



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

Bruna de Paiva Martins

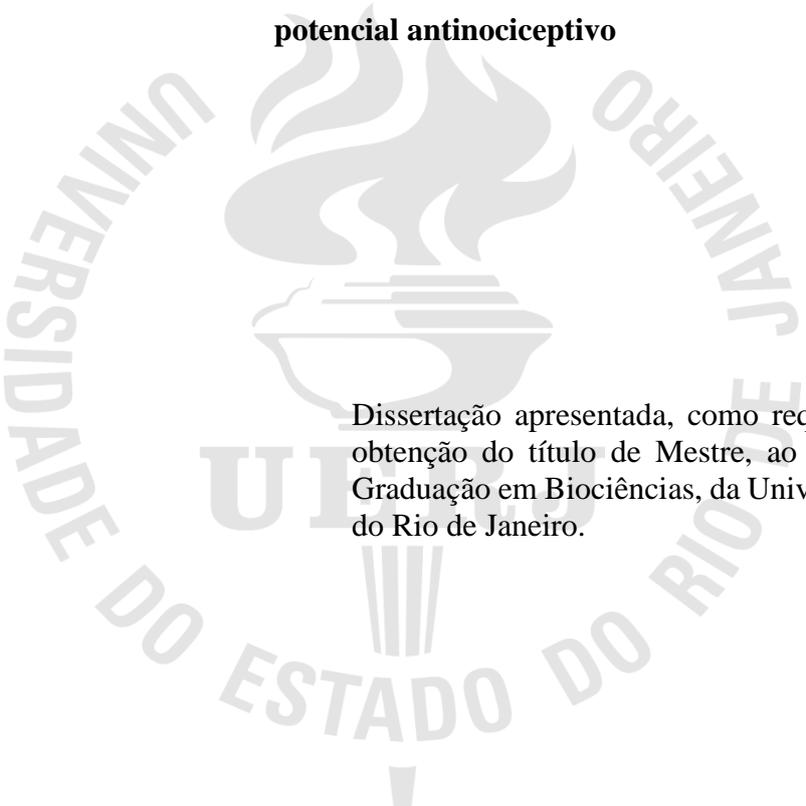
**Análise fitoquímica de frações do extrato aquoso de *Echinodorus
macrophyllus* e de seu potencial antinociceptivo**

Rio de Janeiro

2020

Bruna de Paiva Martins

Análise fitoquímica de frações do extrato aquoso de *Echinodoros macrophyllus* e de seu potencial antinociceptivo



Dissertação apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre, 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

2020

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CBA

M386 Martins, Bruna de Paiva.

Análise fitoquímica de frações do extrato aquoso de *Echinodorus macrophyllus* e de seu potencial antinociceptivo / Bruna de Paiva Martins. - 2020.

82 f.

Orientadora: Marsen Garcia Pinto Coelho

Dissertação (Mestrado) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. Programa de Pós-graduação em Biociências.

1. *Echinodorus macrophyllus* – Teses. 2. Plantas medicinais – Uso terapêutico – Teses. 3. Inflamação – Teses. 4. Inflamação neurogênica. 5. Nociceptividade. I. Coelho, Marsen Garcia Pinto. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes. III. Título.

CDU 633.88

Bibliotecária: Angela da Silva Velho CRB7/4780

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

Assinatura

Data

Bruna de Paiva Martins

Análise fitoquímica de frações do extrato aquoso de *Echinodorus macrophyllus* e de seu potencial antinociceptivo

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

Aprovada em 19 de outubro de 2020.

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. Dr. Davyson de Lima Moreira
Fundação Oswaldo Cruz

Rio de Janeiro

2020

DEDICATÓRIA

Esta dissertação é dedicada a meus queridos e amados avós pelo amor e carinho e dedicação inenarráveis (*in memoriam*).

AGRADECIMENTOS

A DEUS por me permitir a caminhada.

A minha mãe, Cristina por toda dedicação, paciência, cuidado, incentivo e todo amor sem o qual não conseguiria chegar onde estou. Todos os momentos em que precisei de ajuda, todos os jantares no quarto e mimos, por estar estudando. Por todo carinho e amor que me proporcionou desde sempre e por me ensinar a ser uma pessoa de bem, com princípios e a estudar.

Ao meu pai Ilson por todo cuidado e amor.

Ao meu padrasto Romir por todo amor, carinho, apoio e dedicação à minha criação, mesmo que muito difícil no início da minha infância, mas mesmo assim sempre me dando muito amor e carinho.

A todo o apoio financeiro e psicológico que minha mãe e meu padrasto me proporcionaram, sem o qual também não chegaria onde estou.

Ao meu quase esposo Igor por toda paciência, conselhos, incentivo, carinho, amor e reflexões sobre a vida; pela paciência quando eu não sou tão amorosa e todo apoio na vida profissional e amorosa; por todo entusiasmo em ser cientista, por todo apoio nos meus estudos e carreira.

Ao meu irmão Bruno por toda inspiração e momentos de risadas e conselhos.

Aos meus irmãos Bianca, Carol e João por toda compreensão, amor e carinho.

A todos os meus familiares que mesmo sem entender muito o que eu faço me apoiaram.

Aos familiares do meu quase esposo por toda paciência e incentivo, assim como às minhas cunhadas pelo encorajamento.

Ao meu avô materno Roberto por apoio financeiro em boa parte da minha formação.

A todos os meus amigos, familiares, sem exceção, que fizeram e fazem parte da minha história e que me deram de alguma forma força para minha formação.

A todos os meus professores da pré-escola até a universidade que me incentivaram e me apoiaram nas decisões mais determinísticas da minha vida.

À minha orientadora Marsen Garcia Pinto Coelho por sua dedicação, incentivo, carinho e por fazer parte essencial da minha formação e, principalmente na produção deste trabalho.

A Doutora, co-orientadora e amiga Daniele Corrêa Fernandes por seu apoio, paciência, orientação, realização de experimentos, por todo seu trabalho duro em me ajudar nesta batalha.

Aos técnicos do laboratório Shirley, Sr. Paulinho e Beto por todo apoio e incentivo incomparável; todo carinho que demonstram com os alunos, com um carinho de família; por

fazer do laboratório a nossa casa, por nos mostrar que podemos crescer profissional e psicologicamente.

Aos professores do laboratório, Kátia, Graça, Marsen, Veloso, Márcia e Natália por todo ensinamento.

Aos amigos queridos do laboratório, Thayane, Felipe, Rafaela, Nathália Felizardo, Carol Machado, Carol Vieira, Jéssica, Francis, Thayssa, Nemes, Rachel, David e Márcia por todo apoio, carinho e momentos divertidos.

Aos Professores Dr^a. Marsen Garcia Pinto Coelho, Dr^a. Kátia Costa de Carvalho Sabino e Dr. Davyson de Lima Moreira por aceitarem com satisfação integrar a banca de avaliação deste trabalho.

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

À CAPES pelo fomento para realização deste trabalho.

À UERJ e LIA-BPPN, por tornar possível o desenvolvimento desta dissertação.

Existem mais pessoas que desistem

Do que pessoas que fracassam

Autor desconhecido

RESUMO

MARTINS, Bruna de Paiva. *Análise fitoquímica de frações do extrato aquoso de Echinodorus macrophyllus e de seu potencial antinociceptivo*. 2020. 82 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

Echinodorus macrophyllus (Kunth) Mich., espécie da família Alismataceae, é uma planta medicinal utilizada popularmente como diurético e anti-inflamatório, e conhecida como chapéu de couro. O objetivo deste estudo foi realizar o fracionamento e caracterização fitoquímica do extrato aquoso e frações de *Echinodorus macrophyllus* e avaliar o potencial antinociceptivo *in vivo*. O EAEm foi obtido por infusão das folhas 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, assim como por extração líquido-líquido gerando as frações FHex, FDCM, FAcE, FBut e FAq. Todas as frações originadas do EAEm foram analisadas por TLC ou HPTLC em placa de sílica gel 60 e por HPLC-DAD em coluna C18. Os modelos *in vivo* de nocicepção utilizados foram o de placa quente e o de formalina, os quais avaliam respostas a estímulos nociceptivos térmicos e químicos, respectivamente, utilizando-se camundongos SW machos (25-30 g). No modelo de placa quente, os animais foram tratados previamente (v.o.) com EAEm (25 mg/kg), Fr20 e Fr40 (25 e 100 mg/kg), veículo e morfina (10 mg/kg, i.p.). No modelo de formalina, os animais foram tratados previamente (v.o.) com FAcE e FBut (25 e 50 mg/kg), dipirona (50 mg/kg v.o.), veículo (controle) e morfina (10 mg/kg i.p.). Este modelo é bifásico: 0 – 5 min, fase 1 (neurogênica); e de 15 – 25 min, fase 2 (inflamatória). As frações Fr40, FAcE e FBut apresentaram perfis com banda amarela semelhante, quando avaliadas por TLC ou HPTLC e reveladas para flavonoides, o que sugere a presença desta classe de compostos nas frações. As flavonas orientina, isoorientina, vitexina e isovitexina foram utilizadas como padrões, e baseando-se nas colorações e valores de R_f é possível sugerir que a isoorientina e a isovitexina estejam presentes no EAEm, FAcE e FBut, enquanto a vitexina no EAEm, FBut e FAq. Quanto à avaliação da ação antinociceptiva, utilizando-se o modelo de placa quente, a Fr20 foi capaz de aumentar o tempo de latência em 30 min (25 mg/kg) e em 60 min (25 e 100 mg/kg), e a Fr40 na dose 100 mg/kg, em 30 e 60 min. No modelo de formalina, a FAcE apresentou redução do tempo de mordidas e lambidas na fase 1 (neurogênica) com (25 mg/kg), enquanto a FBut reduziu esse tempo com ambas as doses nesta mesma fase, já na fase 2 (inflamatória) a FBut reduziu o tempo apenas com 25 mg/kg. Em função das atividades antinociceptivas observadas com as amostras obtidas do EAEm, estas podem estar associadas à inibição de mecanismos de dor de ação central e/ou periférica, mediados por nociceptores ativados por estímulos térmicos e químicos. Concluindo, o fracionamento do EAEm por partição líquido-líquido foi reprodutível e aumentou o rendimento das frações com ação antinociceptiva, o que permite a continuidade do estudo destas frações. Além disso, as frações Fr40, FAcE e FBut apresentaram perfis fitoquímicos compatíveis com flavonoides, os quais devem estar associados à importante ação antinociceptiva observada.

Palavras-chave: *Echinodorus macrophyllus*. Nocicepção. Inflamação neurogênica. Fracionamento. Fitoquímica

ABSTRACT

MARTINS, Bruna de Paiva. *Phytochemical analysis of fractions of the aqueous extract of Echinodorus macrophyllus and its antinociceptive potential*. 2020. 82 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2020.

Echinodorus macrophyllus (Kunth) Mich. species, of the Alismataceae family, is a medicinal plant popularly known as chapéu de couro and used as a diuretic and anti-inflammatory agent. This study aimed to perform the fractionation and phytochemical characterization of the aqueous extract and fractions of *Echinodorus macrophyllus* and evaluate the *in vivo* antinociceptive potential. The EAEm was obtained by the leaves infusion in distilled water (50 g p.s./L, 100°C), followed by filtration and lyophilization. EAEm was fractionated in Sephadex LH-20, generating fractions Fr20 and Fr40, as well as by liquid-liquid extraction yielding fractions FHex, FDCM, FAcE, FBut, and FAq. All fractions originating from EAEm were analyzed by TLC or HPTLC on a silica gel 60 plate and by HPLC-DAD on a C18 column. The *in vivo* nociception models used were hot plate and formalin, which evaluate responses to thermal and chemical nociceptive stimuli, respectively, using male SW mice (25-30 g). In the hot plate model, the animals were previously treated (v.o.) with EAEm (25 mg/kg), Fr20 and Fr40 (25 and 100 mg/kg), and vehicle, and morphine (10 mg/kg, i.p.). In the formalin model, the animals were previously treated (v.o.) with FAcE and FBut (25 and 50 mg/kg), dipyrone (50 mg/kg v.o.), vehicle (control) and morphine (10 mg/kg i.p.). This model is biphasic: 0 - 5 min, phase 1 (neurogenic); and 15 - 25 min, phase 2 (inflammatory). Fr40, FAcE, and FBut fractions showed profiles with a similar yellow band when evaluated by TLC or HPTLC and revealed for flavonoids, which suggests the presence of this class of compounds in the fractions. The orientin, isoorientin, vitexin, and isovitexin flavones were used as standards. Based on the colorations and Rf values, it is possible to suggest that isoorientin and isovitexin are present in EAEm, FAcE, and FBut, while vitexin in EAEm, FBut, and FAq. Regarding the evaluation of antinociceptive action, using the hot plate model, Fr20 was able to increase the latency time by 30 min (25 mg/kg) and by 60 min (25 and 100 mg/kg), and the Fr40 at a dose of 100 mg/kg, in 30 and 60 min. In the formalin model, FAcE (25 mg/kg) showed a reduction in bite and licked time in phase 1 (neurogenic), while FBut reduced it with both doses in this same phase. In phase 2 (inflammatory), FBut reduced bite and lick time only with the 25 mg/kg dose. Concerning the antinociceptive activities observed with the EAEm samples, such activities may be associated with the inhibition of central/peripheral pain mechanisms, mediated by nociceptors activated by thermal and chemical stimuli. In conclusion, the fractionation of EAEm by liquid-liquid partition was reproducible and increased the yield of fractions with antinociceptive action, which allows the study of these fractions to continue. Besides, Fr40, FAcE, and FBut fractions showed phytochemical profiles compatible with flavonoids, which must be associated with the important antinociceptive action observed.

Keywords: *Echinodorus macrophyllus*. Nociception. Neurogenic inflammation. Fractionation. Phytochemistry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 -	Indicações de uso das plantas medicinais pela ANVISA.....	17
Quadro 2 -	Porcentagem de publicações na área agrônômica, fitoquímica, ensaios biológicos e outras espécies medicinais nativas da Mata Atlântica no CAB Abstract, de 1990 a 2011.....	18
Figura 1 -	Principais fatores que podem influenciar o acúmulo de metabólitos secundários em planta.....	19
Figura 2 -	A espécie <i>Echinodorus macrophyllus</i>	22
Figura 3 -	Estrutura química das equinofilinas.....	25
Figura 4 -	Estrutura química das chapecoderinas.....	25
Figura 5 -	Estrutura química das equinodolídeos.....	25
Figura 6 -	Estruturas das flavonas.....	26
Figura 7 -	Estrutura de compostos isolados de <i>E. macrophyllus</i>	27
Figura 8 -	Estrutura química dos constituintes isolados e identificados nas folhas de <i>E. macrophyllus</i>	27
Figura 9 -	Procedimentos gerais para obtenção de compostos biologicamente ativos.....	28
Figura 10 -	Esquema geral de partição e separação provável dos principais metabólitos secundários presentes em plantas.....	30
Tabela 1 -	Propriedades físico-químicas de alguns solventes comuns usados na extração de produtos naturais.....	31
Figura 11 -	Resumo dos locais de ação das principais classes de fármacos utilizados no manejo da dor.....	35
Figura 12 -	Tipos de neurônios sensoriais primários, responsáveis pela condução do sinal nociceptivo da periferia ao SNC.....	38
Figura 13 -	Fracionamento do EAEm em coluna empacotada com resina Sephadex LH-20.....	44
Figura 14 -	Fracionamento pelo método de Extração líquido-líquido.....	45
Figura 15 -	Extração líquido-líquido do extrato aquoso das folhas de <i>E. macrophyllus</i>	46
Figura 16 -	Cromatografia em camada delgada de alta performance (HPTLC)	50

Figura 17 -	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de fotodiodo (HPLC-DAD)	51
Figura 18 -	Fluxograma do fracionamento do extrato bruto de <i>E. macrophyllus</i> por extração líquido-líquido.....	53
Figura 19 -	Cromatografia em camada delgada das frações obtidas do EAEm por extração líquido-líquido.....	54
Figura 20 -	Cromatografia em camada delgada das frações obtidas do fracionamento por extração líquido-líquido.....	55
Figura 21 -	Cromatografia em camada delgada (TLC) da Fr40, FAcE e FBut.....	56
Figura 22 -	Cromatografia em camada delgada de todas as frações obtidas do fracionamento do EAEm de <i>E. macrophyllus</i> por extração líquido-líquido reveladas com A) Vanilina e B) Iodo.....	56
Tabela 2 -	Análise por HPLC-DAD de frações do EAEm obtidas por extração líquido-líquido.....	57
Figura 23 -	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de fotodiodo (HPLC-DAD)	58
Figura 24 -	Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD dos padrões de Isoorientina, Orientina, Isovitexina e Vitexina em coluna C18 monitorado em 254 nm	59
Figura 25 -	Cromatografia em camada delgada de alta performance (HPTLC)	60
Figura 26 -	Efeito do tratamento com EAEm e suas frações no modelo de placa quente.....	61
Figura 27 -	Efeito do tratamento com as frações FAcE e FBut no modelo de formalina.....	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%MPE	Percentual de resposta máxima possível
a.C.	Antes de Cristo
AMPC	Adenosina monofosfato cíclica
AMPA	ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CAB	Principal serviço de informação bibliográfica em língua inglesa que fornece acesso à literatura mundial sobre ciências da vida aplicada.
CEUA-IBRAG	Comitê de Ética do IBRAG para uso de animais-UERJ
COX	Ciclooxigenases
<i>Cut-off</i>	Tempo de corte
DRG	Gânglio da raiz dorsal
DP	Desvio padrão
EAEm	Extrato aquoso de <i>Echinodorus macrophyllus</i>
Fr	Fração
Fr20	Fração do EAEm eluída de Sephadex LH-20 com 20% etanol
Fr40	Fração do EAEm eluída de Sephadex LH-20 com 40% etanol
FAcE	Fração acetato de etila
FAq	Resíduo aquoso do fracionamento líquido-líquido do EAEm
FBut	Fração butanólica
FDCM	Fração Dicloromatânica
FHex	Fração Hexânica
GMPC	Guanosina monofosfato cíclica
HPLC-DAD	Cromatografia em fase líquida de alta eficiência acoplada a detector de fotodiodo
HPTLC	Cromatografia em camada delgada de alta performance
I.p.	Intraperitoneal
IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor
IL-1 β	Citocinas (interleucina)
Nav	Canal de íon sódio dependente de voltagem
NK	Neurocinina
NMDA	N-metil-D aspartato

NMR	Ressonância Magnética Nuclear
NOS	Sintetase do óxido nítrico
NP	Ácido difenilbórico aminoetiléster (<i>natural product</i>)
OMS	Organização mundial da saúde
PEG	Polietileno glicol
PNPIC	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
PNPMF	Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
Rf	Fator de retenção
s.c.	Subcutâneo
SNC	Sistema nervoso central
SNP	Sistema nervoso periférico
SUS	Sistema Único de Saúde
SW	Camundongo Swiss webster
TLC	Cromatografia em camada delgada
TNF- α	Fator de necrose tumoral
TRP	Receptor de potencial transitório
TRPV1	Receptor de potencial transitório vaniloide 1
TRPV	Receptor de potencial transitório vaniloide
Tr	Tempo de retenção
w/w	Peso/peso
UV	Ultravioleta
v.o.	Via oral
v/v	Volume por volume
VR	Receptor vaniloide
VR1	Receptores vaniloides tipo 1
VRL	Receptor vaniloide <i>like</i> 1

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	15
1.	REVISÃO DA LITERATURA	16
1.1	Plantas medicinais	16
1.1.1	<u>Metabólitos secundários</u>	18
1.1.2	<u>Farmacognosia</u>	19
1.2	A espécie <i>Echinodorus macrophyllus</i>	21
1.2.1	<u>Propriedades farmacológicas</u>	22
1.2.2	<u>Fitoquímica</u>	24
1.2.3	<u>Procedimentos gerais para a obtenção de princípios ativos de plantas</u>	27
1.3	Extração líquido-líquido	29
1.4	Dor e Nociceção	31
1.4.1	<u>Classificação da dor</u>	33
1.4.2	<u>Processamento da dor</u>	34
1.4.2.1	Fibras nociceptivas.....	38
1.4.3	<u>Bases farmacológicas da analgesia</u>	39
2	OBJETIVOS	41
2.1	Geral	41
2.2	Específicos	41
3	MATERIAL E MÉTODOS	42
3.1	Material vegetal	42
3.2	Animais	42
3.3	Reagentes, soluções e material cromatográfico	42
3.4	Equipamentos	43
3.5	Preparação do extrato	44
3.6	Fracionamento do EAEm em coluna de Sephadex LH-20	44
3.7	Fracionamento do EAEm por extração líquido-líquido	45
3.8	Cromatografia em camada delgada	47
3.9	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de fotodiodo (HPLC-DAD)	48
3.10	Teste de analgesia em placa quente (Hot Plate)	48

3.11	Modelo de hiperalgesia induzida por injeção de formalina (injeção intraplantar de agente irritante)	48
3.12	Análise estatística	49
4	RESULTADOS	50
4.1	Análise fitoquímica dos extratos e frações de <i>Echinodorus macrophyllus</i> . ..	50
4.1.1	<u>Fracionamento em coluna de Sephadex LH-20</u>	50
4.1.1.1	Análise do EAEm e frações por HPTLC.....	50
4.1.1.2	Análise do EAEm e frações por HPLC.....	51
4.1.2	<u>Fracionamento do EAEm por extração líquido-líquido</u>	52
4.1.2.1	Análise das frações por TLC.....	52
4.1.2.2	Análise das frações do EAEm e padrões de flavonoides por HPLC-DAD.....	57
4.1.2.3	Comparação de padrões de substâncias presentes em <i>Echinodorus macrophyllus</i> com as frações do EAEm por HPTLC.....	60
4.2	Atividade antinociceptiva dos extratos e frações	61
4.2.1	<u>Atividade antinociceptiva no modelo de placa quente</u>	61
4.2.2	<u>Atividade antinociceptiva no modelo de formalina</u>	62
5	DISCUSSÃO	63
	CONCLUSÃO	70
	REFERÊNCIAS	71

INTRODUÇÃO

A busca por novos medicamentos no Brasil, a partir de produtos naturais, se tornou um importante panorama, no qual aproximadamente 25% dos fármacos empregados na indústria advêm direta ou indiretamente de produtos naturais, além de exercer grande influência na manutenção das condições de saúde das pessoas, sendo utilizada e difundida há muitas gerações (Lozoya, 1997; Klein, 2009). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estimou que aproximadamente 65% da população do mundo confiam principalmente em medicamentos tradicionais de origem vegetal para atenção primária à saúde (Newman e Cragg, 2016). Embora eficazes, os analgésicos estão associados a efeitos adversos importantes. Ainda não se dispõe de um fármaco analgésico e/ou anti-inflamatório ideal, ou seja, sem efeitos colaterais para o tratamento dos pacientes (Fornasari e Coaccioli, 2014). Desta forma, a procura por um fármaco ideal, eficaz, seguro e com poucos efeitos colaterais tornou-se cada vez mais necessária (Rocha, 2014), e os produtos naturais inserem-se perfeitamente na pesquisa de substâncias com potencial atividade analgésica (Silva *et al.*, 2013).

A espécie *Echinodorus macrophyllus* (Kunth) Micheli é uma monocotiledônea, pertencente à família Alismataceae, conhecida como chapéu de couro, nativa do Brasil, e está inscrita nas duas primeiras edições da Farmacopeia dos Estados Unidos do Brasil (1929, 1959). Nasce espontaneamente em margens de rios, lagos e pântanos de todo o país, preferindo solos pantanosos ou águas rasas. Por se tratar de uma planta aquática, é muito utilizada como planta ornamental em aquários e lagos artificiais ou águas salobras (Albuquerque, 2015; Matias, 2016).

Em estudos anteriores de nosso laboratório foram demonstrados os potenciais anti-inflamatório (Fernandes, 2006; Silva *et al.*, 2016) e antinociceptivo (Fernandes, 2014; Fernandes *et al.*, 2019) de extratos e frações de *Echinodorus macrophyllus*.

Os objetivos deste trabalho foram realizar o fracionamento do extrato aquoso de *Echinodorus macrophyllus* visando à obtenção de frações/princípio(s) ativo(s) com propriedade antinociceptiva e realizar a caracterização fitoquímica das frações para identificar a(s) substância(s) com potencial farmacológico. O potencial antinociceptivo das amostras foi avaliado por modelos *in vivo*.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Plantas medicinais

As plantas são seres vivos que produzem diversos metabólitos amplamente utilizados na medicina popular desde os primórdios, diminuindo ou auxiliando no tratamento de algumas doenças ou sintomas (Herbarium, 2011).

Acredita-se que desde o aparecimento da medicina tradicional, as plantas medicinais têm estado presentes em registros antigos desde há 2500 a.C. Nos períodos posteriores, os remédios surgiam de simples observações da natureza e acompanhando doses, reações e eficiência na população. Somente 200 anos depois de Cristo observou-se avanços, como construção de grandes ervanários com 600 plantas em média, onde se descrevia os cuidados no uso, na coleta e utilização medicinal (Herbarium, 2011).

Ao longo da história, desenvolveu-se a utilização de plantas medicinais pela população mundial, tornando-as matérias primas para medicamentos padronizados com consequente desenvolvimento das indústrias química e farmacêutica. Recentemente, com o retorno à vida mais natural, desenvolveram-se outras práticas terapêuticas, como a aromaterapia (Herbarium, 2011).

O Brasil possui uma grande diversidade biológica, com inúmeras espécies vegetais com potencial medicinal. Um grande avanço nesse sentido foi a Portaria do Ministério da Saúde de nº 971 de 03 de maio de 2006 que aprovou a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS).

Essa política trouxe entre as diretrizes para plantas medicinais e fitoterapia, a elaboração da Relação Nacional de Plantas Medicinais e de Fitoterápicos, bem como o provimento do acesso aos usuários do SUS. Ainda em 2006, o Decreto Federal de nº 5.813 de 22 de junho de 2006 instituiu a “Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos” (PNPMF), que incentiva as pesquisas e dá diretrizes para implantação de serviços em caráter nacional pelas Secretarias de Saúde dos Estados, Distrito Federal e dos Municípios (Brasil, 2016).

O PNPMF, documento disponível pelo Ministério da Saúde desde 2006 e atualizado em 2016, estabelece diretrizes para atuação do governo na área de plantas medicinais e de fitoterápicos. Além do Brasil possuir a maior biodiversidade do planeta, associada a uma rica diversidade étnica e cultural, detém um importante conhecimento tradicional associado ao uso de plantas medicinais, e possui o potencial necessário para desenvolvimento de pesquisas com

resultados em tecnologias e terapêuticas apropriadas. Alguns princípios nortearam a elaboração do PNPMF, tais como a melhoria da atenção à saúde e o uso sustentável da biodiversidade brasileira (Brasil, 2006).

O decreto PNPMF firmou diretrizes, quanto ao monitoramento, avaliação, regulamentação de manejo, produção, cultivo, insumos, qualificação de profissionais de saúde, formação técnico-científica dos envolvidos na cadeia produtiva de plantas medicinais, pesquisa, desenvolvimento tecnológico, inovação, produção de materiais didáticos e informativos para plantas medicinais e fitoterápicos.

Estas políticas, em consonância com a Organização Mundial de Saúde (OMS), vêm incentivar a introdução de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos nas Unidades de Saúde, reforçando assim, a importância dessas plantas em trazer benefícios para a saúde da população. O Quadro 1 mostra as indicações de uso da espécie *Echinodorus macrophyllus* pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e no Quadro 2 são apresentadas as publicações de diversas espécies encontradas na Mata Atlântica, incluindo a espécie em estudo.

Quadro 1. Indicações de uso da espécie *Echinodorus macrophyllus* pela ANVISA.

Nomenclatura botânica/popular	Parte utilizada	Forma de utilização	Posologia e modo de usar	Via	Indicações
<i>Echinodorus macrophyllus</i> / Chapéu de couro	folhas	Infusão: 1 g (colher chá) em 150 ml água (xic. de chá)	1 xíc. de chá 3x ao dia	Oral	Diurético e processos inflamatórios
<p>Contraindicações: Não deve ser utilizado por pessoas portadoras de insuficiência renal e cardíaca.</p> <p>Efeitos adversos incluem: Não utilizar doses acima da recomendada, pois pode causar diarreia.</p> <p>Informações adicionais: Pode interagir com medicamentos anti-hipertensivos causando queda na pressão.</p>					

Fonte: Brasil. ANVISA, 2011. Referências: Amaral *et al.*, 2005; Proplam, 2004; Gilbert *et al.*, 2005.

Quadro 2. Porcentagem de publicações na área agrônômica, fitoquímica, ensaios biológicos e outras espécies medicinais nativas da Mata Atlântica no *CAB Abstract*, de 1990 a 2011.

Espécies da Mata Atlântica selecionadas	CAB	Agronomia (%)	Fitoquímica (%)	Ensaio biológicos (%)	Outros (%)
<i>Achyrocline satureioides</i>	46	21,0	32,6	36,9	9,5
<i>Baccharis trimera</i>	49	48,9	6,12	38,7	6,28
<i>Caesalpinia ferrea</i>	23	34,7	0,86	52,1	12,34
<i>Casearia sylvestris</i>	42	9,0	19,0	66,6	5,4
<i>Cordia verbenacea</i>	21	23,0	14,2	57,1	5,7
<i>Echinodorus macrophyllus</i>	7	0,0	28,5	57,1	14,4
<i>Erythrina verna</i>	2	50,0	0,0	50,0	0,0
<i>Lippia alba</i>	84	34,0	40,0	16,6	9,4
<i>Maytenus ilicifolia</i>	84	20,0	25,9	38,0	15,1
<i>Mikania glomerata</i>	45	33,3	6,6	55,5	5,6
<i>Passiflora alata</i>	56	48,0	8,9	23,2	19,9
<i>Polygonum punctatum</i>	4	25,0	0,0	75,9	0,0
<i>Schinus terebinthifolia</i>	2	50,0	50,0	0,0	0,0
<i>Solanum paniculatum</i>	12	16,6	0,0	83,6	0,0
<i>Vernonia condensata</i>	7	28,0	0,0	57,1	14,9
<i>Vernonia polyanthes</i>	7	28,0	0,0	42,5	30,0
Total	491				

Fonte: Ming *et al.*, 2012.

1.1.1 Metabólitos secundários

Os metabólitos secundários das plantas são compostos estruturalmente diversos que não participam diretamente do crescimento, desenvolvimento e reprodução das plantas, como os produtos do metabolismo primário como açúcares, proteínas, lipídeos e ácidos nucleicos (Ahmed *et al.*, 2017). Os metabólitos secundários, geralmente, estão associados à proteção contra fatores bióticos como patógenos e herbívoros, assim como regulação de fatores abióticos como umidade, calor, pH ou disponibilidade de nutrientes. Podem apresentar uma função ecológica como atrativo de polinizadores, atribuindo vantagens para a sobrevivência da planta e para a perpetuação da espécie em seu ecossistema (Lopez-Bucio *et al.*, 2006; Simões *et al.*, 2007; Ahmed *et al.*, 2017). Constituem fontes potenciais de novos mecanismos de ação

farmacológica e de novas classes químicas de medicamentos, com possíveis efeitos benéficos para a saúde humana (Naseri *et al.*, 2019).

Produtos do metabolismo secundário são caracterizados por uma enorme diversidade de substâncias de baixo peso molecular, com estruturas complexas e únicas, onde cada planta tem seu próprio conjunto específico e característico de metabólitos secundários, e alguns dos quais, podem apresentar algum nível de toxicidade. Os metabólitos secundários apresentam uma concentração muito baixa, em torno de 1% do peso seco dos tecidos vegetais, podendo variar em função do estado fisiológico e de desenvolvimento em que a planta se encontra. Sua produção e quantidade também são constantemente afetadas por condições bióticas (herbivoria e ataque de patógenos) e abióticas (radiação UV, altitude, sazonalidade), de estresse, ou de interação entre ambas como mostra na Figura 1 (Oksman-Caldentey *et al.*, 2004; Ahmed *et al.*, 2017).

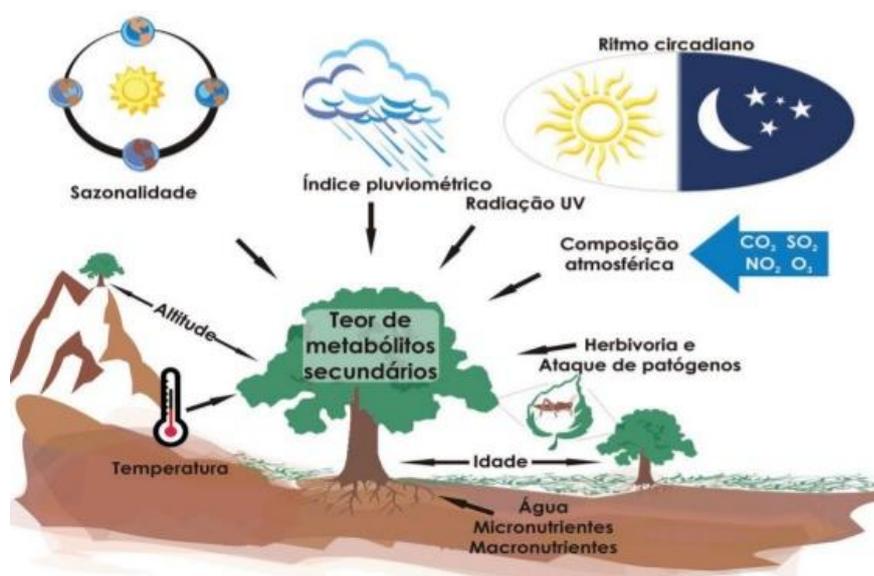


Figura 1. Principais fatores que podem influenciar o acúmulo de metabólitos secundários em planta.

Fonte: Gobbo-Neto, 2007. Acesso 25/01/20.

1.1.2 Farmacognosia

A farmacologia é o ramo da ciência que estuda as propriedades químicas dos medicamentos e respectivas classificações e pode ser definida como o estudo dos seus efeitos e mecanismos de ação. A farmacognosia é o campo da farmacologia que trata de produtos

naturais como alvos farmacêuticos (Simões, 2016). As plantas medicinais são o principal alvo de pesquisa na área da farmacognosia, sendo utilizadas com base no conhecimento popular quanto à forma de administração. Muitas vezes a planta ainda não foi estudada, sendo suas propriedades farmacológicas e tóxicas desconhecidas. Com isto fazem-se necessários ensaios pré-clínicos que contribuam de forma importante para o conhecimento dos constituintes responsáveis pela atividade farmacológica, ou as possíveis interações que envolvam as inúmeras moléculas presentes nos extratos das plantas, levando os pesquisadores, a estudos aprofundados sobre a planta tema (Turolla e Nascimento, 2006).

As plantas medicinais vêm sendo utilizadas há séculos para o alívio de sintomas, auxiliando na saúde básica da população, não somente por fatores econômicos, mas também pela procura de recursos terapêuticos integrativos e complementares (Milazene-Gutierrez *et al.*, 2003).

A expansão da fitoterapia ou a terapia com plantas medicinais pode ser atribuída a diversos fatores tais como: efeitos adversos de fármacos sintéticos; a preferência dos consumidores por tratamentos "naturais"; a validação científica das propriedades farmacológicas de espécies vegetais; o desenvolvimento de novos métodos analíticos colocados à disposição do controle de qualidade; o desenvolvimento de novas formas de preparações e administrações de produtos fitoterápicos; um melhor conhecimento químico, farmacológico e clínico das drogas vegetais e seus derivados; além também do menor custo, se comparado com os fármacos sintéticos (Cañigüeral *et al.*, 2003; Vieira, 2001).

Os metabólitos secundários das plantas têm contribuído para o desenvolvimento de novas moléculas. Tais substâncias podem atuar em inúmeros processos biológicos, como por exemplo: na síntese e liberação de mediadores inflamatórios (metabólitos do ácido araquidônico, peptídeos, citocinas, aminoácidos excitatórios); na produção ou ação de segundos mensageiros (monofosfato cíclico de guanosina, GMPc), monofosfato cíclico de adenosina (AMPc); inibição ou ativação da expressão, em células pró-inflamatórias, da óxido nítrico sintase (NOS), ciclooxigenases (COX), citocinas, interleucina (IL)-1 β , fator de necrose tumoral (TNF)- α ; redução da fragilidade e permeabilidade capilares; inibição da destruição do colágeno e da agregação plaquetária; inibição das enzimas produtoras de carcinógenos, e no processo de desintoxicação do organismo, dentre outros (Calixto, 2005; Pereira e Cardoso, 2012). Além disso, podem apresentar ação anti-inflamatória, antitumoral, antioxidante, antinociceptiva, desintoxicante, adstringência, antisséptico, cicatrizante e vasoconstritor (Pereira e Cardoso, 2012).

1.2 A espécie *Echinodorus macrophyllus*

As espécies do gênero *Echinodorus* são monocotiledôneas pertencentes à família Alismataceae e são restritas às regiões tropicais. A família Alismataceae é constituída por espécies herbáceas adaptadas a locais úmidos e semissombreados, congregando aproximadamente 16 gêneros e 100 espécies distribuídas desde a Guiana até o Brasil e Bolívia (Hayes e Holm-Nilsen, 1994; Canalli e Boye, 2017). Dentre seus gêneros, o *Echinodorus* possui a maior diversidade taxonômica, apresentando 45 espécies (Judd *et al.*, 2008), das quais 26 espécies são encontradas no Brasil (Haynes e Holm-Nielsen, 1994).

As espécies desta família são herbáceas aquáticas ou semiaquáticas, eretas, podendo atingir de 1 a 1,5 m de altura, com folhas submersas, flutuantes ou emergentes. Cada inflorescência permanece florida por aproximadamente 30 dias produzindo cerca de 200 flores hermafroditas, inodoras, com simetria radial, rasas, que possuem corola branca com numerosos estames e pistilos amarelos expostos. Verificou-se que as abelhas são os principais insetos polinizadores (Haynes e Holm-Nielsen, 1994). Suas espécies são utilizadas como fontes de alimentos, na ornamentação de aquários e lagoas, e como fitoterápicos (Silva *et al.*, 2013).

A espécie *Echinodorus macrophyllus* é nativa do Brasil e ocorre no Norte, Nordeste, Centro-Oeste, Sul e Sudeste do Brasil (Matias *et al.*, 2016). É conhecida popularmente como chá-de-campanha, chá-mineiro, erva-do-brejo, erva-de-bugre, congonha-do-brejo, erva-do-pântano ou chapéu de couro, e está inscrita nas duas primeiras edições da Farmacopeia dos Estados Unidos do Brasil (1929, 1959). Esta planta nasce espontaneamente em margens de rios, lagos e pântanos de todo o país, preferindo solos pantanosos ou águas rasas. Por se tratar de uma planta aquática, é muito utilizada como planta ornamental em aquários e lagos artificiais ou águas salobras (Leite *et al.*, 2007; Matias *et al.*, 2016).

A primeira descrição foi realizada por Micheli em 1881. A espécie *E. macrophyllus* (Figura 2) é uma herbácea perene, com comprimento de 20 a 40 cm e larguras entre 15 e 35 cm. Possui limbo de cor verde escura, peciolados, ovais, de base cordiforme, aguda, ou acuminada no ápice, limbos inteiros, com superfície rugosa, áspera, e de 9 a 13 nervuras proeminentes na face abaxial. Apresentam rizomas, folhas emersas sem presença de tricomas, com flores e frutos pedicelados.

O pecíolo é longo, coriáceo, medindo até 70 cm de comprimento, com sulcos longitudinais e providos de estrias longitudinais. Inflorescência paniculada de 6 a 11 flores cada, com cerca de 0,5 a 1 cm de tamanho, hermafroditas, perfeitas, numerosas, dispostas em racimos e alongadas, pétalas brancas e estames e carpelos amarelos. Apresenta floração nos

meses de fevereiro, abril, junho, agosto, setembro, novembro e dezembro. Possui marcas translúcidas ausentes nas lâminas foliares, indicada como chave para identificação da espécie, o que a diferencia da espécie *Echinodorus grandiflorus* (Haynes e Holm-Nielsen, 1994; Canalli e Boye, 2017).

Também é usada na fabricação de refrigerante e chás (Kinupp e Lorenzi, 2014).

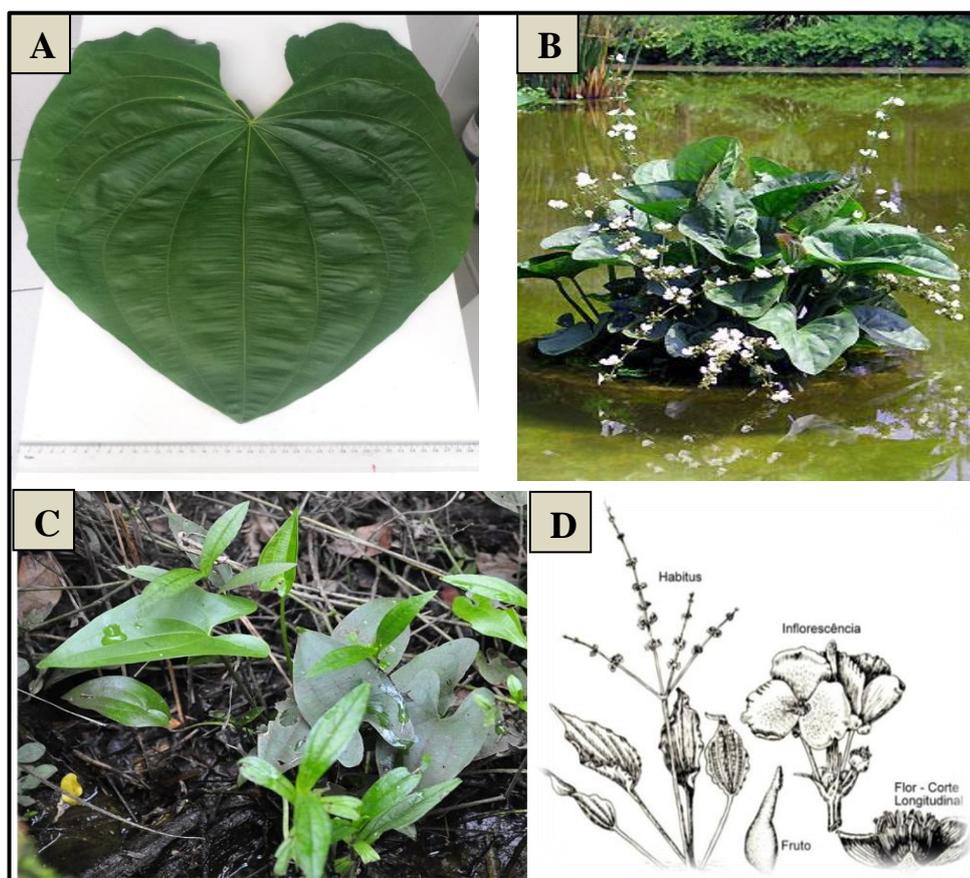


Figura 2. A espécie *Echinodorus macrophyllus*. A. Detalhes da folha (Fonte: arquivo pessoal). B. Planta com flores em habitat alagado. C. Hábito (Canalli e Boye, 2017). D. Prancha botânica de *Echinodorus macrophyllus* Fonte: <http://reformafacil.com.br/paisagismo/jardinagem/jardim-tropical/>, acesso: 17/11/2017. (Joly, 2002 adaptado).

1.2.1 Propriedades farmacológicas

As folhas da *E. macrophyllus* são as partes mais utilizadas na medicina popular, apresentando constituintes químicos ou metabólitos secundários como sais minerais, taninos, flavonoides, triterpenos, heterosídeos cardiotônicos, resina, saponinas e alcaloides. Na

literatura há descrição de ações biológicas como: energéticas, diuréticas, depurativas, anti-reumáticas, hepática, colagoga, anti-inflamatória, adstringente. Também atua no intestino delgado produzindo um efeito laxativo, e nos rins, aumentando o fluxo urinário, atuando na filtração glomerular e estimulando a eliminação de ácido úrico (Leite, 1995; Kobayashi *et al.*, 2000A, B, C; Pimenta *et al.*, 2000; Shigemori *et al.*, 2002). É utilizada popularmente na dose de 300 a 600 mg, três vezes ao dia, para tinturas e compressas, pelo tempo que for necessário, ou como infusão de 20 g das folhas verdes em um litro de água. Uma bebida refrigerante preparada a partir das folhas do chapéu de couro é muito apreciada nos estados do sudeste do Brasil (Herbarium, 2011).

A toxicidade *in vitro* e *in vivo* do extrato aquoso das folhas de *E. macrophyllus* foi analisada por Lopes *et al.* (2000) em experimentos realizados com camundongos, mostrando a ausência de efeito genotóxico e mutagênico desse extrato nas doses testadas. O extrato etanólico das folhas de *E. macrophyllus* também apresentou ausência de atividade genotóxica, mutagênica, toxicológica e apoptótica *in vivo* (Vaz *et al.*, 2016). No entanto, Vidal *et al.* (2010), demonstraram que o extrato aquoso bruto e as frações acetato de etila de *E. macrophyllus* apresentaram genotoxicidade e mutagenicidade em culturas bacterianas nas doses testadas. Entretanto, estudos realizados com o extrato etanólico e hexânico das folhas de *E. macrophyllus* demonstraram que essa planta possui atividade bactericida bastante significativa, apesar de apresentar apenas 1/3 da atividade do controle frente a *B. subtilis* e *Staphylococcus aureus* (Silva *et al.*, 2012).

Estudos desenvolvidos com o extrato aquoso de folhas de *E. macrophyllus* evidenciaram as atividades: antiedematogênica (Castro *et al.*, 2002), anti-inflamatória neurogênica (Fernandes, 2006), imunossupressora em células T de camundongos (Pinto *et al.*, 2007), antioxidante e renoprotetora de lesões renais (Portella *et al.*, 2012; Nascimento *et al.*, 2014). Além do extrato aquoso bruto, suas frações semipurificadas mostraram melhora na função glomerular renal em ratos com necrose tubular aguda induzida por gentamicina (Consenza, 2010) e ação anti-inflamatória (Silva, 2011; Silva *et al.*, 2016).

O extrato etanólico de folhas de *E. macrophyllus* apresentou ação anti-inflamatória sistêmica (aguda e subcrônica) e tópica, antinociceptiva periférica e central, praticamente sem causar sinais e sintomas de toxicidade aguda e subcrônica orais nos animais (Tanus-Rangel *et al.*, 2010), enquanto onze extratos hidroetanólicos avaliados apresentaram atividade antinociceptiva (Strada, 2012).

O óleo essencial de *E. macrophyllus* apresentou efeito antinociceptivo (Fernandes *et al.*, 2013). Estudos de Albuquerque *et al.* (2015) demonstraram efeito cicatrizante da fração acetato

de etila do *E. macrophyllus* em lesão da língua de ratos. O extrato hexânico das folhas de *E. macrophyllus* exibiu atividade antinociceptiva e anti-inflamatória por mecanismos centrais e periféricos em todos os modelos *in vivo* avaliados (Fernandes *et al.*, 2019).

1.2.2 Fitoquímica

A fitoquímica parcial da *E. macrophyllus* foi determinada a partir de uma extração metanólica por Kobayashi *et al.* (2000A, B e C), que isolaram seis novos diterpenoides clerodanos contendo nitrogênio, equinofilinas A-F (Figura 3), um novo diterpenoide tipo *seco* labdano, chapecoderina A e dois novos diterpenoides tipo labdano rearranjados, chapecoderinas B e C (Figura 4) que podem derivar do diterpeno clerodano ácido 16-oxo-15,16H-hardwickico (Kobayashi *et al.*, 2000C). Shigemori *et al.* (2002), isolaram também a partir de extrato metanólico, novos diterpenoides cembranos, equinodolídeos A e B (Figura 5) 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.

A fitoquímica do extrato metanólico das folhas de *E. macrophyllus* revelou a presença de triterpenoides, esteroides, xantonas, flavonóis e flavonas. A partição da fração acetato de etila desse mesmo extrato, conduziu ao isolamento de uma flavona C-glicosilada, a isovitexina (Figura 6 B), e através de uma análise desta fração por cromatografia em camada delgada utilizando a isovitexina como padrão, foi sugerida a presença de outra flavona C-glicosilada, a vitexina (Figura 6 A), que é um flavonoide isômero de posição da isovitexina (Tanus-Rangel *et al.*, 2010).

Estudos realizados por Consenza (2010) visaram à identificação de três flavonoides C-glicosilados: a orientina (Figura 6 C), a vitexina (Figura 6 A), e a isovitexina (Figura 6 D), no extrato bruto etanólico e nas frações hexânica, acetato de etila, butanólica e aquosa. O estudo revelou que a maior concentração desses flavonoides estava na fração acetato de etila e que o composto majoritário no extrato bruto etanólico foi a isovitexina (Figura 6 B).

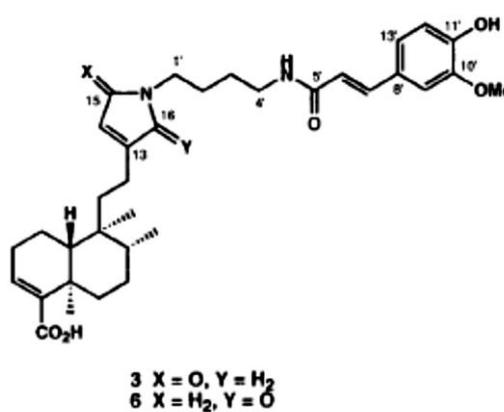
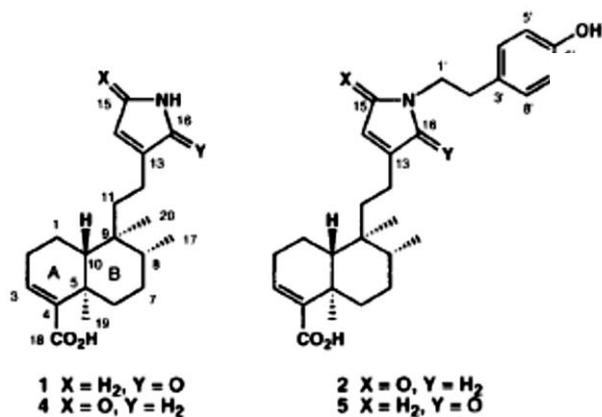


Figura 3. Estrutura química das equinofilinas. Equinofilinas A(5), B(6), C(1), D(2), E(3), F(4).
Fonte: Kobayashi *et al.*, 2000B.

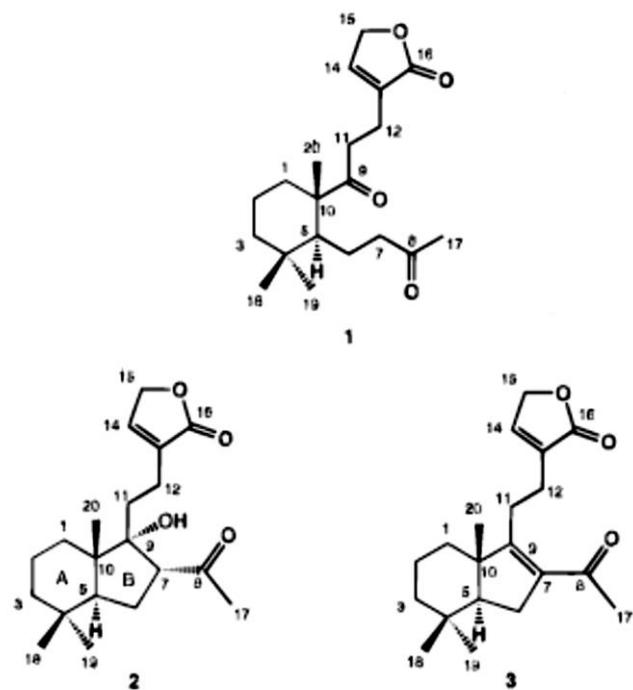


Figura 4. Estrutura química das chapecoderinas. Chapecoderinas A (1), B (2) e C (3).
Fonte: Kobayashi *et al.*, 2000C.

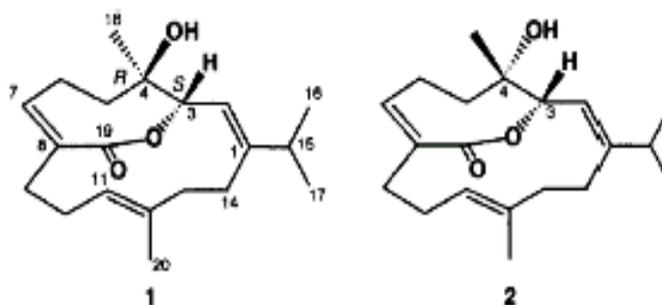


Figura 5. Estrutura química dos equinodolídeos. Equinodolídeos A (1) e B (2).
Fonte: Shigemori *et al.*, 2002.

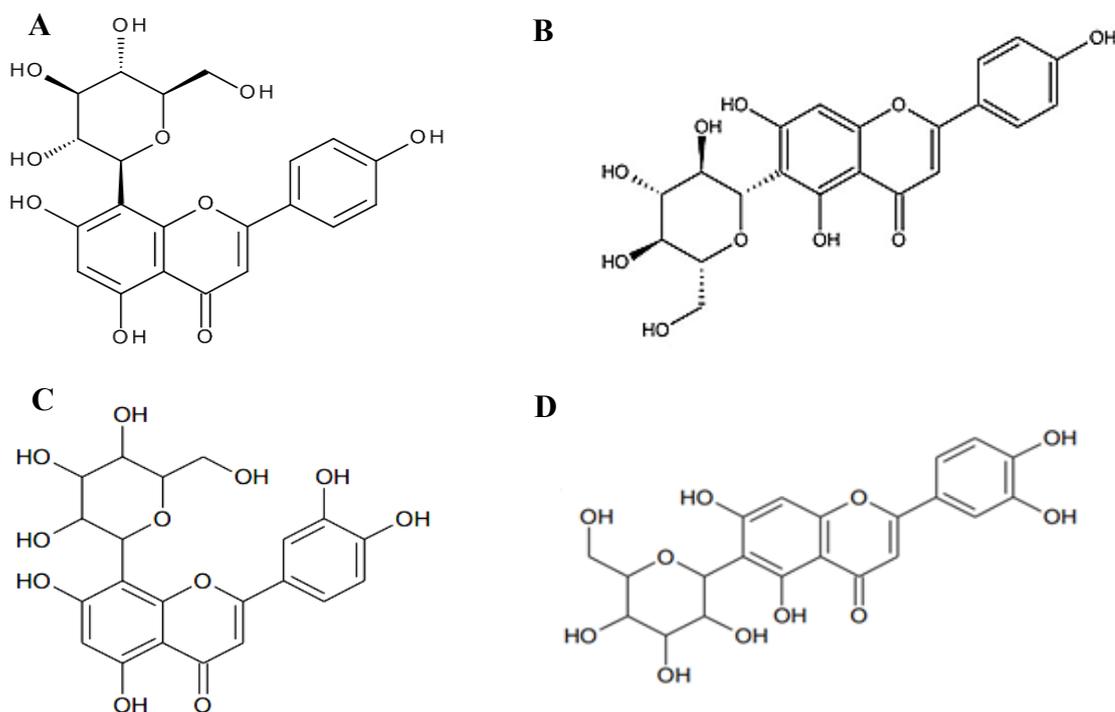


Figura 6. Estruturas das flavonas. Vitexina (A), isovitexina (B), orientina (C), isoorientina (D).
Fonte: Chagas, 2018.

O óleo essencial de *Echinodorus macrophyllus* foi submetido a fracionamento por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) semipreparativa, resultando no isolamento do ácido trans-ferúlico (Figura 7 A) e da flavona 6-C-hexa-hidroxi-apigenina (Figura 7 B) (Silva, 2014). Através de um estudo fitoquímico foi possível identificar diversas substâncias presentes no extrato em hexano obtidos das folhas de *E. macrophyllus*, além de isolar e identificar estruturalmente dois esteróis: estigmasterol e β -sitosterol (Figura 8). Por sua vez, na fração contendo compostos fenólicos foram identificados: ácido trans-aconítico, ácido trans-ferúlico e ácido cafeoilatrônico (Figura 8). Neste trabalho foi investigado o efeito da radiação gama sobre as frações contendo compostos fenólicos, saponinas e alcaloides de *E. macrophyllus*. O uso da radiação com a finalidade de descontaminação microbiológica não provoca mudanças significativas na composição das amostras (Silva, 2014).

De acordo com a revisão bibliográfica realizada para a espécie *E. macrophyllus*, apenas alguns estudos de identificação e isolamento foram realizados. É fundamental a continuação dos estudos fitoquímicos, avançando para avaliação dos efeitos biológicos de cada composto, visando o isolamento e emprego na indústria farmacêutica como fitofármaco.

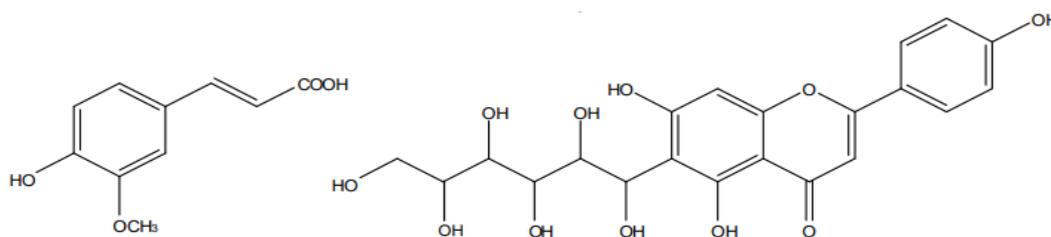


Figura 7. Estrutura de compostos isolados de *E. macrophyllus*. Ácido *trans*-ferúlico (A) e 6-C-hexa-hidroxi-apigenina (B).

Fonte: Silva, 2014.

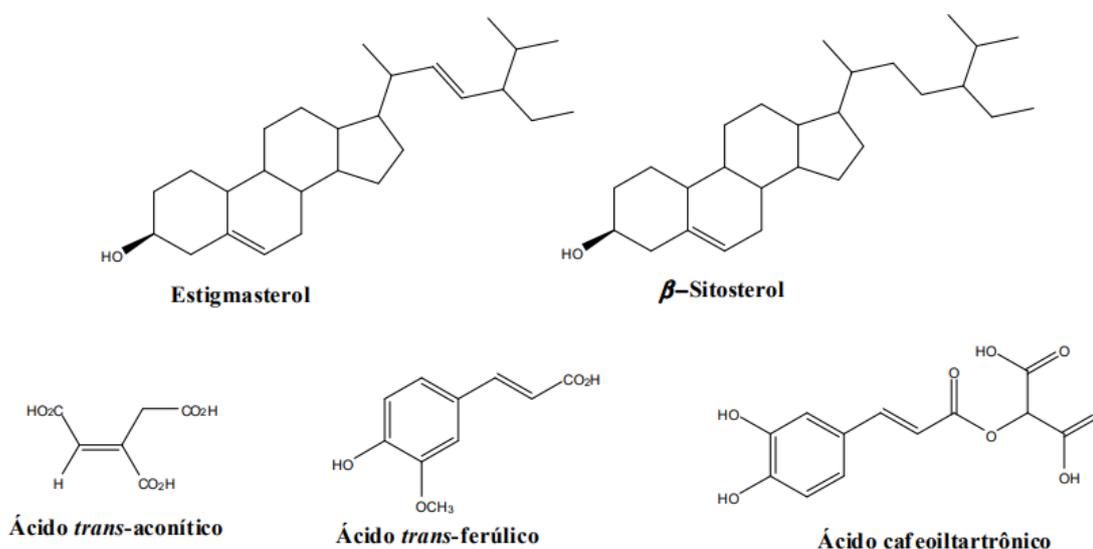


Figura 8. Estrutura química dos constituintes isolados e identificados nas folhas de *E. macrophyllus*.

Fonte: Silva, 2014.

1.2.3 Procedimentos gerais para a obtenção de princípios ativos de plantas

Na Figura 9 é possível observar as etapas básicas que podem ser seguidas quando se procura obter princípios ativos de plantas (Cechinel Filho e Yunes, 1998). Toda substância, independentemente de sua proporção na planta, e de ser conhecida ou não, pode ser um princípio ativo para determinado alvo terapêutico (Calixto, 2001).

As informações botânicas, ecológicas e químicas descritas para a família ou espécie da planta são relevantes e devem ser levadas em consideração, uma vez que o conteúdo e qualidade dos constituintes metabólicos variam entre as espécies, condições bióticas e abióticas (Gobbo-Neto, 2007).

Um extrato bruto de produto natural é literalmente um conjunto de substâncias, tornando necessário aplicar mais de uma técnica de separação para isolar compostos individuais dessa mistura. O extrato bruto é inicialmente separado em várias frações contendo substâncias de polaridades ou tamanhos moleculares semelhantes, utilizando-se vários procedimentos cromatográficos. Para o fracionamento inicial de qualquer extrato bruto, é aconselhável não gerar muitas frações, pois o composto alvo pode ficar distribuído por tantas frações que ele pode não ser detectado devido a estar em baixas concentrações (Otsuka, 2006).

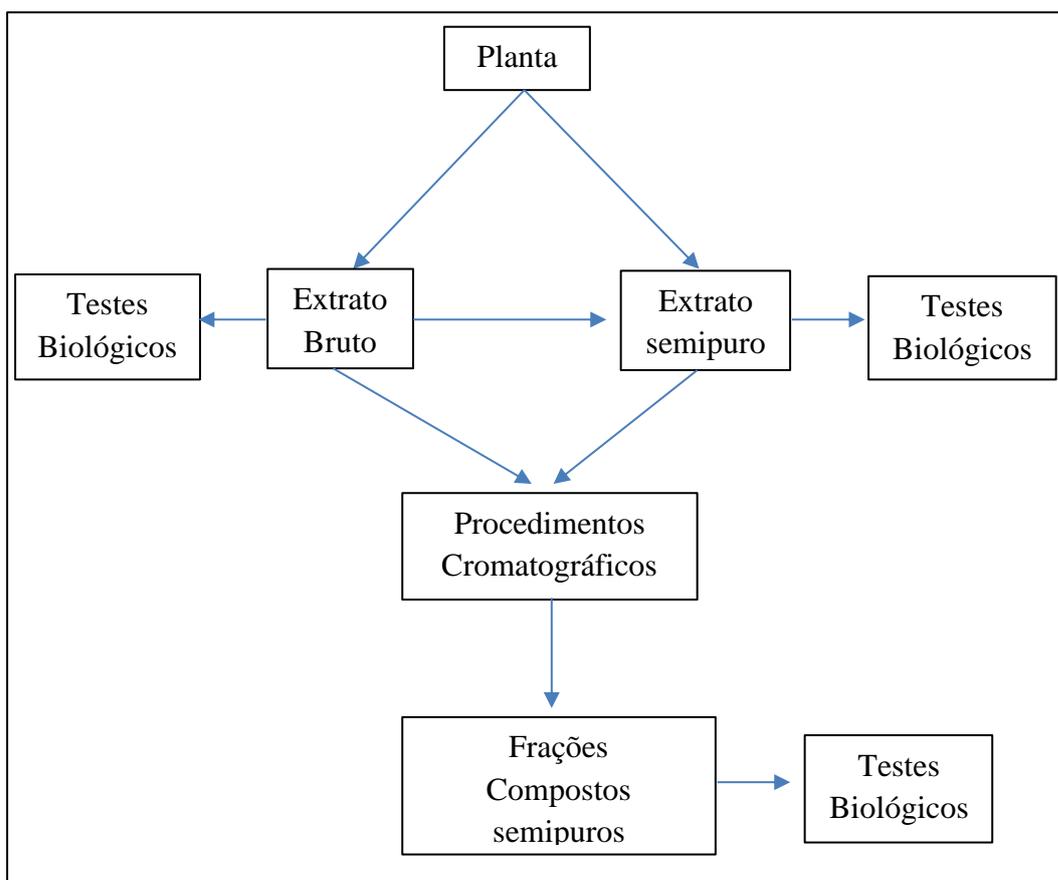


Figura 9. Procedimentos gerais para obtenção de compostos biologicamente ativos.

Fonte: Cechinel Filho; Yunes, 1998 com modificações.

O extrato bruto obtido da parte alvo da planta deverá ser submetido a um processo de fracionamento, como, por exemplo, a partição líquido-líquido com solventes de polaridades crescentes, visando uma separação preliminar das substâncias através de suas polaridades, para posteriormente ser submetido a uma separação mais ampla de classes de metabólitos. Outros solventes de polaridades similares também podem ser utilizados dependendo de quais classes

químicas são os alvos do fracionamento. Também são largamente empregados processos de fracionamento e procedimentos cromatográficos, como por exemplo, a filtração em sílica gel, como Sephadex LH-20 (Cechinel Filho e Yunes, 1998).

Com o objetivo de biomonitorar o fracionamento dos extratos obtidos das plantas, é importante que todas as amostras, brutas e semipurificadas, sejam biologicamente testadas. As amostras que apresentarem o efeito biológico de interesse serão submetidas aos procedimentos cromatográficos preliminares, visando o isolamento das substâncias ativas. No início dos estudos farmacológicos são realizadas triagens das amostras com modelos experimentais menos complexos e em seguida, selecionam-se as amostras mais ativas e/ou purificadas, as quais serão avaliadas em ensaios mais específicos, e posteriormente submetidas à análise de seu mecanismo biológico de ação (Calixto, 2001; Cechinel Filho e Yunes, 1998).

1.3 Extração líquido-líquido

Durante a extração líquido-líquido ocorre a partição da amostra entre duas fases líquidas imiscíveis (Conway e Petrovski, 1995; Queiroz *et al.*, 2001; Ignat *et al.*, 2011). Solventes de polaridade crescente, como por exemplo, n-hexano, diclorometano, acetato de etila e n-butanol, são empregados com o objetivo de extrair substâncias mais apolares, de afinidade com n-hexano, até as mais polares, de afinidade com n-butanol (Calixto, 2001). O solvente é escolhido de modo a apresentar uma afinidade ou seletividade com um ou mais componentes da mistura ou solução e uma densidade diferente para que haja separação visual das fases (Otsuka, 2006).

A partir da escolha do método cromatográfico a ser utilizado, aliado a testes biológicos (*in vivo e in vitro*), as frações que apresentam o perfil desejado de metabólitos ou princípios ativos são enriquecidas e deve-se proceder a um método sistemático de investigação. Este extrato pode ser então submetido a um processo de partição líquido-líquido, com solventes de polaridade crescente, visando uma separação (semipurificação) das substâncias através de suas polaridades.

A Figura 10 ilustra os procedimentos mencionados, indicando as prováveis classes de compostos que podem ser separados (Calixto, 2001).

Consenza (2010) realizou o fracionamento por extração líquido-líquido do extrato bruto de *E. macrophyllus* com acetato de etila e n-butanol, restando o resíduo aquoso, e demonstrou que o extrato bruto e a fração butanólica foram eficazes de melhorar a função glomerular prejudicada pela gentamicina. Fernandes *e colaboradores* (2013) mostraram o efeito

antinociceptivo do óleo essencial de *E. macrophyllus*, cuja fração volátil foi obtida por extração líquido-líquido com diclorometano. Esta técnica de fracionamento também foi utilizada com o extrato etanólico das folhas de *E. grandiflorus*, originando as frações hexânica, clorofórmica e butanólica, que foram avaliadas quanto ao mecanismo vasorrelaxante em leitos mesentéricos isolados (Carvalho, 2018).

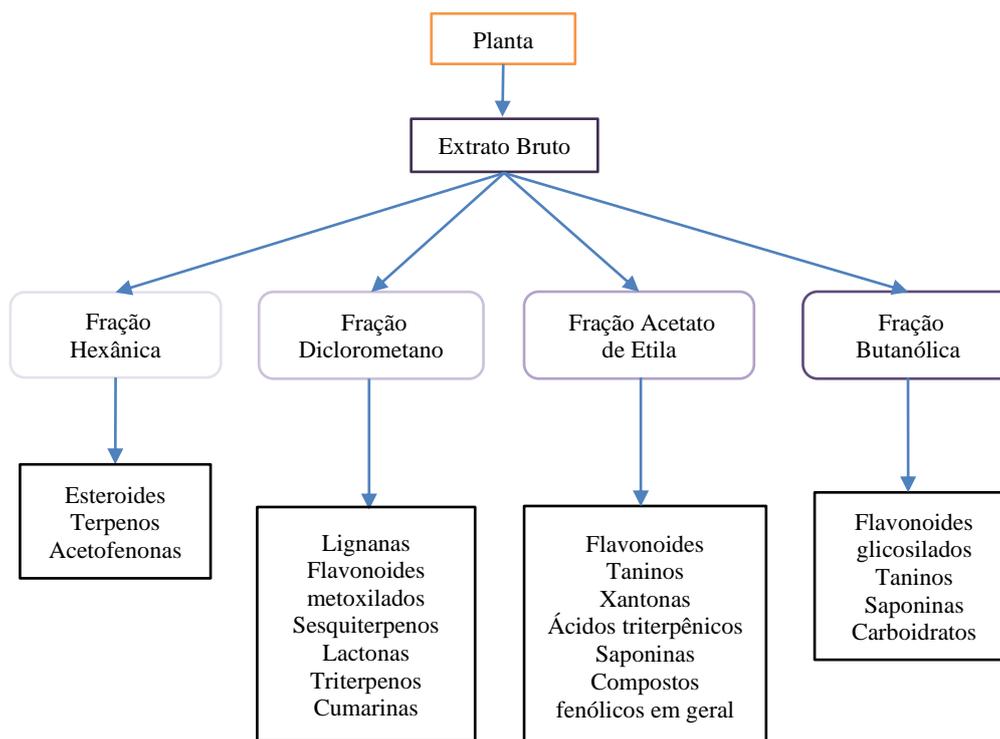


Figura 10. Esquema geral de partição e separação provável dos principais metabólitos secundários presentes em plantas (Cechinel Filho e Yunes, 1998).

A partir do extrato etanólico de *E. grandiflorus* foi evidenciada a presença de compostos fenólicos na fração butanólica e de flavonoides nas frações hexânica e clorofórmica, identificados como ácido cafeico, ácido *p*-cumérico, ácido ferrúlico e luteonina; o extrato bruto e a fração butanólica apresentaram maior efeito vasodilatador (Carvalho, 2018). Do extrato metanólico de rizomas da *E. grandiflorus* foram obtidos por extração líquido-líquido três frações: hexano/acetato de etila (9:1 v/v), acetato de etila 100% e residual aquosa. A fração acetato 100% mostrou atividade anti-inflamatória. Todas as frações diminuíram a produção de mediadores inflamatórios e não apresentaram ação citotóxica *in vitro* (Ribeiro, 2012).

As características físico-químicas distintas como polaridade, densidade, ponto de fusão, solubilidade em água e viscosidade de alguns solventes estão apresentados na Tabela 1.

O solvente selecionado para o procedimento de extração líquido-líquido deve ter um baixo potencial para artefato, baixa toxicidade, baixa inflamabilidade e baixo risco de explosão. Além disso, deve ser econômico e facilmente reciclável por evaporação. Essas questões são importantes para a escolha ideal dos solventes que serão empregados, visando um fracionamento reprodutível. Os principais solventes utilizados para a extração incluem hidrocarbonetos alifáticos e clorados, ésteres e álcoois inferiores (Tabela 1) (Otsuka, 2006).

Tabela 1. Propriedades físico-químicas de alguns solventes comuns usados na extração de produtos naturais.

<i>Solvente</i>	<i>Índice de polaridade</i>	<i>Ponto de ebulição (°C)</i>	<i>Viscosidade (centiPoise)</i>	<i>Solubilidade em água (% w/w)</i>
n- hexano	0,0	69	0,33	0,001
Diclorometano	3,1	41	0,44	1,6
Acetato de etila	4,4	77	0,45	8,7
n-butanol	3,9	118	2,98	7,81
Água	9,0	100	1,00	100

Otsuka, 2006, com modificação.

O procedimento de extração de um produto natural deve ser exaustivo (isto é, extrair o máximo dos metabólitos desejados ou o maior número possível de substâncias); deve-se utilizar um solvente de polaridade apropriada. Assim, solventes não polares são usados para solubilizar principalmente compostos lipofílicos (por exemplo, alcanos, ácidos graxos, pigmentos, ceras, esteróis, alguns terpenoides, alcaloides e cumarinas). Solventes de média polaridade são usados para extrair compostos de polaridade intermediária (por exemplo, alguns alcaloides, flavonoides), enquanto outros polares são usados para compostos mais polares (por exemplo, flavonoides glicosilados, taninos, alguns alcaloides), como mostrado na Figura 10 (Otsuka, 2006).

1.4 Dor e Nocicepção

A dor é um problema de saúde pública, em termos de sofrimento humano e impacto social e econômico. É um componente fundamental da homeostase e proteção, um alerta sobre

estímulos nocivos com potencial dano tecidual. Constitui um importante mecanismo defensivo que nos fornece sinal sobre a anormalidade permitindo que mecanismos de fuga sejam adotados, quando na exposição a danos, traduzindo-se em uma sensação desagradável (Julius e Basbaum, 2001; Patel *et al.*, 2016).

De acordo com a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), o termo dor conceitua-se como uma experiência sensorial e emocional desagradável, relacionado à lesão tecidual real ou potencial, ou descritas em termos desse tipo de dano. A dor, no entanto, é um fenômeno sensorial protetor vital essencial para a sobrevivência. Assim, a dor caracteriza-se como uma experiência complexa que envolve além de transdução de estímulos nocivos ambientais até o Sistema Nervoso Central (SNC), o processamento emocional pelo cérebro (Julius e Basbaum, 2001; revisado por Lee e Neumeister, 2020). É descrita como sendo uma experiência multidimensional na qual estão envolvidos vários componentes: motivacional, aspecto emocional, sensorio-discriminativo, afetivos e cognitivos (Mersky, 1986).

A dor refere-se a uma experiência consciente, subjetiva ou percepção de um sentimento ou sensação, que uma pessoa chama de dor. Já a nocicepção é a ativação fisiológica de vias neurais (nociceptor, vias nociceptivas ou outros processos neurofisiológicos) por estímulos (nocivos, térmicos, mecânicos ou químicos) que são potencialmente ou são prejudiciais. É um mecanismo pelo qual o SNC capta um estímulo desencadeado pela ativação de receptores sensoriais especializados existentes na pele, vasos, músculos, articulações e vísceras (Fürst, 1999; Julius e Basbaum, 2001). Um estímulo é considerado nociceptivo se resultar em uma resposta comportamental, de retirada ou fuga (revisado por Lee e Neumeister, 2020).

A dor é muitas vezes difícil de avaliar com precisão por representar uma percepção subjetiva, uma experiência com dimensão psicológica, podendo incorporar componentes sensoriais com influências pessoais e ambientais, complexa de ser definida e caracterizada. O termo nocicepção refere-se ao estímulo doloroso propriamente dito, ou seja, englobam as vias neuroanatômicas, mecanismos neurológicos e os receptores específicos e mediadores químicos que detectam e processam o estímulo até o SNC (Kandel *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2013).

Portanto, dor e analgesia seriam os termos mais apropriados para o homem, enquanto que nocicepção seria mais indicado para animais experimentais (Yaksh e Malmberg, 1994; Julius e Basbaum, 2001; Kandel *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2013).

Embora eficazes, os analgésicos estão associados a efeitos adversos importantes. Ainda não se dispõe de um fármaco analgésico e/ou anti-inflamatório ideal, ou seja, sem efeitos colaterais para o tratamento dos pacientes (Fornasari e Coaccioli, 2014). Há necessidade de buscar novas alternativas para o desenvolvimento de fármacos para o combate à dor, onde os

produtos naturais inserem-se na pesquisa de moléculas com potencial atividade analgésica (Silva *et al.*, 2013).

1.4.1 Classificação da dor

A dor pode ser classificada de acordo com o tipo de lesão: dor neurogênica, neuropática, psicogênica e nociceptiva.

Quanto ao tempo de duração, a dor pode ser classificada como aguda ou crônica.

A dor aguda é fisiológica, momentânea, constituindo um sinal que adverte o indivíduo de possível lesão, geralmente provocam comportamentos, como a retirada reflexa, protegendo o organismo de lesão posterior (Teixeira e Figueiró, 2001). São mediadas pelas fibras A δ (Yam *et al.*, 2018).

A dor crônica, por outro lado, não traz nenhum benefício para o paciente. É contínua, se repete por períodos prolongados (mais de três meses), sendo gerada por impulsos de pequena magnitude, produzidos por atividade neural anormal (Melzack *et al.*, 1999). Pode ter algum elemento de sensibilização central, mas é principalmente mediada pelas fibras C (revisado por Lee e Neumeister, 2020).

A patologia da dor crônica consiste em uma sensibilização periférica ou central de longa duração e até permanente, que se manifesta pelo aumento da capacidade de resposta e redução do limiar de neurônios nociceptivos na periferia, à estimulação de seus campos receptivos, ou um aumento da capacidade de resposta dos neurônios na região, medula espinhal e áreas supraespinhais às entradas aferentes normais ou sublimiares, respectivamente (Ji *et al.*, 2016). A dor crônica é classificada em nociceptiva, neuropática e psicogênica (Smith *et al.*, 1986; Merskey e Bogduk, 1994; Fürst, 1999). A prevalência da dor crônica pode variar de 12 a 55% na população (Vieira *et al.*, 2012).

A dor neurogênica que reflete uma lesão no tecido neuronal, já a dor neuropática é uma disfunção de estruturas do sistema nervoso periférico ou central são expressões da operação anômala do sistema nervoso. É causada por uma lesão ou doença do sistema somato-sensorial; é a dor como uma doença, associada à injúria tecidual, em geral um trauma, processo inflamatório ou câncer. (Stein, 2013, Colloca *et al.*, 2017). A prevalência da dor neuropática é estimada de 7%-9,8% em até 20% dos pacientes com dor crônica (revisado por Lee e Neumeister, 2020). Esta desordem pode ser provocada por compressão, transecção, infiltração, isquemia, injúria metabólica de corpos celulares de neurônios ou uma combinação desses

fatores (Galluzzi, 2007). Dor do membro fantasma e doenças como *Diabetes mellitus* e Parkinson são as principais causas da dor neuropática (Bowsher, 1999).

A dor nociceptiva consiste na estimulação persistente de nociceptores térmicos, químicos ou mecânicos, com ativação contínua das vias centrais da dor (Millan, 1999).

A dor pode ser física ou psíquica, dependendo da sua origem. Geralmente, a dor mental ou psicogênica é tratada com agentes antipsicóticos, que incluem drogas antidepressivas e ansiolíticas, enquanto a dor gerada por estímulos físicos pode ser tratada com analgésicos e anti-inflamatórios. O sistema nervoso central e o periférico estão envolvidos desde a origem da dor até a sua percepção. O alívio da dor depende de vários fatores, como seu tipo, seu ponto de origem e sua causa (Clark, 2012; Patel *et al.*, 2016).

A dor psicogênica, por sua vez, está relacionada à prevalência de fatores psicológicos na origem da sensação dolorosa. Esse tipo de dor pode ser observado em distúrbios psicológicos como na depressão e na ansiedade generalizada (Merskey, 1986; Fürst, 1999).

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

1.4.2 Processamento da dor

Cinco etapas essenciais podem ser identificadas no processamento neural dos sinais nocivos que levam à experiência de dor: transdução, condução, transmissão, modulação e percepção. O processamento neural da dor envolve os conceitos de transdução de estímulos físico-químicos em sinais neurais que são transmitidos, sujeitos às influências modulatórias, e processados por vias córtico-talâmicas, para permitir a percepção consciente como um estímulo que pode estar ameaçando a integridade corporal (Hudspith, 2019).

Na transdução, há transformação dos estímulos agressivos mecânicos, térmicos (frio ou calor) e químicos (pH baixo ou alto) em potenciais de ação das fibras nervosas periféricas, que são transmitidos para o SNC como mostra a Figura 11 (Besson e Perl, 1969).

Os nociceptores são neurônios sensoriais primários de alto limiar que traduzem os sinais de dor em sinais elétricos, que por sua vez são conduzidos e codificados por fibras nervosas aferentes no corno dorsal da medula espinhal (Fornasari e Coaccioli, 2014).

Os terminais periféricos contêm proteínas transdutoras altamente especializadas, a maioria das quais constituem canais que se abrem em resposta a estímulos específicos de alta

energia, tornando-se permeáveis aos íons cálcio e sódio, que são responsáveis pela despolarização terminal (Lemke, 2004; Fornasari e Coaccioli, 2014).

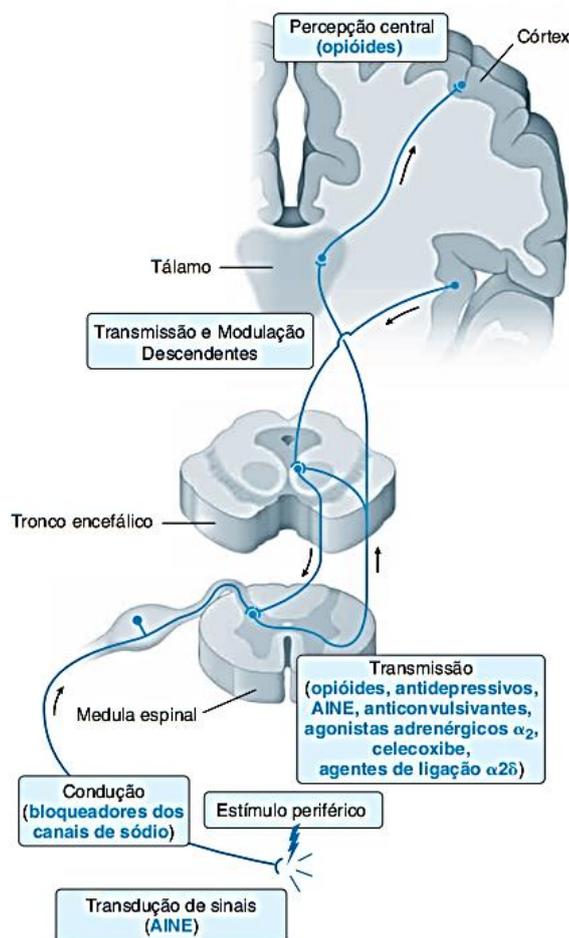


Figura 11. Resumo dos locais de ação das principais classes de fármacos utilizados no manejo da dor.

Fonte: Golan *et al.*, 2014.

A transdução da nocicepção térmica é dada por canais catiônicos não seletivos da superfamília dos canais receptores de potencial transitório (TRP). A transdução de calor nociva é caracterizada pela expressão do canal do receptor TRPV1 (vaniloide) sensível à capsaicina (Hudspith, 2019).

Estímulos nocivos ativam receptores TRPV, resultando em despolarização e liberação de neurotransmissores. Esses receptores são expressos principalmente nas membranas neuronais e nas membranas dos retículos endoplasmáticos, importante reserva de cálcio nas células, que desempenha um papel fundamental na modulação da nocicepção e neuroplasticidade (Satheesh, 2016).

No processo de transdução, o transdutor TRPV1 e o canal de íon sódio dependente de voltagem Nav 1.8 participam da sensibilização periférica. Após a fosforilação, o TRPV1 é ativado a 37°C em vez de 43°C, e o limiar de ativação mais baixo do Nav 1.8 permite a passagem de uma quantidade maior de íons de sódio quando ele se abre (Fornasari e Coaccioli, 2014).

A via nociceptiva é composta por uma cadeia de três neurônios. Os neurônios de primeira ordem, ou neurônios primários aferentes, são responsáveis pela transdução do estímulo nociceptivo e condução do sinal do tecido periférico a neurônios localizados no corno dorsal da medula espinhal, chamados de neurônio de segunda ordem ou neurônios de projeção, que ascendem à medula espinhal e projetam os sinais em neurônios localizados no bulbo, ponte, mesencéfalo, tálamo e hipotálamo. Estes são designados neurônios de terceira ordem, ou neurônios supraespinhais, e projetam os sinais para áreas subcorticais e corticais, onde a dor é finalmente percebida pelo SNC. A analgesia ocorre quando há perda da sensação ou o aumento da tolerância à dor sem a ausência da consciência, alcançado através da administração de sedativos, tranquilizantes ou anestésicos gerais (Figura 11) (Treto e Pinto, 2015).

Posteriormente, há a transmissão e modulação de sinais neurais em níveis espinhais e supraespinhais. A transmissão consiste na comunicação sináptica entre os neurônios de primeira e segunda ordem. A sinapse entre um nociceptor (ou neurônio de primeira ordem) e um neurônio espinotalâmico de segunda ordem é principalmente glutamatérgica. No caso de dor nociceptiva aguda, o glutamato se liga principalmente aos receptores ácido *alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico* (AMPA), que são canais de íons dependentes de ligantes, altamente permeáveis aos íons sódio, que despolarizam os neurônios de segunda ordem e desencadeiam o potencial de ação que atinge o tálamo (Fornasari e Coaccioli, 2014).

A informação nociceptiva é transmitida da medula espinhal para o tálamo e para o córtex por cinco vias ascendentes: os tratos espinotalâmico, espinoreticular, espinomesencefálico, cervicotalâmico, espinohipotálâmico (Julius e Basbaum, 2001).

Após a transmissão, ocorre a fase de modulação, onde há supressão ou amplificação da resposta ao estímulo, ocorrendo também a ativação da via descendente, o que modifica a transmissão nociceptiva pela inibição de estímulos processados dentro das células do corno dorsal da medula espinhal, modificando assim a transmissão do sinal (Tranquilli *et al.*, 2005).

Nas células do corno dorsal ocorre a liberação de mediadores como glutamato, neurocinina A e substância P na fenda sináptica, as quais se ligam a receptores N-metil-D aspartato (NMDA) e de neurocinina (NK). A ligação destes mediadores a estes receptores permite o influxo de cálcio e sódio intercelular, que intensifica a despolarização e desencadeia

prolongada hipersensibilização, o que caracteriza o estado de dor patológica (sensibilização central). Essa sensibilização central é responsável pelos aspectos de extensão da sensibilidade para áreas vizinhas à lesionada (hiperalgesia secundária), e por tornar os mecanorreceptores, que fisiologicamente não determinam dor, capazes de produzi-la (alodinia). Os dois sistemas de modulação nociceptiva mais importantes são mediados por receptores NMDA e opioides (Fantoni e Mastrocinque, 2002; Fantoni, 2012; Aleixo *et al.*, 2017).

As estruturas neurais da dor são rapidamente modificadas no caso de dor inflamatória aguda e, principalmente, crônica, durante a qual os limiares de ativação dos nociceptores periféricos são reduzidos e sua responsividade é aumentada. Essa sensibilização periférica é, principalmente, o resultado da fosforilação de duas estruturas moleculares envolvidas no processamento da dor: o transdutor TRPV1 e o canal Nav 1.8 de íons de sódio dependentes de voltagem. A fosforilação desses substratos deve-se à ativação de diferentes cinases por agentes sensibilizantes que atuam através de seus próprios receptores de membrana, como prostaglandinas, bradicinina e adenosina, liberados pelas células inflamatórias (Fornasari e Coaccioli, 2014).

Um conjunto crescente de evidências sugere que mediadores inflamatórios, incluindo citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e fatores de crescimento em nervos periféricos, gânglio da raiz dorsal (DRG), e medula espinhal contribuem substancialmente para a gênese e manutenção da dor crônica (Grace *et al.*, 2014; Ji *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2017; Ji *et al.*, 2018). Após lesão nervosa ou dano tecidual, os mediadores inflamatórios não são apenas regulados e liberados das células imunes infiltradas (como células T, macrófagos, células NK e mastócitos) e células gliais (por exemplo, células satélites e células Schwann na PNS; micróglia, astrócitos e oligodendrocitos no SNC) para sensibilizar os neurônios sensoriais, mas também liberados pelos neurônios sensoriais para acentuar a ativação glial e a neuroinflamação, levando a sensibilização periférica e central (Chen *et al.*, 2018; Inoue e Tsuda, 2018; Ji *et al.*, 2019; Ji *et al.*, 2018; Zarpelon *et al.*, 2016).

Segundo a teoria da comporta descrita por Melzack e Wall em 1965, a supressão da dor decorreria da inibição pré-sináptica na medula espinhal, resultante da colisão entre potenciais dos aferentes primários e os antidrômicos originados na substância gelatinosa dos cornos posteriores da medula espinhal (Teixeira, 2009). O sistema nervoso é interativo, dinâmico e multifuncional sendo capaz de receber, organizar, interpretar, modular e responder eficientemente aos estímulos de forma diferenciada com base nos mecanismos de plasticidade neuronal. A percepção da dor é um processo complexo, que normalmente resulta da ativação de aferentes não-nociceptivos e nociceptivos, e que pode ser modulada por alguns fatores

intrínsecos do organismo (Treto e Pinto, 2015). O SNC utiliza projeções eferentes no cérebro e na medula espinhal para modular os sinais nociceptivos de entrada e modificar a percepção da dor (Golan *et al.*, 2014).

1.4.2.1 Fibras nociceptivas

As fibras A δ podem ser divididas em duas classes principais, que se diferenciam pela temperatura de ativação (Figura 12). As fibras A δ do tipo I são ativadas por temperaturas em torno de 53°C, enquanto que as do tipo II são ativadas por temperaturas em torno de 43°C. A condução da informação nociceptiva que ocorre via fibras A δ é transmitida numa velocidade entre 12 e 30 m/s (Millan, 1999; Yaksh e Malmberg, 1994; Julius e Basbaum, 2001).

Tipo de fibra	 A α e A β	 A δ (I e II)	 C
Mielinização	Muita	Pouca	Ausente
Diâmetro	10 μ m	2 – 6 μ m	0,4 – 1,2 μ m
Velocidade de condução	30 – 100 m/s	1,2 – 30 m/s	0,5 – 2 m/s
Temperatura de ativação	Não reconhece	Tipo I ~ 53°C Tipo II ~ 43°C	~ 43°C

Figura 12. Tipos de neurônios sensoriais primários, responsáveis pela condução do sinal nociceptivo da periferia ao SNC. Adaptado de Julius e Basbaum (2001).

As fibras C, também conhecidas como fibras polimodais, por transmitirem estímulos mecânicos, térmicos e químicos, conduzem a uma velocidade muito mais lenta em relação às outras fibras nociceptivas, em torno de 0,5 a 2 m/s em virtude de não possuírem bainha de mielina (Plevry e Lauretti 1996; Millan, 1999; Julius e Basbaum, 2001).

As fibras A α e A β são mielinizadas, de grande diâmetro e detectam estímulos aplicados sobre a pele, músculo e articulações e apresentam uma rápida velocidade de condução. Já as fibras A δ e C, de médio e pequeno diâmetro, são pouco mielinizadas e amielinizadas respectivamente, apresentam baixa velocidade de condução e constituem a maioria dos nociceptores. Além disso, as fibras A δ são responsáveis por mediar a dor rápida e bem localizada, e as fibras C por mediar a dor lenta e difusa, com sensação de queimação, que

persiste após o estímulo nocivo ter cessado. Ambas detectam estímulos químicos, mecânicos e térmicos (Julius e Basbaum, 2001; Lent, 2010).

1.4.3 Bases farmacológicas da analgesia

Os estudos realizados nas últimas décadas proporcionaram avanços notáveis na compreensão das bases farmacológicas da analgesia. No entanto, as terapias para a dor não apresentam melhora significativa há várias décadas (Basbaum *et al.*, 2009; Berger *et al.*, 2011).

As principais classes de medicamentos utilizadas no tratamento da dor são os opioides e os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs). Entretanto estas terapias são inadequadas para o alívio da dor crônica (Vandenberg *et al.*, 2014; Corder *et al.*, 2017). Além disso, os opioides não são apenas ineficazes para certos tipos de dor crônica (como dor neuropática), mas também podem piorar a hiperalgesia e alodinia, ou levar a uma variedade de efeitos colaterais, incluindo vício, íon inibidor respiratório e coceira grave (Ashburn e Fleisher, 2018; Busse *et al.*, 2018).

Os receptores para opioides endógenos estão localizados na periferia, no gânglio raiz dorsal, na medula espinhal e no cérebro (Hooten, 2016). Os opioides se ligam a um receptor acoplado a proteína G contendo sete segmentos transmembrana no sistema nervoso central, resultando em hiperpolarização da membrana celular, inibição da adenilato ciclase, diminuição da AMPc intracelular e reduções na liberação de neurotransmissores associados à nocicepção (Pergolizzi *et al.*, 2017). Três receptores com efeitos farmacológicos distintos foram identificados, incluindo o receptor mu-, delta- e kappa-opioide (Stein, 2016).

A atividade agonista no receptor mu-opioide resulta em hiperpolarização da membrana, inibição da adenilato ciclase e diminuição do cAMP intracelular. Essa cascata de reações intracelulares reduz a liberação de neurotransmissores (por exemplo, substância P, ácido g-aminobutírico, dopamina, acetilcolina e norepinefrina) que desempenham papéis importantes na nocicepção (Hooten, 2020).

Os opioides promovem a abertura dos canais de potássio e inibem a abertura de canais de cálcio voltagem dependentes. Estes efeitos de membrana reduzem a excitabilidade neuronal (pois o aumento da condutância de K^+ causa hiperpolarização da membrana, fazendo com que diminua a chance de que a célula dispare potenciais de ação) e reduzem a liberação de transmissores (pela inibição da entrada de Ca^{2+}) (Scholz e Woolf, 2002).

À luz da epidemia do uso de opioides, é importante entender que os pacientes com dor crônica correm um maior risco de transtornos pelo uso de substâncias e que o transtorno pelo

uso ativo de substâncias é uma forte contraindicação relativa à terapia crônica com opioides (Hobelmann e Clark, 2018).

A inibição segmentar mais comumente conhecida e originalmente descrita por Melzack e Wall (1965) como a "teoria dos portões" infere que as sinapses entre neurônios aferentes que transmitem estímulos nocivos (fibras A δ e C) e neurônios no corno dorsal da medula espinhal podem ser bloqueados.

Os AINEs e os esteroides podem ser usados principalmente para reduzir a presença periférica de prostaglandinas. Os efeitos analgésicos dessas classes de fármacos estão relacionados à capacidade de inibir a atividade da enzima cicloxigenase (COX), inibindo desse modo a produção de prostaglandinas e tromboxanos que sensibilizam os nociceptores para liberação de mediadores da inflamação como a bradicinina e assim, inibem a percepção do nociceptor periférico (Fornasari e Coaccioli, 2014).

A sensibilização periférica é um alvo importante para a farmacologia da dor, pois envolve mecanismos de ação dos AINEs. Os esteroides também são usados para diminuir a síntese de moléculas sensibilizantes. Quando os potenciais de ação atingem os terminais nociceptores nos cornos dorsais da medula espinhal, os canais de cálcio dependentes de voltagem do tipo N abrem e promovem a liberação do neurotransmissor. Estes canais contêm a subunidade $\alpha_2\delta$ à qual a pregabalina e a gabapentina se ligam, bloqueando assim o influxo de íons cálcio e a liberação do neurotransmissor (Fornasari e Coaccioli, 2014).

Os opioides, os antidepressivos, os AINEs, os anticonvulsivantes e os agonistas 2-adrenérgicos modulam a transmissão da sensação da dor na medula espinhal, diminuindo o sinal transmitido das vias de dor. Os opioides também modulam a percepção central de estímulos dolorosos. Os múltiplos locais de ação dos analgésicos permitem o uso de uma abordagem combinada de fármacos no manejo da dor (Figura 11) (Golan *et al.*, 2014).

Na tentativa, então, de buscar novas alternativas para o alívio da dor, utilizando a biodiversidade brasileira, neste trabalho daremos continuidade ao estudo do potencial antinociceptivo da espécie *Echinodorus macrophyllus*.

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

Realizar o estudo fitoquímico e avaliar a eficiência do tratamento com o extrato e frações de *Echinodorus macrophyllus* em modelos experimentais de nocicepção *in vivo*.

2.2 Específicos

- Fracionar o extrato aquoso de *Echinodorus macrophyllus*, visando produzir frações/princípio(s) ativo(s) com propriedade antinociceptiva.
- Realizar a caracterização fitoquímica das frações obtidas/isoladas visando identificar a(s) substância(s) com atividade(s) farmacológica(s).
- Avaliar o potencial antinociceptivo em modelos *in vivo*.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Imunologia Aplicada e Bioquímica de Proteínas e Produtos Naturais (*LIA-BPPN*) do Departamento de Bioquímica da Universidade do Estado do Rio de Janeiro (UERJ).

3.1 Material vegetal

Echinodorus macrophyllus (Kunth) Micheli 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.

3.2 Animais

Foram utilizados camundongos machos ou fêmeas 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 ou doados pelo Instituto Vital Brazil. Os animais foram 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*. 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 Protocolos 11/2018 e 13/2018.

3.3 Reagentes, soluções e material cromatográfico

- Ácido acético glacial, formaldeído 37%, Merck S.A., Brasil;

- Água destilada, n-hexano, diclorometano, acetato de etila, n-butanol, etanol anidro e metanol absoluto, grau HPLC, Tedia, EUA;
 - Câmara de Neubauer, BOECO, Alemanha;
 - Coluna para HPLC C18, com 250 mm x 4,6 mm e granulometria de 5 µm, ACE, EUA;
 - Dipirona 86,64%, Laboratório Químico Farmacêutico da Aeronáutica;
 - Isoorientina, orientina, Isovitexina, vitexina e rutina, Merck S.A., Brasil;
 - Papel de Filtro Quantity, JP40-Faixa Branca, J Prolab, Brasil;
 - Sephadex LH20, GE Healthcare, Suécia;
 - Placas de cromatografia em camada delgada (TLC) de Sílica gel 60 Alugram, Macherey-Nagel, 10 x 20cm; Alemanha;
 - Placas de cromatografia em camada delgada de alta performance (HPTLC) de Nano Sílica gel 60 Supelco; MACHEREY-NAGEL, 20 x 20cm; Alemanha;
 - NP (ácido difenilbórico aminoetiléster – “natural product”), PEG (polietileno glicol 400), vanilina, Sigma Chemical Company, EUA;
 - 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;
 - Ultrassom, modelo T7, Thornton Inpec Eletrônica Ltda., Brasil.
- Os demais reagentes foram usados em grau analítico.

3.4 Equipamentos

- Agitador magnético modelo 257, FANEM, Brasil;
- Balança analítica modelo B200, Micronal, Brasil;
- Balança analítica Mettler Toledo, modelo PB 3002, Suíça;
- Câmara de U.V. (365 e 254 nm) Boitton, Pró-Análise, mod. BOIT-GAB01, Brasil;
- Cromatógrafo líquido de alta eficiência (HPLC), com sistema controlador SCL-10A acoplado a detector UV-visível, Modelo SPD-10AV, Shimadzu, Japão;
- Espectrofotômetro UV-visível, Shimadzu, modelo 160A, Japão;
- Estufa tipo 294, de Leo & Cia. Ltda., Brasil;
- Liofilizador Liotop-K105-LIOBRAS;
- Ultrapurificador de água, modelo Milli-Q plus, Millipore Corporation, EUA.

3.5 Preparação do extrato

O extrato aquoso de *Echinodorus macrophyllus* (EAEm) foi obtido a partir da infusão *overnight*, de folhas desidratadas e picadas, em água destilada aquecida a 100°C, na proporção de 50 g de folha a cada 1 L de água destilada. O material foi mantido ao abrigo da luz, sendo posteriormente filtrado em papel filtro (JP40, J Prolab) com ajuda de bomba de vácuo (Vakuumpumpe DS4), e a solução obtida foi submetida à liofilização (Liotop-K105-LIOBRAS) e armazenada em frasco âmbar no freezer.

O rendimento das extrações (%) foi calculado relacionando o peso da planta triturada e do material extraído (peso após liofilização), como é descrito na expressão abaixo:

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

3.6 Fracionamento do EAEm em coluna de Sephadex LH-20

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 polímero Sephadex LH-20, equilibrada em etanol/água 20% (Figura 13).

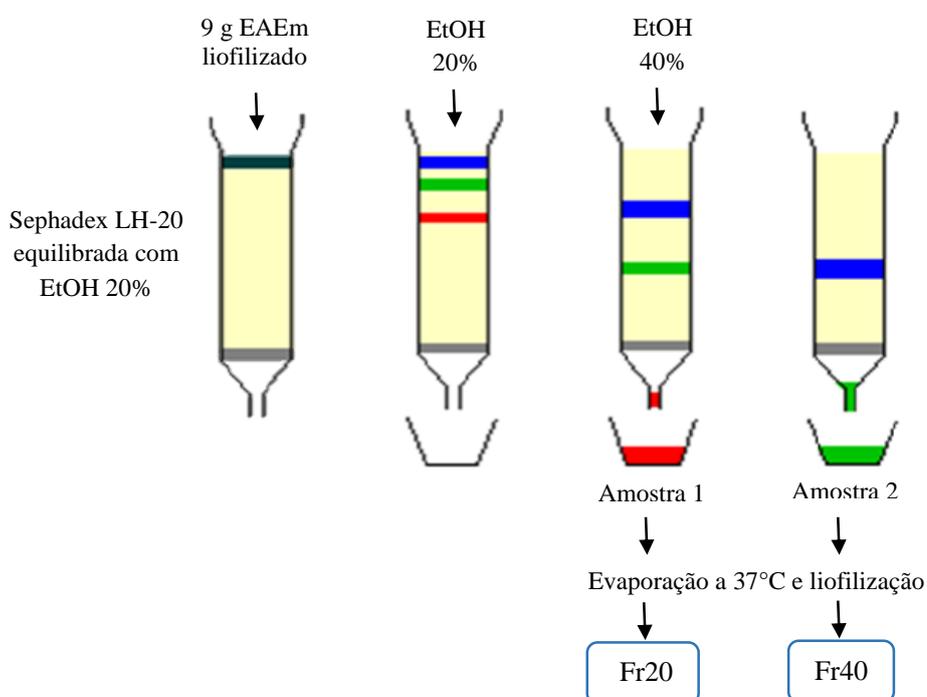


Figura 13. Fracionamento do EAEm em coluna empacotada com resina Sephadex LH-20.

O material foi eluído da coluna utilizando-se sequencialmente (*step wise*) com 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 em camada delgada (TLC). O procedimento foi repetido duas vezes e após comparação dos cromatogramas, as amostras com perfis semelhantes foram reunidas. As frações foram evaporadas no evaporador rotativo, posteriormente liofilizadas e armazenadas a -15°C . Quando necessário, as amostras foram reconstituídas em água ultrapura na concentração adequada para os experimentos.

3.7 Fracionamento do EAEm por extração líquido-líquido

As frações foram obtidas por extração líquido-líquido utilizando 5 g de EAEm liofilizado diluído em 500 mL de água destilada em cada procedimento. Este método consiste na mistura por agitação de líquidos imiscíveis empregando solventes em ordem crescente de polaridade (Figura 14).

O EAEm foi solubilizado em 500 mL de água destilada e transferido para um funil de separação, contendo 100 mL de hexano. Após agitação vigorosa por 15 s e posterior repouso até total separação visível das fases, recolheu-se a fase hexânica (orgânica), repetindo-se o procedimento por três vezes (100 mL) para obtenção da fração hexânica.

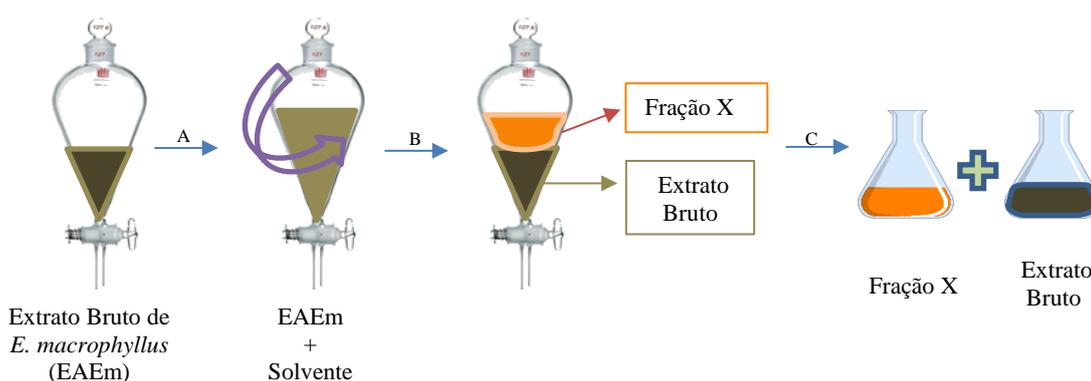


Figura 14. Fracionamento pelo método de Extração líquido-líquido. A) O Extrato Bruto de *E. macrophyllus* é reunido aos solventes de diferentes polaridades no funil de decantação; B) decantação após agitação e rotação; C) Separação das Frações e do EAEm.

O mesmo procedimento foi realizado sequencialmente para obtenção das frações diclorometânica (2 extrações com 250 mL), acetato de etila (3 extrações com 250 mL), e butanólica (6 extrações com 250 mL), restando a fração aquosa residual (Figura 15). A cada partição, o solvente adicionado ao funil foi misturado vigorosamente de maneira a se obter, visualmente, uma mistura homogênea. A forma e tempo de agitação foram iguais às acima descritas para a fração hexano.

Após avaliação da reprodutibilidade por TLC as frações orgânicas foram agrupadas, os frascos oriundos de cada extração líquido-líquido e de cada fração solubilizadas em seu solvente de origem foram reunidos seguidos de evaporação a 35°C (Fisatom 802D) e/ou liofilização. O percentual de rendimento da extração foi calculado pela fórmula: (peso do material obtido/peso do material inicial) x 100.

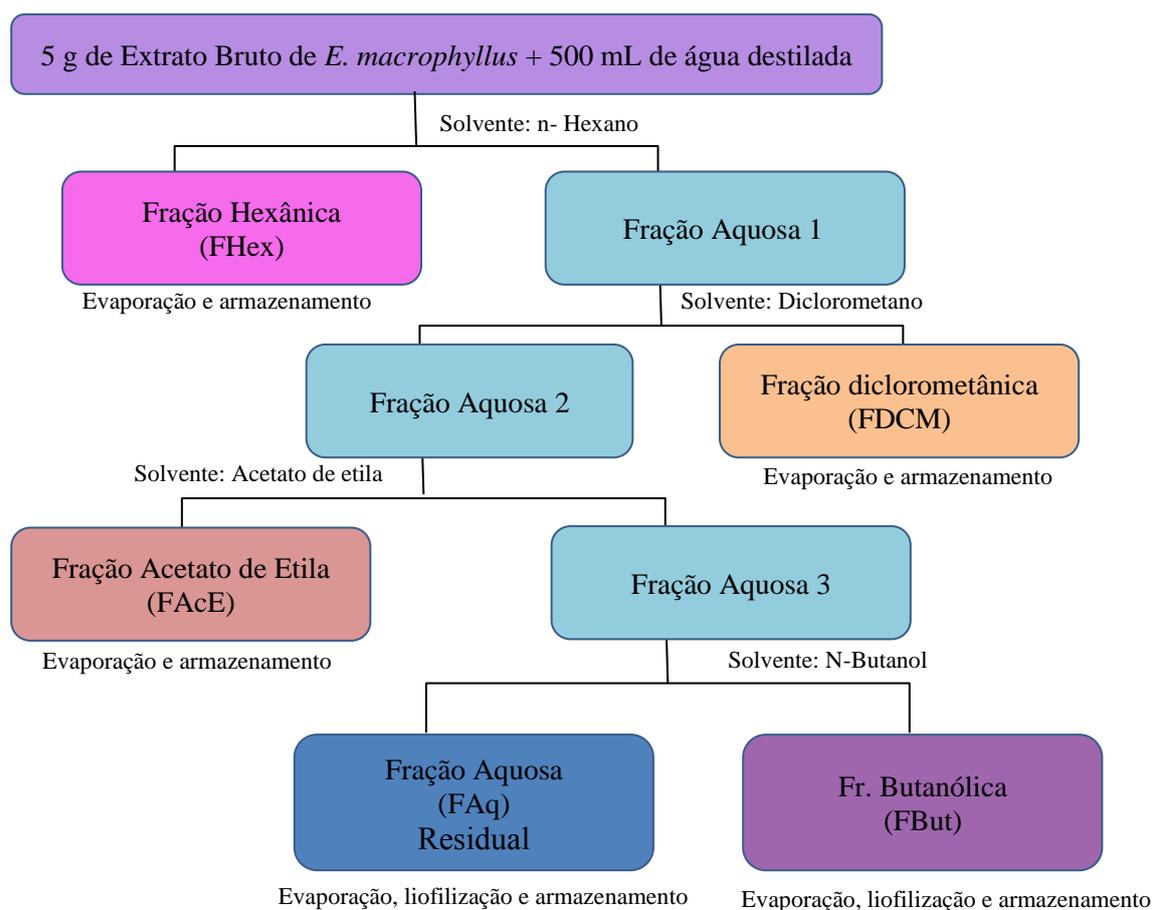


Figura 15. Extração líquido-líquido do extrato aquoso das folhas de *E. macrophyllus*

3.8 Cromatografia em camada delgada

As amostras de EAEm, as frações e os padrões orientina, isoorientina, vitexina, isovitexina foram submetidos à cromatografia em camada delgada (TLC) em placas de sílica gel 60 de 10 x 20 cm ou à cromatografia em camada delgada de alta eficiência (HPTLC) de 3 x 7 cm ou 10 x 20 cm.

O EAEm, Fr20, Fr40 e a fração aquosa residual foram diluídas em água destilada. A FHex foi diluída em n-hexano, as frações FDCM e FAcE foram diluídas em etanol 50%, a FBut diluída em metanol 50% e os padrões em metanol puro, etanol puro, etanol 50% e/ou NaOH. Todas as amostras foram aplicadas 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. A cromatografia foi desenvolvida em cuba de vidro com tampa, à temperatura ambiente, utilizando como eluentes a seguinte mistura de solventes: acetato de etila:diclorometano:ácido 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.

A presença de terpenos foi verificada por revelação com vanilina 0,2 g% em etanol. A placa foi colocada na estufa a 105°C para secar e imediatamente aspergida com H₂SO₄ 5% aquoso. Após secar na estufa a 105°C, foi revelada com vanilina, sendo aquecida por 10 min em estufa a 105°C e observada a coloração (Wagner *et al.*, 1995).

Também foi realizada a revelação da placa de TLC com vapor do iodo, que atua como um reagente universal. Foi adicionada uma pequena quantidade de cristais de iodo em frasco de vidro hermeticamente fechado, realizando o procedimento em capela de exaustão. Após a colocação da placa no recipiente, esperou-se o tempo para o iodo sublimar e se complexar com os compostos orgânicos presentes na placa gerando manchas marrons avermelhadas.

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

O EAEm e suas frações foram analisados por HPLC-DAD e os dados foram processados utilizando o **Software Chromeleon®**. Foram injetados no cromatógrafo 20 µL das amostras (EAEm, Fr40, FHex, FDCM, FAcE, FBut e FAq residual) a 1 mg/mL em metanol:água (9:1 v/v) utilizando-se como fase estacionária uma coluna de fase reversa µBondapak C18 100 Å de 4,6 x 250 mm, com fluxo de 1 mL/min. A eluição foi monitorada na faixa de comprimento de onda de 200-450 nm, sendo utilizada como fase móvel, os solventes A (ácido acético 1%) e B (acetonitrila) da seguinte forma: solvente isocrático 0% de B por 5 min e após um gradiente 0 a 40% de B por 30 min, 40-100% de B por 10 min e isocrático por mais 10 min com 100% de B. Os cromatogramas foram registrados a 254 nm.

3.10 Teste de analgesia em placa quente (Hot Plate)

O teste da placa quente (*hot plate*) foi realizado como descrito por Tita *et al.* (2011), que avalia o tempo em que os animais permanecem sobre uma chapa metálica aquecida ($55 \pm 0,5^\circ\text{C}$) até reagirem ao estímulo térmico com o comportamento de levantar ou lambes as patas. Uma hora antes do início dos experimentos, os camundongos foram mantidos em jejum. As aferições foram realizadas nos tempos de 30, 60 e 120 min após a administração dos tratamentos ($n = 5/\text{grupo}$). Um grupo controle foi tratado por via oral (v.o.) com salina 0,9% e outro com a droga controle morfina 10 mg/kg, por via subcutânea (s.c.). Os tratamentos foram realizados (v.o.) nas doses de 25 mg/kg para o EAEm e para Fr20 ou a Fr40, nas doses 25 e 100 mg/kg. Ao final de cada protocolo experimental, os animais foram eutanasiados em câmara de CO_2 .

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

Os animais foram tratados por via oral 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 - tampão fosfato de sódio 0,01 M, 0,9% NaCl 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).

3.12 Análise estatística

Análises descritivas das variáveis foram realizadas (média e desvio padrão). A análise dos dados foi realizada pelo teste One-way ANOVA seguido do pós-teste Dunnett, utilizando o programa GraphPad Prism[®] versão 6.0. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes (Dawson-Saunders e Trapp, 1994).

4. RESULTADOS

4.1 Análise fitoquímica dos extratos e frações de *Echinodorus macrophyllus*

4.1.1 Fracionamento em coluna de Sephadex LH-20

O extrato bruto de *E. macrophyllus* (EAEm) produzido a partir da preparação por infusão de suas folhas apresentou um rendimento médio de 38% e suas frações Fr20 e Fr40 obtidas a partir do fracionamento em coluna de LH-20 conforme descrito anteriormente (Figura 13), tiveram um rendimento de 92,0% e 7,9%, respectivamente.

4.1.1.1 Análise do EAEm e frações por HPTLC

O extrato aquoso de EAEm e as frações Fr20 e Fr40 obtidas em três fracionamentos em coluna de vidro aberta com Sephadex LH20 foram reunidas e analisadas por cromatografia em camada delgada de alto desempenho (HPTLC), reveladas com NP/PEG e visualizadas sob luz UV a 365 nm (Figura 16).

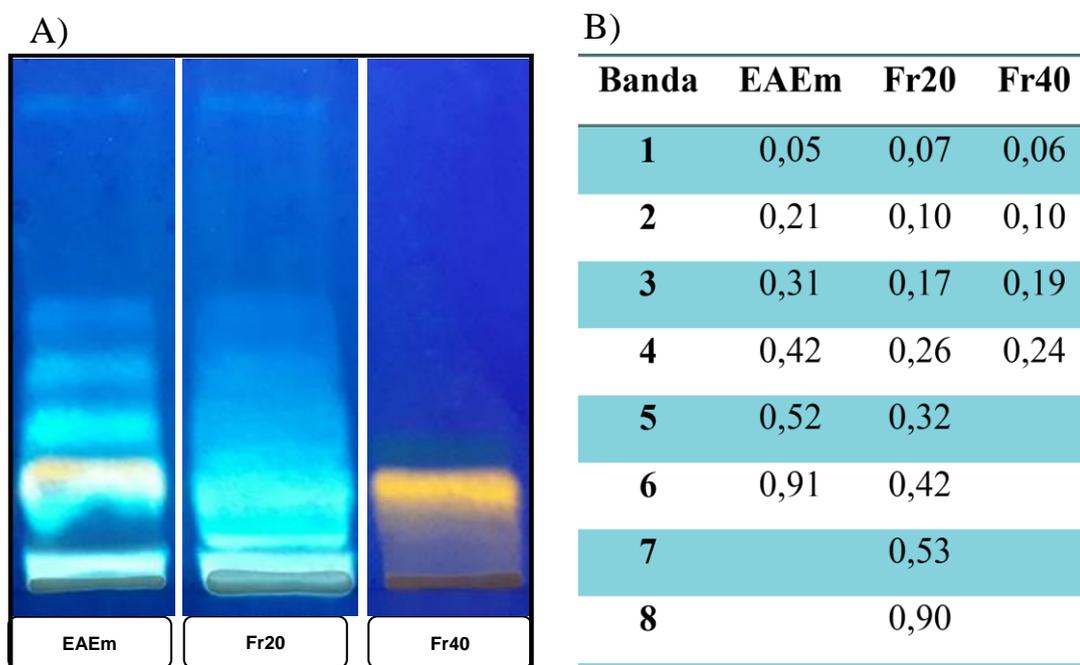


Figura 16. Cromatografia em camada delgada de alta performance (HPTLC). A) Cromatogramas do extrato EAEm e suas frações Fr20, Fr40; B) Valores de Rf determinados nos cromatogramas. As cromatografias foram desenvolvidas em placa de HPTLC em sílica gel 60 com 3 x 10 cm utilizando como fase móvel acetato de etila: diclorometano: ac. acético: água (10:2,5:2:1 v/v), sendo reveladas com NP-PEG (flavonoides) e visualizadas sob luz UV a 365 nm.

Podemos observar que EAEm e Fr20 são constituídos por substâncias com valores de tempo de retenção (Rf) entre 0,05 a 0,91, enquanto a Fr40 apresenta substâncias com valores de Rf entre 0,06 e 0,24, (Figura 16). O EAEm e suas frações quando revelados por NP-PEG apresentaram bandas amarelas, alaranjadas e azuis.

4.1.1.2 Análise do EAEm e frações por HPLC-DAD

Os perfis cromatográficos do EAEm e suas frações, obtidos por HPLC-DAD utilizando uma coluna de fase reversa C18 e monitoramento em 254 nm está apresentado na Figura 17. Para o EAEm (Figura 17A) observamos picos de retenção em duas regiões principais entre 2 e 8 min e entre 13 e 35 min. A fração Fr20 mostrou comportamento semelhante ao extrato bruto, apresentando distribuição de picos na mesma região, embora em menor número e menor intensidade (Figura 17B). A Fr40 mostrou predominância de picos com tempos de retenção entre 24 e 33 min, sendo dois majoritários (Figura 17C).

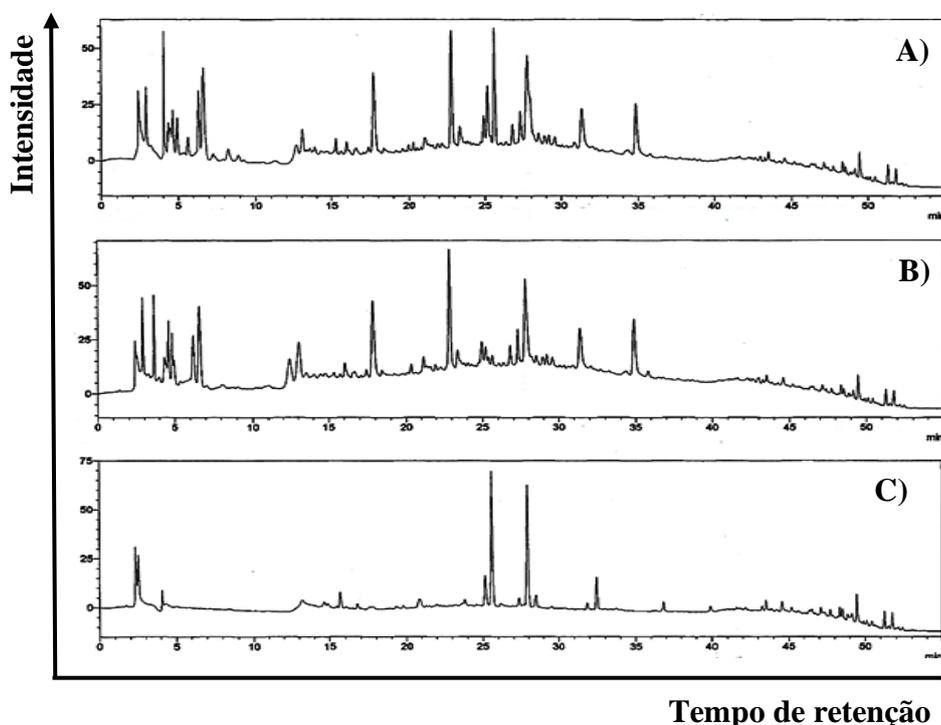


Figura 17. Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de fotiodo (HPLC-DAD). Cromatogramas do EAEm (A), Fr20 (B) e Fr40 (C) obtidos por HPLC-DAD em coluna C18 monitorados em 254 nm. Fase móvel ácido acético 2% (A) e acetonitrila (B). Fluxo de 1 mL/min; Fase móvel ácido acético 2% (A) e acetonitrila (B). Eluição isocrática 0% de B por 5 min, seguido de gradiente 0-40% de B até 35 min; 40-100% de B entre 35 e 45 min; e 100% de B isocrático por mais 10 min.

4.1.2 Fracionamento do EAEm por extração líquido-líquido

O fluxograma mostrado na Figura 18 foi repetido seis vezes, a fim de se obter massa suficiente para prosseguimento das análises, resultando em cinco frações denominadas FHex, FDCM, FAcE, FBut e FAq residual. Os processos de agitação e rotação foram aplicados na produção das frações, seguido de evaporação e/ou liofilização para secagem total das frações para armazenamento. A Figura 18 mostra a massa recuperada/g de EAEm, utilizado no procedimento de fracionamento, e o percentual de cada fração em relação ao total de amostra recuperada. A fração FHex apresentou o menor rendimento neste processo, seguido da FDCM e FAcE. A FBut mostrou o maior rendimento (27%), restando na FAq residual o maior percentual da massa inicial (69,1%).

4.1.2.1 Análise das frações por TLC

Para avaliar a reprodutibilidade dos seis procedimentos independentes de fracionamento por extração líquido-líquido, amostras das frações resultantes de alguns dos procedimentos foram submetidas à análise por cromatografia em camada delgada. Os cromatogramas revelados com NP/PEG e visualizados sob luz UV a 365 nm estão apresentados na Figura 19.

Podemos observar, pelo perfil cromatográfico, que houve reprodutibilidade tanto na produção do extrato bruto, quanto no fracionamento por extração líquido-líquido, analisando-se comparativamente os fracionamentos 1 e 2; e o 5 e 6. Outra informação importante foi que o fracionamento forneceu as frações FHex, FDCM, FAcE, FBut e FAq residual, todas com perfis fitoquímicos diferentes. As frações FHex e FDCM não mostraram bandas coloridas quando reveladas com NP-PEG.

As frações com maior número de bandas foram: FAcE, FBut e FAq residual, sugerindo que estas sejam as frações de maior complexidade. As frações FAcE e FBut apresentaram uma banda amarela intensa, além de bandas esverdeadas e azuis, distribuídas ao longo da corrida cromatográfica.

As frações das extrações 5 e 6, que apresentaram bandas positivas para flavonoides, assim como o EAEm, foram submetidas à outra TLC e os valores de R_f das bandas reveladas por NP-PEG foram calculados (Figura 20).

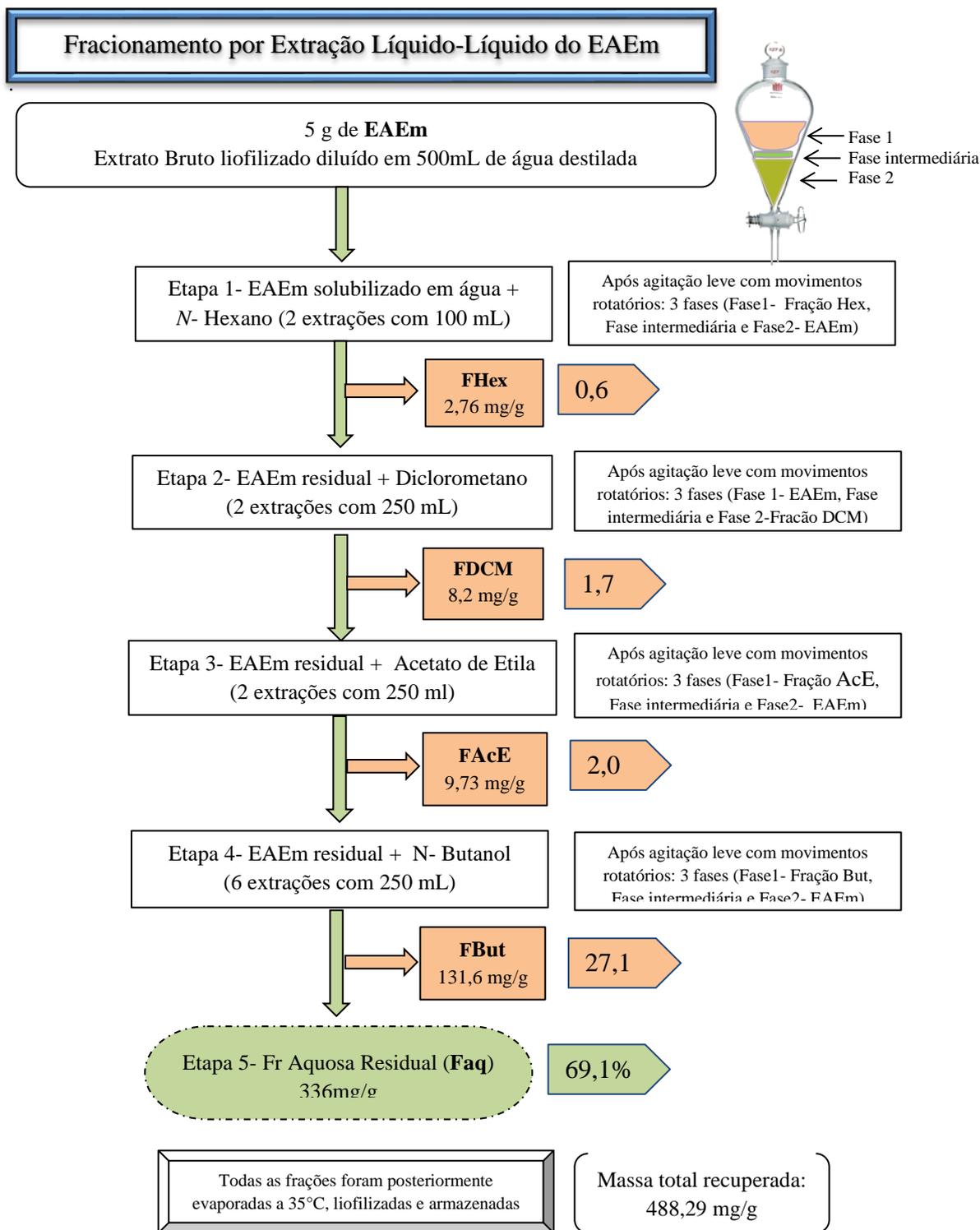


Figura 18. Fluxograma do fracionamento do extrato bruto de *E. macrophyllus* por extração líquido-líquido.

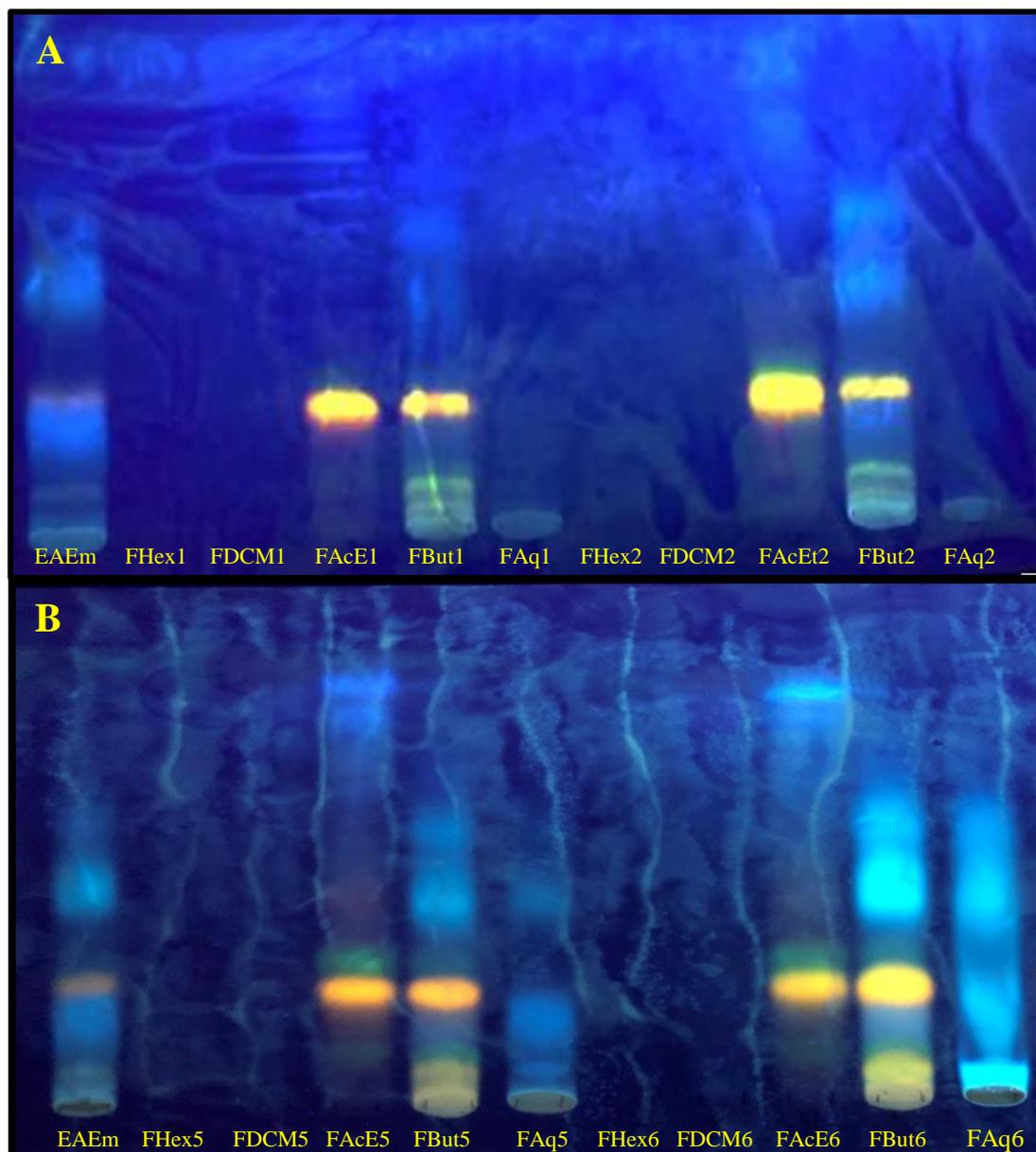
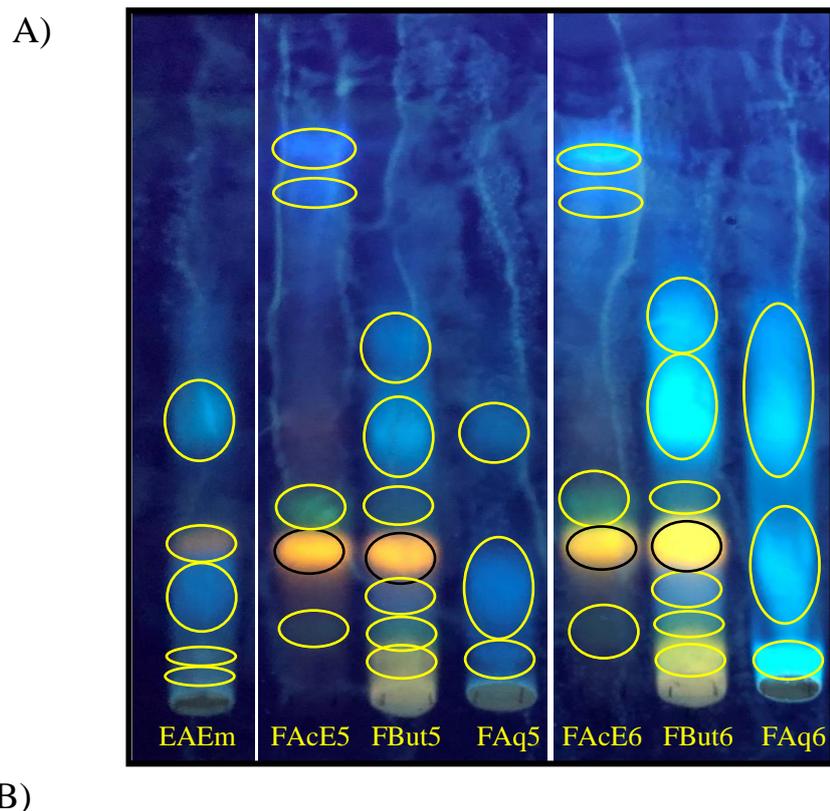


Figura 19. Cromatografia em camada delgada das frações obtidas do EAEm por extração líquido-líquido. Cromatogramas de diferentes extratos EAEm e suas frações FHex, FDCM, FAcE, FBut e FAq residual das extrações 1 e 2 (A) e 5 e 6 (B). As cromatografias foram desenvolvidas em placa de TLC em sílica gel 60 com 10 x 20 cm. Foi utilizada como fase móvel acetato de etila: diclorometano: ac. acético: água (10:2,5:2:1 v/v), sendo reveladas com NP-PEG (flavonoides) e visualizadas sob luz UV a 365 nm.

As frações FAcE e FBut apresentam substâncias de elevada migração e próximo ao ponto de aplicação, com valores de R_f entre 0,08 a 0,92. O EAEm e a FAq residual possuem bandas com R_f entre 0,06 a 0,53, bandas amarelas, alaranjadas e as bandas azuis.



Banda	EAEm	AcE5	FBut5	FAq5	FAcE6	FBut6	FAq6
1	0,06	0,12	0,08	0,08	0,13	0,08	0,08
2	0,09	0,25	0,13	0,20	0,27	0,15	0,23
3	0,19	0,33	0,20	0,46	0,34	0,20	0,53
4	0,28	0,85	0,26		0,84	0,27	
5	0,48	0,92	0,34		0,92	0,35	
6			0,46			0,50	
7			0,61			0,66	

Figura 20. Cromatografia em camada delgada das frações obtidas do fracionamento por extração líquido-líquido. A) Cromatogramas dos diferentes extratos EAEm e suas frações Acetato de Etila (FAcE), Butanólica (FBut) e aquosa residual (FAq) das extrações 5 e 6 que apresentaram bandas delimitadas e assinaladas. B) Valores de Rf determinados nos cromatogramas. As cromatografias foram desenvolvidas em placa de TLC em sílica gel 60 com 10 x 20 cm. Foi utilizada como fase móvel acetato de etila: diclorometano: ac. acético: água (10:2,5:2:1 v/v), sendo reveladas com NP-PEG (flavonoides) e visualizadas sob luz UV a 365 nm.

O perfil por TLC das frações FAcE e FBut foram comparadas com a Fr40 (Figura 21), mostrando similaridade com a banda amarela intensa apresentada em ambas as frações.

Todas as frações e o EAEm foram revelados com outros reagentes como a vanilina e iodo (Figura 22 A e B), porém não revelaram bandas tão evidentes como com o NP-PEG. Entretanto, pode-se observar cinco bandas nas frações FAcE e FBut, para ambas as revelações, mostrando serem as frações com maior complexidade para essa revelação.

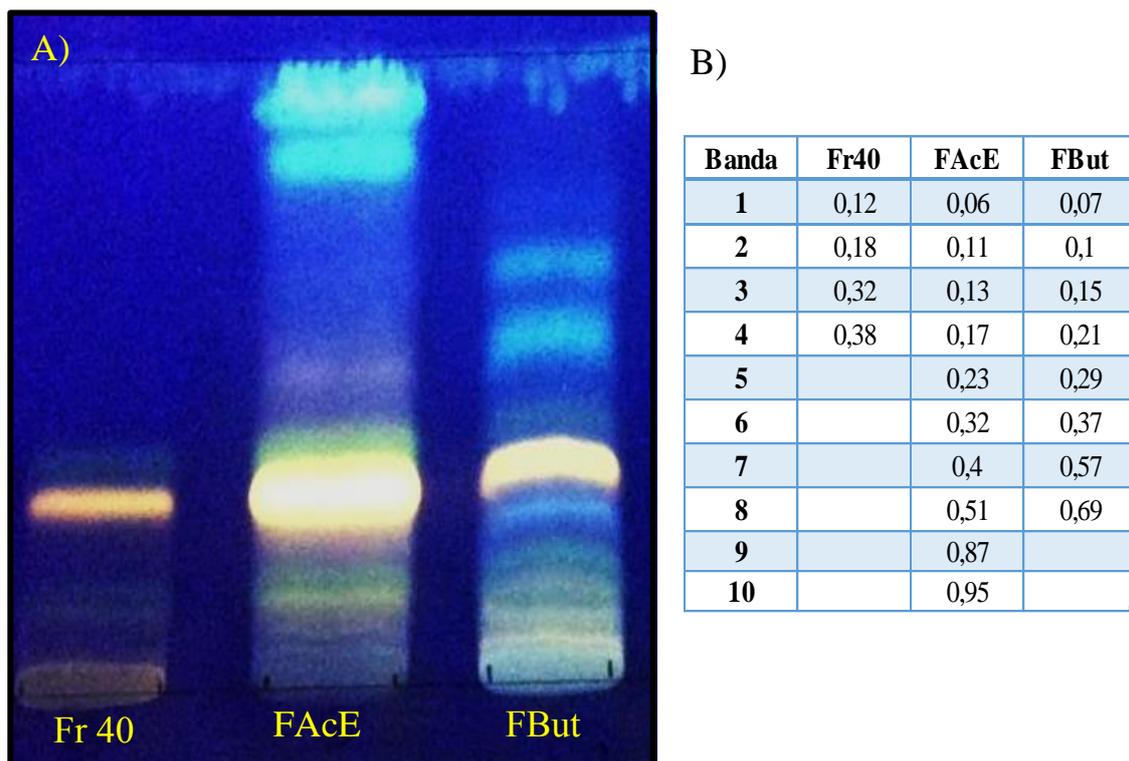


Figura 21. Cromatografia em camada delgada (TLC) da Fr40, FAcE e FBut. As cromatografias foram desenvolvidas em placa de TLC em sílica gel 60 com 10 x 20 cm. Foi utilizado como fase móvel acetato de etila: diclorometano: ac. acético: água (10:2,5:2:1 v/v). A) A cromatografia foi revelada com NP-PEG (flavonoides) e visualizada sob luz UV a 365 nm. B) Valores de Rf determinados nos cromatogramas.

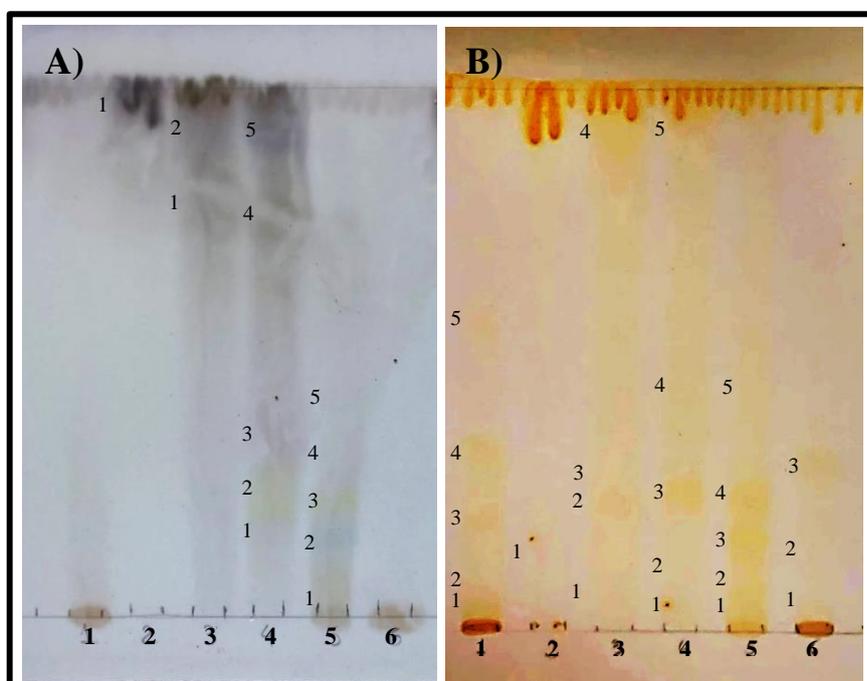


Figura 22. Cromatografia em camada delgada de todas as frações obtidas do fracionamento do EAEm de *E. macrophyllum* por extração líquido-líquido reveladas com A) Vanilina sulfúrica e B) Iodo. As cromatografias foram desenvolvidas em placa de TLC em sílica gel 60 com 10 x 20 cm. Foi utilizado como fase móvel acetato de etila: diclorometano: ac. acético: água (10:2,5:2:1 v/v). A numeração das bandas está à esquerda de cada fração. 1)EAEm; 2)FHex; 3)FDCM; 4) FAcE; 5) FBut; 6)FAq.

4.1.2.2 Análise das frações do EAEm e padrões de flavonoides por HPLC-DAD

Os cromatogramas das frações, obtidos por HPLC-DAD utilizando uma coluna de fase reversa C18 e monitoramento em 254 nm, estão apresentados na Figura 23, e a descrição de cada pico, tempos de retenção e área (%) na Tabela 2. O cromatograma da FHex mostrou dois picos de maior intensidade entre 3 e 50 min de tempo de retenção, porém com pouca eficiência de detecção. A FDCM mostrou cinco picos de maior intensidade na região de 22-45 min, sendo predominante o de TR de 28,171 min (43,51%). A FAcE exibiu um cromatograma de maior complexidade com 19 picos distribuídos em duas regiões principais entre 21-34 min e entre 39-43 min, sendo majoritários os de TR de 26,030 min (16,95%), 28,334 min (13,45%), 22,377 (9,00%) e 43,06 min (8,39%). A FrBut mostrou predominância de 20 picos com tempos de retenção entre 4 e 35 min, sendo majoritários os de TR em 14,787 min (12,93%), 26,075 min (12,12%), 4,962 min (11,20%), 28,369 min (7,92%) e 27,650 min (7,68%).

Padrões de flavonoides descritos na espécie *E macrophyllus* foram submetidos à cromatografia nas mesmas condições (Figura 24), determinando-se os TR de 25,423 (isoorientina), 26,306 (orientina), 27,721 (isovitexina) e 27,801 (vitexina).

Tabela 2. Análise por HPLC-DAD de frações do EAEm obtidas por extração líquido-líquido.

Pico	FHex T _R	Área %	FDCM T _R	Área %	FAcE T _R	Área %	FBut T _R	Área %
1	3,555	48,76	22,764	13,06	2,957	2,51	4,962	11,20
2	48,828	51,24	28,171	43,51	21,718	2,88	5,367	3,07
3			43,500	15,91	22,377	9,00	5,523	6,04
4			44,330	13,45	24,246	4,72	9,221	1,98
5			44,702	14,07	25,630	3,23	14,787	12,93
6					26,030	16,95	14,922	6,59
7					27,156	2,32	22,509	3,05
8					28,135	4,20	23,856	2,86
9					28,334	13,45	23,333	3,66
10					28,891	2,77	24,775	1,87
11					29,568	4,79	25,381	2,72
12					30,165	2,49	25,764	2,17
13					32,096	3,40	26,075	12,12
14					34,295	2,59	27,183	3,73
15					39,450	2,66	27,650	7,68
16					41,604	3,42	28,150	4,42
17					42,457	3,66	28,369	7,92
18					42,656	3,55	28,921	2,85
19					43,062	8,39	31,963	1,26
20							34,852	1,88

Os resultados representam o tempo de retenção (T_R) e as áreas (%) dos cromatogramas.

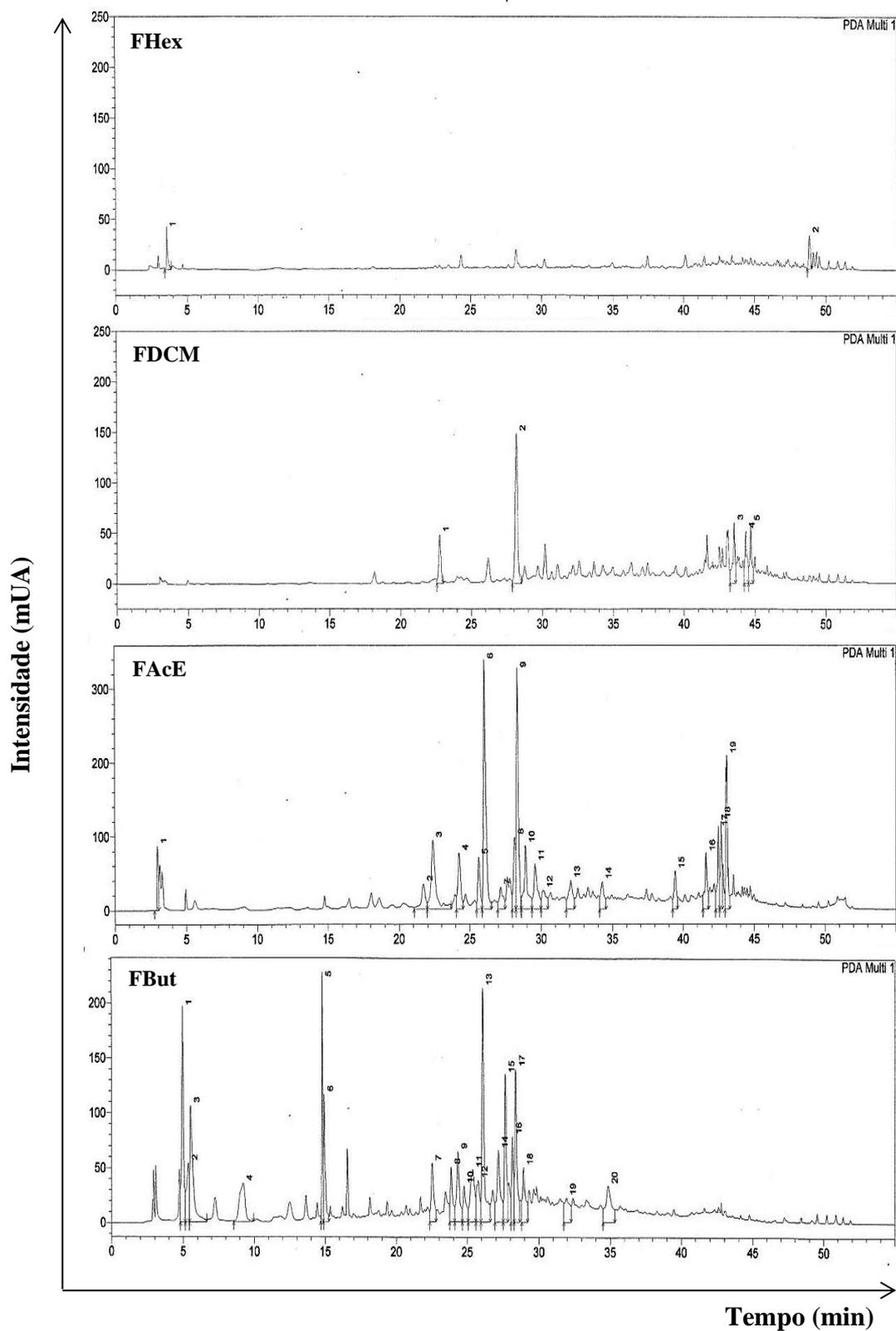


Figura 23. Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de fotiodo (HPLC-DAD). Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD em coluna C18 monitorado em 254 nm. Fluxo de 1 mL/min; Fase móvel ácido acético 1% (A) e acetonitrila (B). Eluição isocrática 0% de B por 5 min e após gradiente 0-40% de B por 30 min; 40-100% de B por 10 min e mais 10 min isocrático com 100% de B.

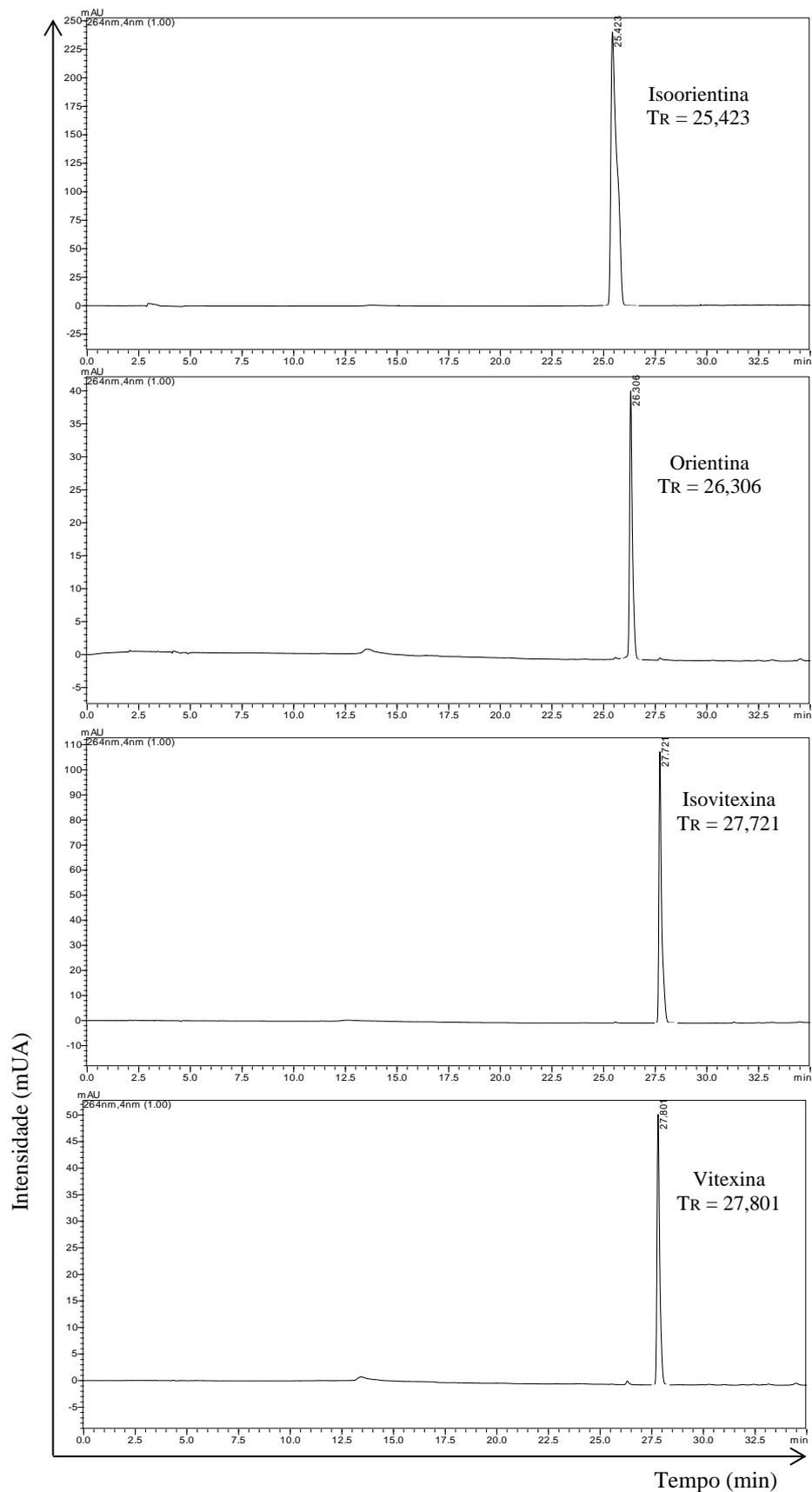


Figura 24. Cromatogramas obtidos por HPLC-DAD dos padrões de Isoorientina, Orientina, Isovitecina e Vitexina em coluna C18 monitorado em 254 nm. Fase móvel ácido acético 1% (A) e acetonitrila (B). Fluxo de 1 mL/min; Eluição isocrática com ácido acético 0% por 5 min, seguido de gradiente de acetonitrila 0-40% por 30 min, 40-100% por 10 min e isocrática com acetonitrila 100% por 10 min.

4.1.2.3 Comparação de padrões de substâncias presentes em *Echinodorus macrophyllus* com as frações do EAEm por HPTLC

Tendo em vista os resultados anteriores e dados da literatura que descrevem a presença de orientina, isoorientina, vitexina e isovitexina, o EAEm e as frações provenientes do seu fracionamento líquido-líquido foram analisados por HPTLC, como mostrado na Figura 25. Não foi possível observar bandas com o padrão orientina. As frações FHex e FDCM também não apresentaram reação positiva para flavonoides. Baseado nas colorações e valores de Rf podemos sugerir que a isoorientina e a isovitexina estão presentes no EAEm, FAcE e FBut, enquanto a vitexina no EAEm, FBut e na FAq.

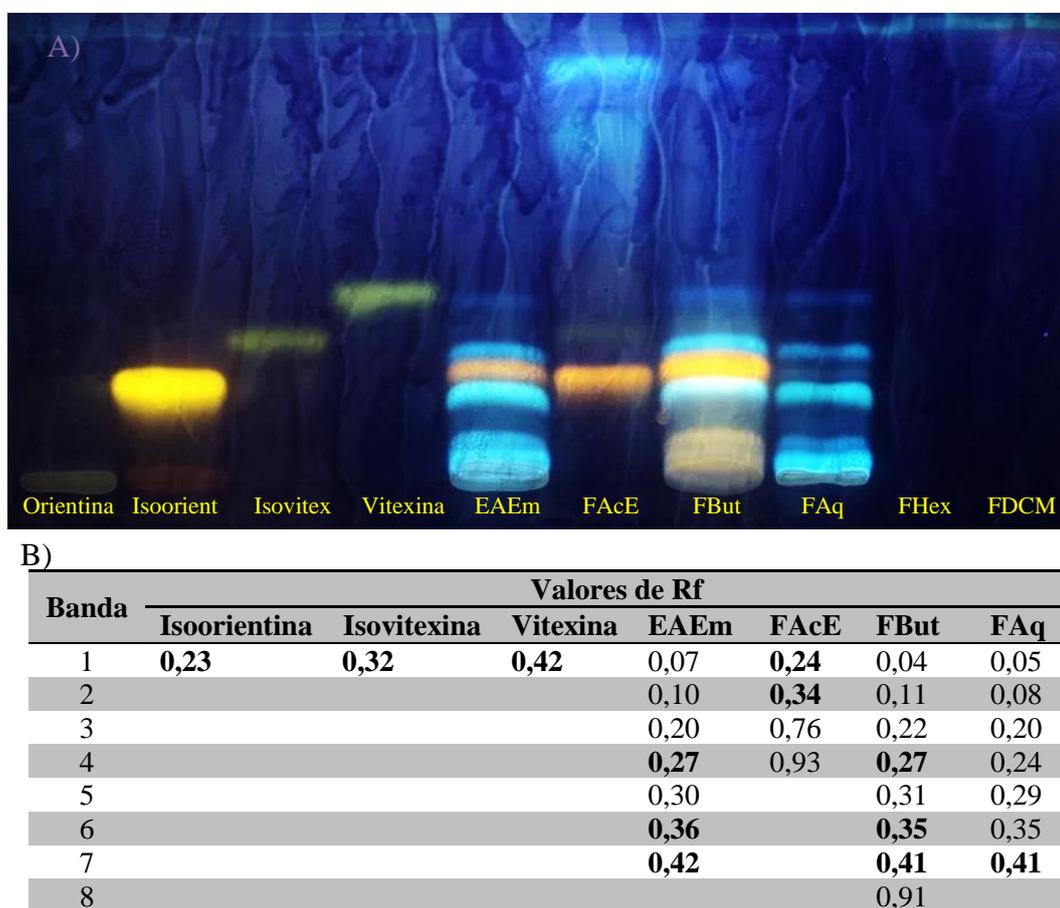


Figura 25. Cromatografia em camada delgada de alta performance (HPTLC). A) Cromatogramas dos padrões orientina, isoorientina, isovitexina, vitexina, e do EAEm e suas frações FAcE, FBut, FAq, FHex e FDCM; B) Valores de Rf determinados no cromatograma. A cromatografia foi desenvolvida em placa de HPTLC 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), sendo reveladas com NP-PEG (flavonoides) e visualizadas sob luz UV a 365 nm. As frações FHex e FDCM e o padrão orientina não apresentaram bandas visíveis na revelação com NP-PEG.

4.2 Atividade antinociceptiva dos extratos e frações

4.2.1 Atividade antinociceptiva no modelo de placa quente

Considerando os resultados anteriores do nosso laboratório, com o EAEm e suas frações Fr20 e Fr40, que mostraram (predominantemente a Fr40) efeito antinociceptivo nos modelos de nocicepção química (contorções induzidas por ácido acético e formalina), e neurogênica (edema de orelha induzida por xilol), decidimos avaliar neste trabalho os efeitos destas amostras em modelo de analgesia térmica. O modelo do estudo foi o de placa quente realizado em camundongos machos tratados (v.o.) nas doses 25 e 100 mg/kg (Figura 26).

A Fr20 foi capaz de aumentar o %MPE quando avaliada em 30 min, para a dose 25 mg/kg e em 60 min para as doses 25 mg/kg e 100 mg/kg. A Fr40 exibiu ação antinociceptiva na dose 100 mg/kg, nos tempos de 30 min e 60 min do ensaio. É importante ressaltar que a dose 25 mg/kg do EAEm não produziu efeito antinociceptivo significativo, o que foi observado para a dose 25 mg/kg da Fr40. A morfina, droga controle, apresentou um máximo de %MPE em torno de 27% no pico de ação antinociceptiva em 60 min.

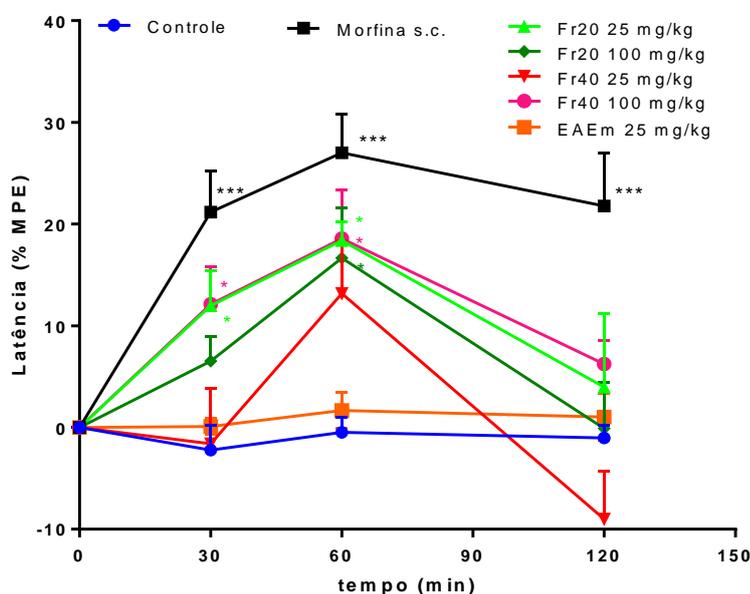


Figura 26. Efeito do tratamento com EAEm, Fr20 e Fr40 no modelo de placa quente. Camundongos SW machos (25-30 g) (n=5/grupo) foram previamente selecionados com *cut-off* de reposta de 5-8 s. Após o tratamento (v.o.), cada animal foi colocado sobre a placa aquecida a $55 \pm 1^\circ\text{C}$ nos tempos de 30, 60 e 120 min, determinando-se o tempo de latência em até 30 s. Os resultados representam a média \pm DP do percentual de resposta máxima possível (%MPE) de dois experimentos. *p < 0,05 e ***p < 0,001 em relação ao grupo controle (teste ANOVA seguido de Dunnett).

4.2.2 Atividade antinociceptiva no modelo de formalina

Visto que a Fr40 apresenta potencial antinociceptivo maior do que a Fr20 (dados não mostrados) e um perfil fitoquímico semelhante às frações FAcE e FBut, optou-se no presente trabalho em analisar o potencial antinociceptivo destas frações.

Para avaliar a resposta nociceptiva química, foi utilizado o modelo de hiperalgesia induzida por injeção de formalina, aplicado como agente irritante. Este modelo avalia duas fases da algisia: o período de 0–5 min, que corresponde à fase 1 (neurogênica) do modelo; e o período de 15–25 min após a injeção do irritante, que corresponde à fase 2 (inflamatória). Na fase 1 (neurogênica) as frações FAcE e FBut mostraram-se eficientes na dose de 25 mg/kg em diminuir os tempos (segundos) de lambidas e mordidas, bem como na dose de 50 mg/kg para a FBut (Figura 27A). Na fase 2 (inflamatória) apenas a FBut na dose de 25 mg/kg foi eficiente na redução do tempo (Figura 27B). Portanto, a FAcE apresentou, neste modelo, efeito antinociceptivo neurogênico na menor dose. Por outro lado, a FBut mostrou um efeito tanto antinociceptivo neurogênico dose-dependente (fase 1) quanto potencial anti-inflamatório na menor dose (fase 2).

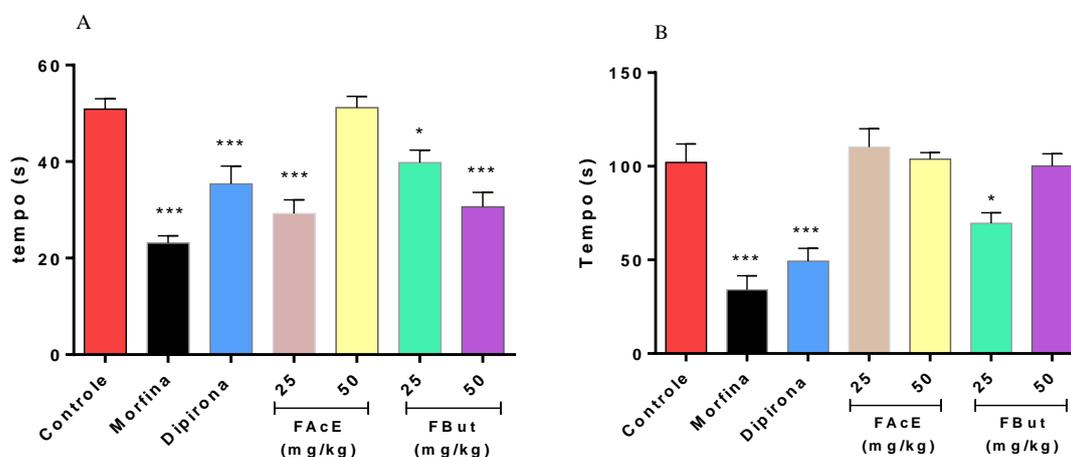


Figura 27. Efeito do tratamento com as frações FAcE e FBut no modelo de formalina. A) Fase antinociceptiva neurogênica (fase 1); B) Fase antinociceptiva inflamatória (fase 2). A nocicepção química foi induzida por injeção de formalina 2,5% na pata traseira direita do animal. Os animais foram tratados (v.o.) com o controle (C, veículo), com 25 e 50 mg/kg das frações obtidas com acetato de etila (FAcE) e butanol (FBut), morfina (Mor, 10 mg/kg, i.p.) ou dipirona (Dip, 50 mg/kg, v.o.) ($n = 5/\text{grupo}$). Os resultados expressam a média \pm e.p.m. do tempo (s) de mordidas e lambidas na pata injetada de dois experimentos na fase neurogênica (A) e inflamatória (B). * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ em relação ao grupo controle (teste ANOVA seguido de Dunnett).

5. DISCUSSÃO

Estudos desenvolvidos no LIA-BPPN demonstraram os potenciais anti-inflamatório (Castro, 2005; Silva *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2016; Fernandes *et al.*, 2019) e antinociceptivo (Fernandes *et al.*, 2006; 2010; 2014) do extrato aquoso de *Echinodorus macrophyllus* e frações.

Visto que o preparo popular da planta é sob a forma de infusão das folhas em água, foi inicialmente preparado um extrato aquoso de *Echinodorus macrophyllus* (EAEm) que foi fracionado por cromatografia em coluna aberta obtendo-se as duas frações Fr20 e Fr40. Este fracionamento foi realizado em coluna aberta contendo Sephadex LH-20 que é um polímero de filtração molecular, capaz de separar moléculas com baixo peso molecular ou arranjo espacial, que podem ser eluídas com solventes polares ou apolares (Henke, 1994). Esta propriedade é devida às características hidrofílicas e lipofílicas do Sephadex LH-20, que é composto por grãos de dextrano entrecruzados que foram hidroxipropilados. As frações do EAEm foram obtidas por eluição com solventes em ordem decrescente de polaridade, o que justifica o maior rendimento da Fr20 em relação à Fr40, uma vez que o EAEm possui elevado caráter polar.

Pudemos observar que EAEm e Fr20 são constituídos por substâncias de baixa polaridade (elevada migração) e alta polaridade (próximo ao ponto de aplicação), com valores de fator de retenção (Rf) entre 0,05 a 0,91, enquanto a Fr40 apresenta substâncias com valores de Rf entre 0,06 e 0,24, portanto com características mais polares (Figura 16). O EAEm e suas frações quando revelados por NP-PEG apresentam bandas amarelas e alaranjadas sugerindo a presença de flavonoides e bandas azuis sugerindo a presença de compostos fenólicos (Wagner *et al.*, 1995).

Uma vez avaliado e demonstrado o efeito antinociceptivo para ambas as frações Fr20 e Fr40, e devido à Fr40 ter apresentado rendimento muito baixo no fracionamento por cromatografia aberta, decidiu-se neste trabalho fracionar o EAEm pela técnica de partição líquido-líquido, visando melhorar a quantidade de produto obtido. Esta nova estratégia de fracionamento gerou as frações FHex, FDCM, FAcE, FBut e FAq. Este procedimento foi realizado por decantação dos solventes de diferentes polaridades, quando misturados ao EAEm, utilizando-se protocolos exaustivos, para extração máxima dos metabólitos (Figura 14 e 15). O EAEm foi solubilizado em água destilada, dado que o extrato bruto foi obtido a partir da infusão em água destilada e a água é um solvente imiscível quando misturado aos solventes utilizados no referido fracionamento.

Os solventes utilizados na extração líquido-líquido foram escolhidos por seus caracteres de índice de polaridade (de 0 a 9,0) e solubilidade em água (de 0,001 a 100) para os solventes n-hexano e n-butanol, respectivamente, pois se buscou extrair maior diversidade de metabólitos secundários presentes no extrato da planta. O fracionamento por extração líquido-líquido foi obtido por mistura do extrato bruto com solventes de polaridades crescentes, e apresentaram rendimentos crescentes (Figura 18), sugerindo maior quantidade de compostos polares no extrato bruto.

A padronização do processo extrativo é importante para se obter reprodutibilidade nos ensaios biológicos, garantindo que todas as extrações apresentam o mesmo perfil de substâncias com ação biológica (Consenza, 2010). A reprodutibilidade das extrações foi confirmada por cromatografia em camada delgada, visto que os perfis de banda entre as extrações analisadas são correspondentes (Figura 19), bem como a determinação dos fatores de retenção comparados entre as extrações 5 e 6 (Figura 20).

A extração líquido-líquido é um método tradicional muito utilizado e relativamente fácil de executar, que permite trabalhar com grandes quantidades de amostras, comparativamente a outras técnicas. Também permite a utilização de solventes, comercialmente disponíveis, com vasta gama de seletividade e solubilidade. A extração líquido-líquido é eficaz, sendo uma das primeiras etapas de separação de extratos de produtos naturais, pois permite obter informações preliminares sobre a polaridade e classes existentes dos componentes biologicamente ativos num extrato (Santos, 2014).

Solventes não polares são usados para solubilizar principalmente compostos lipofílicos (por exemplo alcaloides e cumarinas). Solventes de média polaridade são usados para extrair compostos de polaridade intermediária (por exemplo, alguns alcaloides, flavonoides), enquanto outros solventes polares são usados para compostos mais polares (por exemplo, glicosídeos flavonoides, taninos, alguns alcaloides) (Otsuka, 2006).

Durante o fracionamento por extração líquido-líquido, foi observada uma fase intermediária de aspecto emulsivo entre a fase orgânica (ou fração, no caso) e o extrato bruto, que dificultou a separação nítida da fração. Esta fase intermediária foi coletada separadamente e armazenada para que não houvesse interferência em ambas as extrações, artefato também descrito por Santos (2014).

Estudos anteriores do EAEm (Fernandes, 2006), mostraram um potencial antioxidante do EAEm, assim como a presença de flavonoides utilizando-se cromatografia de camada delgada. Os flavonoides representam um dos grupos de compostos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural encontrados em abundância em

angiospermas, apresentando neste grupo enorme diversidade estrutural. Podem-se encontrar flavonoides em diversas formas estruturais. Quimicamente, a maioria dos flavonoides baseia-se em uma estrutura fundamental que possui um esqueleto formado por 15 átomos de carbono e duas fenilas ligadas por uma cadeia de três carbonos (Simões *et al.*, 2007). As principais classes de flavonoides são as antocianinas, flavonóis, flavonas, isoflavonas, flavanonas e flavanas (Lazary, 2010). Diversas propriedades farmacológicas são associadas aos flavonoides como antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral, antiviral e antiproliferativa (Moghaddam *et al.*, 2012; Maués, 2013; Shrestha, 2013; Marques, 2016; Aryal, 2019).

Em função da presença de flavonoides no EAEm (Fernandes, 2006), as cromatografias em TLC e HPTLC do EAEm e frações foram reveladas para este grupo de compostos com NP-PEG. As análises por TLC com revelações para flavonoides destacaram bandas mais evidentes no EAEm e frações Fr20, Fr40 (Figura 16) e nas frações FAcE, FBut e FAq (Figura 20) as quais foram extraídas com solventes mais polares. As frações FHex e FDCM extraídas com solventes menos polares, não apresentaram bandas coloridas quando reveladas com NP-PEG (Figuras 19, mostrando bandas visíveis somente na revelação com vanilina sulfúrica e iodo (Figura 22), indicando a ausência de flavonoides ou presença em baixas concentrações. A associação vanilina/ácido sulfúrico pode ser usada para visualização de catequinas, alcaloides, flavonoides, componentes de óleos essenciais, esteroides e fenóis (Wall, 2005). A formação de coloração roxa/lilás indica a provável presença de terpenos e aromáticos (Reich e Schibli, 2007), o que não foi observado para estas frações.

As frações FAcE e FBut apresentam substâncias de baixa polaridade (elevada migração) e alta polaridade (próximo ao ponto de aplicação), com valores de R_f entre 0,08 a 0,92. O EAEm e a FAq residual mostraram um comportamento mais polar, com bandas de R_f entre 0,06 a 0,53. As bandas amarelas e alaranjadas observadas na revelação com NP-PEG sugerem a presença de vários flavonoides e as bandas azuis à presença de compostos fenólicos (Wagner *et al.*, 1995).

A complexidade do EAEm e de suas frações ficou evidente pelos valores de R_f variados e bandas de diferentes cores por TLC (Figuras 19, 20, 21) e picos com diferentes tempos de retenção por HPLC-DAD (Figuras 17 e 23).

A Fr20 e o EAEm apresentaram perfis semelhantes, com fatores de retenção similares nas análises por TLC (Figura 16) e cromatogramas análogos por HPLC-DAD (Figura 17), justificando suas ações anti-inflamatórias semelhantes (Silva, 2011; Fernandes, 2014; Silva *et al.*, 2016).

A Fr40 exibiu um potencial antinociceptivo predominante em relação ao EAEm e Fr20 (Fernandes, 2014) e assim, seu perfil cromatográfico por TLC foi comparado com as frações produzidas neste novo procedimento de fracionamento. A Fr40 mostra uma banda amarela intensa (Rf 0,32) que também foi encontrada nas frações FAcE (Rf 0,32) e FBut (Rf 0,37), o que sugere a presença de substâncias com características estruturais semelhantes (Figura 21).

As frações obtidas por extração líquido-líquido foram analisadas por HPLC-DAD (Figura 23), mostrando uma ordem crescente de complexidade à medida que aumenta a polaridade dos solventes, assim como é observado na Fr20, também por HPLC-DAD, em relação à Fr40 (Figura 17). Os perfis de coloração com NP-PEG da Fr20 por HPTLC (Figura 16) e da FAq por TLC (Figura 20), as mais polares dos dois fracionamentos também foram muito semelhantes.

Estudos anteriores mostraram a presença dos flavonoides swertiajaponina, swertisina, isoorientina, isovitexina e seus derivados na Fr40 (manuscrito *in press*), os quais também têm sido descritos estarem presentes em folhas de *Echinodorus grandiflorus* (Schnitzler *et al.*, 2007). A isovitexina (apigenina-6-C-glicosídeo) e isoorientina (luteonina 6-C glicosídeo) foram encontradas em amostras de *Echinodorus scaber* e *E. grandiflorus* (Strada *et al.*, 2017) e de *E. macrophyllus* (Consenza, 2010).

Objetivando verificar a existência destes flavonoides nas frações do EAEm, os padrões isoorientina, orientina, vitexina e isovitexina foram analisados por HPLC-DAD nas mesmas condições utilizadas para as frações (Figura 24). A comparação dos TR dos padrões com os obtidos nas frações (Tabela 2) sugeriu a presença de isoorientina, orientina, isovitexina e/ou vitexina nas frações FAcE e FBut. Isso foi reforçado pela análise por HPTLC (Figura 25), na qual estas frações apresentaram valores de Rf e coloração por NP-PEG semelhantes.

A isovitexina (apigenina-6-C-glucosídeo), geralmente é purificada juntamente com a vitexina, seu isômero. Apresentam várias propriedades farmacológicas, incluindo antioxidantes, anti-inflamatórios, anti-hiperalgésicos e neuroprotetores (He *et al.*, 2016). Assim, a atividade antinociceptiva apresentada pelas frações isoladas do EAEm pode ser devido às propriedades farmacológicas de seus compostos flavonoides.

Outras análises deverão ser realizadas para a identificação dos componentes e padrões presentes nestas frações, como por exemplo, por HPLC-MS ou HPLC-NMR.

Estudos realizados por Consenza (2010) e por Tanus-Rangel *et al.* (2010) com o extrato hidroalcoólico de *E. macrophyllus* evidenciaram a presença de isovitexina e vitexina, o que reforça a presença destas flavonas C-glicosiladas nas frações.

A presença de flavonoides como orientina, isoorientina, vitexina e isovitexina, parece estar associada às atividades antioxidante (Sridhar *et al.*, 2006; Ferreira *et al.*, 2016) e antinociceptiva (Motta, 2013) de amostras. Como estão disponíveis comercialmente, são bons cromóforos (ativos, portanto no ultravioleta) e são quimicamente estáveis, podem constituir boas opções para o desenvolvimento de um sistema de marcadores químicos visando o isolamento dos princípios ativos relacionados ao combate à dor e à inflamação (Strada, 2012).

Como já descrito por Fernandes (2006; 2010 e 2014), a Fr40 apresentou efeito antinociceptivo e anti-inflamatório neurogênico pelo modelo de formalina, além de apresentar polifenóis, flavonoides e potencial antioxidante. Como as frações FAcE e FBut possuem perfis cromatográficos similares à Fr40, priorizamos avaliar o mesmo efeito biológico estudado, a antinocicepção, agora com uma fração apresentando maior rendimento, permitindo a continuação dos estudos *in vivo*.

Os modelos de nocicepção química induzida por formalina e de nocicepção térmica, *hot plate*, foram escolhidos com o objetivo de avaliar as propriedades farmacológicas destes extratos e frações com estímulos químico e térmico.

O teste da placa quente (*hot plate*) avalia o tempo em que os animais permanecem sobre uma placa metálica aquecida ($55 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$) até reagirem ao estímulo térmico com o comportamento de levantar ou lambe as patas (Tita *et al.*, 2011), que são aferidos nos tempos de 30, 60, 90 e 120 min após a administração das amostras a serem analisadas.

O modelo experimental foi inicialmente descrito por Woolfe e Macdonald (1944) como modelo específico para a detecção de substâncias analgésicas de efeito central. Ele caracteriza-se por produzir uma resposta rápida ao estímulo nocivo, mediada pela ativação dos nociceptores (fibras C e A δ), conduzindo o impulso ao corno dorsal da medula espinhal e posteriormente aos centros corticais, sendo a resposta proporcional à frequência e classe de fibras responsáveis pela mensagem. Os nociceptores fibras C e A δ são estimulados após a ativação dos receptores vaniloides, especificamente o receptor do tipo VR-1 (limiar de ativação em 43°C) e receptor do tipo VRL-1 (limiar de ativação em 52°C), que são responsáveis pela resposta ao aumento na temperatura, sendo que os receptores VRL-1 são mais importantes na medição da resposta a estímulos térmicos nocivos (Julius e Basbaum, 2001; Benedito, 2009).

A Fr20 foi capaz de aumentar o %MPE quando avaliada em 30 min, para a dose 25 mg/kg e em 60 min para as doses 25 mg/kg e 100 mg/kg (Figura 26). A Fr40 exibiu ação antinociceptiva na dose 100 mg/kg nos tempos de 30 min e 60 min do ensaio. É importante ressaltar que a dose 25 mg/kg do EAEm não produziu efeito antinociceptivo significativo, o que foi observado para a dose 25 mg/kg da Fr40, sugerindo que o fracionamento foi eficiente

no enriquecimento de fração com substância(s) antinociceptiva(s). A ação positiva das frações neste modelo de placa quente indica que estas contenham substâncias analgésicas de ação central, embora sejam necessários futuros estudos do mecanismo de ação. Com base em estudos anteriores com teste da placa quente propõe-se uma resposta principalmente supra espinhal (Silva, 2013). O efeito analgésico das frações obtidas do EAEm, avaliadas pelo modelo de placa quente, pode ser decorrente da modulação em nível medular ou central da dor, ou da atividade inibitória direta nas terminações nervosas ou vias de transmissão (Le Bars *et al.*, 2001).

O teste da formalina é um método de avaliação comportamental utilizado para medir a efetividade de agentes flogísticos (Hunskar e Hole, 1987; Randolph, 1997). Este modelo de dor está associado à lesão tecidual, no qual se quantifica a resposta comportamental provocada pela injeção subcutânea de formalina diluída na pata traseira do animal (Dubuisson e Dennis, 1977; Martins *et al.*, 2006). A vantagem deste teste sobre outros métodos de nociceção é a possibilidade de avaliar dois tipos diferentes de dor ao longo de um período prolongado de tempo e, assim, permite o teste de analgésicos com diferentes mecanismos de ação (Randolph, 1997).

A primeira fase inicia-se imediatamente após a injeção de formalina (0-5min), caracterizada como dor neurogênica, relacionada com a estimulação química direta dos nociceptores das fibras aferentes do tipo C e em parte, das fibras A δ que está associada à liberação de aminoácidos excitatórios, óxido nítrico e substância P. A segunda fase, que ocorre entre 15-30 min após a injeção de formalina parece ser causada por alterações teciduais e funcionais no corno dorsal da medula espinhal e está relacionada com a liberação de vários mediadores pró-inflamatórios, como bradicinina, prostaglandinas e serotonina, via ativação dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA). O intervalo de quiescência entre a primeira e a segunda fase é resultado de uma inibição da transmissão nociceptiva através de circuitos supraespinhais e espinhais (Hunskar e Hole, 1987).

Ambas as fases são atenuadas por analgésicos centrais que inibem a percepção central, como os opioides, enquanto a resposta na segunda fase é diminuída principalmente por drogas de ação periférica, inibidores seletivos da ciclooxigenase, como os esteroides (hidrocortisona, dexametasona), inibindo a transdução ou transmissão de sinais mediada por AINEs (Al-Khrasani *et al.*, 2012). Os mecanismos periféricos envolvem mediadores produzidos mais tardiamente, principalmente aqueles que são liberados durante o processo inflamatório como bradicinina, a prostaglandina e interleucinas. A prostaglandina e a bradicinina causam alterações em receptores específicos (TRPV1) acoplados a canais iônicos ligante-dependente

(canais de cálcio) via ativação do AMPc, reduzindo o tempo pós-hiperpolarização da membrana neural, causando redução do limiar para disparo da fibra nervosa (Ji *et al.*, 2003).

Neste trabalho (Figura 27), as frações FAcE e FBut mostraram-se eficientes em diminuir os tempos (segundos) de lambidas e mordidas na fase 1 (neurogênica), na dose de 25 mg/kg, mas apenas a FBut reduziu o tempo na dose de 50 mg/kg nesta mesma fase. Na fase 2 (inflamatória), apenas a FBut (25 mg/kg) foi eficiente na redução do tempo de lambidas e mordidas. Desta forma, a FBut mostrou tanto um efeito antinociceptivo neurogênico dose-dependente (fase 1) quanto potencial anti-inflamatório na menor dose (fase 2). Estudos de Fernandes (2014), com o modelo de formalina, mostrou que os extratos brutos (aquoso e hexânico) e suas frações Fr20 e Fr40 inibiram tanto a fase neurogênica quanto a inflamatória, em todas as doses avaliadas (25, 50 e 100 mg/kg), chegando a Fr20 a reduzir, 100% da nocicepção na fase inflamatória (Fernandes, 2014). Comparando com os resultados do modelo de formalina, obtidos com as frações por partição líquido-líquido, destacamos que a FAcE apresentou efeito somente na fase 1 (neurogênica), sugerindo que o novo fracionamento realizado, além de apresentar maior rendimento, também forneceu o uma fração contendo substâncias com ação específica na fase 1, ou seja, substâncias que atuam prioritariamente na dor neurogênica, com mecanismos de dor de ação central, o que não foi possível no fracionamento descrito por Fernandes (2014). Também podemos inferir que a ação farmacológica da FBut pode envolver mecanismos análogos aos das Fr20 e Fr40, uma vez que também inibiu a nocicepção nas duas fases.

Uma análise dos resultados farmacológicos sugere que as frações ativas, obtidas do extrato bruto de *Echinodorus macrophyllus*, possam apresentar substância(s) com ação antinociceptiva do tipo central, por apresentarem resultados positivos em metodologias experimentais de nocicepção de ação central, como placa quente e teste de formalina (fase 1), podendo atuar em diferentes mecanismos específicos, conforme discutidos anteriormente. Adicionalmente, sugere a presença de substância(s) antinociceptiva(s) com ação periférica na FBut (por apresentar positividade na fase 2 do teste de formalina), podendo estas substâncias estarem envolvidas em diferentes mecanismos específicos de ação periférica, como na inibição da ciclooxigenase, redução na síntese e liberação de bradicinina, prostaglandinas (como dipirona) e interleucinas, inibição de receptores específicos, modulação de canais de cálcio, etc., os quais se encontram envolvidos no desenvolvimento da fase 2 de tal modelo experimental.

CONCLUSÕES

- A reprodutibilidade na obtenção dos extratos de *Echinodorus macrophyllus* e no seu fracionamento, por extração líquido-líquido, foi confirmada por métodos cromatográficos;
- Os rendimentos das frações de interesse foram aumentados na segunda estratégia adotada, partição líquido-líquido, para fracionamento do EAEm;
- A análise fitoquímica do EAEm e suas frações apresentou picos e bandas em diferentes regiões e valores de Rf variados, indicando ser o EAEm um extrato rico em diferentes substâncias, e as amostras ainda não purificadas, embora com importante ação farmacológica;
- As frações Fr40, FAcE e FBut apresentaram uma banda amarela de Rf e coloração semelhantes, por revelação com NP-PEG, sugerindo a presença do mesmo tipo de flavonoide em ambas as amostras;
- A presença de flavonoides nas frações FAcE, FBut e FAq também é sugerida, por comparação com padrões, utilizando-se HPTLC e HPLC-DAD;
- FHex e FDCM apresentaram em sua composição substâncias de outra classe diferente de flavonoides, desde que apresentaram bandas evidentes quando reveladas com iodo e vanilina, mas não com NP-PEG;
- As frações Fr20 e Fr40 apresentaram efeito antinociceptivo em modelo in vivo de nocicepção térmica (Hot Plate); As frações FAcE e FBut de *Echinodorus macrophyllus* promoveram ação antinociceptiva no modelo de nocicepção química (formalina), sendo que a FrBut foi ativa tanto na fase neurogênica quanto anti-inflamatória, enquanto a FAcE atuou apenas na fase neurogênica.

REFERÊNCIAS

- Ahmed, E., Arshad, M., Khan, M.Z., Amjad, M.S., Sadaf, H.M., Riaz, I., Sabir, S., Ahmad, N., Saboon. Secondary metabolites and their multidimensional prospective in plant life. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6(2): 205-214, 2017.
- Albuquerque, P. A. A. Efeito da fração acetato de etila do *Echinodorus macrophyllus* (Kunth) Micheli na cicatrização de lesão em língua de ratos. Dissertação de Mestrado, PG Ciências Odontológicas, UNIC, 2015.
- Aleixo, G. A. S., Tudury, E. A., Coelho, M. C. O. C., Andrade, L. S.S., Bessa, A. L. N. G. Tratamento da dor em pequenos animais: fisiopatologia e reconhecimento da dor (revisão de literatura: parte I). *Medicina Veterinária (UFRPE)*, 10(1-4): 19-24, 2017.
- Al-Khrasani, M., Lackó, E., Riba, P., Király, K., Sobor, M., Timár, J., Fürst, S. The central versus peripheral antinociceptive effects of μ -opioid receptor agonists in the new model of rat visceral pain. *Brain Research Bulletin*, 87(2): 238-243, 2012.
- Amaral, A. C. F., Simões, E. V., Ferreira, J. L. P.. Coletânea científica de plantas de uso medicinal. Rio de Janeiro. 2005.
- ANVISA. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira/Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília. 126 pág., 2011. Acessado em 17/11/2017.
http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/conteudo/Formulario_de_Fitoterapicos_da_Farmacopeia_Brasileira.pdf.
- Aryal, S., Baniya, M. K., Danekhu, K., Kunwar, P., Gurung, R., Koirala, N. Total phenolic content, flavonoid content and antioxidant potential of wild vegetables from Western Nepal. *Plants*, 8(4): 96, 2019.
- Ashburn, M. A., Fleisher, L. A. Increasing evidence for the limited role of opioids to treat chronic noncancer pain. *JAMA*, 320(23): 2427-2428, 2018.
- Basbaum, A. I., Bautista, D. M., Scherrer, G., Julius, D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*, 139(2): 267-284, 2009.
- Benedito, R. B. *Efeito antinociceptivo do monoterpeneo (S)-(-)-Álcool perílico em camundongos*. Dissertação. Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2009.
- Berger, J.V., Knaepen, L., Janssen, S. P. M., Jaken, R. J. P., Marcus, M. A., Joosten, E. A. J., Deumens, R. Cellular and molecular insights into neuropathy-induced pain hypersensitivity for mechanism-based treatment approaches. *Brain Research Views*, 67: 282-310, 2011.
- Besson, P., Perl, E. R. Responses of cutaneous sensory units with unmyelinated fibers to noxious stimuli. *Journal of Neurophysiology*, 32: 1025-1043, 1969.

Bowsher, D. The lifetime occurrence of herpes zoster and prevalence of postherpetic neuralgia: a retrospective survey in an elderly population. *European Journal of Pain*, 3(4): 335-342, 1999.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Brasília, DF, 60 p., 2006.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. Política e Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. – Brasília: Ministério da Saúde, 190 p., 2016. Acessado em 10/11/2017. http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_programa_nacional_plantas_medicinais_fitoterapicos.pdf .

Busse, J. W., Wang, L., Kamaleldin, M., Craigie, S., Riva, J. J., Montoya, L., Mulla, S. M., Lopes, L. C., Vogel, N., Chen, E., Kirmayr, K., De Oliveira, K., Olivieri, L., Kaushal, A., Chaparro, L. E., Oyberman, I., Agarwal, A., Couban, R., Tsoi, L., Lam, T., Vandvik, P. O., Hsu, S., Bala, M. M., Schandelmaier, S., Scheidecker, A., Ebrahim, S., Ashoorion, V., Rehman, Y., Hong, P. J., Ross, S., Johnston, B. C., Kunz, R., Sun, X., Buckley, N., Sessler, D. I., Guyatt, G. H. Opioids for chronic noncancer pain: a systematic review and meta-analysis. *JAMA*, 320(23): 2448-2460; 2018.

Calixto, J. B. Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. Chapecó. Argos, 528 p. P713 p; 2001.

Calixto, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view. *Journal of Ethnopharmacology*, 100: 131-134, 2005.

Canalli, Y. D. M., Bove, C. P. Flora of Rio de Janeiro: Alismataceae. *Rodriguésia*, 68 (1): 17-28, 2017.

Cañigüeral, S., Dellacassa, E., Bandoni, A.L. Plantas Medicinales y Fitoterapia: indicadores de dependencia o factores de desarrollo? *Acta Farmacéutica Bonaerense*, 22(3): 265-278, 2003.

Carvalho, E. S. D. Estudo do mecanismo vasorrelaxante do extrato etanólico e frações, das folhas de *Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schldl.) Micheli, em leitos mesentéricos isolados. Dissertação, PG Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados, 2018.

Castro, F. L. Atividade antiedematogênica e antinociceptiva do extrato aquoso de folhas de *Echinodorus macrophyllus*. Dissertação (Mestrado em Biociências), Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2005.

Castro, F. L., Pinto, A.C., Reis, P. A., Coelho, M. G. P. Atividade antiedematogênica do extrato aquoso de *Echinodorus macrophyllus* (EAEm). In: Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil, 17, Cuiabá, Brasil, 2002.

Cechinel Filho, V., Yunes, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. *Química Nova*, 21(1): 99-105, 1998.

Chagas, M. B. D. Reações biomiméticas com metaloporfirinas de metabólitos secundários das folhas de *Passiflora edulis* var. *flavicarpa* Degener (Master's thesis, Brasil), 2018.

Chen, R., Shi, J., Yin, Q., Li, X., Sheng, Y., Han, J., Zhuang, P., Zhang, Y. Morphological and Pathological Characteristics of Brain in Diabetic Encephalopathy. *Journal of Alzheimer's Disease*, 65(1): 15-28; 2018.

Clark, M. A., Finkel, R., Rey, J. A., Whalen, K. Narcotic Analgesic. In: Lippincott's Illustrated review of pharmacology. Harvey, R. A. Editor, 5th Ed. New Delhi: Wolters Kluwer Publication, 2012.

Colloca, L., Ludman, T., Bouhassira, D., Baron, R., Dickenson A. H., David Yarnitsky, D., Freeman, R., Truini, A., Attal, N., Finnerup, N. B., Eccleston, C., Kalso, E., Bennett, D. L., Dworkin, R. H., Srinivasa N. Raja, S. N. Neuropathic pain. *Nature Reviews Disease primers*, 3(1): 1-19, 2017.

Consenza, G. P. Efeito do extrato bruto das folhas de *Echinodorus macrophyllus* e de frações semipurificadas sobre a função renal em ratos com necrose tubular aguda induzida por gentamicina; 2010.

Conway, W. D., Petroski, R. J. (Ed.). *Modern countercurrent chromatography*. American Chemical Society, 1995.

Corder, G., Tawfik, V. L., Wang, D., Sypek, E. I., Low, S. A., Dickinson, J. R., Sotoudeh, C., Clark, J. D., Barres, B.; A., Bohlen, C. J., Scherrer, G. Loss of μ opioid receptor signaling in nociceptors, but not microglia, abrogates morphine tolerance without disrupting analgesia. *Nature Medicine*, 23(2): 164-173; 2017.

Dawson-saunders, B.; Trapp, R. G. *Basic & Clinical Biostatistics*, 2nd Ed., Appleton & Lange Ed., Connecticut, 1994.

Dubuisson, D., Dennis, S. G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine and brain stem stimulation in rats and cats. *Pain*, 4(2): 161-174, 1977.

Fantoni, D. T. Fatos históricos: a dor como sinal vital; a ética no tratamento da dor; princípios básicos de farmacocinética e farmacodinâmica dos analgésicos para alívio da dor. In: Fantoni, D.T. *Tratamento da dor na clínica de pequenos animais*. Rio de Janeiro: Elsevier, cap.1-3, p.3-27; 2012.

Fantoni, D.T., Mastrocinque, S. Fisiopatologia e controle da dor. In: Fantoni, D.T; Cortopassi, S.R. *Anestesia em cães e gatos*. São Paulo: Roca. Cap.31, p.324-326; 2002.

Fernandes, D. C. Análise da atividade anti-inflamatória neurogênica de extrato aquoso de folhas de *Echinodorus macrophyllus* e fitoquímica. Monografia (Bacharelado em Ciências Biológicas), Universidade do Estado do Rio de Janeiro) Rio de Janeiro, 2006.

Fernandes, D. C. Fracionamento do extrato de *Echinodorus macrophyllus* biomonitorado pela atividade anti-inflamatória tópica. Dissertação (Mestrado em Biociências), Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2010.

Fernandes, D. C. Isolamento de substâncias do extrato e frações de *Echinodorus macrophyllus* (Kunth) Michx. com atividade antinociceptiva e estudo de seus mecanismos de ação. Tese (doutorado com Biociências), Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

Fernandes, D. C., Martins, B. P., Medeiros, D. L., Santos, S. V., Gayer, C. R., Velozo, L. S., Coelho, M. G. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of the hexanic extract of *Echinodorus macrophyllus* (Kunth) Micheli in mice. *Brazilian Journal of Health and Biomedical Science*, 18(1): 25-32, 2019.

Fernandes, D. C., Velozo, L. S. M., Alves, R. A., Siqueira, H. A. A.; Silva, G. P., Santos, S. V. M., Gayer, C. R. M., Coelho, M. G. P. Atividade antinociceptiva do óleo essencial de *Echinodorus macrophyllus* (Kunth.) Micheli (Alismataceae). *Revista Fitos*, 7(4): 245-251, 2013.

Ferreira, R. O., Carvalho Junior, A. R. D., Riger, C. J., Castro, R. N., Silva, T., & Carvalho, M. G. D. Constituintes químicos e atividade antioxidante in vivo de flavonoides isolados de *Clusia lanceolata* (Clusiaceae). *Química Nova*, 39(9): 1093-1097, 2016.

Fornasari, D., Coaccioli, S. Pharmacology of pain. *Reumatismo*, 14-17; 2014.

Fürst, S. Transmitters involved in antinociception in the spinal cord. *Brain Research Bulletin*, 48(2): 129-141, 1999.

Galluzzi, K. E. Managing neuropathic pain. *Journal of the American Osteopathic Association*, 107 (10, suppl 6): 39-48, 2007.

Gilbert, B., Ferreira, J. L., Alves, L. F. Monografias de plantas medicinais brasileiras e aclimatadas. Curitiba, ABIFITO, 2005.

Gobbo-Neto, L., Lopes, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*, 30(2): 374-381, 2007.

Golan, D. E., Tashjian, A. H., Armstrong, E. J., Armstrong, A. W. Princípios de Farmacologia. A Base Fisiopatológica da Farmacologia. 3ª edição, 2014.

Grace, P. M., Hutchinson, M. R., Maier, S. F., Watkins, L. R. Pathological pain and the neuroimmune interface. *Nature Reviews Immunology*, 14(4): 217-231, 2014.

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

Haynes, R. R., Holm-Nielsen, L. B. The Alismataceae. In: *Flora Neotropica*. Monograph. 64, New York Botanical Garden, New York, 112 p., 1994.

He, M., Min, J. W., Kong, W. L., He, X. H., Li, J. X., Peng, B. W. A review on the pharmacological effects of vitexin and isovitexin. *Fitoterapia*, 115: 74-85, 2016.

Henke, H. *Präparative Gelchromatographie na Sephadex LH-20*. Salz Und Druck: Alpha Druck Gmbh, 63773 Goldbach: 612, Apud Sephadex LH-20, Catálogo Amersham Bioscience, 1994.

Herbarium. *Introdução à fitoterapia: utilizando adequadamente as plantas medicinais*. Colombo: Herbarium Laboratório Botânico Ltda. 2ª Ed., p. 104, 2011.

Hobelmann, J. G., Clark, M. R. Substance use disorders and detoxification. In: *Essentials of pain medicine*. Elsevier, p. 419-426. e2, 2018.

Hooten, W. M. Dor crônica e transtornos de saúde mental: mecanismos neurais compartilhados, epidemiologia e tratamento. In: *Procedimentos da Clínica Mayo*. Elsevier, p. 955-970, 2016.

Hooten, W. M. Opioid Management: Initiating, Monitoring, and Tapering. *Physical Medicine and Rehabilitation Clinics*, 31(2): 265-277, 2020.

Hudspith, M. J. Anatomy, physiology and pharmacology of pain. *Anaesthesia & Intensive Care Medicine*, 20(8): 419-425, 2019.

Hunskaar, S., Hole, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain*, 30(1): 103-114, 1987.

Ignat, I., Volf, I., Popa, V. I. A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food chemistry*, 126(4): 1821-1835, 2011.

Inoue, K., Tsuda, M. Microglia in neuropathic pain: cellular and molecular mechanisms and therapeutic potential. *Nature Reviews Neuroscience*, 19(3): 138, 2018.

Ji, R. R., Kohno, T., Moore, K. A., Woolf, C. J. Central sensitization and LTP: do pain and memory share similar mechanisms? *Trends in Neurosciences*, 26(12): 696-705, 2003.

Ji, R.-R., Nackley, A., Huh, Y., Terrando, N., Maixner, W. Neuroinflammation and central sensitization in chronic and widespread pain. *Anesthesiology. The Journal of the American Society of Anesthesiologists*, 129(2): 343-366, 2018.

Ji, R. -R., Donnelly, C. R., Nedergaard, M. Astrocytes in chronic pain and itch. *Nature Reviews Neuroscience*, 20(11): 667-685, 2019.

Ji, R. -R., Chamesian, A., Zhang, Y. -Q. Pain regulation by non-neuronal cells 1785 and inflammation. *Science*, 354: 572-577, 2016.

Joly, A. B. *Botânica-Introdução à Taxonomia*, 2002.

Judd, W. S., Campbell, C. S., Kellog, E. A., Stevens, P. F., Donoghue, M. J. *Plant Systematics: a Phylogenetic Approach*. Sunderland. Sinauer Associates, Inc. 2008. 3 ed. p. 249-254.

Julius, D., Basbaum, A. I. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, 413(6852): 203-210, 2001.

Kandel, E. R., Schwartz, J. H., Jessel, T. M. *Princípios de Neurociência*. São Paulo: Manole, 2003.

Kinupp, V. F., Lorenzi, H. J. *Plantas alimentícias não convencionais (PANC) no Brasil: guia de identificação, aspectos nutricionais e receitas ilustradas*, 2014.

Klein, T., Longhini, R., Bruschi, M. L., Mello, J. C. P. Fitoterápicos: um mercado promissor. *Revista Ciência Farmacológica Básica Aplicada*, 30(3): 241-248, 2009.

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

Kobayashi, J., Sekiguchi, M., Shimamoto, S., Shigemori, H., Ohsaki, A. Echinophyllins C-F, new nitrogen-containing clerodane diterpenoids from *Echinodorus macrophyllus*. *Journal of Natural Products*, 63: 1576-1579, 2000B.

Kobayashi, J., Sekiguchi, M., Shimamoto, S., Shigemori, H., Ohsaki, A. Chapecoderins A-C, new labdane-derived diterpenoids from *Echinodorus macrophyllus*. *Journal of Natural Products*, 63: 375-377, 2000C.

Lazary, V. M. D. Efeitos do consumo do isoflavona na prevenção do câncer de mama. [Monografia]. Universidade de Brasília, Faculdade de Ciências da Saúde, Núcleo de Estudos em Educação e Promoção da Saúde, NESPROM, Brasília, 2010.

Le Bars, D., Gozariu, M., Cadden, S. W. Animal models of nociception. *Pharmacological Review*, 53: 597-652, 2001.

Lee, G. I., Neumeister, M. W. Pain: Pathways and Physiology. *Clinics in Plastic Surgery*, 47(2): 173-180, 2020.

Leite, J. P. V. Contribuição para o estudo farmacognóstico do *Echinodorus macrophyllus* (Kunt) Mich. (Chapéu de-couro). Belo Horizonte 86p. Monografia de Especialização em Farmácia, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, 1995.

Leite, J. P. V., Pimenta, D. S., Gomes, R. S. D. L., Dantas-Barros, A. M. Contribuição ao estudo farmacobotânico da *Echinodorus macrophyllus* (Kunth) Micheli (chapéu-de-couro) Alismataceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 17(2): 242-248, 2007.

Lemke, K. A. Understanding the pathophysiology of perioperative pain. *The Canadian Veterinary Journal*, 45(5): 405, 2004.

Lent, R. *Cem bilhões de neurônios: conceitos fundamentais de neurociência*. 2a Ed. São Paulo, Atheneu, 786 p., 2010.

Lopes, C. L., Albano, F., Laranja, G. A. T., Alves, L. M., Martins e Silva, L. F., De Souza, G. P., Araújo, I. M., Nogueira-Neto, J. F., Felzenszwalb, I., Kovary, K. Toxicological evaluation by *in vitro* and *in vivo* assays of an aqueous extract prepared from *Echinodorus macrophyllus* leaves. *Toxicology Letters*, 116: 189-198, 2000.

López-Bucio, J., Acevedo-Hernández, G., Ramirez-Chávez, E. Molinatorres, J. Herrera-Estrela, L. Novel signals for plant development. *Plant Biology*, 9: 523-529, 2006.

Lozoya, X. Fármacos de origen vegetal de ayer y de hoy. *Investigacion y Ciencia*, 254: 4-11, 1997.

Marques, A. E. F. Isolamento e caracterização estrutural de flavonoides de *Sida santaremnensis* H. Monteiro (MALVACEAE) e avaliação do efeito anti-inflamatório e antitumoral, 2016. 91 f Dissertação (Programa Pós-graduação em Ciências Naturais e Biotecnologia) - Universidade Federal de Campina Grande, Cuité, 2016.

Martins, M. A., Bastos, L. C., Tonussi, C. R. Formalin injection into knee joints of rats: pharmacologic characterization of a deep somatic nociceptive model. *Journal of Pain*, 7(2): 100-107, 2006.

Matias, L.Q., Lopes, R.C., Sakuragui, C.M. Alismataceae in lista de espécies da flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2016. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB39963>>. Acesso 16 de setembro de 2020.

Maués, L. A. L. Atividade antiproliferativa e antineoplásica de flavonoides da espécie *Brosimum acutifolium* em modelo de glioblastoma *in vitro*. 2013.

Melzack, R., Wall, P. D. Pain mechanisms: a new theory. *Science*, 150(3699): 971-979, 1965.

Melzack, R., Wall, P. D. Textbook of Pain. 4th Ed. Londres: *Churchill Livingstone*, v. 18, 1999.

Merskey, H., Bogduk, N. (Eds.). Classification of chronic pain: descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. 2. ed. *Seattle, Wash: IASP Press*, 1994.

Mersky, Y. H. Classification of chronic pain. Descriptions of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. Prepared by the International Association for the Study of pain, Subcommittee on taxonomy. *Pain Supplement*, 3: S1-S226, 1986.

Milazene-Gutierrez, M. A., Mello, J. C. P., Delaporte, R. H. Efeitos da intensidade luminosa sobre a morfo-anatomia foliar de *Bouchea fluminensis* (Vell.) Mold. (Verbenaceae) e sua importância no controle de qualidade da droga vegetal. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 13(1): 23-33, 2003.

Millan, M. J. The induction of pain: an integrative review. *Progress in Neurobiology*, 57(1): 1-164, 1999.

Ming, L. C., Ferreira, M. I., Gonçalves, G. G. Pesquisas agronômicas das plantas medicinais da Mata Atlântica regulamentadas pela ANVISA. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 14: 131-137, 2012.

Moghaddam, G., Ebrahimi, S. A., Rahbar-Roshandel, N., Foroumadi, A. Antiproliferative activity of flavonoids: influence of the sequential methoxylation state of the flavonoid structure. *Phytotherapy Research*, 26(7): 1023-1028, 2012.

- Motta, E. V. S., Pinto, N. C. C., Duque, A. P. N., Mendes, R. F., Bellozi, P. M. Q., Scio, E. Atividades antioxidante, antinociceptiva e anti-inflamatória das folhas de *Mucuna pruriens* (L.) DC. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 15(2): 264-272, 2013.
- Nascimento, E. L., Watanabe, M., Fonseca, C. D., Schlottfeldt, F. S., Vattimo, M. F. F. Renoprotective effect of the *Echinodorus macrophyllus* in induced renal injury. *Acta Paulista de Enfermagem*, 27(1): 12-17, 2014.
- Naseri, R., Farzaei F., Fakhri, S., El-Senduny, F. F., Altouhamy, M., Bahramsoltani, R., Ebrahimi, F., Rahimi, R., Farzaei, M. H. Polyphenols for diabetes associated neuropathy: Pharmacological targets and clinical perspective. *Daru*, 27(2): 781-798, 2019.
- Newman, D. J., Cragg, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. *Journal of Natural Products*, 79(3), 629-661, 2016.
- Oksman-Caldentey, K., Inze, D. Plant cell factories in the post-genomic era: new ways to produce designer secondary metabolites – Review. *Trends in Plant Science*, 9(9): 433-440, 2004.
- Otsuka, H. Purification by solvent extraction using partition coefficient. In: S. D. Sarker, Z. Latif & A. I. Gray, Eds. *Natural products isolation*. 2° ed. Totowa, New Jersey: Humana Press Inc., pp. 269-273, 2006.
- Patel, P. K., Sahu J., Chandel S. S. A detailed review on nociceptive models for the screening of analgesic activity in experimental animals. *International Journal of Neurologic Physical Therapy*, 2(6): 44-50, 2016.
- Pereira, R. J., Cardoso, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. *Journal of Biotechnology and Biodiversity*, 3(4): 146-152, 2012.
- Pergolizzi, J. V., Le Quang, J. A., Berger, G. K., Raffa, R. B. The basic pharmacology of opioids informs the opioid discourse about misuse and abuse: A review. *Pain Therapy*, 6: 1-16, 2017.
- Pimenta, D. S., Figueiredo, M. R., Kaplan, M. A. C. Chemical studies on cultivation of *Echinodorus grandiflorus* (cham. & schl.) Mich. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 72(2): 294-294, 2000.
- Pinto, A. C., Rego, C. G., Siqueira, A. M., Cardoso, C. C., Reis, P. A., Marques, E. A., Coelho, M. G. P., Sabino, K. C. C. Immunosuppressive Effects of *Echinodorus macrophyllus* aqueous extract. *Journal of Ethnopharmacology*, 111: 435-439, 2007.
- Pleuvry, B. J., Lauretti, G.R. Biochemical aspects of chronic pain and its relationship to treatment. *Pharmacology & Therapeutics*, 71: 313-324, 1996.
- Portella, V. G., Cosenza, G. P., Diniz, L. R. L., Pacheco, L. F. Cassali, G. D., Caliar, M. V., Brandão, M. G. L., Vieira, M. A. R. Nephroprotective effect of *Echinodorus macrophyllus* Micheli on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. *Nephron Extra*, 2: 177-183, 2012.
- Proplam - Guia de Orientações para implantação do Serviço de Fitoterapia. Rio de Janeiro, 2004.

- Queiroz, S., N., Collins, C., H., Jardim, C., S., F., Métodos de extração e/ou concentração de compostos encontrados em fluídos biológicos para posterior determinação cromatográfica, *Química Nova*, 24(1): 68-76, 2001.
- Randolph, B. C., Peters, M. A. Analgesic effectiveness of ketorolac compared to meperidine in the rat formalin test. *Anesthesia Progress*, 44(1): 11-16, 1997.
- Rang, H. P., Dale, M. M., Ritter, J. M., Flower, R. J., Henderson, G. *Farmacologia*. 7a Ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 808 pp., 2012.
- Reich, E., Schibli, A. High-performance thin-layer chromatography for the analysis of medicinal plants. New York: Thieme, 2007. 300 p.
- Reilly, M. M., Shy, M. E. Diagnosis and new treatments in genetic neuropathies. *Journal of Neurology Neurosurgery Psychiatry*, 80: 1304-1314, 2009.
- Ribeiro, C. J. Atividade anti-inflamatória de rizomas de *Echinodorus grandiflorus* (Cham. & Schltdl.) Micheli (“Chapéu de Couro”). Dissertação, UFJF, 2012.
- Rocha, A. L. R. D. Uso racional de medicamentos, PG lato sensu, Fundação Oswaldo Cruz, 2014.
- Santos, M. P. Extração e caracterização de extratos de *Jatropha gossypifolia* L.: avaliação da sua atividade antimicrobiana e antioxidante. Dissertação. Instituto Superior de Engenharia de Lisboa, 2014.
- Satheesh, N. J., Uehara, Y., Fedotova, J., Pohanka, M., Büsselberg, D., Kruzliak, P. TRPV currents and their role in the nociception and neuroplasticity. *Neuropeptides*, 57: 1-8, 2016.
- Simões, C. M. O. et al. Farmacognosia: do produto natural ao medicamento. Artmed Editora, 2016.
- Schnitzler, M., Petereit, F., Nahrsted, A. Trans-aconitic acid, glucosyl flavones and hydroxycinnamoyl tartaric acids from the leaves of *Echinodorus grandiflorus* ssp. aureus, a Brazilian medicinal plant. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 17: 149-154, 2007.
- Scholz, J., Woolf, C. J. Can we conquer pain?. *Nature Neuroscience*, 5(11): 1062-1067, 2002.
- Shibata, M., Ohkubo, T., Takahashi, H., Inoki, R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. *Pain*, 38(3): 347-352, 1989.
- 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*. *Journal of Natural Products*, 65: 82-84, 2002.
- Shrestha, S., Lee, D-Y., Park, J-H., Cho, J-G., Lee, D-S., Li, B., Kim, Y-C., Jeon, Y-J., Yeon, S-W., Baek, N-I. Flavonoids from the fruits of *Nepalese sumac* (*Rhus parviflora*) attenuate glutamate-induced neurotoxicity in HT22 cells. *Food Science and Biotechnology*, 22(4): 895-902, 2013.
- Silva, G. P. Potencial anti-inflamatório do extrato aquoso de *Echinodorus macrophyllus* e de suas frações em modelo de inflamação aguda. Dissertação. PG Biociências UERJ, 2011.

- Silva, G. P., Fernandes, D. C., Vigliano, M. V., Fonseca EM, Santos SVM, Marques PR, Justo G, Sabino KCC, Coelho MGP. Flavonoid-enriched fraction from *Echinodorus macrophyllus* aqueous extract exhibits high *in-vitro* and *in-vivo* anti-inflammatory activity. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 68:1584-1596, 2016.
- Silva, M. S., Miranda, R. R. S., Ferraz, V. P., Pereira, M. T., Siqueira, E. P., Alcântara, A. F. C. Changes in the essential oil composition of leaves of *Echinodrus macrophyllus* exposed to γ -radiation, *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 23: 600-607, 2013.
- Silva, T. de M. Estudos fitoquímicos e dos efeitos da radiação gama em *Echinodorus macrophyllus* (chapéu-de-couro) e em óleos essenciais de *Inga laurina* e *Eucalyptus grandis* (eucalipto). 2014. 155f. Tese (doutorado em Ciências) - Departamento de Química Universidade Federal de Minas Gerais. Minas Gerais, 2014.
- Silva, T. M., Dias, M. D., Pereira, M. T., Takahashi, J. A., Ferraz, V. P., Piló-Veloso, D., Alcântara, A. F. C. Effect of the γ -radiation on phenol fractions obtained from the leaves of *Echinodorus macrophyllus* Mich. *Radiation Physics and Chemistry*, 81(1): 22-26, 2012.
- Simões, C. M. O., Shenkel, E. P., Gosmann, G., Mello, J. C. P., Mentz, L. A., Petrovick, P. R. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5. ed. Porto Alegre, UFRGS, Florianópolis, UFSC, 2007.
- Smith, G. R., Monson, R. A., Ray, D. C. Patients with multiple unexplained symptoms. Their characteristics, functional health, and health care utilization. *Archives of Internal Medicine*, 146(1): 69-72, 1986.
- Sridhar, C., Krishnaraju, A.V., Subbaraju, G.V. Antiinflammatory constituents of *Temannus labialis*. *Indian Journal of Pharmaceutical Science*, 68: 111-114, 2006.
- Stein, C. Opioids, sensory systems and chronic pain. *European Journal of Pharmacology*, 716(1-3): 179-187, 2013.
- Stein, C. Opioid receptors. *Annual Review of Medicine*, 67: 433-451, 2016.
- Strada, C. L. Otimização de marcadores químicos para a avaliação da atividade antinociceptiva e influência de fatores abióticos nas concentrações de flavonas c-glicosiladas presentes nas folhas de *Echinodorus macrophyllus* (KUNTH) Micheli. Dissertação. Pós Graduação em Química, área Produtos Naturais e Derivados, Universidade Federal de Mato Grosso, 2012.
- Strada, C. L., Lima, K. C., da Silva, V. C., Ribeiro, R. V., Dores, E. F. G., Dall'Oglio, E. L., Schmeda-Hirschmann, G., Carollo, C. A., Martins, D. T. O., Sousa Júnior, P. T. Isovitexin as marker and bioactive compound in the antinociceptive activity of the Brazilian crude drug extracts of *Echinodorus scaber* and *E. grandiflorus*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 27: 619-626, 2017.
- Tanus-Rangel, E., Santos, S. R., Lima, J. C. S., Lopes, L., Noldin, V., Monache, F. D., Cechinel-Filho, V., Martins, D. T. O. Topical and systemic anti-inflammatory effects of *Echinodorus macrophyllus* (Kunth) Micheli (Alismataceae). *Journal of Medicinal Food*, 13(5): 1161-1166, 2010.

- Teixeira, M. J. Fisiopatologia da nocicepção e da supressão da dor. Neto, O. A., Issy, A. M. Dor: Princípios e Prática. Porto Alegre: Artmed, 205-226, 2009.
- Teixeira, M. J., Figueiró, J. A. B. Dor: epidemiologia, fisiopatologia, avaliação, síndromes dolorosas e tratamento. São Paulo: *Grupo Editorial Moreira Jr.*, 406p, 2001.
- Tita, B., Abdel-Haq, H., Vitalone, A., Mazzanti, G., Saso, L. Analgesic properties of *Epilobium angustifolium*, evaluated by the hot plate test and the writhing test. *Farmaco*, 56(5-7): 341-343, 2011.
- Tranquilli, W. J., Grimm, K. A., Lamont, L. A. Tratamento da dor para o clínico de pequenos animais. Editora Roca, 2005.
- Treto, R. R. R., Pinto, W. J. Fisiologia da algesia, uma revisão. *Journal of Amazon Health Science*, 1(2): 1-23, 2015.
- Turolla, M. S., Nascimento, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 42: 289-306, 2006.
- Vandenberg, R. J., Ryan, R. M., Carland, J. E., Imlach, W. L., Christie, M. J. Glycine transport inhibitors for the treatment of pain. *Trends in Pharmacological Sciences*, 35(8): 423-430, 2014.
- Vaz, M. S. M., Silva, M. S. V., Oliveira, R. J., Mota, J. S., Brait, D. R. H., Carvalho, L. N. B., Vani, J. M., Berno, C. R., Araújo, F. H. S., Barros, N. E. Evaluation of the toxicokinetics and apoptotic potential of ethanol extract from *Echinodorus macrophyllus* leaves in vivo. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 82: 32-38, 2016.
- Vidal, L. S., Alves, A. M., Kuster, R. M., Lage, C., Leitão, A. C. Genotoxicity and mutagenicity of *Echinodorus macrophyllus* (chapéu-de-couro) extracts. *Genetics and Molecular Biology*, 33(3): 549-557, 2010.
- Vieira, E. B. M., Garcia, J. B. S., Silva, A. A. M., Araújo, R. L. T. M., Jansen, R. C. S. Prevalence, Characteristics, and factors associated with chronic pain with and without neuropathic characteristics in São Luís, Brazil. *Journal of Pain and Symptom Management*, 44(2): 239-251, 2012.
- Vieira, R.A. Validação científica de plantas medicinais como fator catalisador no desenvolvimento da indústria farmacêutica nacional. *Revista Saúde e Ambiente*, 2(1/2): 57-64, 2001.
- Wagner, H., Bladt, S. *Plant Drug Analysis, A Thin-Layer Chromatography Atlas*. Springer Ed., 2nd Ed., Berlin, 1995.
- Wall, P. E. *Thin-layer Chromatography*. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2005.
- Woolfe, G., MacDonald, A. D. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (Demerol). *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 80(3): 300-307, 1944.

Yaksh, T. L., Malmberg, A. B. Central pharmacology of nociceptive transmission. In: Wall, P. D., Melzack, R., Bonica, J. J. Textbook of pain, Edinburgh: Churchill Livingstone, p.165-96, 1994.

Yam, M. F., Loh, Y. C., Tan, C. S., Adam, S. K., Manan, N. A., Basir, R. General pathways of pain sensation and the major neurotransmitters involved in pain regulation. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(8): 2164, 2018.

Zarpelon, A. C., Rodrigues, F. C., Lopes, A. H., Souza, G. R., T Carvalho, T. T., Pinto, L. G., Xu, D., Ferreira, S. H., Alves-Filho, J. C., McInnes, I. B., Ryffel, B., Quesniaux, V. F. J., Reverchon, F., Mortaud, S., Menuet, A., Foo Y Liew, F. Y., Cunha, F. Q., Cunha, T. M., Verri Jr, W. A. Spinal cord oligodendrocyte-derived alarmin IL-33 mediates neuropathic pain. *The FASEB Journal*, 30(1): 54-65, 2016.

Zhang, Z. J., Jiang, B. C., Gao, Y. J. Chemokines in neuron–glial cell interaction and pathogenesis of neuropathic pain. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74(18): 3275-3291, 2017.