Instituto Vital Brazil. A higiene e desinfecção das caixas foram realizadas em dias alternados, com hipoclorito de sódio, sendo utilizada maravalha estéril.

Os experimentos foram realizados seguindo os padrões éticos para o uso de animais de experimentação e aprovado pelo Comitê de Ética do IBRAG - UERJ (CEUA-IBRAG) segundo Protocolo 05/2009 e 007/2013.

3.1.3 Material descartável, reagentes, soluções, vidrarias especiais e material cromatográfico

- Acetato de etila, diclorometano, etanol anidro, metanol absoluto e n-hexano 95% grau HPLC, Tedia Brazil Ltda., Brasil;
- Ácido acético glacial, formaldeído 37%, Merck S.A., Brasil;
- Câmara de Neubauer, BOECO, Alemanha;
- Coluna para HPLC C18 100, com 4,6 mm x 150 mm e granulometria de 5 µm, Kromasil, Suécia;

- Coluna DB-1 (30 m x 0,25 mm), Varian;
- Cloridrato de Naloxona 0,4 mg/mL (Laboratório hipolabor), Brasil, Dimorfi, Sulfato de morfina 10 mg/mL (Laboratório Cristalia), Brasil, doados pelo Hospital Universitário Pedro Ernesto;
- Dipirona 86,64%, Laboratório Químico Farmacêutico da Aeronáutica;
- Estreptomocina, brometo de 3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), penicilina G, NP (ácido difenilbórico aminoetiléster – “*natural product*”), PEG (polietileno glicol 400), vanilina, da Sigma Chemical Company, EUA;
- Falcon, Corning, EUA;
- Garrafas plásticas para cultura de células, Corning, EUA;
- Isoorientina, orientina, Isovitexina, vitexina e rutina, Merck S.A., Brasil;
- Lâminas (26 x 76 mm) e lâminulas (13 mm), Perfecta, Brasil;
- Meio de cultura DMEM, Gibco, EUA;
- Papel de Filtro Quantity, JP40-Faixa Branca, J Prolab, Brasil;
- Placas de cromatografia em camada delgada de alto desempenho (TLC e HPTLC) de Nano Sílica gel 60, da MACHEREY-NAGEL, Alemanha;
- Placas de cultura de fundo chato com tampa de 96 poços estéreis, Falcon, Beckton Dickinson Labware, EUA;
- Sephadex LH20, GE Healthcare, Suécia;
- Seringas de plástico de 0,5 mL e agulhas hipodérmicas estéreis (0,3 x 8 mm) (BD Ultra-Fine II Becton Dickinson);
- Sonda orogástrica de aço inoxidável, para camundongos IC800, Insight, Brasil;
- Soro fetal bovino inativado e estéril, Cultilab, Brasil;
- Tubos tipo eppendorf, Axygen, EUA;
- Tween 20 (monolaurato de polioxietileno 20 sorbitano), 1H-[1,2,4]oxadiazolo-[4,3-a]quinoxali-1-ona (ODQ), 7-nitroindazol (7-NI), Ioimbina, Clonidina, da Sigma Chemical Company, EUA.

Os demais reagentes foram usados em grau analítico.

3.1.4 Equipamentos e software

- Agitador magnético, modelo 257, FANEM, Brasil;

- Balança Analítica, modelos AB204-5 e B200, Micronal, Brasil;
- Balanças Analíticas modelos AB204-5 e B200, Micronal, Brasil;
- Banho Maria, modelo 100, FANEM Ltda., SP, Brasil;
- Banho-maria, modelo 796, De Leo e Cia Ltda., Brasil;
- Câmaras de fluxo laminar, modelo FLV, série 301, Trox do Brasil, Ltda. E modelo VLFS, série FL4761, Veco, Brasil;
- Câmara de U.V. (365 nm e 254 nm) Boitton - Pró Análise, modelo BOIT-GAB01, Brasil;
- Capela de exaustão, modelo 134263, Ecológica, Brasil;
- Centrífuga Eppendorf, modelo 5702 com rotor A-4-38, EUA;
- Cromatógrafo a gás, modelo Shimadzu 17A acoplado ao espectrômetro de massas, modelo Shimadzu QP 2010plus com detector de energia de ionização de 70 eV, Shimadzu, Japão;
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC-DAD), com sistema controlador DAD-3000 acoplado a detector de fotodiodo (UV-VIS-DAD), Modelo UltiMate 3000, Thermo Scientific Dionex, EUA;
- Espectrofotômetro de Microplacas μ Quant, Bio-Tek Instruments Inc., EUA;
- Estufa com incubadora de CO₂, Sanyo, EUA;
- Estufa tipo 294, de Leo & Cia. Ltda., Brasil;
- Evaporador rotativo, modelo 802, Fisatom, Brasil;
- Liofilizador Heto Drywinner, Heto Lab Equipament, modelo FD6/55, Heto-Holten A/S, Dinamarca;
- Máquina fotográfica digital Sony DSC-H50, Sony, Brasil.
- Microscópio de campo claro, modelo CBA, Olympus, Japão;
- Microscópio invertido com contraste de fase, modelo CK2, Olympus, Japão;
- Potenciômetro Analyser, série 1106/93, Brasil;
- Software KC4 versão 3.0 com Power Reports, Bio-Tek Instruments Inc., EUA.
- Software Chromeleon®, Thermo Scientific Dionex , EUA;
- Ultrapurificador de água, modelo Mili-Q plus, Milipore Corporation, EUA;
- Ultrassom, modelo T7, Thornton Inpec Eletrônica Ltda., Brasil.

3.2 Métodos

3.2.1 Obtenção dos extratos

O extrato aquoso de *Echinodorus macropyllus* (EAEm) foi obtido a partir da infusão de folhas secas trituradas (2kg) na proporção de 50 mg peso seco/mL. A infusão das folhas ocorreu a 100°C com 2 L de água destilada em erlenmeyer, protegido da luz. Depois que a infusão atingiu a temperatura ambiente, foi filtrada, através de funil de Büchner com papel de filtro (JP40, J Prolab) e liofilizada. O procedimento foi repetido 5 vezes e após comparação dos cromatogramas por HPLC, as amostras com perfis semelhantes foram reunidas.

A partir de uma nova maceração de 100 g das folhas de *E. macropyllus*, secas e trituradas com tesoura de corte, foi obtido o extrato hexânico de *E. macropyllus* (EHEm). A maceração realizou-se por meio de três trocas sucessivas de n-hexano 95%, (2 L) e o solvente foi evaporado em evaporador rotativo.

$$\% \text{ de rendimento} = (\text{peso do material obtido} / \text{peso do material inicial}) \times 100$$

3.2.2 Fracionamento do EAEm

O fracionamento do EAEm foi realizado aplicando-se 9 g do extrato bruto liofilizado a uma coluna de vidro aberta (3,5 x 55 cm) contendo o gel Sephadex LH-20, equilibrada em etanol/água 20%. O material foi eluído da coluna utilizando-se sequencialmente (*step wise*) a fase móvel etanol/água (v/v) nas concentrações de 20% e 40% (1 L/eluente). As frações (Fr20 e Fr40) obtidas foram analisadas por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de fotodiodo (HPLC-DAD). O procedimento foi repetido 10 vezes e após comparação dos cromatogramas, as amostras com perfis semelhantes foram reunidas.

As frações foram evaporadas no evaporador rotativo, liofilizadas e armazenadas a -15°C e posteriormente, quando necessário, reconstituídas em água ultra pura, na concentração adequada para os experimentos.

3.2.3 Cromatografia em camada delgada

Os extratos, frações e os padrões orientina, isorientina, vitexina, isovitexina e rutina e ácido pirogálico, foram diluídos em água destilada (1 mg/mL) e aplicados com auxílio de amostradores, a uma distância de 1 cm da margem inferior marcada a lápis. Foram realizadas uma ou duas aplicações no mesmo ponto para fins de concentração da amostra e a placa foi seca à temperatura ambiente. Foram utilizadas placas de HPTLC de 3 x 7 cm ou de TLC 20 x 10 cm.

A cromatografia foi desenvolvida em cuba de vidro com tampa, à temperatura ambiente, utilizando como fase móvel as seguintes misturas de solventes: acetato de etila:diclorometano:ac. acético:água (10:2,5:2:1 v/v).

Para verificar a presença de flavonoides, ao final da corrida, as placas foram secas e reveladas com o reagente NP:PEG. As placas foram imediatamente reveladas com NP 0,5 g% em acetato de etila e após secarem a frio, aspergidas com PEG 5 g% em diclorometano e aquecidas por 3 min a 105°C. A fluorescência foi observada em câmara de UV (365 nm) e posteriormente, estas foram fotografadas e seus Rf calculados.

3.2.4 Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de fotodiodo (HPLC-DAD)

Os extratos e frações foram analisados por HPLC-DAD e os dados foram processados utilizando o Software Chromeleon®, com o objetivo de avaliar e comparar os perfis cromatográficos. O volume de injeção foi de 10 µL de EAEm, Fr20 e Fr40 diluídas a 1 mg/mL em água ultra pura e a resolução da linha de base foi obtida em temperatura ambiente (24 ± 2°C), utilizando-se uma coluna de fase reversa C18 Kromasil 100 Å de 4,6 x 250 mm como fase estacionária.

A eluição, foi monitorada no comprimento de onda de 200-450 nm, sendo utilizada como fase móvel, os solventes A (acetonitrila) e B (ácido acético, ajustado ao pH 3.0) da seguinte forma: 0-30 min, variação linear de A:B (5:95 v/v) para A:B (20:80 v/v); 30-40 min, isocrática A:B (20:80 v/v).

Os cromatogramas foram registados a 340 nm. Os picos foram caracterizados por meio da comparação do tempo de retenção (TR) e espectros de UV com os padrões de referência, e por co-injecção das amostras e padrões, a partir do protocolo adaptado de Costa e colaboradores (2010).

3.2.5 Análise por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS)

A análise qualitativa do extrato hexânico de *E. macrophyllus* (EHEm) foi efetuada em equipamento Shimadzu 17A - Shimadzu QP 2010 Plus, usando coluna capilar de gel de sílica fundida Rtx-5MS, da marca Restek (30 m x 0,32 mm x 0,25 µm). A programação de temperatura usada foi: injetor 260°C, detector 290°C e coluna aquecida de 100°C até 300°C (3°C/min). O EHEm foi solubilizado em diclorometano, sendo injetado 1 µg/µL. Hidrogênio e ar sintético foram usados como gases de arraste, com fluxo de 1,0 mL/min.

A identificação do EHEm foi realizada pela comparação dos seus índices de retenção e espectros de massas (MS) com dados da literatura publicados e com a biblioteca WILEY 275 e NIST 3.0, fornecidas pelo sistema GC-MS (Shimadzu 17A - Shimadzu QP 2010Plus). Os resultados também foram confirmados comparando a ordem de eluição dos compostos com seus índices de retenção relativo relatados na literatura (Alberts *et al.*, 1992; Priestap *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2013). Os índices de retenção foram calculados para todos os componentes voláteis utilizando os dados de retenção de n-alcenos lineares com C₉-C₃₀, conforme descrito por Holler e colaboradores (2009).

3.2.6 Cultura da linhagem celular Neuro-2A

As células NEURO-2A (neuroblastoma murino adquirido do Banco de células do Rio de Janeiro) foram cultivadas em meio essencial mínimo de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) acrescido de 10% de soro fetal bovino (SFB), L-glutamina 2 mM e antibióticos em estufa a 37°C com 5% CO₂, com passagens regulares de duas a três vezes por semana, utilizando-se do processo de tripsinização (0,25% de tripsina + EDTA 0,53 mM (ácido etilenodiamino tetra-acético) para soltar as células aderidas na garrafa.

3.2.7 Ensaio de citotoxicidade – Teste de redução do MTT

Esta técnica se baseia na redução do brometo de 3-(4,5-dimetiliazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT). Este é um método colorimétrico rápido, frequentemente usado para medir proliferação celular e citotoxicidade (Mosman, 1983). Neste ensaio, o MTT é acumulado pelas células por endocitose e a redução do anel tetrazólico deste sal, resulta na formação de cristais de formazan de cor azul que se acumulam em compartimentos endossomais e/ou lisossomais, sendo depois transportados para fora das células por exocitose. Como a endocitose é um mecanismo fundamental das células vivas (Liu *et al.*, 1997), o ensaio do MTT tem sido usado frequentemente para a determinação da viabilidade celular por meio da atividade redutora mitocondrial (ARM) de tais células.

As células da linhagem Neuro-2A (1×10^5 /mL) foram cultivadas *overnight* em meio DMEM suplementado com 10% SFB, em placas de 96 poços de fundo chato, a 37°C, com 5% de CO₂, para permitir a adesão das células ao substrato.

Posteriormente, adicionou-se diferentes concentrações do EAEm, EHEm, Fr20 e Fr40 (1, 5, 10, 20, 30, 50, 70 e 100 µg/mL), exceto no controle, que recebeu somente meio de cultura com SFB. As culturas foram incubadas em um volume final de 100 µL, por 24 h. Duas horas antes do final da incubação, foram adicionados 10 µL/poço de solução de MTT 5 mg/mL em salina tamponada com fosfato pH 7,4 (NaCl 140 mM, KCl 2,7 mM, Na₂HPO₄ 8 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM, pH 7,4), sendo a placa novamente incubada nas mesmas condições descritas anteriormente, por mais 2 h. Com o objetivo de solubilizar os cristais de formazan resultantes da redução do sal de tetrazólio pelas células viáveis, adicionou-se 100 µL de dodecil sulfato de sódio (SDS) 10% com HCl 0,01 N (v/v) e incubou-se novamente, as placas na estufa, a 37°C, *overnight*, para dissolução completa dos cristais de formazan. Após este período, realizou-se a leitura das absorvâncias em espectrofotômetro de microplacas a 570 nm.

Foram realizados ensaios controle cultivando-se células com dimetilsulfóxido (DMSO), não tendo este mostrado efeito citotóxico. A maior concentração de DMSO utilizada nos ensaios foi 0,5%. Também foram realizados ensaios controles constituídos de meio de cultura e diferentes concentrações de EAEm, EHEm, Fr20 e Fr40, que resultaram em absorvância igual ao meio sozinho, indicando que EAEm, EHEm, Fr20 e Fr40 não induzem absorvância de luz em 570 nm, ou seja, na ausência das células, não são capazes de reduzir o MTT. Passou-se então a utilizar como branco somente meio DMEM suplementado com 10% SFB. A média da

absorvância do branco foi descontada dos valores de absorvância das amostras. Os ensaios foram feitos em triplicata. A absorvância obtida com as células que não foram submetidas ao tratamento com EAEm, EHEm, Fr20 e Fr40 (cultura controle) foi considerada como 100% de viabilidade. Os resultados encontram-se expressos na forma de percentual de viabilidade, em relação ao controle.

$$\text{ARM (\% controle)} = \frac{\text{Absorvância das amostras}}{\text{Média da absorvância do controle}} \times (100)$$

3.2.8 Modelo de contorção induzida por injeção intraperitoneal (i.p.) de ácido acético

Com objetivo de avaliar o efeito antinociceptivo dos extratos e frações, foi realizado o modelo de contorção abdominal. Os animais foram previamente tratados com EAEm, EHEm, Fr20 e Fr40 (v.o.) 1 h antes da injeção intraperitoneal (i.p.) de ácido acético 0,6% v/v (HAc; 10 µL/g peso corporal (p.c.)) de acordo com Koster e colaboradores (1959). As contorções foram observadas após 5 min da injeção do ácido, por um período de 10 min (Loro *et al.*, 1999). Cada contorção foi definida como uma sequência que se inicia com o arqueamento do lombo, contração do abdômen, contorção do tronco e/ou pélvis, terminando geralmente com a extensão dos membros.

3.2.9 Modelo de hiperalgesia induzida por injeção de formalina (injeção intraplantar de agente irritante)

Os animais foram tratados com os extratos e as frações e após 30 min foram injetados 20 µL (sub-plantar) de formalina 2,5% (0,5% de formaldeído) em solução salina tamponada (PBS, pH 7,4) na pata traseira direita. Logo após a injeção de formalina, o tempo (em segundos) de lambidas e mordidas na pata traseira direita injetada, considerado como resposta nociceptiva, foi contado num período de 0 – 5 min, que corresponde à fase 1 (neurogênica) do modelo e no período de 15 – 25 min após a injeção do irritante, que corresponde à fase 2 (inflamatória) (Shibata *et al.*, 1989).

3.2.10 Modelo de imersão da cauda em banho a 50°C

O teste de imersão foi realizado foi adaptado de acordo com descrito por Sewell e Spencer (1976) e Gabra e Sirois (2003). O camundongo foi imobilizado gentilmente e 1/3 de sua cauda foi imersa em um banho com água a $55 \pm 1^\circ\text{C}$. O período de tempo (s) entre a imersão da cauda e a sua retirada da água (latência) foi determinado, com um *cut-off* máximo de 10 s, para evitar danos teciduais no animal. Cada animal utilizado foi o seu próprio controle, sendo as latências, antes do tratamento com EAEm, EHEm, Fr20 ou Fr40, determinadas três vezes com intervalos de 15 min. Os animais com valores de latência entre 1,5 s e 3,5 s foram selecionados para a realização dos experimentos. Grupos de animais (n= 5) foram tratados por via oral 1 h antes da imersão da cauda. Como controle positivo de analgesia um grupo de animais recebeu morfina i.p. (10 mg/kg), 45 min antes do teste de imersão.

As respostas obtidas para cada camundongo neste modelo foram convertidas em percentual máximo de efeito (PME%) de acordo com a seguinte fórmula:

$$(\%PME) = \frac{(\text{latência pós-tratamento} - \text{latência pré-tratamento})}{(\text{tempo de } \textit{cut-off} - \text{latência pré-tratamento})} \times 100$$

3.2.11 Estudo do mecanismo antinociceptivo pela via opioidérgica

Para o estudo do mecanismo de ação opiáceo foi empregado o modelo de contorção abdominal induzida por ácido acético descrito no item 3.2.5, segundo o método descrito por Koster e colaboradores (1959). Os animais foram separados em diferentes grupos de cinco animais, sendo 1 h antes do teste retirados água e alimento: 1) O grupo controle recebeu (v.o.) o veículo da diluição da Fr40 (água); 2) O grupo controle antinociceptivo foi tratado (i.p.) com morfina 5 mg/kg, 30 min antes da injeção do irritante; 3) Um grupo foi tratado com naloxona (antagonista não seletivo dos receptores opioides) 5 mg/kg, por via subcutânea (s.c.) na nuca 45 min antes da injeção do ácido acético; 4) Um grupo foi tratado previamente tratado com morfina (30 min) e com naloxona (15 min) antes da injeção do irritante; 5) Um grupo foi tratado com a Fr40 1 h antes da injeção (v.o.) do irritante; 6) Um grupo foi tratado com a Fr40 1 h antes (v.o.) e com naloxona 15 min antes da injeção do irritante. As contorções foram quantificadas após 5 min

da injeção do ácido acético 0,6% (i.p.), por um período de 10 min (Loro *et al.*, 1999).

3.2.12 Estudo do mecanismo adrenérgico

Para o estudo do mecanismo de ação adrenérgica foi empregado o modelo de contorção abdominal induzida por ácido acético descrito no item 3.2.5, segundo o método descrito por Koster e colaboradores (1959). Os animais foram separados em diferentes grupos de cinco animais, sendo 1 h antes do teste retirados água e alimento: 1) O grupo controle recebeu (v.o.) o veículo da diluição da Fr40 (água); 2) Um grupo foi tratado s.c. no dorso com ioimbina (antagonista α_2) 1 mg/kg p.c., 60 min antes da injeção do HAc; 3) Um grupo de animais tratados com clonidina (agonista α_2 adrenérgico) 30 μ g/kg i.p., 30 min antes da injeção do irritante; 4) Um grupo tratado previamente com ioimbina (30 min) e clonidina (15 min) antes da injeção do irritante; 5) Um grupo foi tratado com a Fr40 1 h antes da injeção (v.o.) do irritante; 6) Um grupo foi tratado com a Fr40 1 h antes (v.o.) e com ioimbina 15 min antes da injeção do irritante. As contorções foram quantificadas após 5 min da injeção do ácido acético 0,6% (i.p.), por um período de 10 min (Loro *et al.*, 1999).

3.2.13 Estudo do mecanismo de ação envolvendo a via NO-GMPc

O modelo utilizado foi o de contorção abdominal induzida por ácido acético, segundo o método descrito por Koster e colaboradores (1959). Os animais foram separados em diferentes grupos de cinco animais, sendo a água e alimento retirados uma hora antes do teste: Como controles foram utilizados: 1) O grupo controle recebeu (v.o.) o veículo da diluição da Fr40 (água); 2) Um grupo foi tratado por injeção intramuscular com ODQ (inibidor da enzima guanilato ciclase) 2,5 mg/kg, 60 min antes da injeção do ácido acético; 3) Um grupo recebeu injeção i.m. com 7-nitroindazol (7-NI, inibidor da enzima NO sintase neuronal) 3 mg/kg i.m., 60 min antes da injeção do irritante; 4) Um grupo foi tratado com a Fr40 1 h antes da injeção (v.o.) do irritante; 5) Um grupo foi tratado com a Fr40 1 h antes (v.o.) e com o ODQ (2,5 mg/kg i.m.) 25 min antes da injeção do irritante; 6) Um grupo foi tratado com a Fr40 1 h antes (v.o.) e com o 7-NI (3 mg/kg i.m.) 25

min antes da injeção do HAc 0,6%. As contorções foram quantificadas após 5 min da injeção do ácido acético 0,6% (i.p.), por um período de 10 min (Loro *et al.*, 1999).

3.2.14 Análise estatística

Análises descritivas das variáveis foram realizadas (média e desvio padrão). O teste One-way ANOVA seguido de Tukey foi utilizado para analisar os dados. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes (Dawson-Saunders e Trapp, 1994). Foram utilizados os programas Microsoft® Office Excel e GraphPad Prism® 5 para Windows.

4 RESULTADOS

4.1 Rendimento dos extratos e frações de *E. macrophyllus*

Os rendimentos dos extratos e das frações estão relacionados na Tabela 1. Para o extrato hexânico, após evaporar o solvente, a massa recuperada a partir de 100 g de folhas trituradas foi de 1,11 g de EHEm, com rendimento médio de 1,11%.

Após a liofilização do EAEm (50 mg/mL), obteve-se um rendimento médio de 38% e 775,43 g de massa recuperada a partir da infusão de 2 kg de folhas secas e trituradas.

O fracionamento do EAEm, conforme descrito em Material e Métodos resultou em duas frações nomeadas Fr20 e Fr40. A massa recuperada foi de 8,12 g, o que corresponde a um percentual de 90,2% da massa aplicada na coluna.

Tabela 1 - Rendimento dos extratos e das frações de *E. macrophyllus*.

Fração (Fr)	Massa recuperada (g)	Rendimento (%)
EHEm	1,11	1,11
EAEm	775,43	38
Fr20	7,47	92,0
Fr40	0,64	7,9

% de rendimento = (peso do material extraído/peso do material inicial) x 100

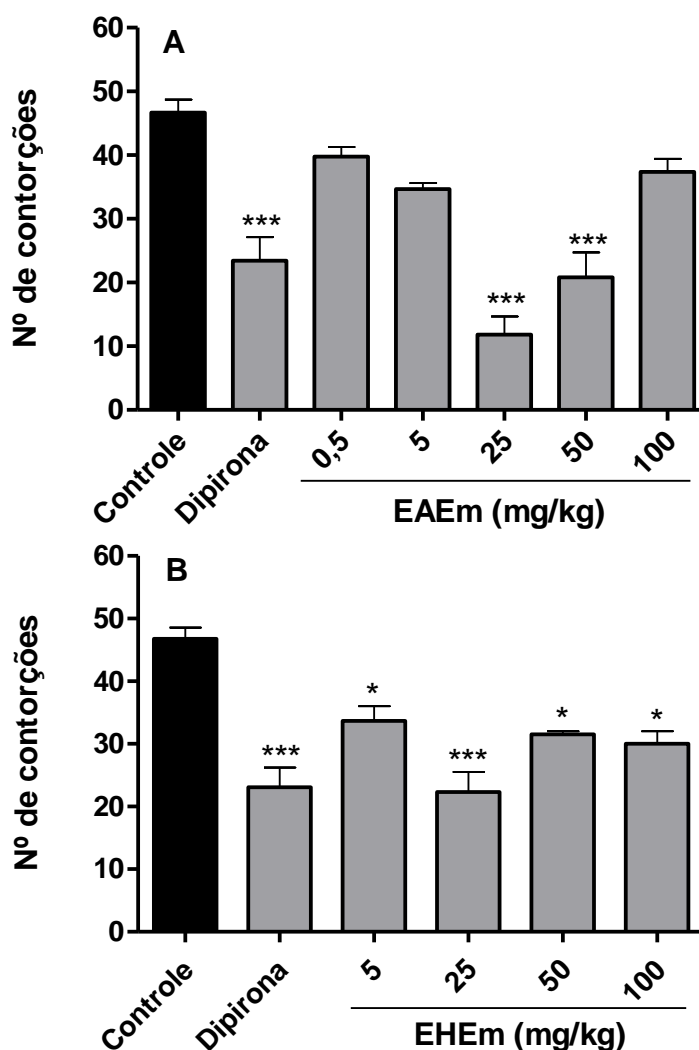
4.2 Estudos *in vivo*

4.2.1 Modelo de hiperalgesia induzida por injeção intraperitoneal (i.p.) de ácido acético

O tratamento com o EAEm apresentou inibição significativa do número de contorções induzidas por ácido acético de 75% e 55% nas respectivas doses de 25 e 50 mg/kg por peso corporal em relação ao grupo controle (Figura 14A). Para o tratamento com o EHEm, observou-se inibição significativa no número de contorções induzidas por ácido acético em todas as doses testadas, com a porcentagem de inibição de 28%, 52%, 32% e 35% em relação ao grupo controle (Figura 14B). O

tratamento com dipirona inibiu em média 51% das contorções induzidas por ácido acético em relação ao grupo controle (Figura 14A e 14B).

Figura 14 - Efeito do tratamento com EAEm e EHEm no modelo de contorção abdominal induzida por ácido acético

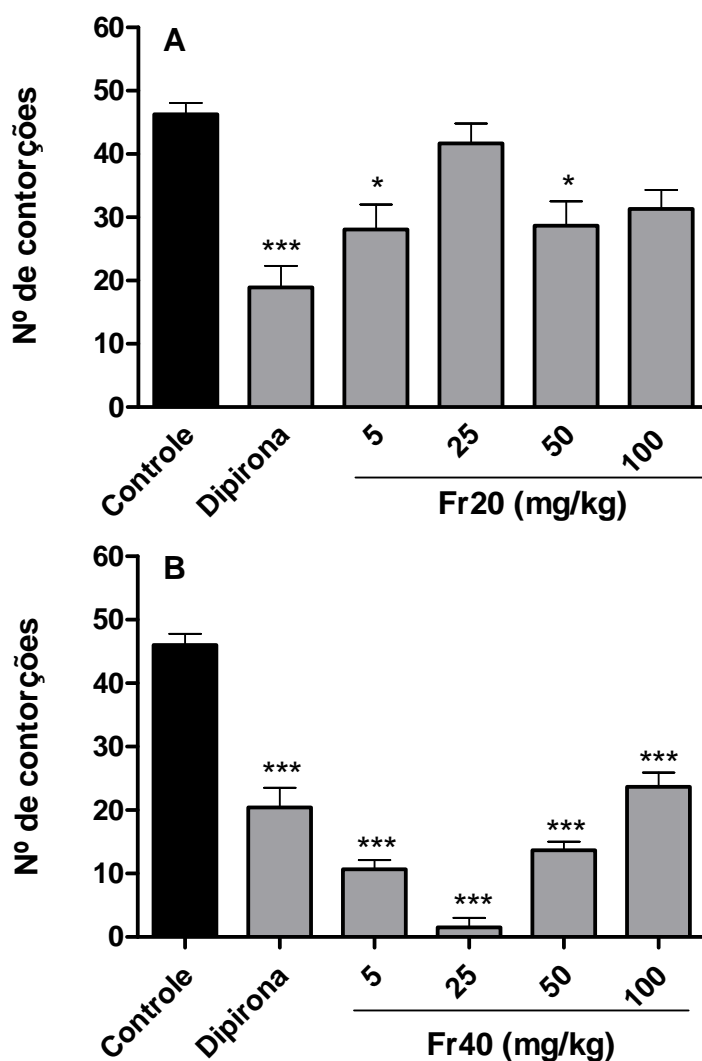


Legenda: Foram administradas (v.o.) diferentes doses do EAEm (A) ou EHEm (B) em camundongos machos SW (n=5/grupo). Os resultados representam a média ± DP de três experimentos e são estatisticamente significativos quando comparados com o controle tratado com veículo (controle) e dipirona (v.o.) 60 min antes da injeção de ácido acético 0,6% (i.p.). *p <0,05 e ***p <0,001 em relação ao grupo controle (teste ANOVA seguido de Tukey).

A Fr20 apresentou inibição moderada com porcentagem de 39% e 38%, nas respectivas doses de 5 e 50 mg/kg (Figura 15A). O tratamento com a fração Fr40

mostrou melhor resultado, com inibição das contorções em todas as doses testadas. A porcentagem de inibição foi 77%, 96%, 70% e 48%, para as respectivas doses 5, 25, 50 e 100 mg/kg (Figura 15B). A dipirona 50 mg/kg (v.o.), foi usada como droga padrão e inibiu em 50% o número de contorções em relação ao controle tratado com veículo.

Figura 15 - Efeito do tratamento com Fr20 e Fr40 no modelo de contorção abdominal induzido por ácido acético

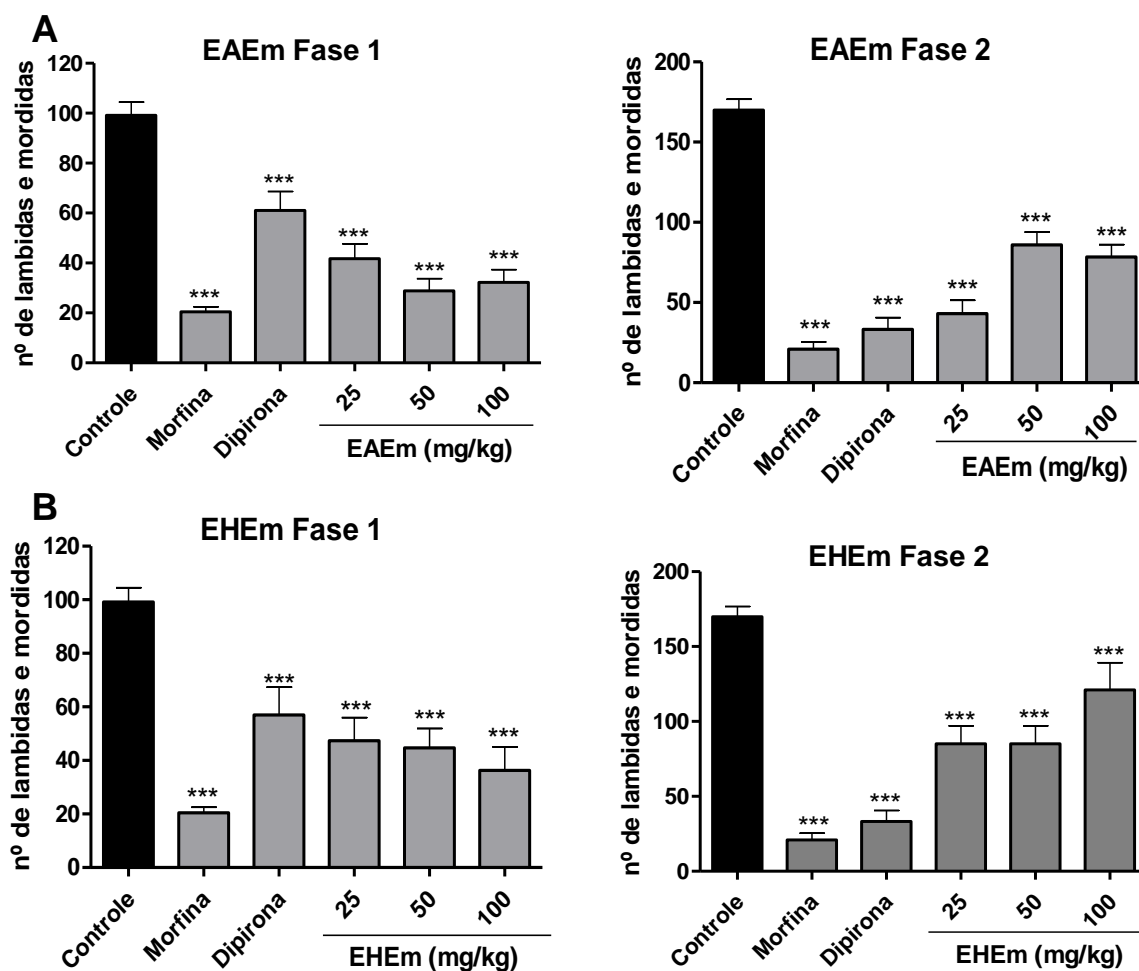


Legenda: Foram administradas (v.o.) as doses de 5 a 100 mg/kg da Fr20 (A) ou Fr40 (B) em camundongos machos SW (n=5/grupo). Os resultados representam a média \pm DP de três experimentos e são estatisticamente significativos quando comparados com o controle tratado com veículo e dipirona (v.o.) 60 min antes da injeção de ácido acético 0,6% (i.p.). *p < 0,05 e ***p < 0,001 em relação ao grupo controle (teste ANOVA seguido de Tukey).

4.2.2 Modelo de formalina (injeção intraplantar de agente irritante)

A atividade antinociceptiva dos EAEm e EHEm também foi analisada no modelo de formalina que exibe duas fases (Figura 16). A primeira fase (fase neurogênica), que ocorre entre 0-5 min corresponde à dor aguda, devido ao processo doloroso pela injeção do irritante. A segunda fase (fase inflamatória) que compreende o período de 15-25 min após a injeção de formalina, corresponde à dor inflamatória, com liberação de mediadores nociceptivos (Murray *et al.*, 1988; Tjølsen *et al.*, 1992).

Figura 16 - Efeito do tratamento com o EAEm e EHEm no modelo de formalina



Legenda: A nocicepção foi induzida por injeção de formalina 2,5% na pata traseira direita do animal. Os animais foram tratados (v.o.) com o controle (veículo), com as doses do EAEm (A), do EHEm (B), morfina (10 mg/kg, i.p.) ou dipirona (50 mg/kg, v.o.) (n = 5/grupo). Os resultados expressam a média \pm DP de três experimentos. ***p<0,001 em relação ao grupo controle tratado com o veículo (teste ANOVA seguido de Tukey).

A média \pm DP das lambidas e mordidas dos controles utilizados (Figuras 16 A e B) foi de $99,20 \pm 5,26$ (1ª Fase) e $169,90 \pm 6,84$ (2ª Fase). A morfina inibiu o número de lambidas e mordidas em 79,4% e 87,7% na 1ª e 2ª fases, respectivamente. A dipirona apresentou efeito predominante na 2ª fase deste modelo, inibindo em média 80,4% do número de lambidas e mordidas e 40,5% na 1ª fase.

Os extratos foram ativos em todas as doses tanto na fase neurogênica quanto inflamatória. O tratamento com o EAEm nas doses 25, 50 e 100 mg/kg produziu uma inibição da nocicepção na 1ª fase de 57,9%, 70,9% e 67,4% e na 2ª fase de 74,6%, 49,5% e 53,9%, respectivamente.

Animais tratados com o EHEM exibiram efeito antinociceptivo predominante na 1ª fase com inibição de 52,2%, 54,9% e 63,4% e inibições na 2ª fase de 50,0%, 50,0% e 28,8% nas doses 25, 50 e 100 mg/kg, respectivamente.

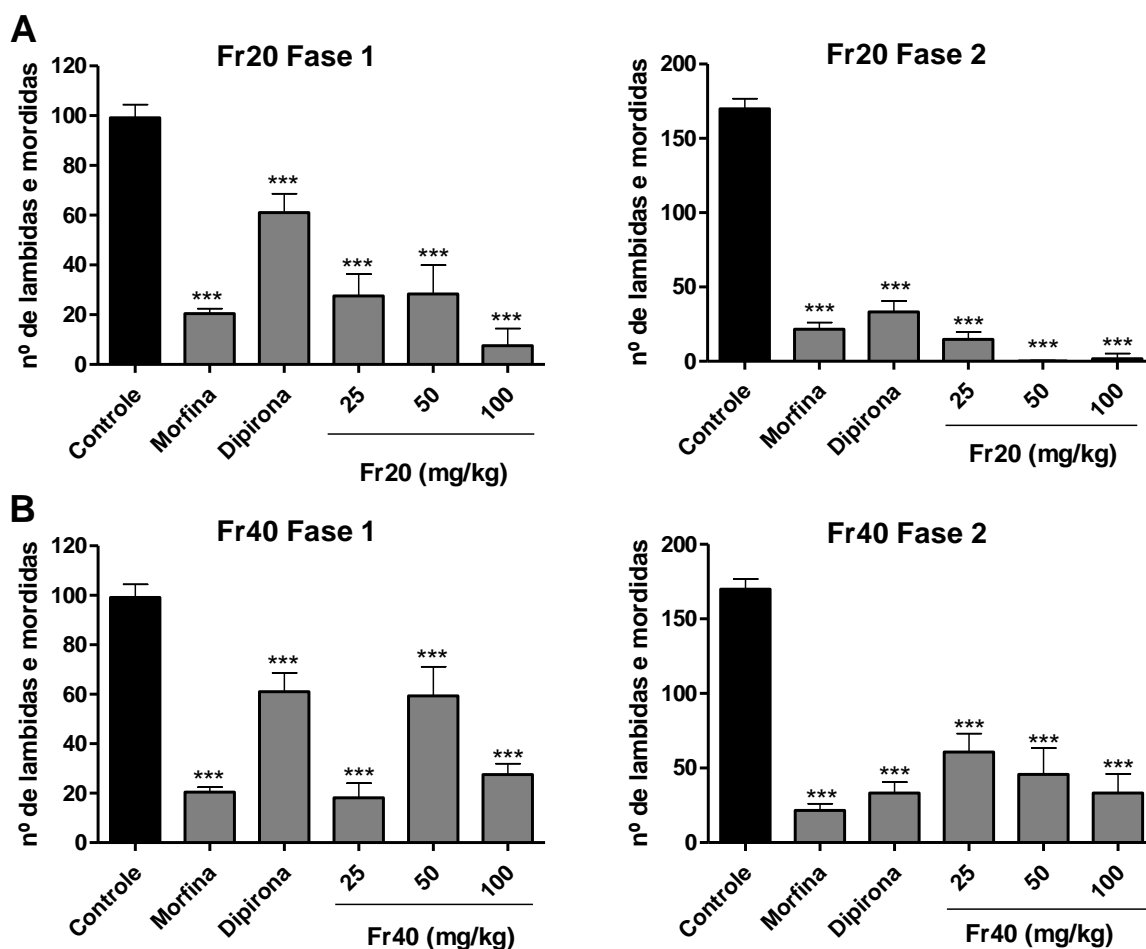
A fração Fr20 (Figura 17A) foi ativa nas duas fases do modelo de formalina, chegando a 100% de redução da nocicepção nas doses 50 e 100 mg/kg na fase inflamatória. Na primeira fase o tratamento com as doses 25, 50 e 100 mg/kg reduziram a nocicepção em 72,3%, 71,4% e 95,4%, respectivamente.

A fração Fr40 (Figura 17B) foi ativa nas duas fases do modelo de formalina, mas apresentou um efeito dose resposta na segunda fase com inibições de 66,3%, 3,1% e 80,4% nas doses 25, 50 e 100 mg/kg respectivamente. Na primeira fase, observou-se um efeito em U invertido, com maior inibição (81,7%) na dose 25 mg/kg.

4.2.3 Modelo de imersão da cauda em banho a 50°C

No modelo de imersão da cauda em banho a 50°C, o tratamento com EHEm mostrou eficiência com a dose de 50 mg/kg nos tempos 60 e 90 minutos (Figura 18A). Já o EAEm não apresentou resultados significativos em nenhuma das doses testadas em relação ao controle, tratado com veículo (Figura 18B).

Figura 17 - Efeito do tratamento com a Fr20 e a FR40 no modelo de formalina

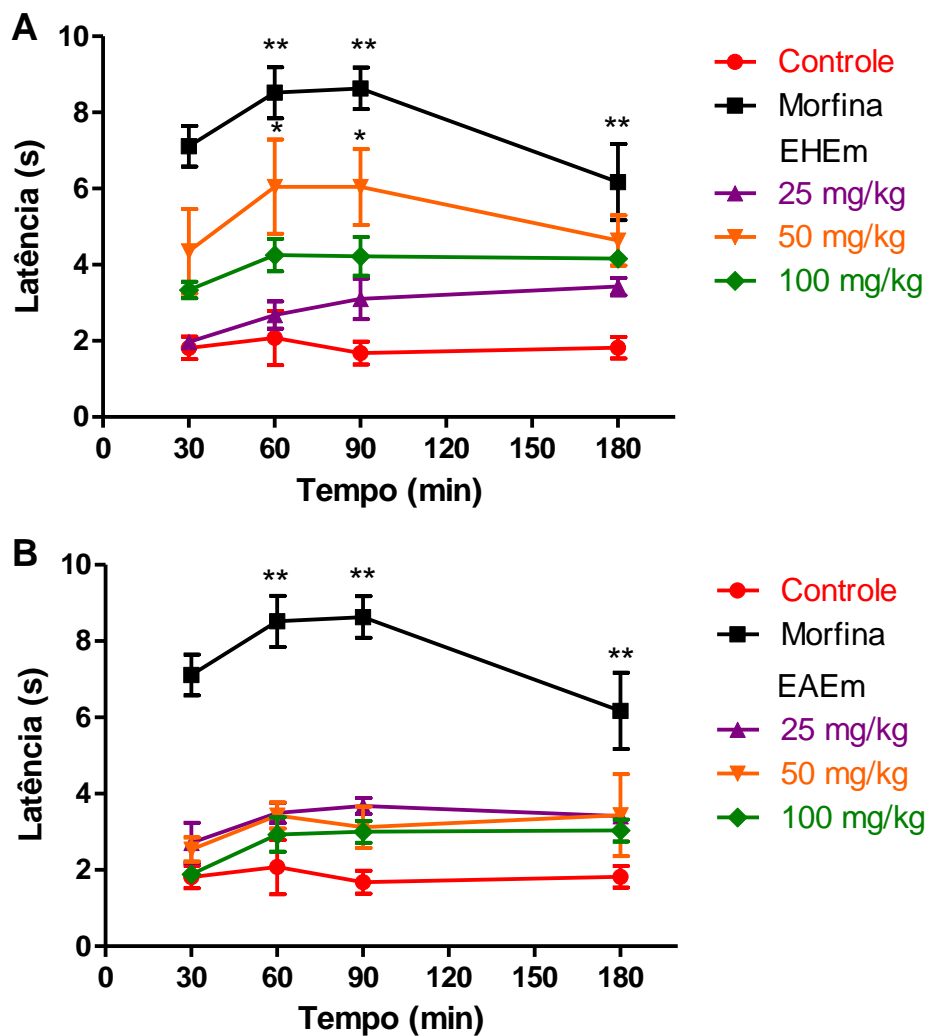


Legenda: A nociceção foi induzida por injeção de formalina 2,5% na pata traseira direita do animal. Os animais foram tratados (v.o.) com o controle (veículo), com as doses da Fr20 (A), da Fr40 (B), morfina (10 mg/kg, i.p.) ou dipirona (50 mg/kg, v.o.) (n = 5/grupo). Os resultados expressam a média \pm DP de três experimentos. ***p<0,001 em relação ao grupo controle tratado com o veículo (teste ANOVA seguido de Tukey).

Para o tratamento com a Fr20 observou-se eficiência no tempo de 90 minutos após tratamento com as três doses administradas (25, 50 e 100 mg/kg) (Figura 19A) enquanto a Fr40 (Figura 19B) aumentou o tempo de latência apenas na maior dose (100 mg/kg) nos tempos de 60, 90 e 180 min.

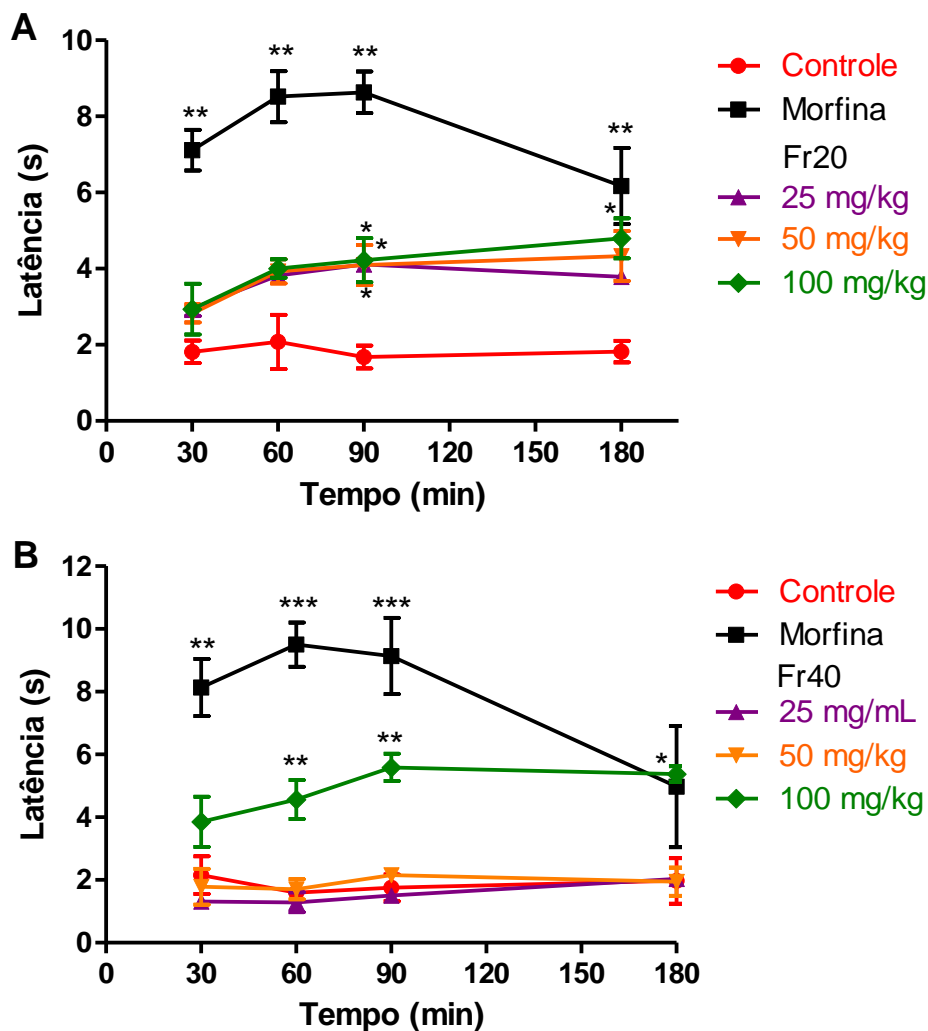
Como droga padrão utilizou-se a morfina, que apresentou eficiência antinociceptiva após o tratamento i.p. em todos os tempos analisados (30 a 180 min), em relação ao controle.

Figura 18 - Efeito do tratamento com EHEm e EAEm no modelo de imersão da cauda em banho a 50°C



Legenda: Grupos de SW macho (5/grupo) tratados com o veículo (controle), extratos (v.o.) ou morfina (10 mg/kg, i.p.) 60 min antes da imersão da cauda. Os resultados representam a latência média \pm SD de cada grupo (três experiências). A inibição (%) foi calculada em relação ao grupo de controle. * $p < 0,05$ e ** $p < 0,01$ em relação ao grupo controle (teste ANOVA seguido de Tukey).

Figura 19 - Efeito do tratamento com Fr20 e Fr40 no modelo de imersão da cauda em banho a 50°C.



Legenda: Grupos de SW macho (5/grupo) tratados com o veículo (controle), Fr20, Fr40 (v.o.) ou morfina (10 mg/kg, i.p.) 60 min antes da imersão da cauda. Os resultados representam a latência média \pm SD por grupo de três experiências. A inibição (%) foi calculada em relação ao grupo de controle. * $p < 0,05$ ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$ em relação ao grupo controle (teste ANOVA seguido de Tukey).

4.3 Estudos *in vitro*

4.3.1 Ensaio de citotoxicidade – Teste de redução do MTT

O efeito citotóxico dos extratos e frações foram avaliados pela atividade redutora mitocondrial no teste do MTT utilizando células da linhagem de neuroblastoma NEURO 2-A. Os resultados mostraram que o EAEm (Figura 20A) foi o que apresentou maior redução da atividade redutora mitocondrial (ARM) em função da concentração, sendo calculado um IC50 de 36,15 µg/mL. O EHEm (Figura 20B) também apresentou uma redução progressiva em função da concentração, atingindo 49% na maior dose (100 mg/ml), porém em menor proporção do que o EAEm. O controle com morfina (Figura 20C) apresentou uma redução de 23% apenas na maior dose. A fração Fr20 (Figura 21A) apresentou um comportamento semelhante ao EHEm, com uma inibição de 38,1% da ARM na maior dose. A Fr40 (Figura 21B) não interferiu na atividade redutora mitocondrial na maioria das concentrações testadas.

4.4 Estudo do mecanismo de ação

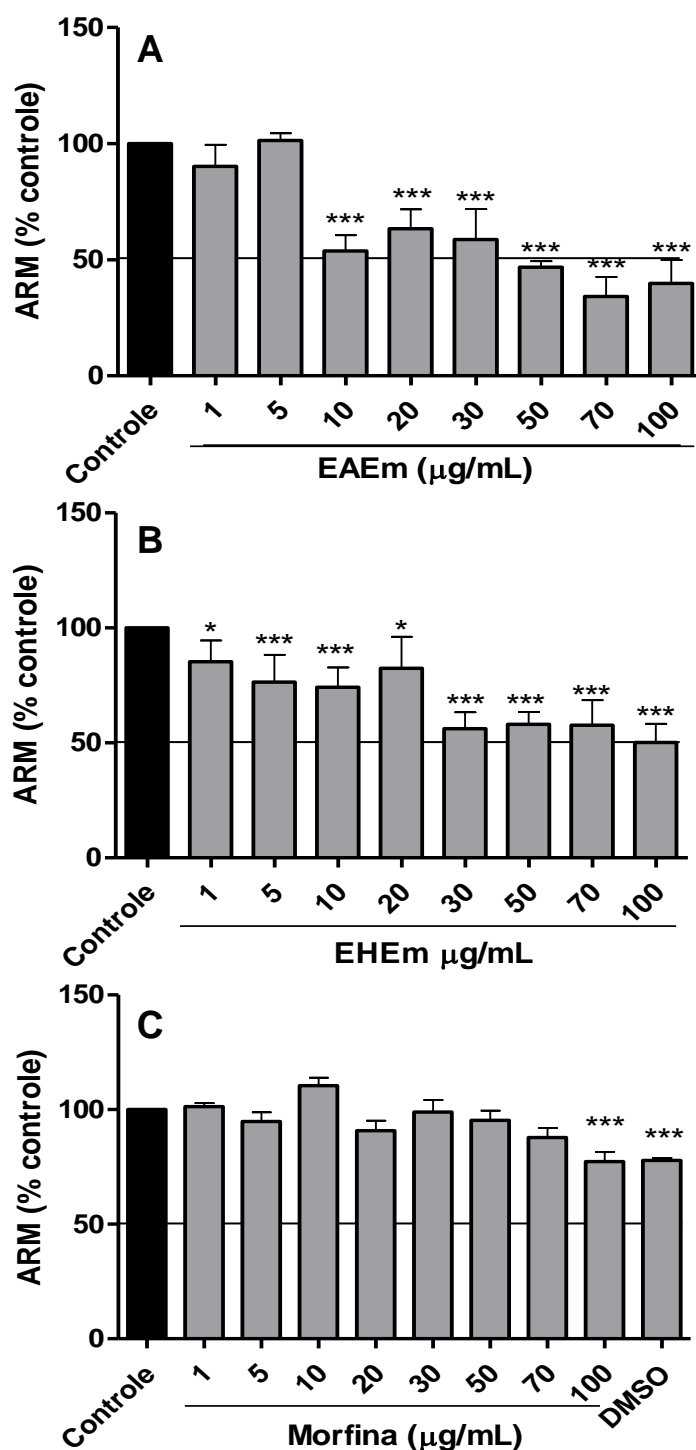
Tendo em vista os resultados anteriores, a Fr40, que apresentou atividade antinociceptiva em todos os modelos avaliados e menor citotoxicidade foi escolhida para o estudo de mecanismo de ação.

4.4.1 Avaliação do mecanismo opiáceo

O mecanismo opiáceo foi avaliado (Tabela 2) empregando o modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético e utilizando como controle positivo a morfina (agonista) e como antagonista, a naloxona.

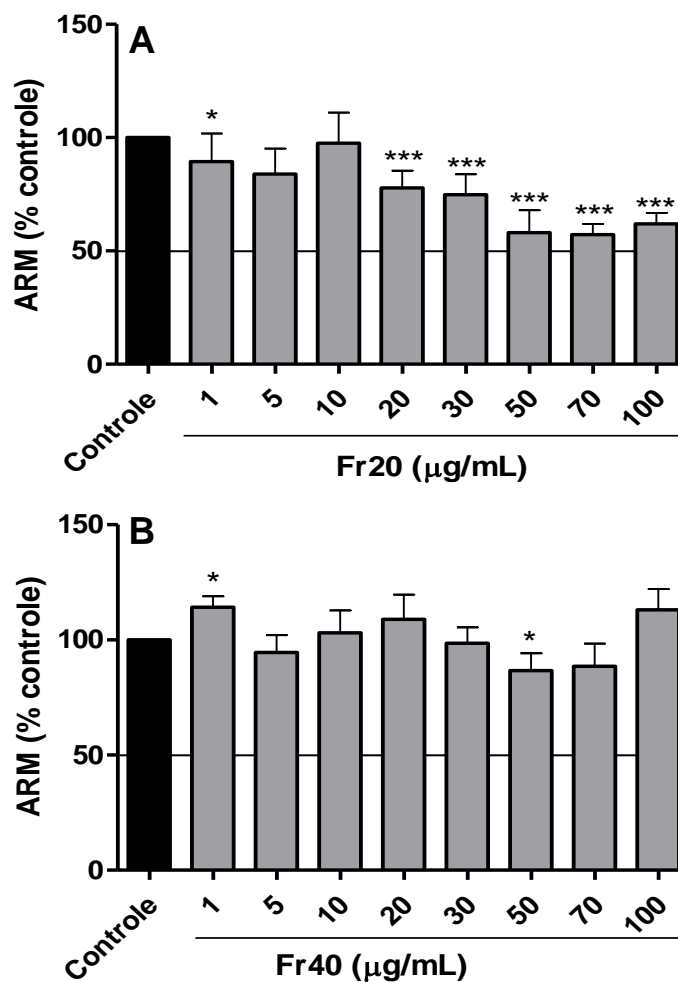
A naloxona não interferiu nas contorções abdominais quando comparada ao grupo controle ($p > 0,05$) e foi capaz de reverter em 61% o efeito antinociceptivo da morfina ($p < 0,001$). Embora a Fr40 tenha reduzido em 75,13% o número de contorções em relação ao grupo controle, seu efeito não foi revertido pela naloxona.

Figura 20 - Efeito citotóxico do EAEm, EHEm e morfina sobre neuroblastoma da linhagem NEURO-2A



Legenda: Células NEURO-2A foram incubadas na ausência e presença de diferentes concentrações (1 a 100 µg/mL) de EAEm (A), EHEm (B) e morfina (C) durante 24 h. A citotoxicidade das amostras foi avaliada através do ensaio do MTT e os resultados expressos em percentual de atividade redutora mitocondrial, comparada ao controle. Os dados representam média \pm DP de três experimentos independentes. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ em relação ao grupo controle pelo teste de Tukey, após análise de variância pelo One-Way ANOVA.

Figura 21 - Efeito citotóxico da Fr20 e Fr40 sobre neuroblastoma da linhagem NEURO-2A



Legenda: Células NEURO-2A foram incubadas na ausência e presença de diferentes concentrações (1 a 100 µg/mL) da Fr20 (A) e Fr40 (B) durante 24 h. A citotoxicidade das amostras foi avaliada através do ensaio do MTT e os resultados expressos em percentual de atividade redutora mitocondrial, comparada ao controle. Os dados representam média ± DP de três experimentos independentes. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ em relação ao grupo controle pelo teste de Tukey, após análise de variância pelo One-Way ANOVA.

Tabela 2 - Avaliação do mecanismo opiáceo da Fr40 no modelo de contorções abdominais induzidas pelo HAC

Grupo	Média ± DP	% inibição
Controle	50,67±2,08	-
Naloxona	46,25±1,71	8,72
Morfina	1,20±2,17***	97,63
Naloxona + Morfina	20,50±4,93***#	59,45
Fr40	12,60±5,94***	75,13
Naloxona + Fr40	13,67±4,51***	73,02

Legenda: Grupo de animais tratados (n=5/grupo) com Fr40 25 mg/kg (v.o.), naloxona (5 mg/kg s.c.), morfina (5 mg/kg i.p) ou naloxona (s.c.) associada à morfina (i.p.) e Fr40 25 mg/kg (v.o.) 60 min antes da injeção i.p. de HAC 0,6%. Os resultados representam a média de contorções ± DP de dois experimentos avaliados entre 5-15 min após a injeção i.p. de HAC 0,6 %. O % de inibição foi comparado em relação ao controle. ***p<0,001 em relação ao controle pelo teste de Tukey e #p<0,01 em relação à morfina pelo teste de Tukey.

4.4.2 Avaliação do mecanismo adrenérgico

O mecanismo adrenérgico foi avaliado (Tabela 3) empregando o modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético e utilizando a ioimbina como antagonista e a clonidina como agonista.

A ioimbina não interferiu nas contorções abdominais quando comparada ao grupo controle (p>0,05) e foi capaz de reverter em 80,4% o efeito da clonidina (p<0,001). A Fr40 reduziu em 75,13% o número de contorções em relação ao grupo controle, e seu efeito foi revertido em 60,2% pela ioimbina.

4.4.3 Avaliação do mecanismo de inibição da guanilato ciclase

O possível envolvimento da ativação da guanilato ciclase e geração de Monofosfato cíclico de guanosina (GMPc) na resposta antinociceptiva da Fr40 foi avaliado (Tabela 4) empregando o modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético e utilizando o ODQ como inibidor da enzima guanilato ciclase.

Tabela 3 - Avaliação do mecanismo adrenérgico da Fr40 no modelo de contorções abdominais induzidas pelo HAC

Grupo	Média ± DP	% inibição
Controle	50,67±2,08	-
loimbina	47,25±3,77	6,75
Clonidina	0,20±0,45***	99,60
loimbina + clonidina	40,80±6,65 [#]	19,47
Fr40	12,60±5,94***	75,13
loimbina + Fr40	35,50±9,81* [§]	29,93

Legenda: Grupo de animais tratados (n=5/grupo) com Fr40 25 mg/kg (v.o.), com a loimbina (1 mg/kg s.c.), clonidina ((30 µg/kg i.p) ou com a clonidina (i.p) associada à loimbina (s.c.) e Fr40 25 mg/kg 60 min antes da injeção i.p. de HAC 0,6%. Os resultados expressam a média de contorções ±desvio padrão de 3 experimentos avaliados entre 5-15 min após a injeção i.p. de HAC 0,6 %. % de inibição foi comparado em relação ao controle. *p<0,05, ***p<0,001 em relação ao controle pelo teste de Tukey e [#]p<0,001 em relação à clonidina pelo teste de Tukey e [§]p<0,001 em relação a Fr40 pelo teste de Tukey.

Tabela 4 - Efeito da Fr40 no modelo de contorções abdominais induzidas pelo HAC avaliando o mecanismo de inibição da guanilato ciclase

Grupo	Média ± DP	% inibição
Controle	50,67±2,08	-
ODQ	41,00±6,08	19,08
Fr40	12,60±5,94***	75,13
ODQ + Fr40	4,50±2,89*** [#]	91,12

Legenda: Grupo de animais tratados (n=6/grupo) com a Fr40 25 mg/kg (v.o.), com o ODQ (2,5 mg/kg i.m.) 60 min antes da injeção i.p. de HAC (0,6%). Os resultados expressam a média de contorções ±desvio padrão de 3 experimentos avaliados entre 5-15 min após a injeção i.p. de HAC 0,6 %. % de inibição foi comparado em relação ao controle. ***p<0,001 em relação ao controle pelo teste de Tukey e [#]p<0,001 em relação ao ODQ pelo teste de Tukey.

O ODQ não interferiu nas contorções abdominais quando comparado ao grupo controle (p>0,05). A Fr40 reduziu em 75,13% o número de contorções em relação ao grupo controle, e seu efeito não foi revertido pelo ODQ.

4.4.4 Avaliação do mecanismo de inibição da NO sintase neuronal

O envolvimento do óxido nítrico (NO) no efeito antinociceptivo da Fr40 foi avaliado (Tabela 5) empregando o modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético e utilizando o 7-NI, um antagonista da NO sintase neuronal.

A 7-NI não interferiu nas contorções abdominais quando comparado ao grupo controle ($p > 0,05$). A Fr40 reduziu em 75,13% o número de contorções em relação ao grupo controle, e seu efeito foi parcialmente revertido (65,4%) pelo 7-NI.

Tabela 5 - Efeito da Fr40 no modelo de contorções abdominais induzidas pelo HAC avaliando o mecanismo de inibição da NO sintase Neuronal.

Grupo	Média \pm DP	% inibição
Controle	50,67 \pm 2,08	-
7-NI	41,60 \pm 7,09	17,90
Fr40	12,60 \pm 5,94 ^{***}	75,13
7-NI + Fr40	37,50 \pm 6,35 [#]	25,99

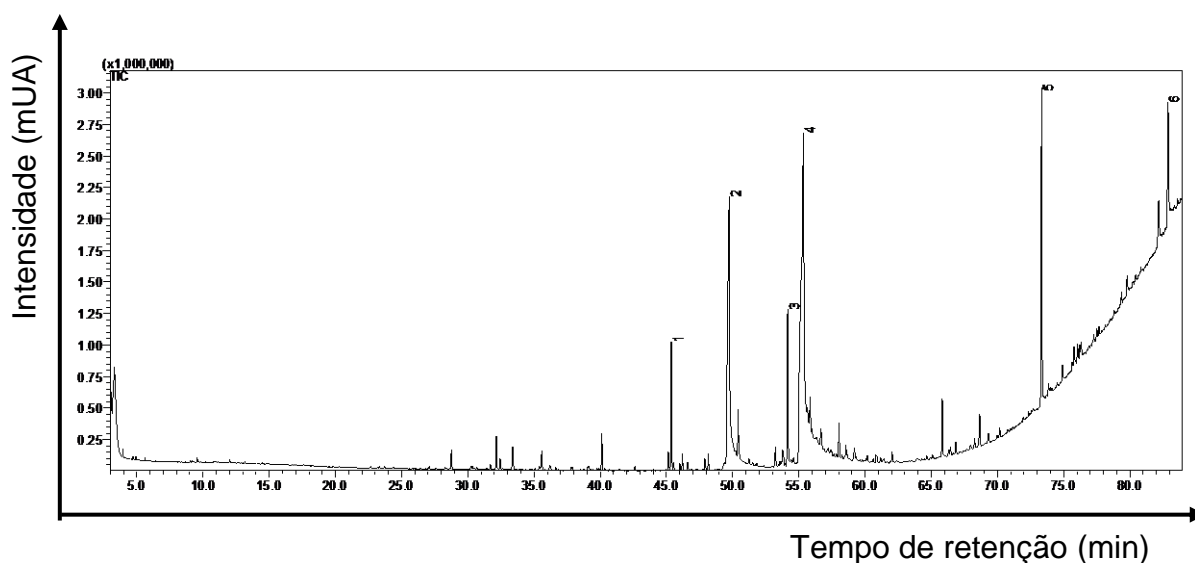
Legenda: Grupo de animais tratados (n=6/grupo) com Fr40 25 mg/kg (v.o.), com o 7-NI (3 mg/kg i.m.), com o 7-NI associado a Fr40 25 mg/kg, 60 min antes da injeção i.p. de HAC (0,6%). Os resultados expressam a média de contorções \pm desvio padrão de dois experimentos avaliados entre 5-15 min após a injeção i.p. de HAC 0,6 %. % de inibição foi comparado em relação ao controle. ^{***} $p < 0,001$ em relação ao controle pelo teste de Tukey e [#] $p < 0,001$ em relação ao Fr40 pelo teste de Tukey.

4.5 Análises fitoquímicas

4.5.1 Perfil cromatográfico EHEm por GC-MS e identificação de seus constituintes

O EHEm foi analisado por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrômetro de massas. O cromatograma obtido, nas condições descritas mostrou seis picos de maior concentração (Figura 22). A análise dos picos presentes neste extrato, por comparação com o banco de dados NIST e a literatura permitiu a identificação de seus constituintes (Tabela 6). Os compostos majoritários com teores acima de 20% foram o ácido palmítico (36,67%) e o esqualeno (23,28%).

Figura 22 - Cromatograma do EHEm obtido por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrômetro de massas (GC-MS)



Legenda: Cromatograma do EHEm obtido por cromatografia gasosa em coluna DB-1 de (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m) e nitrogênio como gás carreador. As temperaturas de injeção e de detecção foram 260°C e 200°C, respectivamente. A programação da temperatura utilizada foi de 100°C a 300°C seguido de um gradiente de 7°C/min, com fluxo de 1 mL/min.

Tabela 6 - Identificação dos constituintes do extrato hexânico de *E. macrophyllus* por GC-MS.

Pico	TR	% EHEm	IR	IR _{Lit}	Composto
1	45,377	7,33	1847	1835	Hexahidrofarnesil acetona
2	49,743	36,67	1976	1984	Ácido palmítico
3	54,155	10,21	2116	2114	(E)-fitol
4	55,354	14,46	2155	2155	(z,z)-9-12-octadecadienoato de etila
5	73,340	23,28	2713	2790	Esqualeno
6	82,887	8,05	-	3332	Estigmasterol

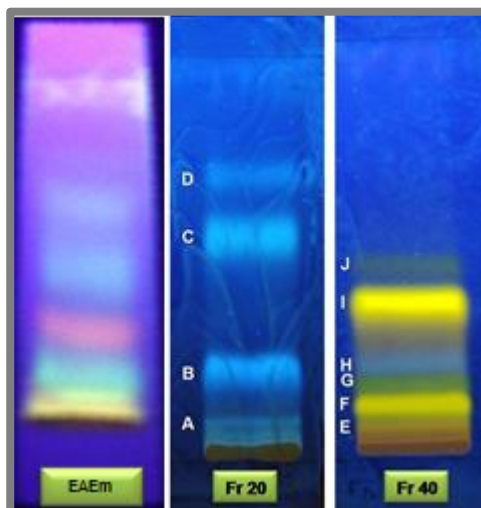
IR = índice de retenção calculado; IR_{Lit} = Índice de retenção de dados da literatura; *Linoleato de etila

4.5.2 Cromatografia em camada delgada de alta eficiência

O EAEm e suas frações foram analisados por cromatografia em camada delgada e reveladas para flavonoides. Dados anteriores mostraram que o EAEm não apresentou bandas coradas com o revelador vanilina/ácido sulfúrico, sugerindo ausência de terpenos (dados não mostrados). A revelação com NP-PEG (Figura 23)

mostrou uma diversidade de bandas com diferentes colorações e intensidades sugerindo uma diversidade de compostos da classe dos fenolicos.

Figura 23 - Análise por HPTLC do extrato EAEm e suas frações

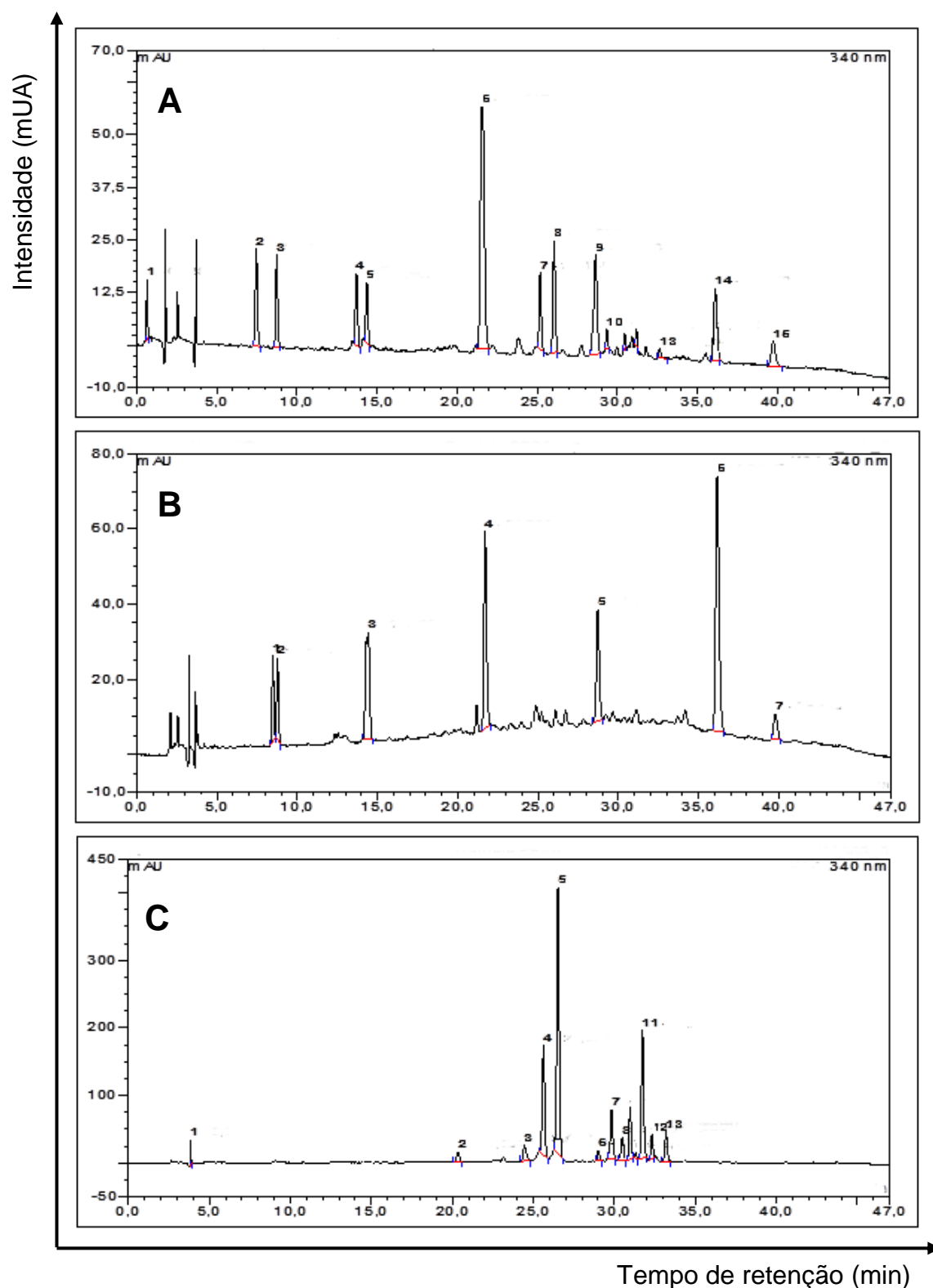


Legenda: As cromatografias foram desenvolvidas em placa de HPTLC em sílica gel 60 com 3 x 7 cm, utilizando como solvente acetato de etila:diclorometano:ac. acético:água (10:2,5:2:1 v/v), reveladas com NP-PEG, e visualizadas sob luz UV a 365 nm.

4.5.3 Perfis cromatográficos do EAEm, Fr20 e Fr40 por HPLC-DAD

Os perfis cromatográficos do EAEm, Fr20 e Fr40 foram obtidos por HPLC-DAD (Figura 24) utilizando uma coluna C18, por meio de monitoramento a 340 nm. O comprimento de onda escolhido baseia-se no protocolo proposto por Costa e colaboradores (2011).

Figura 24 - Cromatogramas do EAEm e frações obtidos por HPLC-DAD a 340 nm.



Legenda: Cromatogramas do EAEm (A), Fr20 (B) e Fr40 (C) obtidos por HPLC-DAD a 340 nm. Foi utilizada uma coluna C18 Kromasil 100 Å (4,6 x 250 mm), com fluxo de 1 mL/min e com um gradiente com as fases móveis: A (acetonitrila) e B (ácido acético 1, ajustado ao pH 3.0) da seguinte forma: 0-30 min, variação linear de A-B (5:95 v/v) para A-B (20:80 v/v); 30-40 min, eluição isocrática A-B (20:80 v/v).

O EAEm apresentou distribuição de picos ao longo do cromatograma, com um pico majoritário (Tabela 7) com tempo de retenção (TR) 21,55 min (33,71%). Já a Fr20 apresentou menor complexidade do que o EAEm e distribuição de picos entre 8 e 40 min, com dois picos majoritários de TR 21,70 min (20,49%) e 36,17 min (34,25%), respectivamente. Os compostos presentes na Fr40 foram eluídos entre 20 e 34 min e seu cromatograma mostrou três picos majoritários com TR 25,63 min (14,89%), 26,52 min (37,20%) e 31,74 min (17,30%).

Tabela 7 - Análise comparativa do EAEm e suas frações Fr20 e Fr40 quanto ao tempo de retenção e área relativa dos picos dos cromatogramas obtidos por HPLC

Nº Pico	EAEm		Fr20		Fr40	
	TR	Área relativa (%)	TR	Área relativa (%)	TR	Área relativa (%)
1	0,63	2,01	8,47	6,09	3,85	0,65
2	7,46	7,04	8,77	5,75	20,35	1,62
3	8,73	6,01	14,43	17,28	24,46	2,74
4	13,71	5,61	21,70	20,49	25,63	14,89
5	14,37	4,34	28,72	12,46	26,52	37,20
6	21,55	33,71	36,17	34,25	29,02	1,34
7	25,19	5,66	39,80	3,68	29,83	7,04
8	26,05	8,88	-	-	30,50	3,38
9	28,64	11,51	-	-	30,98	6,36
10	29,33	1,19	-	-	31,33	0,55
11	30,46	0,81	-	-	31,74	17,30
12	31,19	0,95	-	-	32,33	2,76
13	32,66	0,74	-	-	33,20	4,17
14	36,12	8,06	-	-	-	-
15	39,73	3,49	-	-	-	-

Legenda: Os dados se referem aos resultados da Figura 24.

4.5.4 Perfil cromatográfico da Fr40 por HPLC-DAD com co-injeções de padrões

Tendo em vista resultados anteriores que indicaram a presença de flavonoides, a Fr40 foi analisada por HPLC-DAD utilizando padrões de flavonoides, que são marcadores do gênero *Echinodorus*.

4.5.4.1 Co-injeção de isovitexina

Ao compararmos o cromatograma da Figura 25A com o da Figura 25B, podemos observar que o pico 10 da Fr40, correspondente ao pico 11 observado com a co-injeção de isovitexina está aumentado. Este resultado é melhor observado na Tabela 8, em que a área relativa de 2,52% do pico 10 da Fr40, com TR 29,76 min, aumenta para 12,87%, no pico 11, com TR 29,65 min (em vermelho), indicando a presença de isovitexina na Fr40.

4.5.4.2 Co-injeção de vitexina

Ao compararmos o cromatograma da Figura 26A com o da Figura 26B, podemos observar que os picos 8 e 9 da Fr40, correspondente ao pico 9 e 10 observado com a co-injeção de vitexina está alterado. Este resultado é melhor observado na Tabela 8, em que as áreas relativas de 1,21% do pico 8 (TR 28,32 min) e de 6,49% do pico 9 (TR 29,10) da Fr40, se deslocam para 3,20% no pico 9 (TR 29,36 min) e para 8,50%, no pico 1, com TR 29,62 min (em azul), sugerindo que a vitexina pode não estar presente na Fr40.

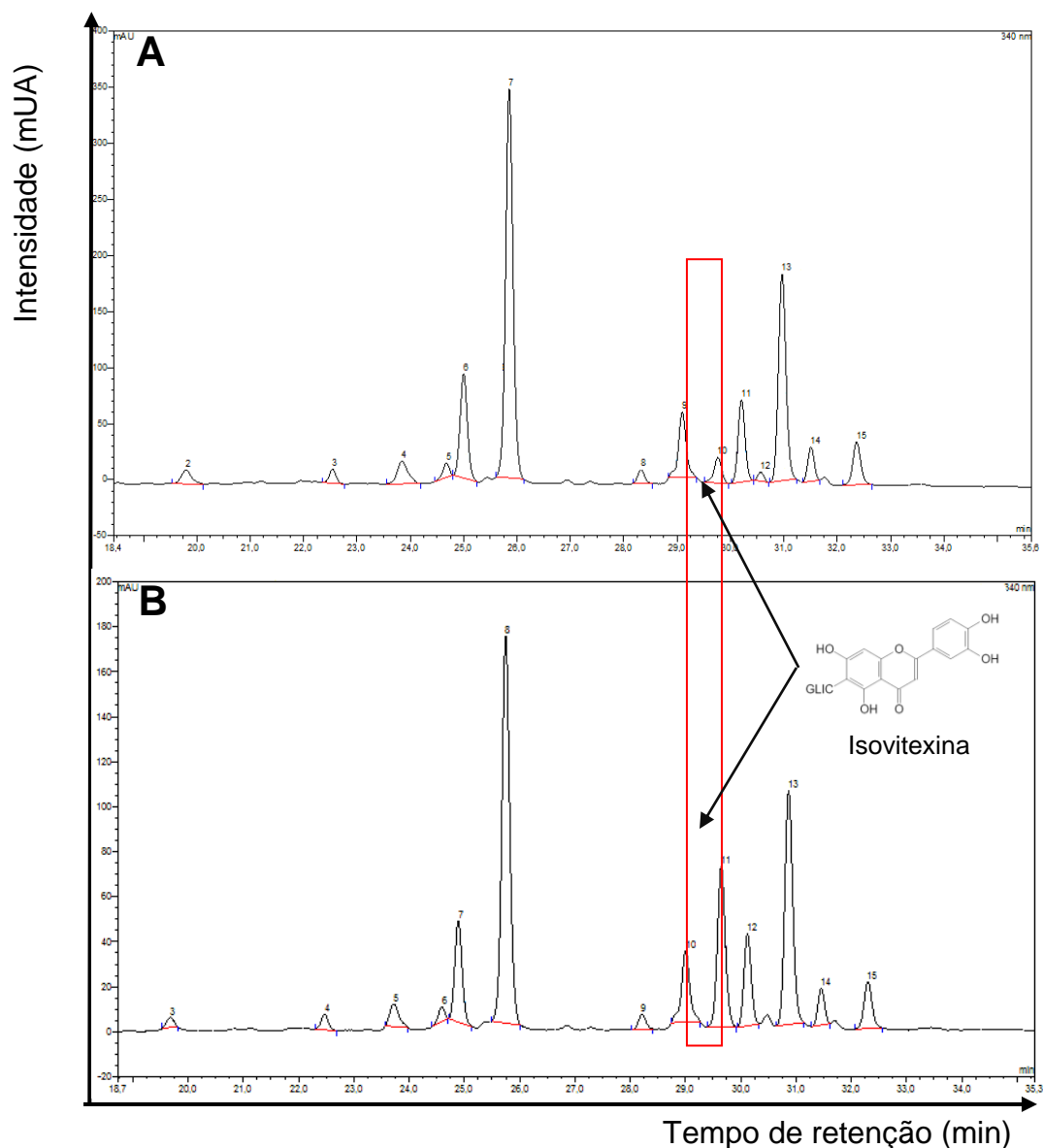
4.5.4.3 Co-injeção de rutina

Ao compararmos o cromatograma da Figura 27A com o da Figura 27B, podemos observar que a região referente aos picos 9 e 10 da Fr40, correspondente a região dos picos 10 e 11 observado com a co-injeção de rutina está alterado. Este resultado é melhor observado na Tabela 9, em que as áreas relativas de 8,03% do pico 9 (TR 29,36 min) e de 2,04% do pico 10 (TR 30,04) da Fr40, se deslocam para 4,36% no pico 10 (TR 29,64 min) e para 5,47%, no pico 11, com TR 30,12 min (em vermelho), sugerindo que a rutina pode não estar presente na Fr40.

4.5.4.4 Co-injeção de orientina

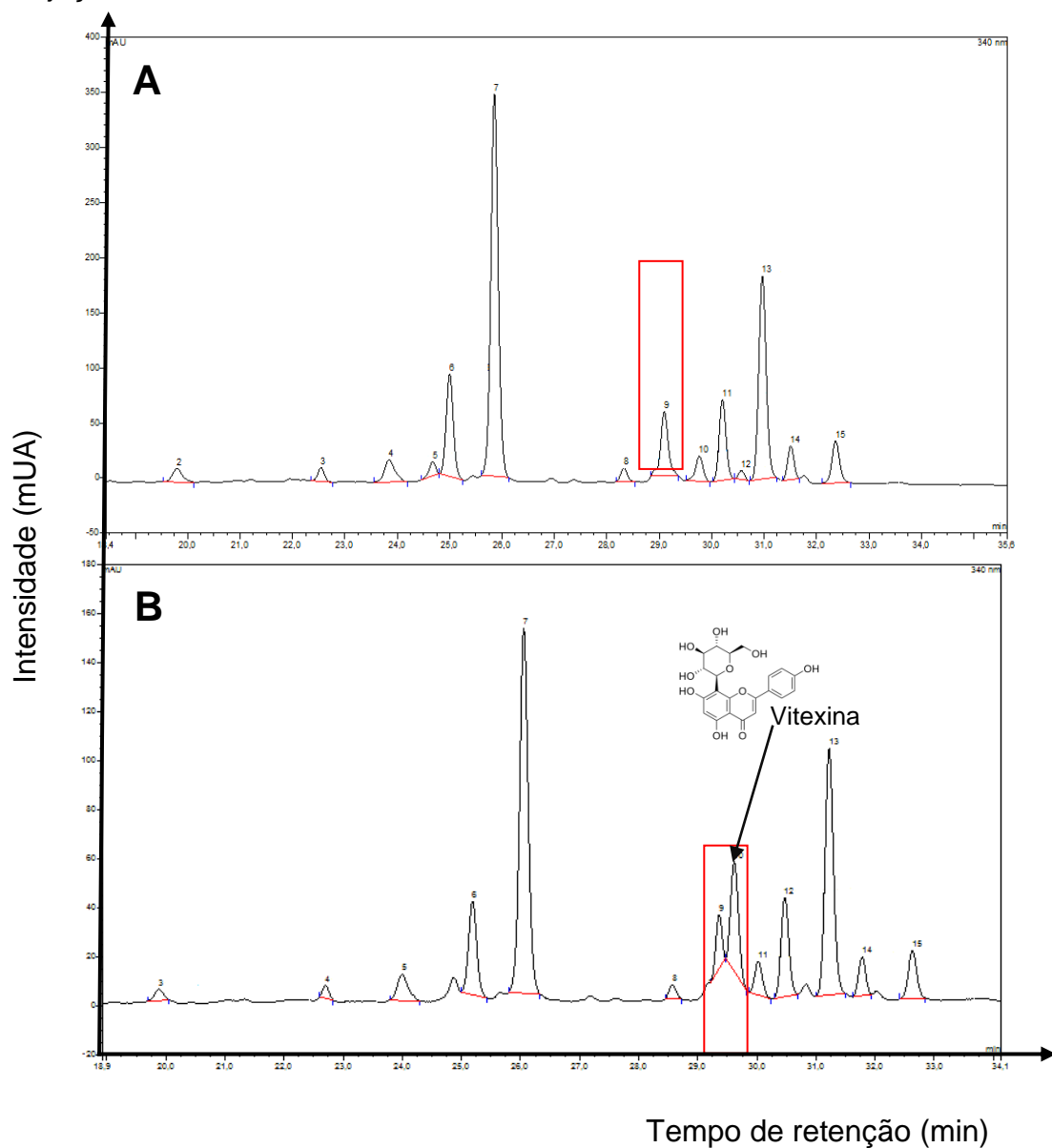
Ao compararmos o cromatograma da Figura 28A com o da Figura 28B, podemos observar que a região referente ao pico 7 da Fr40, correspondente a região dos picos 7 e 8 observado com a co-injeção de orientina está alterado.

Figura 25 - Cromatogramas por HPLC-DAD a 340 nm da Fr40 na ausência ou com co-injeção de isovitexina.



Legenda: Cromatogramas da Fr40 (A) e com co-injeção de isovitexina (B) obtidos por HPLC-DAD a 340 nm. Foi utilizada uma coluna C18 Kromasil 100 Å (4,6 x 250 mm), com fluxo de 1 mL/min e com um gradiente com as fases móveis: A (acetonitrila) e B (ácido acético 1, ajustado ao pH 3.0) da seguinte forma: 0-30 min, variação linear de A-B (5:95 v/v) para A-B (20:80 v/v); 30-40 min, eluição isocrática A-B (20:80 v/v). Foram injetados 10 µL de Fr40 a 1 mg/mL (100 µg) e 10 µL de isovitexina a 25 µg/mL (2,5 µg).

Figura 26 - Cromatogramas por HPLC-DAD a 340 nm da Fr40 na ausência ou com co-injeção de vitexina.



Legenda: Cromatogramas da Fr40 (A) e com co-injeção de vitexina (B) obtidos por HPLC-DAD a 340 nm. Foi utilizada uma coluna C18 Kromasil 100 Å (4,6 x 250 mm), com fluxo de 1 mL/min e com um gradiente com as fases móveis: A (acetonitrila) e B (ácido acético 1, ajustado ao pH 3.0) da seguinte forma: 0-30 min, variação linear de A-B (5:95 v/v) para A-B (20:80 v/v); 30-40 min, eluição isocrática A-B (20:80 v/v). Foram injetados 10 µL de Fr40 a 1 mg/mL (100 µg) e 10 µL de vitexina a 25 µg/mL (2,5 µg).

Tabela 8 – Comparação dos dados dos cromatogramas da Fr40 antes e após a co-injeção de vitexina e isovitexina

Pico	FR40			Pico	Fr40 + vitexina			Pico	Fr40 + Isovitecina		
	TR	Altura pico	Área relativa		TR	Altura pico	Área relativa		TR	Altura pico	Área relativa
2	19,80	12,312	1,79								
3	22,55	12,611	1,22	3	19,88	4,674	1,01	3	19,68	4,464	0,72
4	23,84	20,452	3,13	4	22,70	5,120	0,77	4	22,48	6,927	1,12
5	24,68	12,856	1,19	5	24,00	10,708	2,79	5	23,72	9,958	2,03
6	25,00	92,856	9,62	6	25,19	38,275	7,54	6	24,60	6,519	0,94
7	25,85	346,453	37,12	7	26,06	149,009	31,16	7	24,89	45,176	7,46
8	28,32	12,282	1,21	8	28,57	5,620	0,97	8	25,75	172,075	30,75
9	29,10	58,314	6,49	9	29,36	21,889	3,20	9	28,21	6,670	1,12
10	29,76	22,846	2,52	10	29,62	44,803	8,50	10	29,00	32,092	6,09
11	30,21	73,073	7,31	11	30,02	13,630	2,56	11	29,65	71,278	12,87
12	30,56	8,066	0,69	12	30,47	40,552	7,59	12	30,12	40,875	6,65
13	30,97	184,243	19,96	13	31,22	100,527	20,61	13	30,87	104,102	18,72
14	31,51	30,336	2,77	14	31,78	15,758	2,70	14	31,46	16,290	2,42
15	32,36	37,952	4,29	15	32,63	19,652	3,95	15	32,30	20,991	3,80

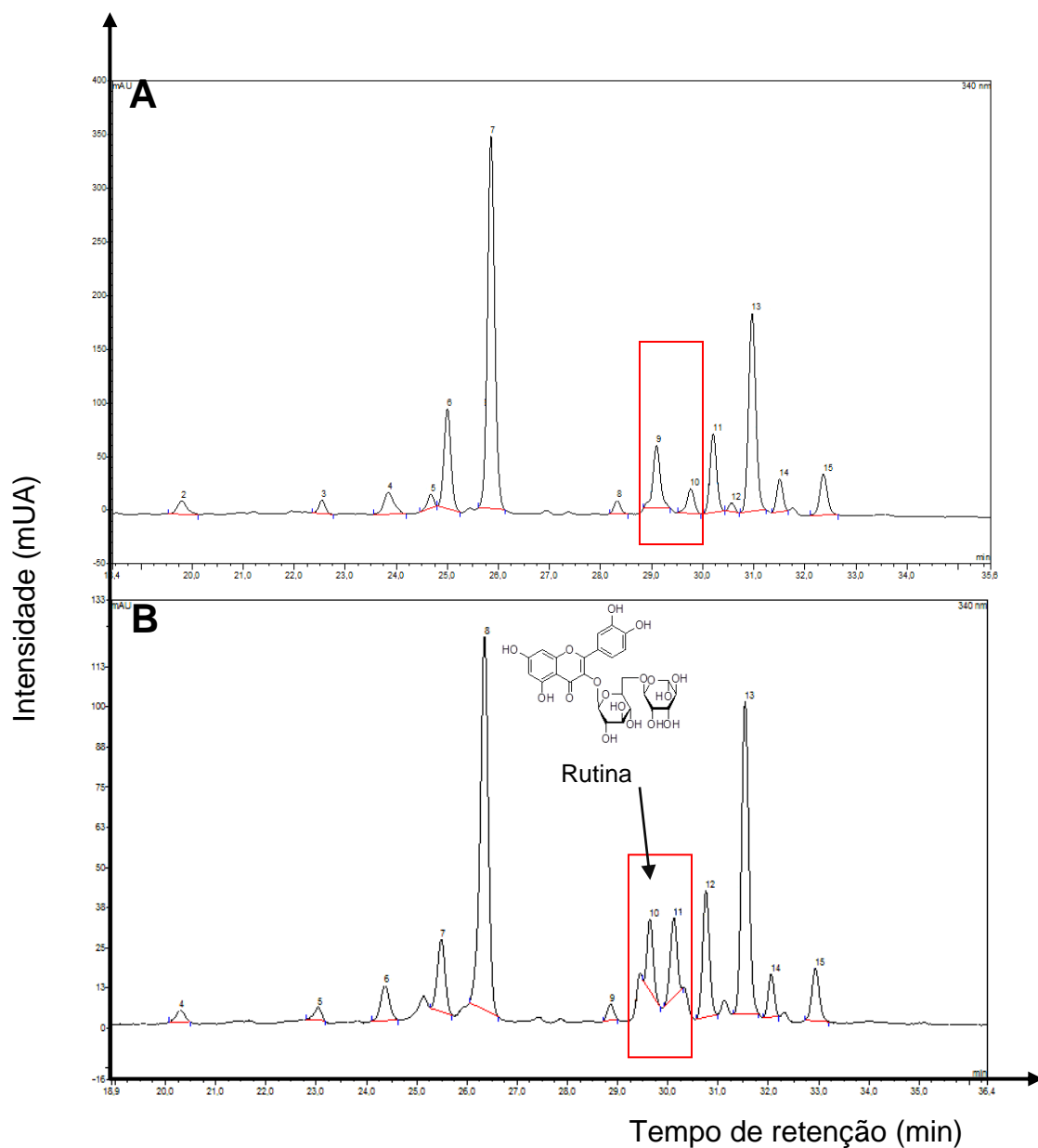
TR = tempo de retenção; altura do pico em mUA (miliunidades arbitrárias); área relativa em %.

Este resultado é melhor observado na Tabela 10, em que a área relativa de 30,62% do pico 7 (TR 26,12 min) da Fr40, se desdobra para 11,99% no pico 6 (TR 26,02 min) e para 10,10%, no pico 7, com TR 26,21 min (em azul), sugerindo que a orientina não deve estar presente na Fr40.

4.5.4.5 Co-injeção de isoorientina

Ao compararmos o cromatograma da Figura 29A com o da Figura 29B, podemos observar que a região referente aos picos 4 e 5 da Fr40, correspondente a região dos pico 4 observado com a co-injeção de isoorientina está muito alterado.

Figura 27 - Cromatogramas por HPLC-DAD a 340 nm da Fr40 na ausência ou com co-injeção de rutina.



Legenda: Cromatogramas da Fr40 (A) e com co-injeção de rutina (B) obtidos por HPLC-DAD a 340 nm. Foi utilizada uma coluna C18 Kromasil 100 Å (4,6 x 250 mm), com fluxo de 1 mL/min e com um gradiente com as fases móveis: A (acetonitrila) e B (ácido acético 1, ajustado ao pH 3.0) da seguinte forma: 0-30 min, variação linear de A-B (5:95 v/v) para A-B (20:80 v/v); 30-40 min, eluição isocrática A-B (20:80 v/v). Foram injetados 10 µL de Fr40 a 1 mg/mL (100 µg) e 10 µL de rutina a 25 µg/mL (2,5 µg).

Tabela 9 – Comparação dos dados dos cromatogramas da FR40 antes e após a co-injeção de rutina.

Pico	FR40			Pico	Fr40 + rutina		
	TR	Altura pico	Área relativa		TR	Altura pico	Área relativa
2	20,10	15,600	1,51	4	20,29	3,703	1,05
3	22,80	17,300	1,33	5	23,04	4,096	0,96
4	24,15	39,111	3,38	6	24,37	11,058	3,21
5	24,92	19,946	1,41	7	25,49	22,620	5,71
6	25,27	88,055	6,31	8	26,35	116,210	31,08
7	26,14	479,471	33,85	9	28,86	5,084	1,05
8	28,59	18,934	1,22	10	29,64	22,415	4,36
9	29,36	101,221	8,03	11	30,12	24,681	5,47
10	30,04	28,397	2,04	12	30,76	39,435	8,75
11	30,48	137,309	8,83	13	31,54	97,354	23,38
12	30,84	15,079	0,84	14	32,06	13,337	2,64
13	31,25	333,971	23,56	15	32,94	16,370	3,98
14	31,79	44,362	2,60				
15	32,67	55,892	4,16				

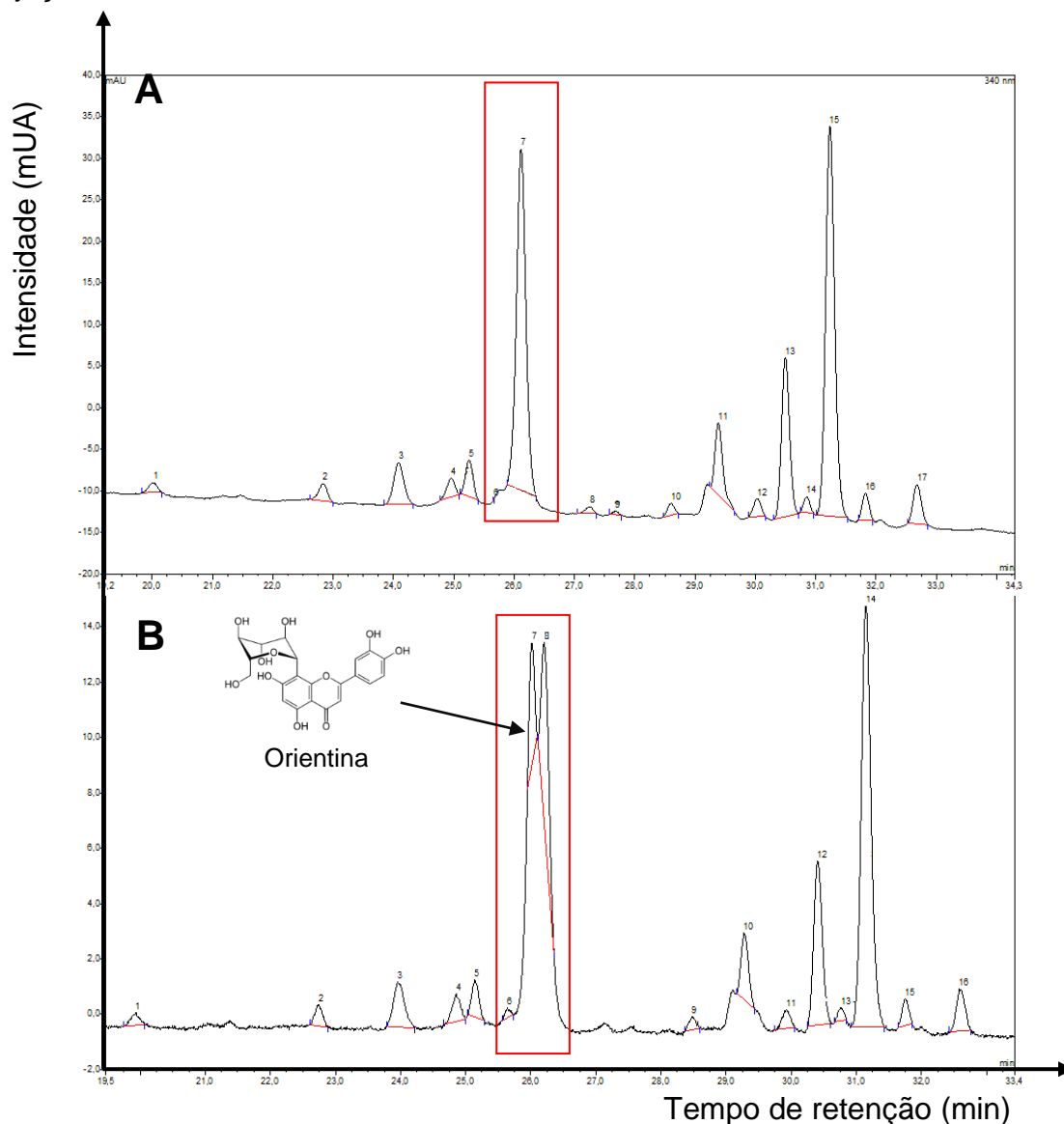
TR = tempo de retenção; altura do pico em mUA (miliunidades arbitrárias); área relativa em %.

Este resultado é melhor observado na Tabela 10, em que as regiões do pico 4 (área relativa de 1,42% com TR 24,96 min) e do pico 5 (2,60% com TR 25,26 min) da Fr40, desaparecem e originam o pico 4 com TR 25,20 min e elevada área relativa de 31,69% (em vermelho), não sendo possível desta forma concluir se a isoorientina está presente na Fr40.

4.5.5 Comparação do EAEm e suas frações com padrões de flavonoides por TLC

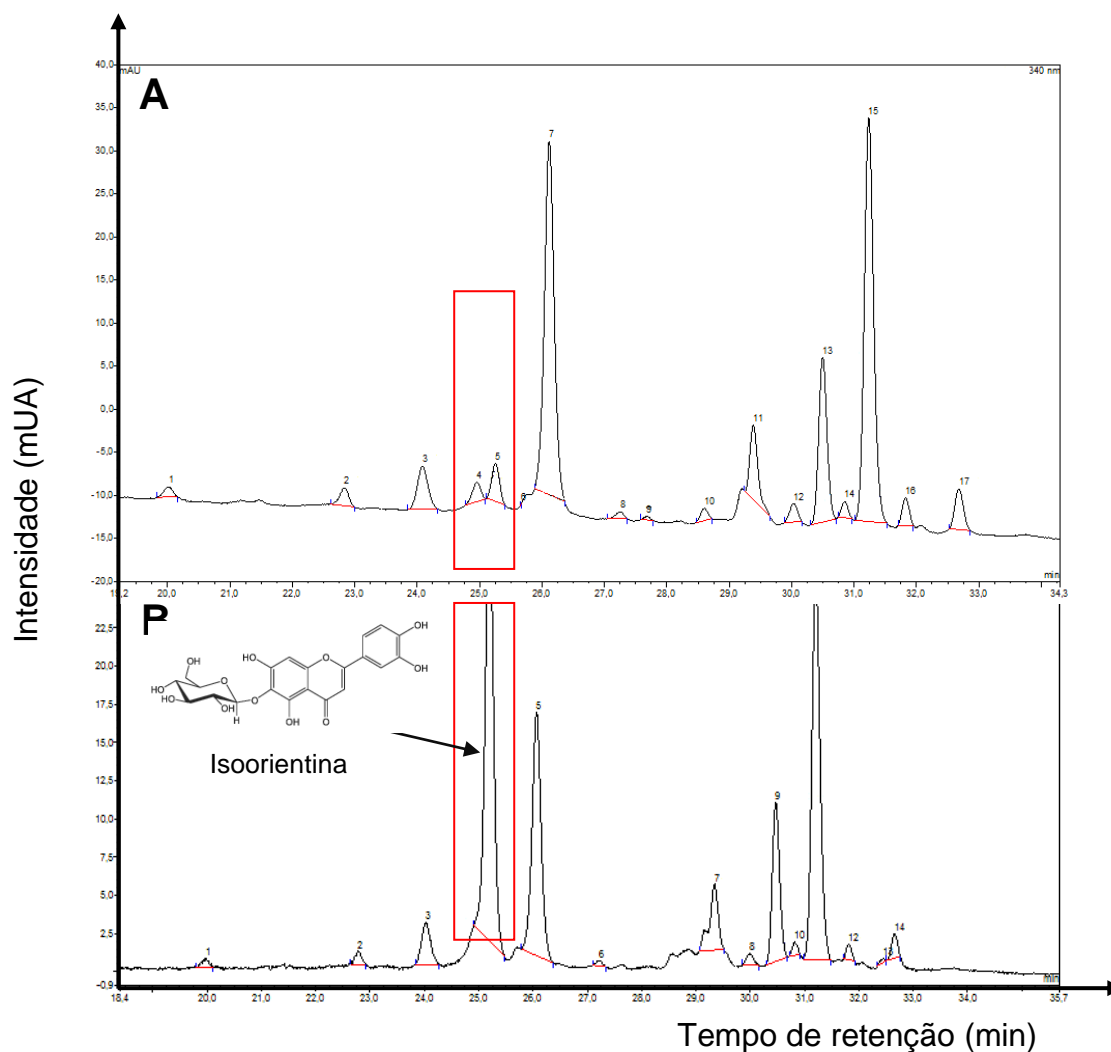
Tendo em vista os resultados obtidos por HPLC com co-injeção dos padrões, foi realizada uma cromatografia em camada delgada (TLC) para comparação dos valores de R_f do Extrato aquoso e suas frações, com os mesmos padrões co-injetados na análise por HPLC-DAD (Figura 30). A análise dos valores de R_f (Tabela 11) sugerem a presença isovitexina e isoorientina na Fr40.

Figura 28 - Cromatogramas por HPLC-DAD a 340 nm da Fr40 na ausência ou com co-injeção de orientina.



Legenda: Cromatogramas da Fr40 (A) e com co-injeção de orientina (B) obtidos por HPLC-DAD a 340 nm. Foi utilizada uma coluna C18 Kromasil 100 Å (4,6 x 250 mm), com fluxo de 1 mL/min e com um gradiente com as fases móveis: A (acetonitrila) e B (ácido acético 1, ajustado ao pH 3.0) da seguinte forma: 0-30 min, variação linear de A-B (5:95 v/v) para A-B (20:80 v/v); 30-40 min, eluição isocrática A-B (20:80 v/v). Foram injetados 10 µL de Fr40 a 1 mg/mL (100 µg) e 10 µL de orientina a 25 µg/mL (2,5 µg).

Figura 29 - Cromatogramas por HPLC-DAD a 340 nm da Fr40 na ausência ou com co-injeção de isoorientina.



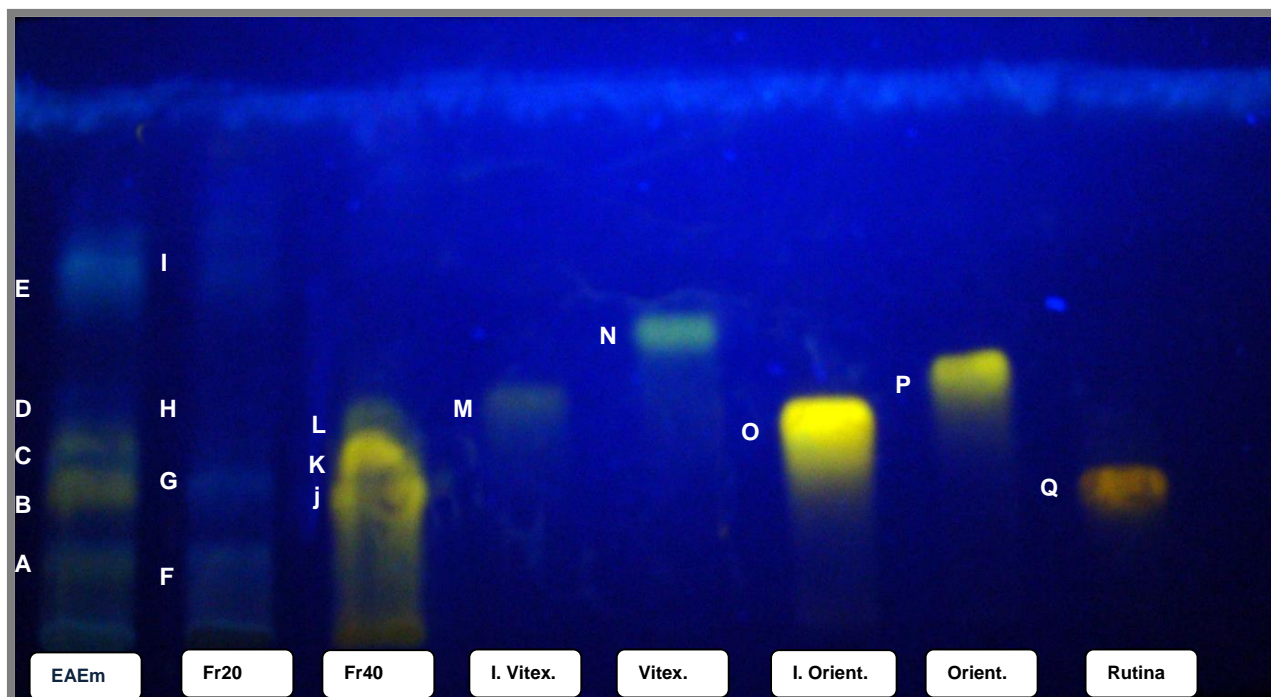
Legenda: Cromatogramas da Fr40 (A) e com co-injeção de isoorientina (B) obtidos por HPLC-DAD a 340 nm. Foi utilizada uma coluna C18 Kromasil 100 Å (4,6 x 250 mm), com fluxo de 1 mL/min e com um gradiente com as fases móveis: A (acetonitrila) e B (ácido acético 1, ajustado ao pH 3.0) da seguinte forma: 0-30 min, variação linear de A-B (5:95 v/v) para A-B (20:80 v/v); 30-40 min, eluição isocrática A-B (20:80 v/v). Foram injetados 10 µL de Fr40 a 1 mg/mL (100 µg) e 10 µL de isoorientina a 25 µg/mL (2,5 µg).

Tabela 10 - Comparação dos dados dos cromatogramas da FR40 antes e após a co-injeção de orientina e isoorientina.

Pico	FR40			Pico	Fr40 + Orientina			Pico	Fr40 + Isoorientina		
	TR	Altura pico	Área relativa		TR	Altura pico	Área relativa		TR	Altura pico	Área relativa
1	20,02	1,192	0,79		22,75	0,613	1,06		19,98	0,640	0,51
2	22,83	2,087	1,42		23,96	1,617	4,74		22,78	0,889	0,76
3	24,09	5,015	4,02	3	24,86	0,832	1,50	3	24,03	2,743	3,20
4	24,96	2,252	1,42	4	25,14	1,446	2,98	4	25,20	28,910	31,69
5	25,26	4,425	2,60	5	25,64	0,382	0,56	5	26,07	15,925	18,80
6	25,66	0,033	0,00	6	26,02	6,559	11,99	6	27,21	0,382	0,27
7	26,12	41,082	30,62	7	26,21	5,636	10,10	7	29,35	4,302	4,86
8	27,26	0,797	0,46	8	29,10	0,511	0,79	8	29,99	0,764	0,68
9	27,68	0,429	0,18	9	29,27	2,226	4,17	9	30,47	10,382	9,79
10	28,60	1,433	0,80	10	29,93	0,609	1,21	10	30,81	0,902	0,58
11	29,38	8,694	5,23	11	30,41	5,892	13,68	11	31,21	25,041	26,82
12	30,03	2,150	1,28	12	30,77	0,533	0,92	12	31,81	1,039	0,70
13	30,50	19,122	12,09	13	31,14	15,222	40,92	13	32,44	0,271	0,16
14	30,85	1,930	0,92	14	31,75	0,966	1,73	14	32,66	1,598	1,19
15	31,24	46,934	33,41	15	32,58	1,547	3,65	15	19,98	0,640	0,51

TR = tempo de retenção; altura do pico em mUA (miliunidades arbitrárias); área relativa em %.

Figura 30 - Comparação do EAEm e frações com padrões de flavonoides por TLC



Legenda: A cromatografia foi desenvolvida em placa de TLC em sílica gel 60 com 10 x 20 cm, utilizando como fase móvel acetato de etila:diclorometano:ac. acético:água (10:2,5:2:1 v/v), revelada com NP-PEG e visualizada sob luz UV a 365 nm.

Tabela 11 - Valores de Rf das Frações de EAEm obtidos por TLC

	Bandas	Rf (cm)
EAEm	A	0,16
	B	0,28
	C	0,37
	D	0,63
	E	0,91
Fr20	F	0,16
	G	0,29
	H	0,67
	I	0,75
Fr40	J	0,31
	K	0,34
	L	0,40
Isovitexina	M	0,41
Vitexina	N	0,47
Isoorientina	O	0,35
Orientina	P	0,43
Rutina	Q	0,22

Legenda: Rf dos padrões, Frações e de EAEm obtidos por TLC

5 DISCUSSÃO

O fitoterápico é uma classe de medicamento largamente utilizado no país e constitui um mercado em potencial expansão (Carvalho *et al.*, 2008). Além disso, as empresas farmacêuticas estão cada vez mais investindo em formulações à base de plantas para o tratamento de diversas doenças e distúrbios em todo o mundo (Johnson *et al.*, 2003). O metabolismo secundário dos vegetais é o responsável pela produção de substâncias particulares a cada espécie, chamadas de princípios ativos dos vegetais (Botsaris, 1995; Ikan, 1996).

A espécie *Echinodorus macrophyllus*, uma planta conhecida popularmente como chapéu de couro, apresenta atividade anti-inflamatória sugerida pelo uso medicinal popular. Castro (2004) relatou o potencial antiedematogênico e antinociceptivo do EAEm e Fernandes (2006; 2010) observou o potencial anti-inflamatório neurogênico, além de detectar a presença de polifenóis, flavonoides e seu potencial antioxidante, o que fundamentou a base para o presente estudo.

Como esta planta é preparada pela população sob a forma de chá (infusão em água), os experimentos deste estudo foram elaborados a partir do extrato liofilizado e preparado por extração aquosa do material botânico, que foi fracionado por meio de técnicas cromatográficas com o objetivo de separar seus compostos. O extrato hexânico (EHEm), foi obtido por maceração das folhas secas e picadas, com trocas sucessivas de n-hexano 95%. O extrato aquoso apresentou maior rendimento do que o extrato hexânico, indicando a predominância de moléculas polares na planta.

O fracionamento do EAEm foi realizado em coluna aberta preenchida com resina Sephadex LH-20 (fase estacionária). Esta foi especialmente desenvolvida para filtração molecular de produtos naturais como esteroides, terpenoides, lipídios e peptídeos de baixo peso molecular (abaixo de 35 resíduos de aminoácidos) (Henke, 1994). A Sephadex LH-20 é composta por grãos de dextrano entrecruzados que foram hidroxipropilados para ter ambas as características hidrofílicas e lipofílicas. Devido a este duplo caráter, ela pode ser utilizada com água e com vários solventes orgânicos. A escolha do solvente tem grande influência na separação dos componentes da amostra, em que o procedimento escolhido pode ser por partição entre as fases estacionária e móvel quando utilizamos esta resina (Henke, 1994).

Como foi realizada uma eluição da coluna com solventes em concentração com redução de polaridade, houve um enriquecimento da fração eluída no início do fracionamento, resultando em duas frações: Fr20 e Fr40, sendo que a Fr20 foi a que apresentou maior rendimento (Tabela 1) e isto se deve ao fato do EAEm ter forte característica polar em seus constituintes químicos.

O próximo passo foi o biomonitoramento utilizando os modelos experimentais de nocicepção, tais como, o de contorção abdominal induzido por ácido acético, modelo de formalina e o de imersão da cauda em banho a 50°C (*Tail-flick ou tail-immersion test*).

O modelo de contorção abdominal induzido por ácido acético, adaptado de Koster e colaboradores (1959), é um método utilizado rotineiramente e sensível para o *screening* da eficácia de agentes analgésicos periféricos, sendo este modelo mais sensível a analgésicos não-esteroides (Collier *et al.*, 1963). A hiperalgesia causada pelo ácido acético é explicada devido à liberação e aumento do nível de vários mediadores, como a histamina e serotonina que atuam por estimulação dos neurônios nociceptivos periféricos (Cui *et al.*, 2010).

A atividade antinociceptiva apresentada pelo tratamento com EAEm na dose de 25 e 50 mg/kg, foi observada pela inibição das contorções induzidas por ácido acético em 75% e 55% respectivamente (Figura 14A). O tratamento com EHEm inibiu o número de contorções significativamente em todas as doses testadas, porém a dose de 25 mg/kg apresentou melhor eficiência, com 52% de inibição do número de contorções (Figura 14B). Já o tratamento com a Fr20, mostrou inibição moderada das contorções com o tratamento em duas doses testadas (Figura 15A). O melhor desempenho foi observado no tratamento com a dose de 25 mg/kg da Fr40 (Figura 15B), que inibiu 98% das contorções. Borgi e colaboradores (2008), testaram frações obtidas a partir das folhas de *Zizyphus lotus* (L.) Lam., ricas em flavonoides no modelo experimental de algisia induzida por ácido acético e em uma dose de 200 mg/kg obteve inibição de 88% das contorções. Em outro estudo, Couto (2011) descreveu uma inibição de 63% e 80,2%, para doses de 100 e 300 mg/kg de

Como foi realizada uma eluição da coluna com solventes em concentração com redução de polaridade, houve um enriquecimento da fração eluída no início do fracionamento, resultando em duas frações: Fr20 e Fr40, sendo que a Fr20 foi a que apresentou maior rendimento (Tabela 1) e isto se deve ao fato do EAEm ter forte característica polar em seus constituintes químicos.

O próximo passo foi o biomonitoramento utilizando os modelos experimentais de nocicepção, tais como, o de contorção abdominal induzido por ácido acético, modelo de formalina e o de imersão da cauda em banho a 50°C (*Tail-flick ou tail-immersion test*).

O modelo de contorção abdominal induzido por ácido acético, adaptado de Koster e colaboradores (1959), é um método utilizado rotineiramente e sensível para o *screening* da eficácia de agentes analgésicos periféricos, sendo este modelo mais sensível a analgésicos não-esteroides (Collier *et al.*, 1963). A hiperalgesia causada pelo ácido acético é explicada devido à liberação e aumento do nível de vários mediadores, como a histamina e serotonina que atuam por estimulação dos neurônios nociceptivos periféricos (Cui *et al.*, 2010).

A atividade antinociceptiva apresentada pelo tratamento com EAEm na dose de 25 e 50 mg/kg, foi observada pela inibição das contorções induzidas por ácido acético em 75% e 55% respectivamente (Figura 14A). O tratamento com EHEm inibiu o número de contorções significativamente em todas as doses testadas, porém a dose de 25 mg/kg apresentou melhor eficiência, com 52% de inibição do número de contorções (Figura 14B). Já o tratamento com a Fr20, mostrou inibição moderada das contorções com o tratamento em duas doses testadas (Figura 15A). O melhor desempenho foi observado no tratamento com a dose de 25 mg/kg da Fr40 (Figura 15B), que inibiu 98% das contorções. Borgi e colaboradores (2008), testaram frações obtidas a partir das folhas de *Zizyphus lotus* (L.) Lam., ricas em flavonoides no modelo experimental de algesia induzida por ácido acético e em uma dose de 200 mg/kg obteve inibição de 88% das contorções. Em outro estudo, Couto (2011) descreveu uma inibição de 63% e 80,2%, para doses de 100 e 300 mg/kg de extrato de *Emilia sonchifolia* (L.) DC. Estes dados da literatura permitem inferir que os extratos brutos e as frações do EAEm possuem uma atividade antinociceptiva superior em menores doses para este modelo experimental.

Esta atividade antinociceptiva pode estar relacionada à inibição da liberação de mediadores em resposta ao ácido acético, como a bradicinina, substância P, prostaglandinas e algumas citocinas como Interleucina 1Beta (IL-1 β), TNF- α e Interleucina 8 (IL-8) (Correa *et al.*, 1996; Ribeiro *et al.*, 2000; Ikeda *et al.*, 2001; Vanderlei *et al.*, 2010).

Arslan e colaboradores (2010) descreveram que ácidos triterpenoides, flavonoides e compostos fenólicos possuem efeitos analgésico e anti-inflamatório em

modelos animais. Reforçando esta idéia, outros estudos têm demonstrado que flavonoides como rutina, quercetina e luteolina tem atividade antinociceptiva bastante significativa (Deliorman *et al.*, 2007).

Os efeitos antinociceptivos dos extratos e frações de *E. macrophyllus* também foram verificados sobre o comportamento nociceptivo espontâneo induzido por injeção intraplantar de formalina na pata traseira do camundongo.

O modelo de formalina é comumente usado para observar dor inflamatória aguda, em que as lambidas e mordidas, na pata traseira afetada, são observadas em duas fases distintas (Dubuisson e Dennis, 1977). A primeira e segunda fase, acredita-se refletir a excitação de nociceptores aferentes periféricos e sensibilização central, respectivamente (Dickenson e Sullivan, 1987; Yaksh *et al.*, 2001). Enquanto a primeira (fase neurogênica) e segunda fase (fase inflamatória) são atenuadas por opioides (para revisão, ver Yaksh *et al.*, 2001), a segunda fase é atenuada por inibidores seletivos de cicloxigenases. Como outras substâncias que atuam sobre o SNC, os extratos foram ativos em todas as doses tanto na fase neurogênica quanto inflamatória Figuras 16 A e B). A Fr20 (Figura 17A) foi ativa nas duas fases do modelo de formalina, chegando a 100% de redução da nocicepção na fase inflamatória e na primeira fase todas as doses testadas reduziram a nocicepção eficientemente. Em outro estudo Vilela e colaboradores (2009), descreveram uma inibição significativa em tratamentos com doses de 30 e 300 mg/kg de extrato de *Sonchus oleraceus* L.. Este dado da literatura permite inferir que os extratos EAEm, EHEm e as frações do EAEm possuem uma atividade antinociceptiva superior em doses menores ou igual a 100 mg/kg para este modelo experimental.

O outro modelo experimental utilizado foi o modelo de imersão da cauda em banho a 50°C, que tem sido usado para analisar o comportamento a respostas de estímulos térmicos nocivos. Os resultados nos mostram que o tratamento com EAEm não produziu nenhum efeito antinociceptivo neste modelo (Figura 18B). Já o tratamento com EHEm, na dose de 50 mg/kg, reduziu a nocicepção nos tempos de 60 e 90 minutos (Figura 18A). Para os animais tratados com a Fr20, observou-se o efeito antinociceptivo em todas as doses testadas no tempo de 90 minutos (Figura 19A) e a Fr40 (Figura 19B) apresentou maior eficiência no tempo de 90 min na maior dose. Estes dados são bastante expressivos, quando comparados a alguns resultados descritos na literatura com o mesmo modelo, em que se observam

tratamentos com doses a partir de 100 mg/kg, que seriam concentrações altas, para se observar uma atividade antinociceptiva (Vilela *et al.*, 2009; Couto *et al.*, 2011).

O uso da medicina tradicional é amplamente difundido e as plantas ainda apresentam uma grande fonte de antioxidantes naturais que podem servir como direcionamento para o desenvolvimento de novos medicamentos. Ácidos triterpenoides, flavonoides e compostos fenólicos possuem efeitos analgésicos (Arslan *et al.*, 2010). E seguindo por esta linha, em outros estudos realizados em nosso laboratório, foi determinado o teor de polifenóis e flavonoides e também o poder redutor dos compostos do *E. macrophyllus*.

Sabendo que a ocorrência do estresse oxidativo tem sido descrita em vários modelos experimentais de nocicepção, e este tem sido implicado como um mecanismo na indução e manutenção da dor (Kim *et al.*, 2004; Rossato *et al.*, 2011), esta hipótese reforça o fato de que algumas substâncias antioxidantes apresentam efeitos antinociceptivos em ambos, alodinia mecânica e hiperalgesia térmica (Kim *et al.*, 2004; Rossato *et al.*, 2010).

Os mecanismos precisos envolvidos na resposta antinociceptiva dos extratos e frações de *E. macrophyllus* não estão completamente compreendidos, mas eles podem estar relacionados a presença de flavonoides e outros compostos aromáticos.

Com o objetivo de avaliar a citotoxicidade do EAEm, EHEm, Fr20 e Fr40, utilizou-se o ensaio que avalia pela redução do MTT a viabilidade celular utilizando células da linhagem de neuroblastoma NEURO 2-A. A quantidade de produto formazan é proporcional ao número de células viáveis (Gentile *et al.*, 2004). Os resultados mostraram que o EAEm (Figura 20A) foi o que apresentou maior redução da atividade redutora mitocondrial (ARM) em função da concentração, sendo calculado um IC₅₀ de 36,15 µg/mL e que a Fr40 (Figura 21B) não interferiu na atividade redutora mitocondrial na maioria das concentrações testadas. Shih e colaboradores (2009) relataram resultados expressivos com este ensaio apresentando baixa citotoxicidade dos extratos testados obtidos a partir da batata doce e um efeito indutor da proliferação celular.

Os compostos dos extratos e frações da *Echinodorus macrophyllus* apresentaram atividade antinociceptiva em modelos de nocicepção gerados por um produto químico ou por estímulo nocivo térmico, em diferentes respostas nociceptivas. A Fr40, apresentou atividade antinociceptiva em todos os modelos

avaliados e menor citotoxicidade, sendo assim escolhida para o estudo de mecanismo de ação no modelo de ácido acético, na dose de 25 mg/kg, a qual foi a dose mais ativa nos testes avaliados.

Intencionou-se avaliar algumas vias de ação antinociceptiva utilizando modelo de contorção induzida por ácido acético 0,06%, com tratamentos com agonistas e antagonistas para melhor compreensão do mecanismo de redução da dor induzida pela Fr40 de *E. macrophyllus*. Está bem estabelecido que o ácido acético ou formalina induz dor visceral nos animais através da estimulação do nervo sensorial aferente primário e as fibras nervosas C (Collier *et al.*, 1963;. Shibata *et al.*, 1989.; Sawynok, 2003).

Uma função importante do sistema opiáceo é a de modulação da percepção da dor. Os receptores- δ são responsáveis primariamente pela analgesia, mas também por modular funções cognitivas e de dependência física. Estão localizados nos núcleos pontinos, amígdalas, bulbo olfatório, córtex cerebral profundo e nos neurônios sensitivos periféricos (Martins *et al.*, 2012). Estes receptores, na membrana celular, são acoplados à proteína G. Quando estimulados por um fármaco opioide (morfina), ocorre a inibição da enzima adenilato ciclase, reduzindo o nível intracelular de adenosina monofosfato cíclico. Com isso há o fechamento dos canais de cálcio dependentes de voltagem nas terminações pré-sinápticas, reduzindo a liberação de neurotransmissores e ainda a ativação dos receptores, porém não os canais de K^+ da membrana pós-sináptica. Isso causa uma hiperpolarização desse neurônio, bloqueando parcialmente a transmissão do estímulo doloroso (Martins *et al.*, 2012).

O mecanismo opiáceo foi avaliado (Tabela 2) utilizando como controles a morfina (agonista opioide) e a naloxona (antagonista). A naloxona não interferiu nas contorções abdominais quando comparada ao grupo controle e foi capaz de reverter em 61% o efeito da morfina. Embora a Fr40 tenha reduzido em 75,13% o número de contorções em relação ao grupo controle, seu efeito não foi revertido pela naloxona, o que sugere, que a Fr40 não atue pela via opiácea. Marcon e colaboradores (2009) avaliaram a atividade antinociceptiva de *P. kleinii* (Burseraceae), que inibiu 85% das contorções. Porém, este efeito antinociceptivo não foi revertido pela naloxona, um antagonista de receptor opióide não selectivo.

A clonidina é um fármaco agonista dos receptores α -2adrenérgicos pré-sinápticos, os quais estão presentes em estruturas do sistema nervoso periférico e central, mais precisamente no cérebro, medula espinhal e gânglios das raízes dorsais. Todos estes sítios estão potencialmente implicados nos efeitos antinociceptivos da clonidina. Sabe-se que sua ação simpatolítica em estruturas espinhais e supraespinhais responsáveis pela modulação do estímulo doloroso resulta em analgesia eficaz (Mason, 2004; Flores *et al.*, 2012).

Classicamente, a clonidina tem sido utilizada por via sistêmica e no neuroeixo. Seu uso terapêutico, entretanto, tem sido limitado por efeitos adversos como sedação, boca seca, hipotensão e hipertensão rebote (Mason, 2004). Sabe-se que receptores α -2-adrenérgicos são expressos em neurônios sensoriais nociceptivos primários e que a atuação periférica destes receptores reproduz antinocicepção. Esta observação originou a hipótese de que a administração de clonidina tem efeito antinociceptivo (Heyneman *et al.*, 2000; Mason, 2004). Os nervos periféricos lesados apresentam sensibilidade adrenérgica aumentada e a presença de agonistas adrenérgicos, como a noradrenalina, pode aumentar suas descargas ectópicas, resultando em maior sensação dolorosa. Estudos demonstram que a ativação dos receptores α -2 adrenérgicos periféricos pela clonidina reduz a liberação local de catecolaminas, diminuindo a dor e a alodinia (Heyneman *et al.*, 2000; Mason, 2004).

O mecanismo adrenérgico foi avaliado (Tabela 3) empregando o modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético e utilizando como controles a ioimbina (antagonista) e a clonidina (agonista). A ioimbina não interferiu nas contorções abdominais quando comparada ao grupo controle e foi capaz de reverter em 80,4% do efeito da clonidina. A Fr40 reduziu em 75,13% o número de contorções em relação ao grupo controle, e seu efeito foi revertido em 60,2% pela ioimbina, o que sugere que esta fração não atue somente no mecanismo adrenérgico, com possível sinergia com outros mecanismos de ação antinociceptiva.

O possível envolvimento da ativação da guanilato ciclase e geração de GMPc foi avaliado (Tabela 4) empregando o modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético e utilizando o ODQ como inibidor da enzima. O ODQ não interferiu nas contorções abdominais quando comparado ao grupo controle ($p > 0,05$). A Fr40 reduziu em 75,13% o número de contorções em relação ao grupo controle, e seu efeito não foi revertido pelo ODQ.

Estudos demonstram que o óxido nítrico (NO) modula a transmissão sináptica tanto no sistema nervoso central, bem como no sistema periférico (Salter *et al.*, 1996; Jain *et al.*, 1999). Nas terminações nervosas o NO é produzido pela NO sintase neuronal, podendo difundir-se para o meio extracelular ativando a guanilato ciclase, induzindo a formação de GMPc. Autores relatam que dependendo das condições experimentais o NO pode produzir efeito pró-nociceptivo e antinociceptivo (Sakurada *et al.*, 1996).

A contribuição do NO para o efeito antinociceptivo da Fr40 foi avaliada (Tabela 5) empregando o modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético e utilizando o 7-NI, um inibidor da NOs neuronal (antagonista competitivo), por competir com a L-arginina (substrato pela ligação à enzima NOs neuronal).

A 7-NI não interferiu nas contorções abdominais quando comparado ao grupo controle. A Fr40 reduziu em 75,13% o número de contorções em relação ao grupo controle, e seu efeito foi parcialmente revertido (65,4%) pelo 7-NI.

A análise do cromatograma do EHEm obtido por cromatografia em fase gasosa e acoplada a espectrômetro de massas (Figura 22), resultou na identificação dos compostos do extrato, em que podemos observar os componentes majoritários: o ácido palmítico (36,67%) e o esqualeno (23,28%) mostrados na (Tabela 6). O esqualeno é um membro da classe dos terpenos e tem considerável potencial para diversas aplicações farmacêuticas. É utilizado como agente protetor, diminuindo os efeitos colaterais induzidos por quimioterapia, melhora a resposta imune, reduz o efeito das espécies reativas de oxigênio (Reddy e Couvreur, 2009).

Para melhor avaliação do conjunto de compostos que constituem o EAEm e a Fr20 e Fr40, procedeu-se a análises dos perfis cromatográficos por HPLC – DAD em coluna C18 (Figura 24 e Tabela 7) e monitorados em 340 nm. Estes apresentaram diferenças importantes com picos principais característicos para cada analito e menor complexidade de componentes na Fr40 (Figura 24).

Como priorizou-se a Fr40 por sua maior eficiência nos ensaios *in vivo* e *in vitro*, esta também foi escolhida para análise dos perfis cromatográficos por HPLC–DAD em coluna C18 com alguns padrões marcadores do gênero *Echinodorus*. Como relatado por Pimenta (2002), enquanto o ácido echinoico era predominante na fração hexânica, a isoorientina, isovitexina e ácido ferrúlico eram predominantes no extrato etanólico da espécie *E. grandiflorus*.

A partir destas informações realizou-se a análise da Fr40 com co-injeções de isovitexina, vitexina, rutina, orientina e isoorientina. As análises dos compostos da Fr40 por HPLC–DAD foram realizadas segundo protocolo proposto por Costa e colaboradores (2010).

Foi detectado na Fr40 a presença de Isoviteína com TR 29,65 min observados na Figura 25 A-B e Tabela 8. Os demais padrões co-injetados: vitexina (Figura 26 A-B e Tabela 8), rutina (Figura 27-B e Tabela 9), orientina e isoorientina (Figura 28A-B e Tabela 10), foram observados nos cromatogramas, porém sem que se possa afirmar sua presença ou ausência. Por análise do cromatograma obtido por TLC, confirmamos a presença de isovitexina e de isoorientina. Outras análises deverão ser realizadas para a identificação dos componentes presentes nesta fração, como por exemplo, por HPLC-MS ou HPLC-NMR.

O presente estudo mostrou o efeito antinociceptivo do extrato e frações de *Echinodorus macrophyllus* em diferentes respostas nociceptivas geradas por um produto químico ou por estímulo nocivo térmico e nenhum trabalho a respeito da presença dos flavonoides identificados neste estudo, para a espécie *E. macrophyllus* foi encontrado na literatura.

CONCLUSÃO

- O EAEm foi fracionado resultando em duas frações nomeadas Fr20 e Fr40;
- O EHEm, EAEm e suas frações Fr20 e Fr40 apresentaram inibição significativa do número de contorções induzidas por ácido acético de 96%, sendo a Fr40, a de maior eficiência, com inibição das contorções em todas as doses testadas;
- No modelo de formalina, o EHEm, EAEm e suas frações Fr20 e Fr40 inibiram as fases neurogênica e inflamatória. A fração Fr20 foi a mais ativa inibindo até 100% da nocicepção na fase inflamatória;
- No modelo de imersão da cauda em banho a 50°C, o tratamento com EHEm mostrou eficiência apenas no tratamento com a dose de 50 mg/kg (60 e 90 min) e o EAEm não teve atividade. A Fr20 aumentou o tempo de latência em 90 min nas três doses administradas (25, 50 e 100 mg/kg) e a Fr40 apenas na maior dose (100 mg/kg) nos tempos de 60, 90 e 180 min;
- Estudos de citotoxicidade *in vitro* com células NEURO 2-A mostraram que o EAEm foi o que apresentou maior redução da ARM (IC₅₀ de 36,15 µg/mL), o EHEm e a Fr20 reduziram a ARM em até 49% e 38,1%, respectivamente e a Fr40 não interferiu na ARM na maioria das concentrações testadas;
- A Fr40 apresentou atividade antinociceptiva em todos os modelos avaliados e menor citotoxicidade, sendo assim escolhida para o estudo de mecanismo de ação no modelo de ácido acético, na dose de 25 mg/kg, a qual foi a dose mais ativa nos testes avaliados;
- A Fr40 não atuou pela via opiácea, não sendo o seu efeito antinociceptivo (75,13%) revertido pela naloxona;
- O efeito antinociceptivo da Fr40, parece envolver em parte a ativação adrenérgica, já que o seu efeito antinociceptivo (75,13%) foi parcialmente revertido em 60,2% pela ioimbina.
- O óxido nítrico parece contribuir para o efeito antinociceptivo da Fr40, parcialmente reduzido pelo 7-NI (65,4%). Entretanto, a ativação da guanilato ciclase, não está envolvida nesta resposta.
- A análise fitoquímica do EHEm por GC-MS identificou seus constituintes, sendo majoritários o ácido palmítico e o esqualeno.

- A análise da Fr40 por HPLC-DAD com coinjeção de padrões de flavonoides marcadores do gênero e por TLC revelaram a presença de isovitexina e de isoorientina.

REFERÊNCIA

- Agra MF, Freitas, PF., Barbosa-Filho JM. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Braz. J. Pharmacog.* 2007; 17:114–140
- Akerele O. Medicinal plants and primary health care: an agenda for action. *Phytotherapy* 1988;9(5):355–363.
- Alberts AC, Sharp TR, Werner DI and Weldon PJ. Seasonal variation of lipids in femoral gland secretions of male green Iguanas (*Iguana iguana*). *J. Chem. Ecol.* 1992; 18:703–712.
- Albuquerque UP, Monteiro JM, Ramos MA, Amorim ELC. Medicinal and magic plants from a public market in northeastern Brazil. *J. Ethnopharmacol.* 2007;110: 76–91.
- Amorozo MCM. Uso e diversidade de plantas medicinais em Santo Antônio do Levenger MT Brasil. *Acta Botân. Bras.* 2002;16:189–203.
- Angelo PM, Jorge N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* 2007; 66:232–240.
- Arslan R, Bektas N, Ozturk Y. Antinociceptive activity of methanol extract of fruits of *Capparis ovata* in mice. *J. Ethnopharmacol.* 2010; 131: 28–32.
- Azaizeh H, Saad B., Cooper E., Said O. Traditional Arabic and Islamic Medicine, a re-emerging health aid. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2010; 7:419–424.
- Begoss A, Hanazaki N, Yamashiro JY. Medicinal plants in the Atlantic Forest (Brazil): knowledge, use and conservation. *Kuman Ecol.* 2002; 30: 281–299.
- Brazilian Ministry of Health [Official Website of the Health Ministry of Brazil]. Available from: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=28757&janela=1 (accessed 13.12.11).
- Brazilian Ministry of Health [Official Website of the Health Ministry of Brazil]. RENISUS – National List of Medicinal Interest to SUS. May 10, 2009. Available from: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf> (accessed 10.12.11).

Brazilian Ministry of Health [Official Website of the Health Ministry of Brazil]. Document nº 971. Approval of the National Policy on Integrative and Complementary Practices (PNPIC) in the Health System. May 2, 2006. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/PNPIC.pdf> (acesso 12.05.11).

Bonica JJ, Yaksh T, Liebeskind JC, Pechnick RN, Depaulis A. Biochemistry and modulation of nociception and pain. In: Bonica, JJ Ed. The management of Pain, 2nd Ed, Vol. 1, Malvern, Lea & Febiger, 1990; 95-121.

Borgi W, Recio, MC, Ríos, JL, Chouchane, N. Anti-inflammatory and analgesic activities of flavonoid and saponin fractions from *Zizyphus lotus* (L.) Lam. S. Afr. J. Bot., 2008; 74: 320–324.

Botsaris AS. Fitoterapia chinesa e plantas brasileiras. Editora ícone, 1995.

Brandão MGL, Cosenza GP, Stanislau AM, Fernandes GW. Influence of Brazilian herbal regulations on the use and conservation of native medicinal plants. Environ. Monit. Assess. 2010;164: 369–377.

Brandão MGL, Diniz BG, Monte-Mór RLM. Plantas medicinais: um saber ameaçado. Ciên. Hoje 2004; 35: 64–66.

Breivik H, Collett B, Ventafridda, V, Cohen R, Gallacher D. Survey of chronic pain in Europe: prevalence, impact on daily life, and treatment. Eur. J. Pain 2006; 10: 287–333.

Bruneton J, Mann J, Robbers JE, Samuelsson G. Metabolismo Vegetal Secundário. In: Simões CMO, Schenkel EP., Gosmann G., Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. Farmacognosia: Da planta ao medicamento. 6^a Ed. Brasil. UFRGS & UFSC Eds, 2007; 411.

Buck ML, Michel RS. Talking with families about herbal therapies. J. Pediat. 2000; 136: 673–678.

Butler MS. The Role of Natural Product Chemistry in Drug Discovery. J. Nat. Prod. , 2004; 67: 2141–2153.

Calixto JB. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). Braz. J. Med. Biol. Res. 2000; 33: 179–189.

Calixto JB. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view. J. Ethnopharmacol. 2005;100: 131–134.

Carvalho ACB, BalbinoEE, Maciel A, Perfeito JPS. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. Rev. Bras. Farmacog. 2008;18(2): 314–319.

Castro FL. Biomonitoramento da atividade imunoinflamatória do extrato aquoso de *Echinodorus macrophyllus* (EAEm) e suas frações. Dissertação de Mestrado, PG-Biologia-UERJ, 2006.

Castro FL. Atividade antiedematogênica e antinociceptiva do extrato aquoso de folhas de *Echinodorus macrophyllus*. Monografia de conclusão da graduação em Biologia, UERJ, 2004.

Cechinel Filho V, Yunes RA. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. Quím. Nov. 1998; 21: 99–105,

Chan EKF, Rowe HC, Hansen BG., Kliebenstein DJ. The complex genetic architecture of the metabolome. PLoS. Genet. 2010; 1001: 198.

Chirinos R, Betalleluz-Pallardel I, Huamán A, Arbizu C, Pedreschi R, Campos D. HPLC–DAD characterization of phenolic compounds from Andean Oca (*Oxalis tuberosa* Mol.) tubers and their contribution to the antioxidant capacity. Food. Chem. 2009; 113: 1243–1251.

Collier HOJ, Dineen LC, Johnson CA, Schneider C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. Brit. J. Pharmacol. 1963; 32: 295–310.

Correa CR, Kyke DJ, Chakraverty S, Calixto JB. Antinociceptive profile of the pseudopeptide B2 bradykinin and its receptor antagonist NPC18688 in mice. Br. J. Pharmacol. 1996; 8: 117–552.

Costa GM, Ortmann CF, Schenkel EP, Reginatto FH. An HPLC-DAD Method to Quantification of Main Phenolic compounds from Leaves of *Cecropia Species*. Braz. Chem. Soc. 2010; 22: 1096–1102.

Costa, M., Tanaka, C.M.A., Imamura, P.M., Marsaioli, A.J. Isolation and synthesis of a new Clerodane from *Echinodorus grandiflorus*. Phytochem. 50: 117–121, 1999.

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

Cui J, Hu W, CAI Z, Liu Y, Lis S, Tao W, Xiang H. New medicinal properties of mangostins: analgesic activity and pharmacological characterization of active ingredients from the fruit hull of *Garcinia mangostana* L. Pharmacol. Biochem. Behav. 2010; 95: 166–172.

Dawson-Saunders B, Trap RG. 2nd ed. New York: Oxford University Press; 1994. Basic and Clinical Biostatistics. 2nd ed. Norwalk, CT: Appleton & Lange; 1994.

Deliorman OD, Hartevioğlu A, Küpeli E, Yesilada E. In vivo anti-inflammatory and antinociceptive activity of the crude extract and fractions from *Rosa canina* L. fruits. *J. Ethnopharmacol.* , 2007; 112: 394–400.

Dickenson AH, Sullivan AF. Subcutaneous formalin-induced activity of dorsal horn neurones in the rat: differential response to an intrathecal opiate administered pre or post formalin. 1987; 30(3):349-60.

Dickinson T, Fleetwood-Walker SM. VIP e Pacap: very important in pain? *Trends Pharmacol.* 1999;20: 324-329.

Di Stasi LC, Hiruma-Lima CA. *Plantas Medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica*. São Paulo: Editora UNESP, 2002.

Dostrovsky JO, Craig AD. Ascending projection systems. In *Textbook of Pain*, 5th Ed. S.B. McMahon and M. Koltzenburg, Eds. (London: Elsevier Churchill Livingstone), 2006; 187–203.

Dubuisson D. e Dennis SG. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain*.1977;4(2):161-74.

Dutra RC, Tavares CZ, Ferraz SO, Souza OV, Pimenta DS. Investigação das atividades analgésicas e antiinflamatória do extrato metanólico dos rizomas de *Echinodorus grandiflorus*. *Rev. Bras. Farmacog.* 2006; 16: 469–474.

Etkin NL, Elisabetsky E. Seeking a transdisciplinary and culturally germane science: the future of ethnopharmacology. *J. Ethnopharmacol.* 2005; 100: 23–26.

Feher M, Schmidt JM .Property distributions: Differences between drugs, natural products, and molecules from combinatorial chemistry. *J. Chem. Inf. Comput. Sci.* 2003;43: 218–227.

Fernandes DC. Análise da atividade anti-inflamatória neurogênica do extrato aquoso de folhas de *Echinodorus macrophyllus* e fitoquímica. Monografia de Bacharelado em Ciências Biológicas, UCB, 2006.

Fernandes DC. Fracionamento do extrato de *Echinodorus macrophyllus* biomonitorado pela atividade anti-inflamatória tópica. Dissertação de mestrado em Biociências, UERJ, 2010.

Gabra BH, Sirois P. Beneficial effect of chronic treatment with the selective bradykinin B1 receptor antagonists, R-715 and R-954, in attenuating streptozotocin-diabetic thermal hyperalgesia in mice. *Peptides* 2003; 24: 1131–1139.

Ganesan A. The impact of natural products upon modern drug discovery. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2008; 12: 306–317.

Gardana C, Scaglianti M, Pietta P, Simonetti P. Analysis of the polyphenol fraction of propolis from different sources by liquid chromatography–tandem mass spectrometry. *J. Pharmaceut. Biomed.* 2007; 45: 390–399.

Gentile C, Tesoriere L, Allegra M, Livrea MA. e D'Alessio P. Antioxidant Betalains from Cactus Pear (*Opuntia ficus-indica*) Inhibit Endothelial ICAM-1 Expression; *Annals New York Academy Sciences*, 2004;1028: 481–486.

Gertsch J. How scientific is the science in ethnopharmacology? Historical perspectives and epistemological problems. *J. Ethnopharmacol.* 2009; 122(2): 177–183.

Giada MLR. Food Phenolic Compounds: Main Classes, Sources and Their Antioxidant Power. In *Oxidative Stress and Chronic Degenerative Diseases - A Role for Antioxidants*. Morales-Gonzalez, J.A. Ed., Cap. 4, 2013.

Giulietti AM, Harley RM, Queiroz LP, Wanderley MGL. Berg CVD. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. *Megadiv.* 2005;1: 52–61.

Gobbo-Neto L, Lopes NP. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Quím. Nov.*2007; 30: 374–81.

Gozzani JL. Opióides e antagonistas. *Bras. Anestesiol.* 1994; 44: 65–73.

Grover JK, Yadav SP. Pharmacological actions and potential uses of *Momordica charantia*: a review. *J. Ethnopharmacol.* 2004; 93: 123–132.

Gutiérrez RMP, Mitchell S, Solis RV. *Psidium guajava*: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *J. Ethnopharmacol.* 2008; 117: 1–27.

Hagiwara H, Takeuchi F, Hoshi T, Suzuki T, Ando M. First total synthesis of Chapecoderin A: Absolute configuration of the natural product. *Tetrahedron. Lett.* 2001; 42: 7629–7631.

Harnack LJ, Ryddel SA, Stang J. Prevalence of use of herbal products by adults in the Minneapolis/St Paul, Minn, metropolitan area. *Mayo Clinic Proceedings*, 2001; 76: 688–694.

Harvey AL. Natural products in drug discovery. *Drug. Disc. Today* 2008; 13: 894–901.

Haynes RR, Holm-Nielsen LB. *The Alismataceae*. Flora Neotropica, Monograph. 64, New York Botanical Garden, New York, 1994.

Henke H. Präparative Gelchromatographie na Sephadex LH-20. Salz Und Druck: Alpha Druck GmbH, 63773 Goldbach: 612, Apud Sephadex LH-20, Catál. Amersham Biosci., 1994.

Heyneman CA, Lawless-Liday C, Wall GC. Oral versus Topical NSAIDs in Rheumatic Diseases. *Drugs*, 2000; 60: (3): 555-574.

Holler FJ, Skoog DA, Crouch SR. *Princípios de análise instrumental*. Ed. Artmed. Porto Alegre, 2009.

Hübel K, Leßmann T, Waldmann H. Chemical biology—identification of small molecule modulators of cellular activity by natural product inspired synthesis. *Chem. Soc. Rev.* 2008; 37: 1361–1374.

Ijeoma UF, Aderonke SO, Ogbonna O, Augustina MA, Chijioke-Nwauche Ifeyinwa. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of crude extracts of *Ipomoea involucreta* leaves in mice and rats. *Asian. Pac. J. Trop. Med.* 2011; 4: 121-124.

Ikan R. Produtos naturais - Um guia laboratorial. In: Carlos, M. Literatura Quím. do MCS - VITILIKA'S, 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 Sci.* 2001; 69: 2911–2919.

Jain NK, Kulkarni SK. L-Name, a nitric oxide synthase inhibitor, modulates cholinergic antinociception. *Exp. Clin. Pharmacol.* 1999; 21: 161-165.

Johnson VJ, He Q, Osuchowski MF, Sharma RP. Physiological responses of a natural antioxidant flavonoid mixture, silymarin, in BALB/c mice: III. Silymarin inhibits T-lymphocyte function at low doses but stimulates inflammatory processes at high doses. *Planta Med.* 2003;69: 44-49.

Joly AB. Botânica: Introdução a Taxonomia vegetal. Companhia editora nacional, 13ª edição, 2002.

Kim HK., Park SK, Zhou JL, Tagliatela G, Chung K, Coggeshall RE. Reactive oxygen species (ROS) play an important role in a rat model of neuropathic pain. *Pain* 2004; 111: 116–124.

Kobayashi J, Sekiguchi M, Shigemori H, Ohsaki A. Echinophyllins A and B, novel nitrogen-containing clerodane diterpenoids from *Echinodorus macrophyllus*. *Tetrahedron Lett.* 2000; 41: 2939–2943, (A).

Kobayashi J, Sekiguchi M, Shimamoto S, Shigemori H, Ohsaki A. Echinophyllins C-F, New Nitrogen-Containing Clerodane Diterpenoids from *Echinodorus macrophyllus*. *J. Nat. Prod.* 2000;63: 1576–1579, (B).

Kobayashi J, Sekiguchi M, Shimamoto S, Shigemori H, Ohsaki A. Chapecoderins A-C, new labdane-derived diterpenoids from *Echinodorus macrophyllus*. *J. Nat. Prod.*, 2000;63: 375–377, (C).

Koehn FE, Carter GT. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2005; 4: 206–220.

Koster R, Anderson M, de Beer EJ. Acetic acid for analgesic screening. Fed. Proc. 1959; 18: 412.

Kroymann J. Natural diversity and adaptation in plant secondary metabolism. Curr. Opin. Plant Biol. 2011; 14: 246–251.

Le Bars D, Gozaríu M, Cadden SW. Animal models of nociception. Pharmacol. Rev. 2001; 53: 597–652.

Lee SJ, Umamo K, Shibamoto T, Lee KG. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. Food Chem. 2005; 91: 131–137.

Liu X, Zou H, Slaughter C and Wang X. DFF, a Heterodimeric Protein That Functions Downstream of Caspase-3 to Trigger DNA Fragmentation during Apoptosis. Cell 1997; 89: 175–184.

Lopes LC, Albano F, Laranja GAT, Alves LM, Silva LFM, Souza GP, Araujo IM., Nogueira-Neto JF, Felzenszwalb I, Kovary K. Toxicological evaluation by *in vitro* and *in vivo* assays of an aqueous extract prepared from *Echinodorus macrophyllus* leaves. Toxicol. Lett. 2000;116: 189–198.

Loro JF, del Rio I, Pérez-Santana L. Preliminary studies of analgesic and antiinflammatory properties of *Opuntia dillenii* aqueous extract J. Ethnopharmacol. 1999;67: 213-218.

Maciel MAM. Pinto AC, Veiga Jr V.F., Grynberg NF, Echevarria A. Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. Quim Nov. 2002; 25: 429–438.

Manns D, Hartmann R. Echinodol: A new cembrane derivative from *Echinodorus grandiflorus*. Planta Med., 1993; 59: 465–466.

Marcon R, Luiza AP, Wenera MFP, Freitas CS, Baggio CH, Nascimento FP, Soldid C, Pizzolattid MG, Santos ARS. Evidence of TRPV1 receptor and PKC signaling pathway in the antinociceptive effect of amyriin octanoate. Brain Research. 2009; 1295: 76-88.

Marschner P. Marschner's Mineral Nutrition of Higher Plants. 3rd Ed., London, UK: Elsevier Ltd., 2012.

Martins RT, Almeida DB, Monteiro FR, Kowacs PA, Ramina.R. Receptores opioides até o contexto atual. Rev. Dor, 2012; 13(1): 75-79.

Mason NJ, Artis D, Hunter CA. New lessons from old pathogens: what parasitic infections have taught us about the role of nuclear factor- κ B in the regulation of immunity. Immunological Rev. 2004; 201(1): 48–56

McChesney JD, Venkataraman SK, Henri JT. Plant natural products: Back to the future or into extinction? Phytochem. 2007; 68: 2015–2022.

Medana C, Carbone F, Aigotti R, Appendino G, Baiocchi C. Selective analysis of phenolic compounds in propolis by HPLC–MS/MS. *Phytochem. Anal.* 2008; 19: 32–39.

Merksey H, Bogduk N. *Classification of Chronic Pain*. Seattle: IASP Press, 1994.

Michalski F, Peres CA, Lake IR. Deforestation dynamics in a fragmented region of southern Amazonia: Evaluation and future scenarios. *Environ. Conserv.* 2008;35: 93–103.

Ministério da Saúde (BR). Ato Portaria Nº 19/GM de 03/01/2002. [acesso 2009/8/17]. Disponível em: <http://dtr2001.saude.gov.br/sas/PORTARIAS/Port2002>.

Minnerman KP, Wecker L, Larner J, Brody TM. Brody – *Farmacologia humana*. 4ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 349–379, 2006.

Mosman T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Immun. Meth.* 1983; 65: 55-63.

Murray CW, Porreca F, Cowna A. Methodological refinements to the mouse paw formalin test: an animal model of tonic pain. *J. Pharmacol. Meth.* 1988; 20: 175-186.

Nett AU. *Semiologia: Dor*. Med. Resumos, 2009; 1: 1-6.

Newman DJ, Cragg GM. Natural Products as Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010†. *J Nat Prod.* 2012; 75(3): 311–335.

Okokon JE, Nwafor PA., Andrew UE. Antimalarial and analgesic activities of ethanolic leaf extract of *Panicum maximum*. *Asian Pac. J. Trop. Med.* 2011; 4: 442–446.

Petrovick PR, Marques LC, De Paula IC. New rules for phytopharmaceutical drug registration in Brazil. *J. Ethnopharmacol.* 1999;66: 51–55.

Portal Anvisa: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/d595840047457ee08aa8de3fbc4c6735/tabela+drogas+vegetais.pdf?MOD=AJPERES> 10/02/2014.
Prakash, P., Gupta, N. Therapeutic uses of *Ocimum sanctum* Linn. (Tulsi) with a note on eugenol and its pharmacological actions: a short review. *Indian J. Physiol. Pharmacol.* 49: 125–131, 2005.

Priestap HA, Van Baren CM, Di Leo Lira P. Coussio, J.D., and Bandoni AL. Volatile constituents of *Aristolochia* Argentina. *Phytochem.* 2003; 63: 221–225.

Rataj K. *Alismataceae* of Brazil. *Acta Amazon.* 1978; 8: 1–54.

Reddy LH e Couvreur P. Squalene: A natural triterpene for use in disease management and therapy. *Advanc. Drug Delivery Rev.* 2009; 61(15):1412–1426.

Reilly, MM, Shy, ME. Diagnosis and new treatments in genetic neuropathies. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 2009; 80:1304-1314.

Ribeiro AQ, Leite JPV., Dantas-Barros AM. Profile of the utilization of phytotherapeutic medicines in community pharmacies of Belo Horizonte, under the influence of the national legislation. *Braz. J. Pharmacog.* 2005; 15: 65–70.

Ribeiro RA, Vale ML, Thomazzi SM, Paschoalato AB, Poole S., Ferreira SH. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 2000; 387: 111–118.

Rossato MF, Velloso NA, de Oliveira Ferreira AP, de Mello CF, Ferreira J. Spinal levels of nonprotein thiols are related to nociception in mice. *J. Pain* 2010; 11: 545–54.

Rossato MF, Cristiani GT, Bandero Walker I, Klafke JZ, Oliveira AP, Villarinho JG, Zanon RB, Royes LFF, Athayde ML, Gomez MV, Ferreira J. Eriodictyol: A flavonoid antagonist of the TRPV1 receptor with antioxidant activity. *Bioch. Pharmacol.* 2011; 81: 544–551.

Saça CS, Carmo FA, Arbuleia JPS, Souza RCX, Alves SA, Rosa B. A dor como 5º sinal vital: atuação da equipe de enfermagem no hospital privado com gestão do Sistema Único de Saúde (SUS). *A. J. Health Sci. Inst.* 2010; 28: 35–41.

Sakurada T, Manome Y, Tan-no K, Sakurada S, Kisara K, Hara A, Abiko A. Involvement of nitric oxide in spinally mediated capsaicin and glutamate-induced behavioural responses in the mouse. *Neurochem. Internat.* 1996; 29: 271-278.

Salter M, Strijbos FPJLM, Neale S, Duffy C, Follenfant RL, Garthwaites J. The nitric oxide-cyclic GMP pathway is required for nociceptive signaling at specific loci within the somatosensory pathway. *Neurosci.* 1996; 73: 649-655.

Sawynok J. Topical and peripherally acting analgesics. *Pharmacol. Rev., Nova Scotia.* 2003; 55(1):1-20.

Schlüter U, Colmsee C, Scholz U, Bräutigam A, Weber APM, Zellerhoff N, Bucher M, Fahnenstich H, Sonnewald U. Adaptation of maize source leaf metabolism to stress related disturbances in carbon, nitrogen and phosphorus balance. *BMC Genomics.* 2013; 14: 442.

Seidl PR. Pharmaceuticals from natural products: current trends. *Ann. Braz. Acad. Sci.* 2002; 74: 145–150.

Sewell RDE, Spencer PSJ. Antinociceptive activity of narcotic agonist and partial agonist analgesics and other agents in the tail-immersion test in mice and rats. *Neuropharmacol.* 1976; 15: 683–688.

Shahidi F, Naczki M. Food phenolics: sources, chemistry, effects and applications. *Lancaster Tech.* 1995.

- Shanley P, Luz L. The impacts of forest degradation on medicinal plant use and implications for health care in eastern Amazonia. *Bio. Sci.* 2003; 53: 573–584.
- Shanley P, Rosa NA. Conhecimento em erosão: um inventário etnobotânico na fronteira de exploração da Amazônia oriental. *Bol. Mus. Paraense Emílio Goeldi.* 2005; 1: 147–171.
- Shibata M, Ohkubo T, Takahashi H, Inoki R. Modified formalin test: characteristic Biphasic pain response. *Pain.* 1989; 38: 347-352.
- Shigemori H, Shimamoto S, Sekiguchi M, Ohsaki A, Kobayashi J. Echinodolides A and B, new cembrane diterpenoids with an eight-membered lactone ring from the leaves of *Echinodorus macrophyllus*. *J. Nat. Prod.* 2002; 65: 82–84.
- Shih MC, Kuo CC, Chiang W. Effects of drying and extrusion on colour, chemical composition, antioxidant activities and mitogenic response of spleen lymphocytes of sweet potatoes. *Food Chem.* 2009; 117: 114–121.
- Silva MS, Miranda RRS, Ferraz, VP, Pereira MT, Siqueira EP, Alcântara AFC. Changes in the essential oil composition of leaves of *Echinodrus macrophyllus* exposed to γ -radiation, *Rev. Bras. Farmacog.* 2013; 23: 600-607.
- Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. *Farmacognosia: da planta ao medicamento.* Porto Alegre: UFSC, 2007.
- Soares, D. *Plantas & ervas medicinais.* Provenzano, 2° Ed., 2002.
- Souza Brito, ARM, Souza Brito AA. Forty years of Brazilian medicinal plant research. *J. Ethnopharmacol.* 1993; 39: 53–67.
- Sousa MJM, Moral FF, Nascimento GNL, Soares NP, Aversi-Ferreira TA. Medicinal plants used by Itamaraty community nearby Anápolis, Goiás State, Brazil. *Acta Scient. Health Sci.* 2010; 32: 177–184.
- Stewart AJ, Stewart RF. *Phenols.* Ecotoxicol. Elsevier B.V. All rights reserved. 2008; 2682–2689.
- Tan AC, Konczak I, Sze DMY, Ramzan I. Towards the discovery of novel phytochemicals for disease prevention from native Australian plants: an ethnobotanical approach. *Asia Pac. J. Clin. Nutr.* 2010; 19: 330–334.
- Tanaka CMA, Sarragiotto MH, Zukerman-Schpector J, Marsaioli AJ. A cembrane from *Echinodorus grandiflorus*. *Phytochem.* 1997; 44: 1547–1549.
- Tjolsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 1992; 51: 5-17.
- Tomczyka M, Lattéb KP. Potentilla - A review of its phytochemical and pharmacological profile. *J. Ethnopharmacol.* 2009; 122: 184–204.

Tracey I, Mantyh PW. The Cerebral Signature for Pain Perception and Its Modulation. *J. Neuron*. 2007; 55: 377–391.

Tripathi KD. *Farmacologia médica*. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 367–379, 2006.

Van Andel T, Westers P. Why Surinamese migrants in the Netherlands continue to use medicinal herbs from their home country? *J. Ethnopharmacol*. 2010; 127: 694–701.

Vanderlei ESO, Patoilo KKNR, Lima NA, Lima APS, Rodrigues JA, Silva LMCM, Lima MEP, Lima V, Benevides NMB. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of lectin from the marine green alga *Caulerpa cupressoides*. *Int. Immunopharmacol*. 2010; 10: 1113–1118.

Viegas C, Bolsani VS, Barreiro EJ. The natural products and the modern medicinal chemistry. *Quim. Nova*. 2006; 29: 326–337.

Vilela FC, de Mesquita Padilha M, Dos Santos-E-Silva L, Alves-da-Silva G, Giusti- Paiva A. Evaluation of the antinociceptive activity of extracts of *Sonchus oleraceus* L. in mice. *J. Ethnopharmacol*. 2009; 124: 306–310.

Watanabe M, Hubberten HM, Saito K, Hoefgen R. General Regulatory Patterns of Plant Mineral Nutrient Depletion as Revealed by *serat* Quadruple Mutants Disturbed in Cysteine Synthesis. *Mol. Plant*. 2010; 3: 438–466.

Wayland C. Gendering local knowledge: medicinal plant use and primary health care in the Amazon. *Med. Anthropol. Quarterly*. 2001; 15: 171–188.

Wayland C. Contextualizing the politics of knowledge: physicians' attitudes toward medicinal plants. *Med. Anthropol. Quarterly*. 2003; 17: 483–500.

Wink M. Biochemistry, physiology and ecological functions of secondary metabolites. In *Annual Plant Reviews, Biochemistry of Plant Secondary Metabolism*, 2nd Ed. vol 40, Wink, M., Ed., Wiley-Blackwell. 2010; 1–19.

Woolf CJ. What is this thing called pain? *J. Clin. Invest*. 2010; 120: 3742–3744.

Yaksh TL, Dirig DM, Conway CM, Swenson C, Luo D, Isakson PC. The acute antihyperalgesic action of non-steroidal, anti-inflammatory drug and release of spinal PGE₂ is mediated by the inhibition of constitutive spinal cyclo-oxygenase-2 (COX-2) but not COX-1. *J Neurosci*. 2001; 21: 5847–53.

Yoon SL, Horne CH, Adams C. Herbal product use by African American older women. *Clinic. Nursing Res*. 2004; 13: 271–288.

Yunes RA, Cechinel Filho V. In: *Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna*; Yunes RA, Calixto JB, Eds. 1ª ed. Ed. Argos: Chapecó, cap. 1, 2001.

Zárate R, Dirks C, Van der Heijden R, Verpoorte R. Terpenoid indole alkaloid profile changes in *Catharanthus pusillus* during development. *Plant Sci.* 2001; 160: 971–977.

Zhang RX, Li MX, Jia ZP. *Rehmannia glutinosa*: Review of botany, chemistry and pharmacology. *J. Ethnopharmacol.* 2008; 117: 199–214.