

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

**AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DAS ATIVIDADES
ANTIOXIDANTE, ANTINOCICEPTIVA E ANTI-
INFLAMATÓRIA DE EXTRATOS DE *CARYOCAR VILLOSUM*
EM ENSAIOS *IN VITRO* E *IN VIVO***

GUTEMBERG LOPES SOARES

MANAUS
2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

GUTEMBERG LOPES SOARES

AVALIAÇÃO FARMACOLÓGICA DAS ATIVIDADES
ANTIOXIDANTE, ANTINOCICEPTIVA E ANTI-
INFLAMATÓRIA DE EXTRATOS DE *CARYOCAR VILLOSUM*
EM ENSAIOS *IN VITRO* E *IN VIVO*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Clarice de Carvalho Veloso Moura

Co-orientador: Prof. Dr. Emerson Silva Lima

MANAUS
2018

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S676a Soares, Gutemberg Lopes
Avaliação farmacológica das atividades antioxidante,
antinociceptiva e anti-inflamatória de extratos de *Caryocar villosum*
em ensaios in vitro e in vivo / Gutemberg Lopes Soares. 2018
128 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Clarice de Carvalho Veloso Moura
Coorientador: Emerson Silva Lima
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) -
Universidade Federal do Amazonas.

1. *Caryocar villosum*. 2. Piquiá. 3. Nocicepção. 4. Inflamação. 5.
Etnofarmacologia. I. Moura, Clarice de Carvalho Veloso II.
Universidade Federal do Amazonas III. Título

Avaliação Farmacológica das Atividades Antioxidante, Antinociceptiva e Anti-inflamatória de Extratos de *Caryocar villosum* em Ensaios *in vitro* e *in vivo*

DISCENTE: GUTEMBERG LOPES SOARES

PARECER:

Esta dissertação foi julgada adequada para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas em sua forma final e definitiva pelo Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas.

Manaus, AM, 24/05/2018.

Prof. Dr. Emerson Silva Lima
Coordenador do PPGCF

A mesma foi apresentada perante a banca composta pelos seguintes professores:

Clarice de Carvalho Veloso Moura
Profa. Dra. Clarice de Carvalho Veloso Moura
Orientadora e presidente da banca

Michael Brian Santiago
Prof. Dr. Michael Brian Santiago
Membro externo (UEA)

[Assinatura]
Prof. Dr. José Wilson do Nascimento Corrêa
Membro externo (UFAM)

*A todos aqueles que lutaram e
morreram preparando o caminho
para a Ciência e assim tivéssemos
um ponto de partida.*

*A Deus, o maior químico, biólogo,
matemático e físico que o mundo já
teve. Toda a Ciência vem Dele.*

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela verdadeira felicidade e pela força ao enfrentar a vida e seus percalços. Sou inteiramente grato pelo Seu amor e pelas suas provisões.

À minha esposa Fred'ane, por todo o seu amor, apoio e por transformar tristeza em alegria, insegurança em confiança. Com você posso alcançar lugares mais altos sem perder a razão. Como sou feliz ao seu lado! Eu te amo.

Ao meu grande pai Cleber (*in memoriam*), o homem responsável pela minha educação, cuidado e valores tão importantes. Se não fosse por você, não chegaria até aqui. Como anseio em te reencontrar na eternidade!

À minha mãe Silvana, por seu carinho e pela criação nas veredas corretas em meio a um mundo tão corrompido pela maldade.

Ao meu sogro Manuel, pelas tardes gostosas em que conversávamos sobre plantas medicinais e segredos do homem da floresta. Horas essas que me faziam refletir em como a criação de Deus é maravilhosa.

A todos os meus professores, homens e mulheres que me inspiraram a conquistar coisas maiores e ir além, por todo o conhecimento adquirido ao longo de anos na minha casa acadêmica.

À minha orientadora professora Clarice de Carvalho Veloso Moura, por ter me guiado dentro de uma área tão linda do conhecimento e por ter me ensinado com empenho, paciência e respeito.

À colaboradora Andrea de Castro Perez, pela contribuição por meio dos experimentos realizados na Universidade Federal de Minas Gerais.

A todos os colaboradores do Laboratório Temático Biotério Central do INPA, sempre dispostos a ajudar no que era preciso.

Aos professores Emerson Silva Lima e Fernanda Guilhon Simplicio, pelas importantes contribuições para o trabalho e pelo espaço físico cedido nos testes laboratoriais.

Aos amigos da graduação e mestrado (Farmafriends), por providenciarem momentos de alegria e descontração em meio às responsabilidades acadêmicas. Em cada um de vocês admirei e quis adquirir o que era bom para mim.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM), pela bolsa concedida.

Obrigado a todos vocês!

*“Quando, porém, vier o que é
perfeito, o que é imperfeito
desaparecerá.”*

1 Coríntios 13:10

RESUMO

A dor e a inflamação são sinais de proteção do organismo nas situações de perigo e dano tecidual. Porém, em caráter exacerbado, mecanismos celulares e moleculares levam a uma persistente dor inflamatória consequente da intensa sensibilização dos nociceptores, comprometendo a qualidade de vida de muitas pessoas. Devido aos efeitos adversos, dependência química e tolerância relacionados aos atuais medicamentos, a busca por novas alternativas é necessária. Nesse contexto, a importante biodiversidade Amazônica fornece fontes de novos produtos terapêuticos, uma vez que muitas plantas são usadas pela população local para tratar suas doenças, mas pouco foram estudadas cientificamente. Uma dessas espécies é a *Caryocar villosum*, conhecida como piquiá, cujo óleo do fruto é tradicionalmente aplicado para o tratamento de dores musculares e reumatismo. Escassos trabalhos relatam as atividades farmacológicas do óleo do piquiá na dor e inflamação, efeitos relacionados com os compostos fenólicos. Posto isto, objetivou-se avaliar as atividades antioxidante, antinociceptiva e anti-inflamatória de extratos obtidos de outras partes do piquiá. Foi avaliada a atividade sequestrante dos radicais ABTS•+ e DPPH• *in vitro*. Para as atividades antinociceptiva e anti-inflamatória *in vivo*, foram executados os testes de contorções abdominais induzidas por ácido acético, hiperalgesia mecânica induzida por carragenina, formalina e edema de pata induzido por carragenina. A atividade locomotora foi avaliada no teste de *rota-rod*. Os experimentos realizados foram aprovados mediante protocolo de aprovação do Comitê de Ética nº 042/2016. O extrato etanólico das cascas do fruto da *Caryocar villosum*, EECv (cascas), apresentou a menor CI₅₀ (5,33 µg/mL) frente ao radical DPPH• dentre todos os extratos. Além disso, o EECv (cascas), administrado por via oral na dose de 300 mg/Kg, inibiu significativamente o número de contorções abdominais, o tempo de lambida da pata na segunda fase do teste da formalina e a hiperalgesia mecânica, quando comparado ao grupo não tratado. O efeito biológico foi revertido pela administração prévia de naloxona. O EECv (cascas) também reduziu significativamente o volume do edema formado na fase tardia, quando comparado com o grupo não tratado. Estes efeitos farmacológicos foram atribuídos à presença de compostos fenólicos e flavonoides no extrato, sendo o ácido gálico e o ácido *p*-coumaroilquínico as substâncias majoritárias. Portanto, sugere-se que o EECv (cascas) possui atividades anti-inflamatória, por inibição da síntese de prostaglandinas, e antinociceptiva periférica com a modulação da via opioidérgica. Atesta-se assim o uso medicinal das cascas do fruto da *Caryocar villosum* para o tratamento da dor e inflamação, além do seu óleo, bem como a possibilidade tecnológica para a obtenção de um novo fitomedicamento.

Palavras-chave: *Caryocar villosum*, piquiá, nocicepção, inflamação, etnofarmacologia

ABSTRACT

Pain and inflammation are organism protection signs in situations of danger and tissue damage. However, in an exacerbated way, molecular and cellular mechanisms lead to a persistent inflammatory pain resulting from the intense nociceptors sensitization, compromising the life quality of many people. Due to the adverse effects, chemical dependence and tolerance related to the current medicines, the search for new alternatives is necessary. In this context, the important Amazonian biodiversity provides sources of new therapeutic products, since many plants are used by the local population to treat their diseases, but few were scientifically studied. One of these species is *Caryocar villosum*, known as piquiá, which fruit oil is traditionally applied for the treatment of muscular pain and rheumatism. Scarce works report the pharmacological activities of piquiá oil in pain and inflammation, effects related to phenolic compounds. Therefore, the aim of this study was to evaluate the antioxidant, antinociceptive and anti-inflammatory activities of extracts obtained from other parts of piquiá. The scavenging activity of ABTS•+ and DPPH• radicals were evaluated *in vitro*. For the antinociceptive and anti-inflammatory activities *in vivo*, the tests of acetic acid-induced writhing, carrageenan-induced mechanical hyperalgesia, formalin and carrageenan-induced paw edema were performed. The locomotor activity was assessed by *rota-rod* test. The experiments carried out were approved by protocol of approval of the Ethics Committee n° 042/2016. The ethanolic extract of the *Caryocar villosum* fruit peels, EECv (peels), presented the lowest IC₅₀ (5,33 µg/µL) against the DPPH• radical among all extracts. In addition, EECv (peels), given orally at dose of 300 mg/Kg, significantly inhibited the number of abdominal contortions, the paw licking time in the second phase of the formalin test and the mechanical hyperalgesia, when compared to the untreated group. The biological effect was reversed by prior administration of naloxone. EECv (peels) also significantly reduced the edema volume formed in the late phase, when compared to the untreated group. These pharmacological effects were attributed to the presence of phenolic compounds and flavonoids in the extract, as gallic and *p*-coumaroylquinic acids being the major substances. Therefore, it is suggested that EECv (peels) has anti-inflammatory activity, by inhibition of prostaglandins synthesis, and peripheral antinociceptive activity with opioid pathway modulation. This attests the medicinal use of the *Caryocar villosum* fruit peels for the treatment of pain and inflammation, besides its oil, as well as the technological possibility to obtain a new phytomedicine.

Keywords: *Caryocar villosum*, piquiá, nociception, inflammation, ethnopharmacology

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Extratos obtidos a partir das matérias-primas do piquiá.....	58
Tabela 2 – Rendimentos dos extratos obtidos de piquiá.....	70
Tabela 3 – Teor de compostos fenólicos totais nos extratos obtidos de piquiá.....	71
Tabela 4 – Teor de flavonoides nos extratos obtidos de piquiá.....	72
Tabela 5 – Atividade sequestrante dos radicais ABTS•+ dos extratos obtidos de piquiá.....	73
Tabela 6 – Valores de CI ₅₀ dos extratos obtidos de piquiá para o radical ABTS•+.....	74
Tabela 7 – Atividade sequestrante dos radicais DPPH• dos extratos obtidos de piquiá.....	75
Tabela 8 – Valores de CI ₅₀ dos extratos obtidos de piquiá para o radical DPPH•.....	76
Tabela 9 – Classes de substâncias encontradas no EECv (cascas).....	77
Tabela 10 – Compostos detectados no EECv (cascas) por ESI-MS.....	78

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Frutos da <i>Caryocar villosum</i> (piquiá).....	20
Figura 2 – Fluxograma das etapas metodológicas do presente trabalho.....	56
Figura 3 – Espectros obtidos do EECv (cascas) por ESI-MS.....	79
Figura 4 – Efeito do EECv (cascas) e do seu veículo no tempo de permanência no <i>rota-rod</i> em camundongos.....	80
Figura 5 – Efeito do EECv (cascas) no número de contorções abdominais induzidas por ácido acético 0,9% em camundongos.....	81
Figura 6 – Efeito do EECv (cascas) na inflamação no teste do edema de pata induzido por carragenina em camundongos.....	83
Figura 7 – Efeito do EECv (cascas) na hiperalgisia mecânica induzida por carragenina em camundongos.....	84
Figura 8 – Avaliação da participação da via opioidérgica no mecanismo de ação antinociceptivo do EECv (cascas) em camundongos.....	85
Figura 9 – Efeito do EECv (cascas) no tempo de lambida da pata dos camundongos na primeira fase do teste da formalina.....	86
Figura 10 – Efeito do EECv (cascas) no tempo de lambida da pata dos camundongos na segunda fase do teste da formalina.....	87

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfônico
AINES	anti-inflamatórios não esteroidais
AMPc	adenosina 3'5'-monofosfato cíclico
BDNF	fator neurotrófico derivado do cérebro
<i>C. villosum</i>	<i>Caryocar villosum</i>
CGAs	ácidos clorogênicos
CGRP	peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
CI ₅₀	concentração inibitória de 50 %
COX-1	ciclooxigenase 1
COX-2	ciclooxigenase 2
DAG	diacilglicerol
DIPAG	PAG dorsolateral
DmPAG	PAG dorsomedial
DMSO	dimetilsulfóxido
DPM	desvio padrão da média
DPPH	2,2-difenil-1-picrilidrazila
EECv (cascas)	extrato etanólico das cascas do fruto de <i>Caryocar villosum</i>
ERNs	espécies reativas de nitrogênio
EROs	espécies reativas de oxigênio
ESI-MS	espectrometria de massas com ionização por <i>electrospray</i>
IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor
IFN- γ	interferon-gama
IL	interleucina
iNOS	óxido nítrico sintase induzível
<i>L. thomasi</i>	<i>Lonchophylla thomasi</i>
Lpag	PAG lateral
LPS	lipopolissacarídeo
MAPK	proteína quinase ativada por mitógenos
MCP-1	proteína quimiotática de monócitos 1
MPO	mieloperoxidase

NF- κ B	fator nuclear kappa B
NGC	núcleo reticular gigantocelular
NGF	fator de crescimento neural
NK1	receptor de neurocinina 1
NMDA	N-metil-D-aspartato
NO	óxido nítrico
NRM	núcleo magno da rafe
ORL-1	receptor do tipo opioide 1
OX1R	receptor de orexina do tipo 1
PAG	substância cinzenta periaquedutal
PGE ₂	prostaglandina E ₂
PGF _{2α}	prostaglandina F ₂ alfa
PGI ₂	prostaglandina I ₂
PKA	proteína quinase A
PKC	proteína quinase C
POMC	pró-opiomelanocortina
Receptor CB ₁	receptor canabinoide do tipo 1
RMV	medula ventromedial rostral
SNC	Sistema Nervoso Central
TNF- α	fator de necrose tumoral alfa
TRPA1	receptor de potencial transitório relacionado a proteína anquirina do tipo 1
TRPV1	receptor de potencial transitório vanilóide do tipo 1
TXA ₂	tromboxano A ₂
vIPAG	PAG ventrolateral

LISTA DE SÍMBOLOS

$\mu\text{g/mL}$	micrograma por mililitro
m/s	metro por segundo
mg/Kg	miligramas por kilograma
mg/mL	miligramas por mililitro
mL/Kg	mililitro por kilograma
mN	milinewton
α	alfa
β	beta
γ	gama
δ	delta
Δ	Delta
ϵ	épsilon
ζ	zeta
κ	kappa
λ	lambda
μ	mi
μL	microlitro
μm	micrómetro
σ	sigma

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	19
2.1 A espécie <i>Caryocar villosum</i>	19
2.1.1 Estudos fitoquímicos da <i>C. villosum</i>	22
2.1.2 Atividades biológicas da <i>C. villosum</i>	24
2.2 Dor, nociceção e via ascendente.....	29
2.3 Controle medular e via descendente da dor.....	33
2.4 Sistema opioidérgico.....	38
2.5 Mecanismos celulares e moleculares da inflamação na dor.....	44
3. OBJETIVOS.....	55
3.1 Objetivo geral.....	55
3.2 Objetivos específicos.....	55
4. METODOLOGIA.....	56
4.1 Obtenção da matéria-prima vegetal.....	56
4.2 Obtenção dos extratos.....	57
4.2.1 Extração fracionada.....	58
4.2.2 Extratos hidroetanólicos.....	59
4.2.2.1 Secagem por liofilização.....	59
4.2.2.2 Secagem por <i>spray dryer</i>	60
4.3 Ensaios <i>in vitro</i>	60
4.3.1 Determinação de compostos fenólicos totais.....	60
4.3.2 Determinação de flavonoides.....	61
4.3.3 Atividade antioxidante.....	61

4.3.3.1	Atividade sequestrante dos radicais ABTS•+	61
4.3.3.2	Atividade sequestrante dos radicais DPPH•	62
4.4	Estudos químicos	63
4.4.1	Prospecção fitoquímica	63
4.4.2	Espectrometria de massas com ionização por <i>electrospray</i> (ESI-MS)	63
4.5	Ensaio <i>in vivo</i>	64
4.5.1	Teste de coordenação motora	65
4.5.2	Contorções abdominais induzidas por ácido acético	66
4.5.3	Edema de pata induzido por carragenina	67
4.5.4	Hiperálgia mecânica induzida por carragenina e avaliação da participação da via opioidérgica	67
4.5.5	Teste da formalina	68
4.6	Análise estatística	69
5.	RESULTADOS	70
5.1	Rendimentos dos extratos obtidos	70
5.2	Ensaio <i>in vitro</i>	71
5.2.1	Determinação de compostos fenólicos totais	71
5.2.2	Determinação de flavonoides	72
5.2.3	Atividade antioxidante	73
5.2.3.1	Atividade sequestrante dos radicais ABTS•+	73
5.2.3.2	Atividade sequestrante dos radicais DPPH•	75
5.3	Estudos químicos	77
5.3.1	Prospecção fitoquímica	77

5.3.2	Espectrometria de massas com ionização por <i>electrospray</i> (ESI-MS).....	78
5.4	Ensaio <i>in vivo</i>	79
5.4.1	Teste de coordenação motora.....	79
5.4.2	Contorções abdominais induzidas por ácido acético.....	81
5.4.3	Edema de pata induzido por carragenina.....	82
5.4.4	Hiperálgia mecânica induzida por carragenina e avaliação da participação da via opioidérgica.....	83
5.4.5	Teste da formalina.....	85
6.	DISCUSSÃO DOS RESULTADOS.....	88
7.	CONCLUSÃO.....	109
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	110
	ANEXO – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	128

1. INTRODUÇÃO

A dor é um problema mundial de saúde pública e seu manejo clínico uma prioridade, tendo em vista que o alívio para esta condição já é considerado um direito humano básico (SREEKEESON e MAHOMOODALLY, 2014; XIAO *et al*, 2016). Uma vez que a dor compõe uma experiência multidimensional ao envolver diversos aspectos, a sua percepção e transmissão ocorrem por meio de mecanismos periféricos e centrais (SARMENTO-NETO *et al*, 2016; XIAO *et al*, 2016).

Uma parte considerável da população é afetada por algum tipo de dor, o que resulta na perda da qualidade de vida e, conseqüentemente, reflete em demasiado consumo de medicamentos (OLIVEIRA *et al*, 2014). Juntamente com a inflamação, a dor pode resultar em situações críticas para o paciente, como o estresse e a perda da capacidade cotidiana (RAZIQ *et al*, 2016). Nas situações crônicas, o tratamento, a avaliação e o manejo da dor são desafiadores para mais de 1,5 bilhões de doentes que sofrem de diversas condições, como a dor lombar, dor do câncer, cefaleia, fibromialgia e artrite dolorosa (SREEKEESON e MAHOMOODALLY, 2014).

Nos diferentes tipos de dor associada com a inflamação, os agentes anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) se destacam por reduzir eficientemente a dor e a inflamação, efeitos esses associados à inibição da cicloxigenase 2 (COX-2) (LAJILI *et al*, 2016). Além de AINES, opioides, anestésicos locais, acetaminofeno (paracetamol), anticonvulsivantes, antidepressivos, canabinoides e outros agentes farmacológicos também são utilizados para o seu tratamento (FLORES *et al*, 2012; FERREIRA *et al*, 2014).

Apesar da variabilidade de terapias, existem dificuldades para o seu uso, como a limitada eficácia a longo prazo e efeitos adversos (SREEKEESON e MAHOMOODALLY, 2014). Além disso, problemas relacionados à tolerância a opioides são comuns entre os

pacientes e a eficácia desses medicamentos varia para cada tipo de dor (MORGAN e CHRISTIE, 2011; PASTERNAK, 2014). Portanto, faz-se necessária a pesquisa por novos compostos terapêuticos, haja visto as reações adversas, dependência física e tendência de abuso dos medicamentos atuais disponíveis (XIAO *et al*, 2016).

Por outro lado, o uso de medicamentos de procedência natural demonstra eficácia no manejo de diversas condições inflamatórias e dolorosas, com menos efeitos adversos e benefícios tão eficazes quanto os medicamentos vigentes (RAZIQ *et al*, 2016). Nesse contexto, os produtos naturais representam uma fonte primordial para a pesquisa de substâncias com ação analgésica. Assim, o Brasil possui privilégio por deter grande diversidade biológica, que se traduz em riqueza de espécies com potencial medicinal para a produção de novos fitoterápicos (SILVA *et al*, 2013).

As espécies presentes no clima tropical são produtoras de metabólitos secundários diversos, que são substâncias utilizadas para a proteção destas plantas contra situações adversas referentes às variações de temperatura, degradação ultravioleta, presença de herbívoros e outros. Tais metabólitos secundários tornam essas espécies endêmicas atrativas e consolidadas como tratamentos medicinais viáveis (SILVA e TEIXEIRA, 2015). Muitas espécies medicinais do Brasil são pouco estudadas e o investimento na pesquisa sustentável da biodiversidade amazônica certamente renderá produtos naturais potencialmente importantes (NUNOMURA *et al*, 2009; TACON e FREITAS, 2013).

Como resultado da pesquisa de plantas medicinais e seus metabólitos secundários com ação analgésica e anti-inflamatória, o Acheflan® foi o primeiro fitoterápico nacional introduzido no mercado, apresentando boa aceitação pela comunidade médica (OLIVEIRA *et al*, 2014).

Aos flavonoides são atribuídas propriedades anti-inflamatória e analgésica. Muitas plantas que possuem flavonoides em sua composição são utilizadas visando esses efeitos na

medicina popular (XIAO *et al*, 2016). Uma delas é a *Caryocar villosum*, conhecida como piquiá (CHISTÉ *et al*, 2014), cujo óleo do fruto é bastante utilizado pela população local da comunidade de Piquiatuba, no estado do Pará, para o alívio de dores musculares, além de reumatismo, erisipela e asma, que são doenças de natureza dolorosa e/ou inflamatória (GALUPPO, 2004; CLAY *et al*, 2010).

Em laboratório, foi demonstrado que o óleo do fruto do piquiá possui atividades anti-inflamatória sistêmica, anti-inflamatória tópica e antinociceptiva, todas verificadas em testes animais (GALUPPO, 2004; XAVIER, 2011; XAVIER *et al*, 2011), além da atividade anti-inflamatória *in vitro* para extratos obtidos das sementes, polpa e cascas do fruto (YAMAGUCHI *et al*, 2017).

As atividades antinociceptiva e anti-inflamatória do extrato dessa espécie nunca foram avaliadas antes em modelos animais. Portanto, devido à necessidade de terapias complementares para o tratamento da dor e inflamação, no presente trabalho foram avaliadas as atividades antioxidante, antinociceptiva e anti-inflamatória de extratos obtidos das cascas do fruto e de um *pool* de sementes e polpa da *Caryocar villosum*, utilizando ensaios *in vitro* e *in vivo*.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 A espécie *Caryocar villosum*

A família Caryocaraceae, pertencente à ordem Theales, divide-se em dois gêneros, *Caryocar* e *Anthodiscus*, e possui ao todo 26 espécies presentes nas regiões tropicais e neotropicais da América, o que engloba desde a Costa Rica até o sudeste brasileiro. Essas espécies são compostas por árvores de grande e médio porte, com folhas trifolioladas, estipuladas, opostas ou alternadas, e flores actinomórficas (MAGID *et al*, 2006a; MARTINS e GRIBEL, 2007; XAVIER *et al*, 2011; VALENTE, 2012).

As 16 espécies componentes do gênero *Caryocar* estão distribuídas desde a Costa Rica até o Paraguai. De todas elas, 12 estão presentes no Brasil e ocorrem em maior abundância na Região Amazônica (XAVIER *et al*, 2011; VALENTE, 2012; LEAL *et al*, 2016).

A *C. villosum*, conhecida popularmente como piquiá, alcança de 35 a 50 metros de altura e se trata de uma das maiores árvores oleaginosas. Além do nome popular brasileiro, pode também ser chamada de pikia, pekea ou pékéya na Guiana Francesa (MAGID *et al*, 2006b; XAVIER *et al*, 2011; MORAIS e GUTJAHR, 2012).

O piquiá distribui-se predominantemente na região firme do estuário, mas pode ocorrer em toda a extensão da Bacia Amazônica, além de uma parte da região nordestina. Apesar de haver a exploração contínua da espécie, o que possibilita a sua escassez em algumas regiões, ainda não é considerada em risco de extinção (MAGID *et al*, 2006a; ALMEIDA *et al*, 2012; MORAIS e GUTJAHR, 2012).

O morcego da espécie *Lonchophylla thomasi* é importante para a polinização do piquiá. A ocorrência de queimadas na floresta afasta a presença do *L. thomasi*, o que desfavorece a *C. villosum*. Outras espécies de morcegos como *Phyllostomus discolor* e pertencentes à subfamília

Glossophaginae, além de outros animais, também participam da etapa de polinização da árvore (MARTINS e GRIBEL, 2007; VALENTE, 2012).

O piquiá representa uma notória importância econômica para as famílias ribeirinhas e pessoas de diversas áreas, devido às inúmeras aplicações das variadas partes da árvore que abrangem desde a culinária até a construção. Ademais, o piquiá possui grande valor nutritivo e reúne em sua composição substâncias responsáveis por atividades biológicas, como as saponinas, compostos fenólicos, flavonoides, carotenoides e vitaminas C e E (VALENTE, 2012; CHISTÉ *et al*, 2014; LEAL *et al*, 2016).



Figura 1 – Frutos da *Caryocar villosum* (piquiá). **Fonte:** Gutemberg Soares, Abril de 2018.

Entre os meses de julho e novembro ocorre a floração do piquazeiro. Não ocorre a frutificação da espécie em todos os anos, mas, quando acontece, 350 frutos em média são produzidos durante o período de amadurecimento entre os meses de fevereiro e maio. Com peso médio de 280 gramas, o fruto do piquiá tem de 7 a 9 cm de diâmetro e possui uma forma redonda irregular oblongo-globoso. A polpa corresponde a 23% do total do fruto, enquanto que a amêndoa equivale a 6% (MARX *et al*, 1997; MAGID *et al*, 2006a; MORAIS e GUTJAHR, 2012).

Do fruto e da amêndoa, extrai-se um óleo muito apreciado, pois pode ser utilizado na cozinha regional, indústria cosmética e produção de sabão; nesta última aplicação as sementes

e cascas do fruto também são utilizadas. O hexano é utilizado no processo de extração do óleo, o que confere um rendimento de aproximadamente 46% para a polpa e 42% para as amêndoas (MAGID *et al*, 2008; XAVIER *et al*, 2011; MORAIS e GUTJAHR, 2012; CHISTÉ *et al*, 2014).

As sementes do fruto são comestíveis, a fresco ou processadas, e podem ser utilizadas como afrodisíaco. São oleosas, brancas e apresentam uma massa carnuda e aromática, rica em nutrientes como caroteno, fósforo, cobre, ferro e riboflavina. A retirada das sementes do endocarpo é difícil, visto a presença de espinhos finos nessa estrutura (MARX *et al*, 1997; VALENTE, 2012; ASCARI *et al*, 2013).

A aplicação do piquiá na indústria cosmética diz respeito à produção de loções, cremes para pele, sabonetes, xampus, condicionadores, sais de banho, cremes pós-depilação e maquiagem. O óleo extraído da amêndoa possui ponto de fusão semelhante ao da pele humana e, por isso, é utilizado em formulações dermatológicas (MORAIS e GUTJAHR, 2012).

O fruto pode ser cozido em água e sal para o consumo e também é utilizado para sucos e licores. Grande teor de ácido oleico está presente em seu óleo, o que o torna comestível, viável para frituras e uma alternativa à manteiga. De suas cascas pode-se obter uma tinta usada na escrita e na coloração de fios e redes. O tronco da árvore fornece material para a construção civil e naval, pois sua matéria-prima é bastante resistente a insetos que se alimentam de madeira. A população local utiliza as cascas do tronco e o fruto como um veneno para peixes. Esse efeito tóxico está relacionado à presença de saponinas (MAGID *et al*, 2006a; MAGID *et al*, 2006b; XAVIER *et al*, 2011; MORAIS e GUTJAHR, 2012).

Quanto ao uso popular medicinal da espécie, as tribos indígenas do Brasil, Venezuela, Guiana Francesa e Colômbia utilizam as cascas do caule e o fruto para tratamento de tumores externos, filariose e micoses. Assim como o óleo de pequi (*Caryocar brasiliense*), o óleo de piquiá é utilizado contra dermatofitoses na região Nordeste do Brasil (MAGID *et al*, 2006b; MAGID *et al*, 2008; CHISTÉ *et al*, 2012).

O óleo também é tradicionalmente aplicado como um anti-inflamatório natural para prevenir bronquite, febre, tosse, resfriados e enfermidades no fígado, além de combater dores musculares e reumatismo. Como fonte de vitamina A, o fruto é ingerido para tratamento e prevenção de problemas na visão. O tratamento de frieiras também é realizado com as cascas do fruto (XAVIER *et al*, 2011; MORAIS e GUTJAHR, 2012; ASCARI *et al*, 2013).

2.1.1 Estudos fitoquímicos da *C. villosum*

A quantificação de taninos totais presentes em extratos obtidos da polpa do piquiá por diferentes solventes foi feita por Chisté *et al* (2014). Como resultado, o extrato hidroetanólico atingiu a maior concentração desses compostos.

Além de taninos, compostos fenólicos, carotenoides e flavonoides também estão presentes na polpa do fruto (ALMEIDA *et al*, 2012). Barreto *et al* (2009) demonstrou que o piquiá foi o fruto que apresentou as maiores concentrações de compostos fenólicos e flavonoides em um trabalho feito com 18 polpas diferentes. Outro trabalho, também realizado com a polpa de piquiá, definiu o extrato hidroetanólico como o maior detentor de compostos fenólicos e flavonoides; enquanto que o extrato etanólico exibiu a maior concentração para os carotenoides (CHISTÉ *et al*, 2014).

Entre os estudos que quantificaram os compostos fenólicos presentes na polpa, o ácido gálico, ácido elágico ranosídeo, ácido elágico desoxihexosídeo e ácido elágico foram tidos como os compostos majoritários desta classe no extrato (ALMEIDA *et al*, 2012; CHISTÉ *et al*, 2012). Chisté e Mercadante (2012) também obtiveram resultados semelhantes, uma vez que o composto majoritário encontrado foi o ácido gálico, seguido por ácido elágico desoxihexosídeo e ácido elágico.

Yamaguchi *et al* (2017) quantificaram os compostos fenólicos e flavonoides em extratos etanólicos e hidroetanólicos obtidos a partir das cascas do fruto, polpa e sementes. Como resultados, os extratos feitos com a polpa foram os que apresentaram as maiores concentrações desses compostos. Além disso, a análise cromatográfica dos extratos obtidos da polpa e cascas do fruto exibiu o mesmo perfil para os compostos majoritários detectados, ácido gálico e ácido elágico, porém em quantidades diferentes, sendo que os extratos obtidos da polpa continham maiores concentrações dessas substâncias.

Isolou-se do extrato metanólico das cascas do caule do piquiá sete novos glicosídeos fenólicos em um estudo feito também com a *Caryocar glabrum*. Tempo depois, o grupo de pesquisa teve êxito na identificação de mais 15 compostos na fração metanólica menos ativa (MAGID *et al*, 2008).

Magid *et al* (2006a) isolaram e identificaram a estrutura química de 24 cariocarosídeos, um tipo de saponina, a partir da polpa e cascas do fruto. Desse total, 14 eram substâncias inéditas. Em trabalho posterior, Magid *et al* (2006b) analisaram as cascas do caule da espécie e isolaram 7 cariocarosídeos, sendo 5 deles novos compostos.

Com relação aos carotenoides, os principais detectados na polpa do piquiá foram a anteraxantina e a zeaxantina. A neoxantina, violaxantina, β -caroteno e a luteína também foram encontrados (ALMEIDA *et al*, 2012). Chisté e Mercadante (2012) e Chisté *et al* (2012) obtiveram resultados semelhantes, em que os principais compostos foram a *trans*-anteraxantina, a *trans*-zeaxantina, a *trans*-neoxantina e a luteína. Outros carotenoides também encontrados no fruto foram *cis*- β -criptoxantina e α -caroteno (GODOY, 1993). Galuppo (2004) realizou a prospecção fitoquímica do óleo do fruto do piquiá e foram detectadas a presença de carotenoides, além de esteroides e triterpenoides.

O α -tocoferol foi o único tocoferol já detectado na polpa da *C. villosum*. Substâncias como o ácido oleico, esteroides e substâncias voláteis como o β -bisaboleno, 2-heptadona, (*E*)-

nerolidol e furfural, já foram encontradas no fruto (MARX *et al*, 1997; ALMEIDA *et al*, 2012; CHISTÉ *et al*, 2014; LEAL *et al*, 2016).

A cromatografia gasosa foi utilizada para detecção e quantificação de ácidos graxos presentes no óleo de piquiá. Entre os achados, o ácido linoleico se mostrou com maior teor, seguido pelo ácido oleico e ácido palmítico (POLONINI *et al*, 2012).

Marx *et al* (1997) estiveram à frente de um estudo abrangente sobre a composição química da polpa do piquiá. Mais de 50% do teor dos ácidos graxos encontrados eram representados pelos ácidos palmítico e oleico. O 7,25-stigmastadienol, β -sitosterol e estigmasterol foram os principais componentes esteróis encontrados. Com relação aos minerais analisados, o cálcio, magnésio e o fósforo se destacaram com valores de 83, 52 e 41 mg/100g, respectivamente. Por fim, o ácido γ -aminobutírico foi o aminoácido não proteico de maior concentração, e a taurina e a *o*-fosfoetanolamina foram as aminas biogênicas mais abundantes.

O óleo possui grande quantidade de ácidos graxos e vitaminas A, C e do complexo B, bem como fitosteróis, sitosteróis, estigmasterol, lanosterol, esteroides e triterpenóides (XAVIER *et al*, 2011; MORAIS e GUTJAHR, 2012). Após análise do óleo por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, foram identificados os principais ésteres de ácido graxo hexadecanoato de metila, octadecanoato de metila e (*E*)-octadecenoato de metila (XAVIER *et al*, 2011).

2.1.2 Atividades biológicas da *C. villosum*

Nas folhas, cascas do caule e polpa do fruto do piquiá estão contidos taninos que contribuem para várias atividades biológicas, como a antimicrobiana, antioxidante, antitumoral e inseticida, uma vez que essas substâncias podem se ligar a proteínas, polissacarídeos, alcaloides e íons (VALENTE, 2012).

A atividade fungicida frente ao fungo da espécie *Fusarium* sp foi avaliada por Valente (2012), que avaliou os extratos aquoso e alcoólico obtidos a partir das folhas da *C. villosum*. Na pesquisa, o extrato etanólico a quente obteve o melhor desempenho em inibir linearmente o crescimento microbiano do micélio em função do aumento da concentração. Por outro lado, o extrato aquoso a frio não alcançou diferença significativa no crescimento microbiano para nenhuma das concentrações testadas, quando comparados aos extratos etanólico e metanólico. Para o teste de inibição da germinação de conídios, o extrato etanólico a quente apresentou maior eficácia.

Para a atividade antioxidante, a polpa do fruto se destaca por possuir substâncias com atividade capturadora de radicais livres, como os compostos fenólicos e os flavonoides. Em um estudo comparativo, o piquiá apresentou dentre 18 polpas de frutos, o melhor desempenho quanto à atividade antioxidante, expressa em valor de capacidade antioxidante equivalente ao Trolox[®] (ácido 6-hidróxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico) para a captura de radicais livres (BARRETO *et al*, 2009; ALMEIDA *et al*, 2012).

Diferentes extratos obtidos a partir da polpa do piquiá foram submetidos a testes para verificar a capacidade de capturar espécies reativas de oxigênio (EROs) e espécies reativas de nitrogênio (ERNs). Como resultado, os menores valores de concentração inibitória de 50 % (CI₅₀) contra o ácido hipocloroso (HOCl), óxido nítrico (NO•) e peroxinitrito (ONOO⁻) foram obtidos pelos extratos aquoso e hidroetanólico. O extrato hidroetanólico obteve 37% de inibição de radical superóxido (O₂•⁻), enquanto que para o extrato aquoso o resultado foi de 15%. Mesmo testados nas maiores concentrações, os extratos etanólico, etanol/acetato de etila e acetato de etila não apresentaram qualquer efeito para a atividade avaliada (CHISTÉ *et al*, 2012).

Chisté *et al* (2014), em um estudo utilizando extratos obtidos da polpa do piquiá, verificaram que o extrato hidroetanólico, quando comparado aos demais, foi o mais eficaz no teste de captura de radicais peroxil (ROO•). Um resultado diferente do esperado foi observado

no ensaio de extinção do oxigênio singlet ($^1\text{O}_2$), no qual os extratos aquoso e hidroetanólico exibiram os melhores resultados, sendo o extrato hidroetanólico o mais ativo. Apesar do extrato etanólico ter apresentado maior concentração de carotenoides, substâncias reconhecidas como melhores extintores desse tipo de radical, não obteve melhor desempenho frente aos demais.

O extrato etanólico, obtido das cascas do fruto do piquiá, apresentou os menores valores de CI_{50} para os ensaios de atividade antioxidante por radical ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolina)-6-sulfônico (ABTS $\bullet+$) e por radical 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH \bullet) dentre todos os extratos feitos a partir das sementes, polpa e cascas do fruto da espécie. Ademais, os extratos exibiram percentagens de inibição da produção de EROs que variaram de 70 a 80 % em ensaio de atividade antioxidante celular (YAMAGUCHI *et al*, 2017).

A atividade larvicida do piquiá foi constatada por meio de ensaio de toxicidade com *Artemia salina*, uma espécie de crustáceo. Os autores analisaram tanto os extratos metanólicos obtidos a partir das cascas do fruto e da polpa quanto a fração bruta de saponinas. A fração de saponinas demonstrou o melhor resultado, porém os outros extratos também apresentaram uma atividade larvicida eficaz, sendo o extrato metanólico obtido da polpa mais ativo que o obtido das cascas do fruto. Com isso, há a fundamentação do uso de partes da planta como veneno para peixe, bem como o uso potencial do piquiá como pesticida e agente antitumoral (MAGID *et al*, 2006a).

A atividade citotóxica de duas saponinas cariocarosídeas, isoladas do extrato das cascas do caule do piquiá, contra queratinócitos humanos foi realizada por Magid *et al* (2006b), que constataram uma moderada atividade. Posteriormente, o extrato das cascas do caule apresentou atividade de inibição da tirosinase em ensaio *in vitro* (MAGID *et al*, 2008). Já os extratos etanólicos e hidroetanólicos obtidos da polpa, sementes e cascas do fruto do piquiá não exibiram citotoxicidade contra fibroblastos humanos. Porém, os extratos obtidos das cascas do fruto

demonstraram citotoxicidade para células de linhagem cancerígena (YAMAGUCHI *et al*, 2017).

O óleo do piquiá, juntamente com os óleos analisados de outras espécies, apresentou um baixo fator de proteção solar. Sendo assim, a *C. villosum* não demonstrou atividade fotoprotetora satisfatória contra os raios solares (POLONINI *et al*, 2012).

Porém, uma atividade fotoprotetora positiva do extrato, obtido a partir das cascas do fruto, foi relatada por Yamaguchi *et al* (2016) em um trabalho que visou medir a absorção nos comprimentos de ondas referentes às absorções nas regiões ultravioleta A, B e C, componentes da radiação UV, que é responsável por problemas decorrentes da exposição demasiada ao sol. Como resultado, os extratos etanólico e hidroetanólico do piquiá apresentaram os maiores valores de comprimento de onda máximo, o que resultou em uma ótima ação fotoprotetora semelhante aos compostos utilizados em protetores solar, como o ácido *p*-aminobenzóico, mesmo quando os extratos foram diluídos. Esta propriedade está relacionada com a presença de compostos fenólicos e flavonoides, que são responsáveis pela proteção de plantas contra a radiação ultravioleta.

A polpa do fruto do piquiá demonstrou uma atividade antígeno-tóxica em uma pesquisa realizada por Almeida *et al* (2012). No referido estudo, todas as doses avaliadas apresentaram um efeito protetor no teste do micronúcleo, quando células da medula óssea receberam tratamento prévio com a polpa do piquiá antes de serem tratadas com a doxorubicina. Da mesma forma, no mesmo estudo, a polpa do piquiá diminuiu o dano no DNA induzido pelo efeito genotóxico da doxorubicina, principalmente em células cardíacas e hepáticas. O mecanismo sugerido para essa atividade pode estar relacionado com a presença de substâncias antioxidantes na polpa do piquiá, como os carotenoides e os compostos fenólicos, os quais foram detectados no fruto (ALMEIDA *et al*, 2012).

O óleo do piquiá foi avaliado quanto ao seu efeito antinociceptivo nos testes de contorções abdominais induzidas por ácido acético e placa quente. Devido ao pré-tratamento por via oral dos animais com o composto, houve uma redução significativa do número de contorções durante a resposta nociceptiva. Porém, o óleo não mostrou ação biológica no teste da placa quente, o que levou os autores a concluir que o mesmo possui apenas ação periférica e não central (GALUPPO, 2004).

Na avaliação da atividade anti-inflamatória *in vitro*, todos os extratos etanólicos e hidroetanólicos obtidos a partir das sementes, polpa e cascas do fruto do piquiá foram eficazes em diminuir a produção de óxido nítrico (NO) em macrófagos estimulados por lipopolissacarídeo (LPS), uma substância que desencadeia o processo inflamatório, sendo considerados os extratos obtidos das cascas do fruto os mais eficazes (YAMAGUCHI *et al*, 2017).

Foi avaliada a atividade anti-inflamatória do óleo do piquiá por meio dos ensaios de edema de pata induzido por dextrana e edema de pata induzido por carragenina em ratos. Como resultado, o óleo administrado por via oral foi capaz de reduzir significativamente o volume do edema formado na pata dos animais em ambos os testes (GALUPPO, 2004).

O óleo fixo extraído do piquiá foi avaliado quanto à atividade anti-inflamatória tópica em modelos animais. No teste do granuloma, todas as doses administradas por via tópica inibiram significativamente a formação de tecido granulomatoso de uma forma dose-dependente, quando comparadas ao grupo controle positivo dexametasona. Para o teste de edema de pata, o óleo, aplicado topicamente, reverteu a formação do edema, tendo sua maior ação após 4 horas da administração da carragenina. Enquanto que no teste da permeabilidade vascular, a dose aplicada do óleo pela via tópica reverteu a resposta à histamina em 40%, sendo significativo se comparado ao controle positivo. Segundo os autores, os efeitos constatados estão relacionados com os ésteres de ácido graxo encontrados no óleo fixo de piquiá, que

possuem a capacidade de modular a resposta inflamatória aguda e crônica (XAVIER *et al*, 2011).

2.2 Dor, nociceção e via ascendente

Uma das funções mais importantes do nosso organismo é o fornecimento de informações necessárias para reação às ameaças. Dentre esses mecanismos, pode-se citar, por exemplo, a dor. A percepção da dor é um processo essencial e atua como sinal protetor, mas que, se exacerbado, transforma-se em uma doença dolorosa (VERMA *et al*, 2015). Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP), dor é definida como uma experiência emocional e sensorial desagradável associada a ameaças potenciais ou reais (KLAUMANN *et al*, 2008).

Tão importante quanto a dor, o termo “nociceção” tem origem do latim “nocere”, que significa “ferir”. A palavra se refere a um fenômeno sensorial psicológico e foi introduzida no século 20 por Sherrington (COUTAX *et al*, 2005). De fato, a nociceção está relacionada com o reconhecimento da dor pelo sistema nervoso central (SNC), porém sem envolvimento de componente emocional, que está incluído na subjetividade da dor. A nociceção, portanto, é empregada comumente para os animais, enquanto que a dor é melhor aplicada aos humanos (KLAUMANN *et al*, 2008).

O entendimento e compreensão a respeito da dor avançaram bastante nas últimas décadas. Técnicas moleculares e de imagens funcionais permitiram entender os mecanismos nociceptivos a nível celular, bem como o papel do córtex cerebral na percepção da dor (JOHNSON, 2016).

Com o início dos estudos, descobriu-se que nas terminações nervosas livres de neurônios sensoriais primários (neurônios de primeira ordem) existem os nociceptores, um tipo

de receptor sensorial especializado que é ativado após estímulo capaz de causar dano tecidual, iniciando assim o processo de percepção da dor (JULIUS e BASBAUM, 2001; KLAUMANN *et al*, 2008). A relação entre as propriedades dos nociceptores e a percepção da dor se mostrou válida mediante várias abordagens experimentais durante mais de um século de pesquisas, porém, evidências também apontam que esses receptores podem ser ativados na ausência de percepção da dor (BALIKI e APKARIAN, 2015).

Os nociceptores são componentes heterogêneos e podem ser classificados de diversas formas, observando algumas características como a mielinização, conteúdo peptidérgico, expressão de canais de sódio voltagem dependente e expressão de moléculas transdutoras. Além disso, tipos diferentes de nociceptores determinam modalidades nociceptivas distintas, como dores mecânicas ou térmicas; e também subtipos de nociceptores contribuem para estados diferentes na dor crônica, como a dor neuropática ou inflamatória. Conhecer tais particularidades na transmissão da dor e diferenciá-las pode propiciar uma terapia estratégica no tratamento clínico (CARR e ZACHARIOU, 2014).

Quando são ativados, os nociceptores liberam o glutamato como neurotransmissor primário, mas outras substâncias excitatórias também são liberadas como a substância P, fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e a somatostatina. Todos esses componentes são importantes tanto na sinalização sináptica central quanto na sinalização eferente cutânea (DUBIN e PATAPOUTIAN, 2010; KWON *et al*, 2014).

A função dos nociceptores é captar as informações advindas da periferia, quando um agente lesivo interrompe a integridade tecidual, e transmiti-las por meio de sinapses químicas e consequente liberação de neurotransmissor para os próximos neurônios. Para que isso ocorra, a atividade elétrica neuronal dispara potenciais de ação que levam a uma mudança do potencial de membrana do nociceptor denominada de potencial de receptor (FEIN, 2011).

Esses eventos que geram a transdução do sinal podem ser decorrentes basicamente de três tipos de estímulos no tecido lesado. Nos estímulos próprios ocorre uma alteração conformacional da comporta de canais iônicos. Ou seja, o próprio efeito lesivo externo pode regular diretamente a abertura de canais iônicos, que geram os potenciais de ação necessários para a transdução do sinal. Uma outra forma de gerar o potencial receptor diz respeito a moléculas, antes contidas dentro de células, que são expostas ao meio extracelular após a lesão e se ligam nos receptores presentes nos nociceptores, o que resulta nos potenciais de ação. Finalmente, moléculas geradas por meio da resposta inflamatória do organismo ao agente lesivo são liberadas no foco reativo e se ligam aos seus receptores presentes na membrana do nociceptor (FEIN, 2011).

Portanto, o processo da nocicepção ocorre com a transmissão da sensação dolorosa captada pelos nociceptores na periferia e transmitida para a medula espinhal por meio de neurônios de primeira ordem (KLAUMANN *et al*, 2008; AICH *et al*, 2015). Os neurônios de primeira ordem são divididos em grupos, visando seu diâmetro, grau de mielinização e velocidade de condução do impulso nervoso. As fibras A β , A δ e C são as representantes desses componentes. Cada classe de fibra também pode ser subdividida em outros tipos (KLAUMANN *et al*, 2008).

As fibras A β possuem diâmetro de 10 a 12 μm com uma camada mielinizada de 2 a 5 μm . Viabilizam conduções rápidas em velocidade maior que 10 m/s. Esses neurônios são responsáveis pela captação de sensações inócuas mecânicas, como toque, propriocepção e vibrações. Um subconjunto de fibras A β engloba os mecanossensores de adaptação rápida, que respondem a estímulos mecânicos com limiar de 1 mN e compõem 10% dos neurônios. Nestes mecanossensores há combinações de canais iônicos responsáveis por hiperpolarizar rapidamente os neurônios, inibindo assim novas estimulações sensoriais. Os mecanoceutores de adaptação lenta são um outro subconjunto de fibras A β , representam 12% dos neurônios e

são responsáveis por estímulos com limiares de 1,5 mN para a despolarização (BARANIUK, 2012).

As fibras A δ apresentam diâmetro de 6 μ m com camada de mielina de 2 μ m. Conduzem impulsos a velocidade de 2 a 10 m/s. Entre essas fibras, encontram-se os mecanonociceptores A δ (12% dos neurônios) com função sensorial mecânica (<5 mN) e outro conjunto de fibras altamente mecanossensíveis, que apresentam limiar de ativação <0,5 mN e representam 6% desses neurônios (BARANIUK, 2012).

As fibras C são amielinizadas, possuem diâmetro de 1 a 5 μ m, o que desencadeia velocidades de condução menores que 1,5 m/s. Essas são as mais numerosas e representam cerca de 50% dos neurônios nervosos periféricos. As fibras C são divididas em quatro classes: nociceptores polimodais, o subconjunto C M/MH/MC/H, as fibras de baixo limiar do tipo C e os silenciados (DUBIN e PATAPOUTIAN, 2010).

Os nociceptores polimodais são 30% do total de fibras C e são ativados por pressão mecânica (10 mN), faixas diversas de temperaturas frias e quentes e substâncias químicas e inflamatórias endógenas. O subconjunto C M/MH/MC/H representa 20% dos neurônios e combinam nociceptores mecânico (M), mecânico e térmico (MH), mecânico e frio (MC) e apenas térmico (H). As fibras de baixo limiar do tipo C englobam 5% dos neurônios e são altamente sensíveis às pressões leves (<0,5 mN). As fibras C silenciadas representam 5% dos neurônios, são sensíveis ao calor e ativadas somente em coordenação com outros neurônios (DUBIN e PATAPOUTIAN, 2010). Normalmente estas fibras não são excitadas, mas condições inflamatórias as recrutam para desenvolver sua função na dor nociceptiva (RAHMAN e DICKENSON, 2013).

Os principais nociceptores são as terminações nervosas provenientes das fibras aferentes A δ e C, ambas de pequeno diâmetro, e que podem ser ativados mediante estímulo mecânico, químico ou térmico (CORTELLI *et al*, 2013). Sendo assim, as fibras A δ e C são responsáveis

por transmitir a informação nociceptiva, enquanto que as fibras A β somente transmitem informações referentes a estímulos inócuos (KLAUMANN *et al*, 2008). As fibras A δ e C inervam todos os tecidos do corpo humano e ligam-se principalmente à lâmina I (camada mais superficial do corno dorsal espinal e trigêmeo) e à lâmina V (CORTELLI *et al*, 2013). Assim, a informação é levada ao tálamo por meio de neurônios secundários ou de segunda ordem presentes na medula espinal, que ascendem ao longo da sua extensão. Finalmente, os neurônios de terceira ordem projetam-se para o córtex cerebral e outras partes do cérebro (KLAUMANN *et al*, 2008; AICH *et al*, 2015).

Várias regiões cerebrais que recebem o potencial de ação dos neurônios de terceira ordem são ativadas. Entre elas estão o córtex somatossensorial, o córtex parieto-insular, o córtex cingulado anterior (FRIAS e MERIGHI, 2016), o córtex pré-frontal, a ínsula, a amígdala, o tálamo, o cerebelo e o circuito de recompensa mesolímbico, que incluem o *nucleus accumbens* e a área tegmental ventral (OSSIPOV *et al*, 2014).

Além das outras funções já conhecidas, acredita-se que o córtex somatossensorial e a ínsula possuem função de ler e traduzir as características sensoriais da dor, como por exemplo a natureza (picada ou queimação), a duração e o local acometido. Já as regiões do sistema límbico e pré-frontal codificam as características emocionais e motivacionais da resposta e estão relacionadas com as questões afetivas e emocionais da dor (OSSIPOV *et al*, 2014).

2.3 Controle medular e via descendente da dor

O conhecimento a respeito da natureza e modulação da dor sempre foi alvo de estudos e controvérsias, porém, foi no século 19 que a chamada “Teoria de Controle da Comporta”, proposta por Melzack e Wall em 1965, revolucionou o entendimento e manejo da dor (KATZ e ROSENBLOOM, 2015).

A Teoria da Comporta propôs que a substância gelatinosa do corno dorsal da medula espinhal atuasse como um mecanismo de portão em que ocorre o aumento ou diminuição dos impulsos nociceptivos provenientes das fibras periféricas, antes que esses impulsos cheguem às células centrais de transmissão, responsáveis pela percepção e reação à dor. Portanto, se uma quantidade maior de informação passar pelo portão de forma exacerbada, a mesma será lida, interpretada e transformada em dor (MELZACK e WALL, 1965).

Melzack e Wall (1965) também determinaram a participação das fibras aferentes nesse processo. Sendo assim, as fibras de maior calibre ativam a ação inibitória da substância gelatinosa sobre as células centrais de transmissão, impedindo assim o processo nociceptivo. Por outro lado, as fibras de menor calibre desencadeiam o efeito contrário, o que leva a facilitação da transmissão nociceptiva.

Atualmente, sabe-se que as respostas ao sinal nociceptivo ocorrem em diversas partes do SNC, direta ou indiretamente. O complexo nuclear da amígdala, por exemplo, pode desencadear respostas autônomas, motoras e endócrinas, incluindo também o medo condicionado na percepção à dor, por meio de sua interação com outras estruturas, tais como o hipotálamo, tronco e o núcleo de leito da *stria terminalis*. Por sua vez, as áreas posterior e lateral do hipotálamo são importantes na integração das respostas autonômicas e endócrinas que levam à homeostasia e adaptação aos estímulos internos e externos (CORTELLI *et al*, 2013).

Mais compartimentos também influenciam nestes processos, como o córtex pré-frontal, córtex cingulado anterior, córtex insular, pontes dorsolaterais, entre outros (KWON *et al*, 2014). Algumas doenças crônicas dolorosas estão relacionadas com a alteração no controle endógeno da dor em algum desses sítios reguladores, alterando assim a sua percepção (HEMINGTON e COULOMBE, 2015).

O tronco encefálico é uma estrutura anatômica que se destaca por possuir regiões importantes na modulação descendente da dor, que regulam e controlam a mesma ao nível da

medula espinhal. Entre essas regiões podemos citar a substância cinzenta periaquedutal (PAG), a medula ventromedial rostral (RMV), a porção mais lateral e caudal do núcleo reticular dorsal e a medula ventrolateral (LIU *et al*, 2014).

A modulação descendente da dor se refere à ação em que vias descendentes originadas do tronco encefálico modulam a transmissão nociceptiva ascendente na medula espinhal (CHAKIATH *et al*, 2015). Uma das vias mais conhecidas é a via descendente inibitória PAG-RMV-medula espinhal, que se inicia na PAG e se projeta até o corno dorsal da medula espinhal por meio da RVM, culminando na inibição da transmissão nociceptiva ascendente (LAU e VAUGHAN, 2014). As projeções descendentes iniciadas na PAG, e que chegam até o corno da medula espinhal, ocorrem mediante conexões excitatórias com neurônios noradrenérgicos e serotoninérgicos. Em seguida, conexões inibitórias ocorrem com neurônios das lâminas I, II e V, diminuindo a transmissão de impulsos dolorosos na medula espinhal, e dessa forma, a dor (KLAUMANN *et al*, 2008).

A RMV é formada pelo núcleo magno da rafe (NRM), núcleo reticular gigantocelular (NGC), núcleo reticular gigantocelular-para alfa e núcleo reticular paragigantocelular (OSSIPOV *et al*, 2010; OSSIPOV *et al*, 2014). Foi demonstrado que o NRM e o NGC possuem uma importante modulação descendente da dor, pois a lesão química seletiva do NRM produziu uma hiperalgesia térmica e o dano neurotóxico ao NGC produziu efeito contrário, atenuando a hiperalgesia (WEI *et al*, 1999).

A compreensão sobre a via descendente inibitória PAG-RMV-medula espinhal se fundamentou no estudo do papel do NRM. Inicialmente, sabia-se que a PAG não se projetava diretamente para a medula espinhal, mas que se projetava para o NRM. Além disso, a estimulação do NRM produzia analgesia e achava-se que este componente do SNC possuía neurônios que se projetavam para a medula espinhal (BASBAUM *et al*, 1976).

Fora então demonstrado, pela primeira vez, que a analgesia e a inibição da dor a nível da medula espinhal, resultante da ação de opioides e da estimulação da PAG, eram mediadas pelo NRM. Sendo assim, o controle descendente endógeno da dor inicia-se na PAG, projeta-se para o NRM e chega até o corno dorsal da medula (BASBAUM *et al*, 1976). Mais tarde, descobriu-se que a RMV, uma vez ativada pelas projeções advindas da PAG, libera serotonina, que faz conexões com os interneurônios inibitórios do corno dorsal da medula. Os interneurônios inibitórios, por sua vez, liberam peptídeos opioides endógenos, principalmente a encefalina, para dentro do corno dorsal da medula, de modo a inibir a transmissão sináptica dos impulsos nociceptivos para os neurônios de segunda ordem (WATKINS e MAYER, 1982; FIELDS e BASBAUM, 1999).

Portanto, este circuito modulador inibitório bloqueia os neurônios nociceptivos ascendentes na medula espinhal em uma ação direta por inibição de interneurônios excitatórios ou estimulação de interneurônios inibitórios. Estas projeções descendentes também promovem sinapses com terminais de neurônios aferentes primários, de modo a diminuir a liberação de glutamato, principal neurotransmissor excitatório (KLAUMANN *et al*, 2008).

A PAG é tida como o centro da modulação descendente da dor, sendo importante para a analgesia produzida pela morfina. A estimulação elétrica dessa região resultou na inibição de resposta ao estímulo nocivo em ratos (REYNOLDS, 1969). Quando a PAG integra informações nociceptivas advindas do SNC superior (hipotálamo, amígdala e córtex insular) e das regiões periféricas, a mesma projeta-se para a RMV, de onde vias descendentes se projetam para a medula espinhal por meio do funículo dorsolateral (KWON *et al*, 2014; TOMIM *et al*, 2016).

Além da RMV, a PAG também utiliza o tegmento pontino dorsolateral para que ocorra a modulação da dor, porém, essa estrutura não se projeta diretamente para o corno dorsal da medula espinhal (KWON *et al*, 2014). A RMV pode receber projeções do tálamo, do *locus coeruleus* noradrenérgico e da região parabraquial, e é considerada a estrutura final comum na

modulação descendente da dor, recebendo informações das diversas regiões do SNC e projetando-as tanto para o corno dorsal da medula espinal quanto para a região *nucleus caudalis* trigeminal (OSSIPOV *et al*, 2014).

O *locus coeruleus* compreende as principais projeções noradrenérgicas descendentes. Os neurônios presentes nessa região expressam predominantemente receptores de orexina do tipo 1 (OX1R) e recebem inervações dos neurônios de orexina, que é um peptídeo derivado da pré-pró-orexina. A administração central de orexina resultou em redução da resposta nociceptiva em ratos submetidos a modelo de dor visceral, térmica e inflamatória. Da mesma forma, a PAG é inervada por neurônios produtores de orexina e a presença de OX1R na mesma indica esse mecanismo de antinocicepção (INUTSUKA *et al*, 2016).

As divisões da PAG são as regiões dorsomedial (dmPAG), dorsolateral (dlPAG), lateral (lPAG) e ventrolateral (vlPAG). A dmPAG recebe projeções advindas do núcleo da amígdala central. Os nervos aferentes do córtex pré-frontal medial e da amígdala basolateral se projetam para a dlPAG. Já a lPAG recebe projeções do córtex dorsomedial, córtex cingulado e da amígdala basolateral, enquanto que a vlPAG recebe das regiões do córtex orbital e também da amígdala basolateral (LINNMAN *et al*, 2012).

Além da modulação da dor, todas essas regiões estão envolvidas em processos como ansiedade, comportamento reprodutivo, medo, vocalização e função cardiovascular. A lPAG e a dlPAG estão relacionadas com a analgesia não-opioide. A vlPAG está envolvida com a analgesia opioide (LINNMAN *et al*, 2012). De fato, a PAG e a RVM são os maiores alvos da ação de opioides e canabinoides, substâncias que exercem efeito analgésico (LAU e VAUGHAN, 2014).

Os receptores canabinoides do tipo 1 (CB₁) estão presentes na PAG e estudos demonstram efeitos no alívio da dor decorrentes da ativação desses receptores (CHIOU *et al*, 2013), tendo sido esse efeito anulado com a utilização de um antagonista do receptor CB₁

(VANEGAS, 2013). Ademais, já foi demonstrado que a microinjeção de opioides na PAG desencadeia analgesia, possuindo seu efeito revertido pela naloxona, antagonista não-específico dos receptores opioides (OSSIPOV *et al*, 2014).

Uma vez que a projeção advinda da PAG alcance a RVM, esta, então, pode executar um controle bidirecional no processamento nociceptivo espinhal da medula por meio de dois tipos celulares: as células *OFF* e células *ON* (CRISTINO *et al*, 2016). Estas células são neurônios que executam o equilíbrio da estimulação e inibição nociceptiva. As células *OFF* são ativadas por opioides e inibidas por estímulo nocivo, sendo responsáveis por inibir a transmissão de impulsos dolorosos na medula espinhal. As células *ON*, que são ativadas por estímulo nocivo e inibidas por opioides, produzem respostas nociceptivas e promovem a facilitação da dor (KWON *et al*, 2014).

2.4 Sistema opioidérgico

Existem registros antigos de que o ópio já era utilizado por diversos povos, como os chineses, árabes, assírios, egípcios, sumérios, gregos e romanos, tanto de forma recreativa quanto medicinal. Conhecer os componentes químicos das diferentes substâncias que compõe o ópio, bem como o mecanismo de ação e os receptores endógenos, foi possível com o avanço da ciência, e hoje, o sistema opioidérgico se define como uma importante parte da farmacologia em que a pesquisa avança e contribui com novas aplicações (MARTINS *et al*, 2012).

Opioides são importantes analgésicos utilizados clinicamente para a dor crônica e aguda, estando notavelmente entre os medicamentos que causam constantes quadros de dependência química (LEE e HO, 2013). Outros efeitos indesejáveis, além da dependência química, são náuseas, vômitos, constipação, tolerância, etc. Esforços têm sido realizados, de

modo a reduzir as desvantagens dos opioides e manter sua eficácia terapêutica (SHANG e FILIZOLA, 2015).

O termo “opiáceo” refere-se ao ligante do sistema opioidérgico que se obtém de fontes naturais, enquanto que “opioides” englobam tanto as substâncias naturais quanto as sintéticas (NASH e MEUCCI, 2014). O principal exemplo de opioides que podemos citar é a morfina, obtida a partir da *Papaver somniferum* (MATTOS, 2014). Outra planta que deu origem a um opioide é a *Salvia divinorum*, de onde se obtém um diterpeno denominado Salvinorina A, que possui efeito anti-inflamatório (SOBCZAK *et al*, 2014).

De modo a combater a dependência à morfina, posteriormente foi criada a heroína (diacilmorfina) por meio de acréscimo de dois grupos acetil à estrutura química. Quando surgiu, a heroína se consolidou como o primeiro opioide não vicioso para o tratamento da asma e tosse. Porém, mais tarde percebeu-se a grande dependência química associada ao seu uso, sendo por fim proibida, juntamente com o ópio (MERRER *et al*, 2009).

Além dos opioides, outras substâncias naturalmente produzidas pelo nosso organismo desempenham variadas funções na homeostasia da membrana celular, sistema imunológico, função gastrintestinal, neuromodulação e outras. Existem em torno de 10 opioides endógenos, que diferem entre si a respeito da afinidade e especificidade para os seus receptores. Os três principais tipos de opioides endógenos, também chamados de peptídeos opioides, são as encefalinas, as dinorfinas e endorfinas (NASH e MEUCCI, 2014).

Juntamente com os principais opioides endógenos, as endomorfina, soymorfina e a casoxina 4 também fazem parte desse grupo de compostos (SOBCZAK *et al*, 2014). Os peptídeos opioides endógenos, bem como seus receptores, são amplamente expressos ao longo de todo o SNC, principalmente nas áreas relacionadas com a motivação, o estresse e o aprendizado (BEFORT, 2015).

O sistema opioidérgico é um dos principais complexos envolvidos nos mecanismos de evolução, como a percepção e modulação da dor, o sistema de recompensa, o vício e o comportamento de medo, entre outros (LESNIAK e LIPKOWSKI, 2011). De fato, o sistema opioidérgico pode atuar em diferentes tipos de estresse, seja emocional, físico ou metabólico, promovendo uma resposta de adaptação em um órgão específico ou sistema (HEADRICK *et al*, 2015). A função de regulação do sistema se comporta como uma importante chave para várias situações psicológicas (BEFORT, 2015).

As diferentes respostas observadas com a administração de morfina e cetociclazocina em um modelo animal levaram à conclusão de que existiriam receptores específicos para cada opioide (STEVENS, 2009). Os receptores opioides, aos quais os opioides se ligam para realizar seus efeitos, foram demonstrados no corpo humano pela primeira vez em 1973, e estão abundantes ao longo de todo o SNC e nos tecidos periféricos (NOBLE *et al*, 2015). Estão presentes principalmente nas regiões subcorticais do cérebro, como o tálamo, a PAG e o *locus coeruleus*, no corno dorsal espinhal, como nas lâminas I e II e também nas fibras aferentes pré-sinápticas, interneurônios e neurônios de projeção pós-sinápticos (TRANG *et al*, 2015). Esses receptores fazem parte da família de receptores acoplados à proteína G e são divididos em clássicos e não clássicos. Os receptores clássicos e majoritários são os receptores opioides μ , κ e δ (NINKOVIĆ e ROY, 2013).

A nomeação dos receptores opioides ocorreu em razão da letra grega correspondente inicial das substâncias que foram capazes de ativá-los. Sendo assim, μ (*mu*) para a morfina e κ (*kappa*) para a cetociclazocina (em inglês “ketocyclazocine”). Já o receptor δ (*delta*) teve essa nomeação devido à utilização de camundongo *vas deferens* durante a sua descoberta (LAW *et al*, 2013).

Estruturalmente, os receptores opioides são proteínas de membrana integrais acopladas às proteínas $G_{i/o}$ heterotriméricas. Eles possuem dez domínios transmembranares, sendo sete

deles hidrofóbicos (TM I–VII) e três hidrofílicos (i1–13). Compostos também por três laços extracelulares (e1–e3), um terminal carboxil e outro de amina glicosilada. A região i3 possui sequência idêntica de 20 a 23 aminoácidos entre os três receptores. Já a região terminal carboxila é formada por 59, 51 e 47 aminoácidos para os receptores μ , δ e κ , respectivamente; essa região também possui sequência idêntica de 10 a 12 aminoácidos entre os receptores (SOBCZAK *et al*, 2014).

O receptor δ , o primeiro a ser clonado, é ativado pela deltorfina e pelo SIOM (uma substância derivada da naltrexona), e possui como antagonista o naltrindol, também derivado da naltrexona. O primeiro agonista identificado para o receptor κ foi a cetociclazocina, porém é antagonizado potencialmente pela nor-binaltorfimina. Da mesma forma, a morfina é reconhecida como o primeiro agonista do receptor μ , que possui como antagonista a naloxona (MARTINS *et al*, 2012). A naloxona, na verdade, é um antagonista não-específico para os três tipos de receptores, porém possui maior afinidade para o receptor μ (SUBIRÁN *et al*, 2011). No entanto, o cloccinamox é o antagonista específico irreversível para os receptores μ (PEREIRA *et al*, 2004).

Os receptores opioides μ foram encontrados em maior quantidade no cerebelo, núcleo caudado e núcleo *accumbens*, estando mais relacionados com as funções de nocicepção, ciclo respiratório e trânsito intestinal. Os receptores opioides δ estão mais concentrados no hipocampo, córtex cerebral, putâmen, núcleo caudado, núcleo *accumbens* e lobo temporal; cabem a eles a função de analgesia, funções cognitivas e dependência física. Já os receptores opioides κ são mais presentes no núcleo caudado, núcleo *accumbens*, núcleo hipotalâmico e putâmen, regulando as funções de nocicepção, termorregulação, diurese e secreção endócrina (MARTINS *et al*, 2012; SOBCZAK *et al*, 2014).

Os receptores não clássicos foram frutos de décadas de estudo e entre eles está o receptor do tipo opioide 1 (ORL-1, do inglês “opioid receptor like-1), único clonado desta classe. Este

receptor, também chamado de receptor orfanina 1 ou nociceptina, é bastante homólogo aos receptores opioides clássicos (SUBIRÁN *et al*, 2011; NINKOVIĆ e ROY, 2013). Diferentemente dos outros receptores clássicos, o ORL-1 é insensível ao antagonismo da naloxona, porém ele é ativado pela nociceptina ou orfanina FQ, um peptídeo opioide endógeno originado a partir da pró-nociceptina (BERRENDERO *et al*, 2010; SUBIRÁN *et al*, 2011; TRANG *et al*, 2015). Outro receptor que apresenta evidência de ser ligado pelos opioides é o receptor do tipo *toll* 4, um importante componente do sistema imunológico inato (TRANG *et al*, 2015).

Inicialmente, o receptor σ (*sigma*) foi descrito como receptor opioide, mas estudos de sua estrutura mudaram tal classificação. Outros receptores foram ditos opioides com base no perfil farmacológico, como os receptores ϵ (*épsilon*), ζ (*zeta*) e λ (*lambda*), porém não partilham nenhuma de outras características dos receptores clássicos e até hoje foram pouco caracterizados. A priori, apenas 4 receptores foram clonados, porém, evidências apontaram que variações de subtipos também ocorressem entre os receptores opioides (NINKOVIĆ e ROY, 2013).

Os subtipos de receptores são μ_{1-3} , κ_{1-3} e δ_{1-2} . Os diferentes subtipos explicariam as diferentes afinidades e especificidades para os agonistas, bem como efeitos farmacológicos. Por exemplo, o receptor μ_1 é responsável pela ação antinociceptiva, enquanto o receptor μ_2 causa depressão respiratória quando ativado. O conhecimento a respeito dos subtipos levou ao refinamento da busca por drogas mais específicas e com menos efeitos adversos (LAW *et al*, 2013).

A ativação dos receptores opioides desencadeia a dissociação da proteína G em suas subunidades, o que causa ações celulares. A subunidade $G\alpha$ inibitória inibe a adenilato ciclase, não havendo assim a produção de adenosina 3'5'-monofosfato cíclico (AMPC) necessário para a fosforilação de proteínas, via ativação de quinases, e abertura de canais para Ca^{2+} controlados

por voltagem. Já a subunidade $G\beta\gamma$ inibe os canais para Ca^{2+} controlados por voltagem e abre os canais retificadores para K^+ associados à proteína G. O impedimento do influxo de íons cálcio e o efluxo de íons potássio causam hiperpolarização da membrana, diminuindo a excitabilidade neuronal e a liberação de neurotransmissores (RANG e DALE, 2012; SOBCZAK *et al*, 2014).

Após a atuação dos agonistas, os receptores opioides δ são internalizados e lisossomas os degradam, de modo a dessensibilizar a célula para uma nova ativação. Os receptores opioides μ , porém, não são digeridos por lisossomas; antes, eles são internalizados e então reciclados para a superfície da célula (KLENOWSKI *et al*, 2015).

Com relação aos peptídeos endógenos, as dinorfinas são originadas a partir de pró-dinorfina e ligam-se especificamente ao receptor κ . Já as endorfinas derivam da pró-opiomelanocortina (POMC) e possuem maior afinidade pelos receptores μ que pelos receptores δ e reduzida afinidade por receptores κ (FONT *et al*, 2013). A POMC também é capaz de originar outras moléculas como o hormônio corticotrófico, melanotropinas α e β e as lipotropinas α , β e γ (SUBIRÁN *et al*, 2011). Entre as dinorfinas, estão as dinorfinas A e B e as neomorfinas α e β . As principais endorfinas são as endorfinas α e β (SOBCZAK *et al*, 2014).

As encefalinas produzidas a partir de pró-encefalina são a $[Leu^5]$ encefalina, $[Met^5]$ encefalina, $[Met^5]$ encefalina-Arg⁶-Gly⁷-Leu⁸ e $[Met^5]$ encefalina-Arg⁶-Phe⁷. Essas substâncias são pequenos peptídeos produzidos na hipófise, glândulas adrenais, pâncreas e também são encontradas nas células endócrinas do intestino e em leucócitos. A $[Leu^5]$ encefalina e a $[Met^5]$ encefalina são as duas principais representantes desse grupo e, mesmo apresentando potente afinidade pelos receptores opioides δ , também demonstram alguma afinidade pelo receptor μ . Baseando-se na estrutura das encefalinas, foi sintetizado um agonista do receptor μ denominado DAMGO. Este sintético demonstrou maior potência que a

morfina na redução da dor visceral em modelo animal (SOBCZAK *et al*, 2014; AL-KHRASANI *et al*, 2012).

As endomorfinais principais são a endomorfina-1 e a endomorfina-2. São tetrapeptídeos isolados do cérebro humano e seu precursor é desconhecido. Possuem a maior afinidade pelos receptores opioides μ dentre todos os opioides endógenos. As soymorfinais 5, 6 e 7 possuem como precursor a β -conglucina e são agonistas do receptor μ . A casoxina 4 foi isolada da fração de κ -caseína do leite bovino e se comporta como um antagonista do receptor μ , revertendo a ação da morfina de inibir a contração intestinal induzida eletricamente em modelos animais (SOBCZAK *et al*, 2014).

2.5 Mecanismos celulares e moleculares da inflamação na dor

O estudo acerca da inflamação data desde os tempos remotos, visto que se trata de uma das reações fisiológicas protetoras mais importantes do organismo. Inicialmente, Hipócrates demonstrou os primeiros sinais da inflamação, que posteriormente foram articulados por Celsius. Estes eram o rubor (*rubor*), calor (*calor*), dor (*dolor*) e edema (*tumor*). O quinto sinal, perda da função (*functio laesa*), foi proposto por Galeno. Depois de muito tempo, no século 19, a acidose foi demonstrada como mais um sinal inflamatório (KUPRASH e NEDOSPASOV, 2016).

A dor funciona como um sinal precoce de alerta que é iniciado após a ação de algum estímulo nocivo e potencialmente perigoso, de modo a evitar o dano tecidual no local acometido. Este processo inicial é denominado dor nociceptiva ou neurogênica e ocorre por meio da ativação dos nociceptores periféricos. Porém, quando há o aumento da sensibilidade desse sistema nociceptivo inicial, mediante a interrupção da integridade do tecido por trauma,

toxinas, respostas imunes inadequadas, calor, infecção ou outros fatores, desenvolve-se a chamada dor inflamatória (CHEN *et al*, 2013).

Há uma grande evidência da interação entre o sistema imune e os neurônios nociceptivos na regulação da inflamação e da dor aguda ou crônica. As células imunes presentes nos terminais dos nervos periféricos e na medula espinhal liberam mediadores que controlam a sensibilidade mecânica e térmica. Por outro lado, os nociceptores liberam neuropeptídeos e neurotransmissores nos terminais nervosos que modulam as respostas vasculares, inatas e adaptativa das células imunes (PINHO-RIBEIRO *et al*, 2017).

Após a injúria local do tecido, células danificadas ou estressadas liberam mediadores inflamatórios (MOMIN e MCNAUGHTON, 2009). Bradicina, prostaglandinas, serotonina, fator de crescimento neural (NGF), proteína quimiotática de monócitos 1 (MCP-1) e citocinas como a interleucina (IL)-1 β , IL-6 e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) são exemplos desses agentes inflamatórios que sensibilizam e ativam os nociceptores periféricos, desencadeando a dor inflamatória. Essas substâncias são acumuladas no tecido danificado, o que pode causar rubor, calor e edema, além de uma dor espontânea e uma região sensível (RAHMAN e DICKENSON, 2013; LIM *et al*, 2015).

Outros componentes que também podem causar a sensibilização de neurônios sensoriais, ou seja, a diminuição do seu limiar para ativação, são os tromboxanos, leucotrienos, fator de ativação plaquetária, prótons H⁺, K⁺, NO e purinas e seus derivados como a adenosina e a adenosina trifosfato (MOMIN e MCNAUGHTON, 2009; SERHAN *et al*, 2011; VERMA *et al*, 2015).

Os mediadores inflamatórios liberados pelas células imunes se ligam a canais iônicos expressos nos terminais nervosos nociceptivos, como o receptor de potencial transitório vanilóide do tipo 1 (TRPV1), receptor de potencial transitório relacionado a proteína anquirina do tipo 1 (TRPA1) e canais para sódio dependentes de voltagem Nav1.7, Nav1.8 e Nav1.9, de

modo a processar e traduzir o estímulo nocivo em dor por meio da geração de potenciais de ação (PINHO-RIBEIRO *et al*, 2017). O TRPV1 e TRPA1 são considerados os principais agentes nos mecanismos nociceptivos inflamatórios, pois podem ser ativados por numerosos mediadores inflamatórios, inclusive influenciando indiretamente na liberação dos mesmos (FISCHER *et al*, 2017).

Na dor neurogênica ocorre a ação de alguns neuropeptídios, como a substância P, somatostatina, CGRP, galanina, polipeptídeo intestinal vasoativo e BDNF. Essas substâncias são liberadas pelos nervos periféricos em suas terminações sensoriais, após a ativação de canais iônicos por mediadores inflamatórios, e propiciam a vasodilatação, migração e recrutamento de macrófagos e polimorfonucleares, extravasamento de plasma e a degranulação de mastócitos, agravando assim a injúria tecidual e, conseqüentemente, a inflamação (KWON *et al*, 2014; VERMA *et al*, 2015).

Um exemplo de sinalização mecânica na dor neurogênica é constatado quando há a liberação de substância P mediante a ativação de canais TRPA1 presentes em fibras C. Em seguida, a substância P medeia uma resposta neuroimune por meio da ativação de receptores de neurocinina 1 (NK1) presentes em mastócitos, o que resulta na sua degranulação, bem como na liberação de histamina e serotonina em seguida (FISCHER *et al*, 2017).

A ação dos mediadores inflamatórios sobre os neurônios aferentes de primeira ordem sensibiliza-os de tal forma que ocorre uma diminuição do limiar da dor, além de uma maior responsividade aos estímulos nocivos e disparos neuronais espontâneos (RAHMAN e DICKENSON, 2013). Em condições patológicas, essas respostas exacerbadas do sinal nociceptivo podem levar ao fenômeno de hiperalgesia, em que há uma sensibilidade da dor maior que o normal, ou alodinia, quando ocorre dor a partir de estímulos normalmente não nocivos. Ambos os cenários são a base de doenças crônicas dolorosas, como a artrite (LINLEY *et al*, 2010).

Todos esses processos e outros componentes presentes na resposta inflamatória à dor ocorrem de forma dinâmica, complexa e multimedida, para que eventos bioquímicos e celulares restaurem a normalidade e contenham o desequilíbrio causado pela injúria celular (CARVALHO e LEMÔNICA, 1998; LIM *et al*, 2015). Diante disso, fica claro como essas interações periféricas e centrais retêm um papel chave na detecção, prevenção e reparo do dano tecidual, restaurando assim a homeostase. Qualquer desregulação nesse dinâmico controle pode desencadear a base de diversas doenças dolorosas e inflamatórias. Da mesma forma, é essencial desvendar em sua totalidade como todos esses fatores interagem e modulam as respostas nociceptivas, de modo a propiciar eficientes abordagens terapêuticas com novos mecanismos de ação e menos efeitos adversos envolvidos (PINHO-RIBEIRO *et al*, 2017).

Para a compreensão desse dinamismo, é necessária uma breve explanação de como alguns dos envolvidos nesse processo atuam em suas diferentes funções.

Citocinas

Expressas ao longo de todo o organismo humano, as citocinas são moléculas sinalizadoras e promotoras da dor inflamatória. Normalmente estão em baixas concentrações, porém, em ambientes de inflamação, sua concentração aumenta em até três ordens de grandeza (KRUSTEV *et al*, 2015). Esses pequenos polipeptídeos podem ser liberados por neurônios, células da microglia, monócitos, macrófagos, linfócitos T, linfócitos B e neutrófilos, após haver o recrutamento desses componentes para o sítio de lesão celular. As células não imunes também podem liberá-los, como as células endoteliais e os fibroblastos (KRUSTEV *et al*, 2015; BJURSTROM *et al*, 2016).

Muitas citocinas já foram descobertas e subdivididas de acordo com diferentes propriedades, mas as principais envolvidas em resposta à lesão periférica são as IL-1 β , IL-6,

IL-8 e TNF- α , cujas funções incluem a modulação e expressão de outras citocinas pró-inflamatórias, ativação de células gliais, disparo de cascatas moleculares e sensibilização de neurônios (BJURSTROM *et al*, 2016).

Cada citocina pode desencadear atribuições mais específicas. A IL-1 β , por exemplo, possui funções de ativação da micróglia, indução de liberação de substância P, regulação da expressão de NGF, aumento da excitabilidade dos neurônios do corno dorsal, aumento da atividade no receptor N-metil-D-aspartato (NMDA), aumento da transmissão glutamatérgica e diminuição das sinapses de transmissão inibitória. O TNF α , por sua vez, além de promover a sensibilização dos neurônios, induz as células gliais do corno dorsal a liberar IL-1 β e IL-6 e os astrócitos a liberar o MCP-1. (BJURSTROM *et al*, 2016). Juntamente com a IL-1, o TNF- α também pode fazer com que células endoteliais produzam selectinas para o processo de adesão celular (CARVALHO e LEMÔNICA, 1998).

As células microgliais no SNC podem liberar IL-12, EROs, NO, prostaglandinas e outras quimiocinas, além de IL-1 β e TNF- α , de modo a recrutar mais células para o foco inflamatório, aumentando a resposta. É interessante citar que também existe um mecanismo contrário que atua quando o estímulo nocivo é resolvido e a resposta inflamatória deve ser atenuada. Nesse caso, mediadores anti-inflamatórios são lançados, como a IL-10 e o fator de crescimento transformador beta, e ocorre o aumento da expressão de arginase-1. Esses compostos inibem a liberação de citocinas pró-inflamatórias, facilitando a regeneração tecidual e a recuperação homeostática (CARNIGLIA *et al*, 2017). A IL-10, em especial, atua inibindo o fator nuclear kappa B (NF- κ B), o que desfavorece a síntese de IL-1, IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF- α e interferon-gama (IFN- γ) (COBELLI *et al*, 2011; BJURSTROM *et al*, 2016).

Um outro exemplo desse balanço na resposta inflamatória pode ser visto nos linfócitos T. Enquanto os linfócitos Th1 possuem expressão aumentada de IL-2, TNF- α e IFN- γ durante o processo inflamatório, os linfócitos Th2 estão com as citocinas anti-inflamatórias IL-4, IL-10

e IL-13 diminuídas. Porém, na etapa de resolução da inflamação para o reparo tecidual e a homeostasia, os linfócitos Th2 expressam em maiores concentrações as IL-4, IL-10 e IL-13, inibindo assim a atuação de citocinas pró-inflamatórias (KULMATYCKI e JAMALI, 2007).

Prostaglandinas

As prostaglandinas E₂ (PGE₂) e I₂ (PGI₂) (prostaciclina), identificadas em 1972, são mediadoras inflamatórias importantes para o processo de sensibilização do nociceptor. Ambas atuam ativando receptores acoplados a proteína G nos neurônios sensoriais, de modo a aumentar a liberação de substância P e CGRP (PIOMELLI e SASSO, 2014). As ações da PGE₂ e PGI₂ são essenciais nas respostas vasculares da inflamação, e juntamente com as funções de adesão e quimiotaxia dos leucotrienos LTB₄, permitem a saída de monócitos e neutrófilos de vênulas, por meio da diapedese, em direção ao foco inflamatório (SERHAN, 2014).

A produção de prostaglandinas inicia quando citocinas pró-inflamatórias liberadas por células do sistema imune desencadeiam a quebra de fosfolípidos de membrana (KULMATYCKI e JAMALI, 2007). Esta ação nos fosfolípidos ocorre pela ação da fosfolipase A₂, o que resulta na produção de ácido araquidônico. Este, por sua vez, atua como substrato de cicloxigenases, lipoxigenases e epoxigenases, resultando em prostaglandinas, leucotrienos e ácidos epóxi-eicosatrienóicos, respectivamente (CHEN *et al*, 2013).

Cicloxigenase

As enzimas cicloxigenase 1 (COX-1) e COX-2 metabolizam o ácido araquidônico em prostaglandina H₂, um intermediário precursor de todas as prostaglandinas, a saber PGE₂, PGI₂, prostaglandina D₂, prostaglandina F₂ alfa (PGF_{2α}) e tromboxano A₂ (TXA₂). Esse ponto da

cascata inflamatória se mostrou como um importante alvo para a ação de AINES, pois uma vez que eles inibem a ação da cicloxigenase, ocorre a redução da sensibilização periférica e da dor inflamatória ao inibirem a síntese de prostaglandinas (CHEN *et al*, 2013; PIOMELLI e SASSO, 2014).

As citocinas e o NO influenciam na atuação da cicloxigenase, e conseqüentemente das prostaglandinas. Exemplo disso pode ser constatado por meio da IL-1, expressa em quantidades maiores em resposta a estímulo nocivo e invasivo (WUERTZ e HAGLUND, 2013). A IL-1 é um mediador que aumenta a transcrição de COX-2 e de PGE₂ (VERMA *et al*, 2015). Com relação ao NO, foi demonstrado que essa substância aumentou a expressão e ativação da COX-1 na fase aguda do teste da inflamação induzida por carragenina, enquanto que na fase tardia houve aumento da expressão da COX-2, o que levou à produção de PGE₂ e PGI₂ e ao agravamento da inflamação tecidual (TORIYABE *et al*, 2004).

Bradicinina

A bradicinina é um autacóide componente da família das cininas, importante na formação da dor inflamatória. Além do dano tecidual, ela está envolvida em outros processos como as reações alérgicas e infecções virais e bacterianas. Em todos estes, reações levam à formação de bradicinina que, por sua vez, estimula os nervos aferentes primários e sensibiliza os nociceptores. Os efeitos da bradicinina ocorrem por meio da ativação dos receptores B₁ e B₂, ambos metabotrópicos acoplados à proteína G, o que leva à vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e recrutamento de leucócitos (CAYLA *et al*, 2012; BUJALSKA-ZADROŽNY *et al*, 2013).

Os receptores B₂ estão presentes em todos os tipos de tecido, inclusive nociceptores, e desenvolvem a dor aguda quando ativados. Os receptores B₁ estão presentes nas terminações

nervosas dos neurônios aferentes primários, mas não estão abundantes em todos os tecidos como os receptores B₂. Em condições de inflamação, os receptores B₁ podem ter sua expressão induzida por influência de citocinas e outros mediadores inflamatórios e são responsáveis por aumentar os efeitos das prostaglandinas e citocinas (KAUFMAN *et al*, 2011; BUJALSKA-ZADROŻNY *et al*, 2013).

NGF

O NGF é produzido em diferentes tipos celulares, como os queratinócitos e as células epiteliais viscerais, porém, em condições inflamatórias, a sua expressão aumenta por parte dos macrófagos, mastócitos e células de Schwann. O papel do NGF e de seu receptor é crucial, visto que a sua ausência ou mutação em camundongos podem causar neuropatias sensoriais e simpáticas severas, como por exemplo a insensibilidade congênita parcial ou total a dor (BJURSTROM *et al*, 2016).

Quando liberado na periferia, o NGF atua como um mediador inflamatório algogênico. Porém, ele também modula indiretamente a dor central, efeito observado com a administração intratecal do NGF, o que causa dor e hiperalgesia térmica (BJURSTROM *et al*, 2016).

Uma vez liberado, os efeitos desencadeados pelo NGF ao se ligar no complexo receptor de tirosina quinase A/receptor neurotrófico p75 são resultantes de uma via de sinalização que aumenta a expressão de neuropeptídeos (como a calcitonina e a substância P), canais iônicos controlados por ligantes (como o TRPV1 e receptor B₂ de bradicinina) e canais iônicos controlados por voltagem (como Na_v 1.8 e Na_v 1.9). Ocorre também a sensibilização de nociceptores diretamente, e indiretamente por meio da ativação de macrófagos e mastócitos (BJURSTROM *et al*, 2016).

Adenosina

A adenosina é um nucleosídeo que parece deter um papel na regulação da inflamação periférica, pois já foi demonstrada a liberação dessa substância em respostas à administração de formalina e glutamato em animais nos modelos *in vivo*, sendo que os mastócitos não contribuíram com a sua liberação na inflamação induzida por formalina (HERSINI *et al*, 2014).

Nestes processos, houve a participação de receptores de glutamato, que desenvolveu o aumento da sensibilização e da nocicepção, e de receptores de capsaicina, que permitiu maior liberação de adenosina (HERSINI *et al*, 2014).

Proteínas quinases e AMPc

A estimulação dos nociceptores pode ser acentuada por meio da ativação de proteínas quinases, que também é propiciada pela sinalização de mediadores pró-inflamatórios. As principais enzimas envolvidas são a proteína quinase A (PKA), proteína quinase C (PKC) e proteína quinase ativada por mitógenos (MAPK) (LIM *et al*, 2015). Juntamente com essas quinases, o AMPc exerce um papel central na sensibilização de nociceptores mediante estímulo nocivo. O aumento de AMPc está relacionado com a ativação de PKA, bem como a PKC parece ser ativada por AMPc. A PKC ϵ , presente nos neurônios ganglionares da raiz dorsal, é a única isoforma translocada e ativada por efeito nocivo. Por exemplo, após a administração periférica de carragenina, a PKC ϵ contribui significativamente para uma hipernocicepção e sensibilização (VILLARREAL *et al*, 2009).

A atuação da PKC ocorre após a ligação da PGE₂, liberada decorrente do estímulo nocivo, ao seu receptor prostanoide EP₁. Uma vez estimulados, os receptores EP₁ ativam a fosfolipase C via proteína Gq, o que resulta na formação de trifosfato de inositol e diacilglicerol

(DAG). O DAG formado se liga ao seu sítio específico na molécula da PKC, ativando-a. A PKC, por sua vez, inicia a fosforilação de proteínas, o que abre os canais para Ca^{2+} controlados por voltagem, facilitando assim a despolarização celular e consequente transmissão do sinal nociceptivo inflamatório na hipernocicepção (CLAUDINO, 2006; RANG e DALE, 2012).

Substância P

A substância P, liberada pelos nervos aferentes primários na dor neurogênica, é produzida a partir do gene pré-protaquinina A e tem sua expressão regulada pela IL-6. Nos terminais centrais dos neurônios de primeira ordem, a substância P ativa receptores de neurocinina presentes nas lâminas I e II do corno dorsal da medula espinhal. Nos terminais periféricos, a substância P causa vasodilatação, proliferação linfocitária e secreção de citocinas por meio de células imunes (NAKAMURA *et al*, 2012; BJURSTROM *et al*, 2016). Esse processo de vasodilatação e consequente extravasamento de mediadores inflamatórios também ocorre devido à produção de NO, estimulada pela substância P, no vaso endotelial (CARVALHO e LEMÔNICA, 1998).

Nakamura *et al* (2012) utilizaram a técnica de radioimunoensaio a fim de demonstrar que a liberação de substância P ocorre por meio da ativação de TRPA1 por isotiocianato nos neurônios aferentes primários terminais e centrais, o que resulta em respostas inflamatórias e nociceptivas significativas. Por outro lado, as respostas inflamatórias mediadas por receptores NK1 (sítio de ligação da substância P) nos tecidos periféricos, que incluem edema e hiperalgesia térmica, ocorrem por meio da ativação de TRPA1. Nesse processo, a quantidade liberada de substância P é dependente de influxo de Ca^{2+} extracelular e da consequente fosforilação de MAPK p38.

BDNF

O BDNF é um neuropeptídeo liberado nas terminações nervosas dos neurônios aferentes primários durante o processo inflamatório (KWON *et al*, 2014). Faz parte da família dos fatores de crescimento neurais e inicialmente foi associado ao desenvolvimento e regeneração do sistema nervoso, porém, possui papel importante na modulação da transmissão sináptica da nocicepção. Na inflamação periférica, o BDNF está presente em altas concentrações, o que leva a uma hiperalgesia somática, que pode ser revertida com a administração de anticorpos anti-BDNF (YANG *et al*, 2010). Na sensibilização central, o BDNF aumenta a transmissão glutamatérgica por meio da fosforilação de receptores NMDA (BJURSTROM *et al*, 2016).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar as atividades farmacológicas antioxidante, antinociceptiva e anti-inflamatória de extratos de *Caryocar villosum* (piquiá).

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Obter extratos aquosos e orgânicos de diferentes frações a partir das cascas do fruto e de um *pool* de sementes e polpa da *Caryocar villosum*;
- ✓ Quantificar o teor de compostos fenólicos totais e flavonoides dos extratos obtidos;
- ✓ Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* dos extratos obtidos;
- ✓ Identificar as classes de compostos fitoquímicos e as substâncias isoladas presentes no extrato mais bioativo;
- ✓ Avaliar a influência do extrato mais bioativo na coordenação motora de camundongos;
- ✓ Avaliar a atividade antinociceptiva *in vivo* do extrato mais bioativo;
- ✓ Avaliar a atividade anti-inflamatória *in vivo* do extrato mais bioativo;
- ✓ Investigar a participação da via opioidérgica no mecanismo de ação antinociceptivo do extrato mais bioativo.

4. METODOLOGIA

Na Figura 2 encontra-se o fluxograma representando todo o delineamento experimental deste trabalho.

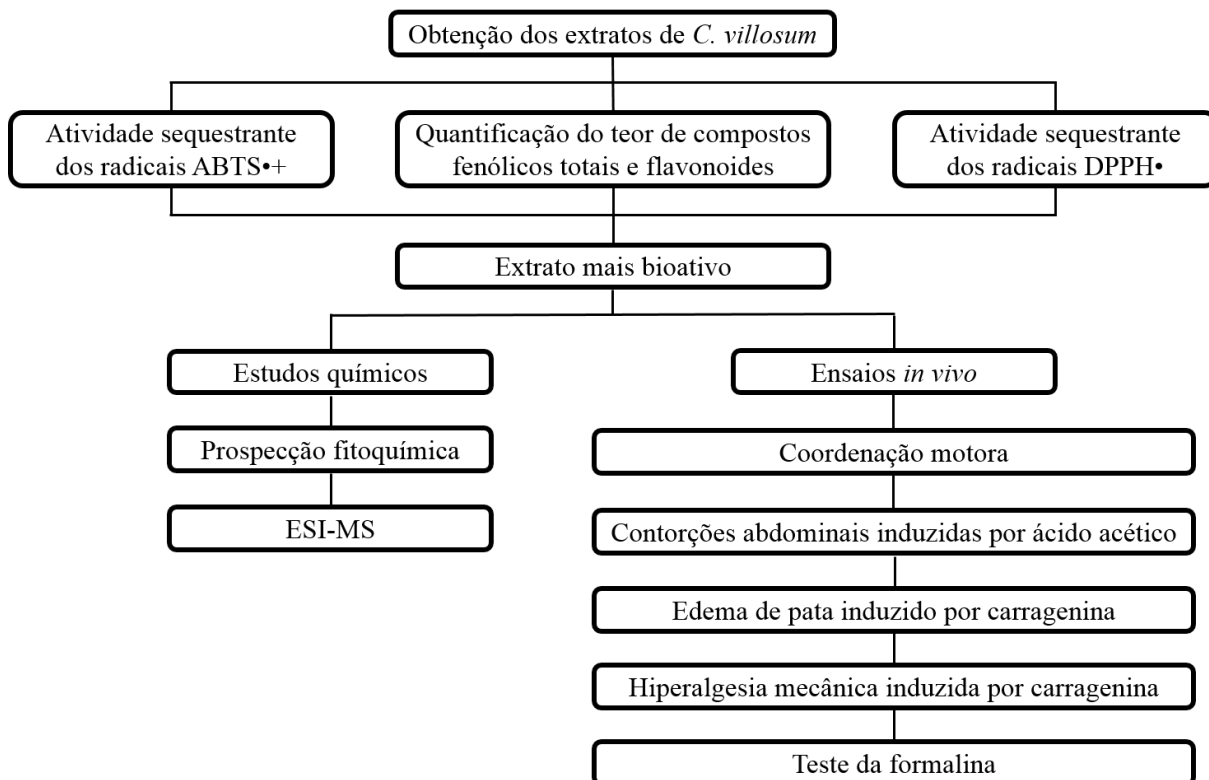


Figura 2 – Fluxograma das etapas metodológicas do presente trabalho. Após a obtenção dos extratos de *C. villosum*, os mesmos foram submetidos aos ensaios de quantificação de compostos fenólicos totais e flavonoides e atividade antioxidante. Após isso, o extrato mais bioativo prosseguiu nos estudos químicos e ensaios *in vivo* de avaliação de atividade antinociceptiva e anti-inflamatória.

4.1 Obtenção da matéria-prima vegetal

Para a execução do trabalho, foram utilizadas como matéria-prima vegetal as seguintes partes da *C. villosum*: 1) cascas do fruto e 2) *pool* de sementes e polpa (1:1). Esse material foi

cedido pelo banco de matérias-primas do Laboratório de Atividade Biológica Biophar da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas.

Os frutos da *C. villosum* foram coletados na reserva Reserva Ducke em fevereiro de 2012. O registro da espécie se encontra depositado no herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia sob o número de registro 73164 e a sua identificação ocorreu pela Dr.^a Raquel Medeiros.

Após a coleta dos frutos, suas cascas, sementes e polpas foram separadas. Então o material foi seco em forno de circulação de ar a 40 °C, triturado em moinho e armazenado em recipientes plásticos fora do alcance da luz.

4.2 Obtenção dos extratos

Para cada matéria-prima, foi realizada uma extração fracionada por sistema Soxhlet utilizando solventes de crescente polaridade na temperatura de 45 °C. Além da extração fracionada, também foram preparados, para cada matéria-prima, 2 extratos hidroetanólicos, sendo um seco por liofilização e o outro por *spray dryer*.

Ao todo foram produzidos dez extratos provenientes das cascas do fruto e do *pool* de sementes e polpa. No entanto, apenas um extrato, considerado o mais bioativo, prosseguiu nos estudos químicos e ensaios de atividade anti-inflamatória e antinociceptiva. Os critérios de seleção do extrato mais bioativo levaram em consideração o maior teor de compostos fenólicos totais e flavonoides e também os menores valores de CI_{50} nos ensaios de atividade antioxidante (radicais ABTS^{•+} e DPPH[•]). Portanto, antecipa-se a informação de que o extrato etanólico das cascas do fruto de *Caryocar villosum* – EECv (cascas) – foi eleito o extrato mais bioativo, de acordo com os critérios pré-estabelecidos no presente trabalho, o que posteriormente será discorrido na seção de resultados.

Na Tabela 1 estão presentes todos os extratos utilizados durante o trabalho com suas respectivas siglas.

Tabela 1: Extratos obtidos a partir das matérias-primas do piquiá

Cascas do fruto		<i>Pool</i> de sementes e polpa	
Extrato	Sigla	Extrato	Sigla
Hexânico	EHxCv (cascas)	Hexânico	EHxCv (<i>pool</i>)
Acetato de etila	EAcCv (cascas)	Acetato de etila	EAcCv (<i>pool</i>)
Etanólico	EECv (cascas)	Etanólico	EECv (<i>pool</i>)
Hidroetanólico seco por liofilização	EHCv (cascas/liofilização)	Hidroetanólico seco por liofilização	EHCv (<i>pool</i> /liofilização)
Hidroetanólico seco por <i>spray dryer</i>	EHCv (cascas/ <i>spray dryer</i>)	Hidroetanólico seco por <i>spray dryer</i>	EHCv (<i>pool/spray dryer</i>)

Fonte: Gutemberg Soares

4.2.1 Extração fracionada

A matéria-prima foi pesada e transferida para a corneta do Soxhlet previamente vedada no fundo com algodão e gazes. A quantidade a ser transferida respeitou o limite da altura do sifão, sem ultrapassagem. Portanto, foram transferidos 280 gramas de cascas do fruto e 142 gramas do *pool* de sementes e polpa. Em seguida, a extração ocorreu utilizando 500 mL de cada solvente, iniciando com o hexano, em seguida o acetato de etila e por fim, concluindo com o etanol. Para cada solvente, a extração ocorreu em 5 ciclos extrativos ou até que a cor do extrato se tornasse estável.

Finalizada a extração de cada fração, o extrato passou por processo de filtração à vácuo e foi seco por rotaevaporador a 45 °C. O produto resultante foi depositado em pote de vidro previamente pesado e deixado em capela com fluxo de ar até a secagem completa do extrato.

Terminado isso, foi feita a pesagem do pote com seu conteúdo para cálculo de rendimento e o extrato foi armazenado em geladeira até o início das próximas análises.

4.2.2 Extratos hidroetanólicos

O extrato foi preparado por maceração utilizando solução hidroetanólica 8:2 (etanol:água destilada) com a relação droga:solvente de 10% (p/v). Após pesagem da quantidade de matéria-prima necessária, esta, juntamente com a solução hidroetanólica, foram transferidas para Erlenmeyer.

Logo depois da homogeneização do conteúdo, o Erlenmeyer foi tampado e deixado em ambiente longe da luz por 72 horas. Sequencialmente, o conteúdo do Erlenmeyer foi submetido a processo de filtração a vácuo e o extrato filtrado foi levado ao rotaevaporador a 45 °C.

Nesse ponto, para obtenção de um extrato seco por liofilização e outro seco por *spray dryer* de cada matéria-prima seguiram-se procedimentos diferentes, os quais estão descritos a seguir.

4.2.2.1 Secagem por liofilização

Após a rotaevaporação, o extrato foi depositado em um recipiente de plástico e levado ao refrigerador para o seu congelamento. O extrato congelado passou por processo de secagem por liofilizador durante uma semana ou até que ocorresse a secagem total do mesmo. O produto resultante foi depositado em pote de vidro previamente pesado e foi feito pesagem do pote com seu conteúdo para cálculo de rendimento. O extrato foi armazenado em geladeira até o início das próximas análises.

4.2.2.2 Secagem por *spray dryer*

Após a rotaevaporação, o extrato foi colocado em recipiente de vidro adequado e submetido à secagem por *spray dryer* na temperatura de 85-90 °C durante 2 horas. O extrato seco foi coletado e transferido para um pote de vidro previamente pesado e foi feita pesagem do pote com seu conteúdo para cálculo de rendimento. O extrato foi armazenado em geladeira até o início das próximas análises.

4.3 Ensaio *in vitro*

4.3.1 Determinação de compostos fenólicos totais

Para determinação de compostos fenólicos totais, foi utilizado o método de Folin-Ciocalteu com modificações, conforme descrito por Ainsworth e Gillespie (2007). Os extratos foram dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO), de modo a alcançar a concentração de 1 mg/mL. Em cada cavidade da microplaca de 96 poços, foram adicionados 10 µL de cada extrato e 50 µL da solução de Folin 10%. A placa foi incubada em ambiente escuro durante 8 minutos. Para finalizar, foram adicionados 240 µL de carbonato de sódio em cada poço e uma nova incubação de 3 minutos ocorreu. No final, a absorvância da reação foi medida em leitor de microplaca à 620 nm. Como padrão foi utilizado o ácido gálico. Os ensaios foram feitos em triplicata e o cálculo da percentagem do teor de compostos fenólicos totais foi baseado na seguinte fórmula:

$$\% \text{ fenóis} = (\text{Absorvância da Amostra} / \text{Absorvância do Padrão}) * 100$$

4.3.2 Determinação de flavonoides

A metodologia empregada foi a utilizada por Chang *et al* (2002), com modificações. Inicialmente, 30 µL de cada extrato, concentração de 1 mg/mL previamente diluído em DMSO, foram adicionados em cada poço da placa. Em seguida, 90 µL de etanol também foram adicionados e ocorreu a primeira leitura em leitor de microplaca à 405 nm. Por fim, foram adicionados em cada poço 6 µL de cloreto de alumínio 10 %, 6 µL de acetato de potássio 1 M e 168 µL de etanol. Então, a placa foi incubada em ambiente escuro por 30 min, e em seguida, foi feita a segunda leitura da placa. Como padrão foi utilizada a quercetina. Os ensaios foram feitos em triplicata e o cálculo do teor de flavonoides foi baseado na seguinte fórmula:

$$\% \text{ flavonoides} = (\text{Absorbância da Amostra} / \text{Absorbância do Padrão}) * 100$$

4.3.3 Atividade antioxidante

4.3.3.1 Atividade sequestrante dos radicais ABTS•+

Para avaliação da atividade sequestrante do radical ABTS•+, foi utilizada a metodologia descrita por Santos *et al* (2014), com modificações. Inicialmente, o sal de ABTS foi diluído em água Milli-Q® de modo a alcançar a concentração de 2 mg/mL. Esta solução foi oxidada sob agitação durante 4 horas com persulfato de potássio a 5 mM em ambiente longe da luz. Em cada poço da microplaca foram adicionados primeiramente 30 µL do extrato na concentração de 1 mg/mL, e em seguida 270 µL do radical ABTS•+. A placa foi incubada em ambiente escuro durante 15 minutos e foi processada posteriormente em leitor de microplaca à 630 nm. O ácido

gálico foi tido como o padrão e como controle negativo foi usado o DMSO. Os ensaios foram feitos em triplicata e a percentagem de inibição foi calculada segundo a fórmula:

$$\% \text{ inibição} = 100 - (\text{Absorbância da Amostra} / \text{média absorbância do Padrão}) * 100$$

Inicialmente, o ensaio ocorreu com a concentração do extrato em cada poço sendo 100 µg/mL. Porém, para se obter uma curva de inibição, os extratos que apresentaram efeito foram diluídos e testados em triplicata nas concentrações de 50 µg/mL, 25 µg/mL, 12,5 µg/mL, 6,25 µg/mL, 3,125 µg/mL, 1,5625 µg/mL, 0,78125 µg/mL e 0,390625 µg/mL. Para as novas concentrações testadas, o ácido gálico foi utilizado como controle positivo. A CI₅₀ foi calculada com base na equação da reta obtida.

4.3.3.2 Atividade sequestrante dos radicais DPPH•

O ensaio foi realizado segundo o procedimento de Molyneux (2004), com alterações. Em cada poço da microplaca foram adicionados primeiramente 30 µL do extrato na concentração de 1 mg/mL, e em seguida 270 µL de solução de radical DPPH• na concentração de 2mg/12 ml em etanol. A placa foi incubada em ambiente escuro durante 30 minutos e foi lida posteriormente em leitor de microplaca à 492 nm. O ácido gálico foi tido como o padrão e como controle negativo foi usado o DMSO. Os ensaios foram feitos em triplicata e a percentagem de inibição foi calculada segundo a fórmula:

$$\% \text{ inibição} = 100 - (\text{Absorbância da Amostra} / \text{média absorbância do Padrão}) * 100$$

Como no teste do radical ABTS^{•+}, no radical DPPH[•] o ensaio ocorreu com a concentração do extrato em cada poço sendo 100 µg/mL. Porém, para se obter uma curva de inibição e se obter a CI₅₀, os extratos que apresentaram efeito foram diluídos e testados em triplicata em novas concentrações e utilizando-se o ácido gálico como controle positivo.

4.4 Estudos químicos

4.4.1 Prospecção fitoquímica

A prospecção fitoquímica preliminar foi empregada com o intuito de detectar a presença de grupos biologicamente ativos no EECv (cascas) decorrentes do metabolismo vegetal, como compostos fenólicos, triterpenos, esteroides e nitrogenados. Na busca de diferentes classes, foram utilizadas as metodologias propostas por Matos (1997), Costa (2002) e Simões (2010), que baseiam o procedimento operacional padrão (POP) de triagem fitoquímica do Laboratório de Produtos Naturais e Semissíntese Fitophar da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Amazonas.

Os métodos utilizados durante a triagem fitoquímica englobam reações químicas e reagentes detectores em tubos de ensaio e placas de toque, os quais revelam qualitativamente a presença de substâncias específicas por meio da mudança de coloração, formação de espuma e precipitação de proteínas (SOARES *et al*, 2016).

4.4.2 Espectrometria de massas com ionização por *electrospray* (ESI-MS)

A espectrometria de massas foi aplicada para a detecção de compostos isolados presentes no EECv (cascas). Os espectros foram adquiridos usando um espectrômetro *ion trap*

LCQ Fleet™ (Thermo Scientific) equipado com uma fonte de *electrospray*, operando no modo negativo e programado para monitorar a faixa de m/z 100-1000. O extrato foi diluído a 5 ppm em metanol grau HPLC e aplicado por inserção direta através da bomba seringa do próprio equipamento. Para aumentar a sensibilidade na análise tandem, foram adicionados 4 µL de ácido acético glacial a 10 mL da solução diluída, sendo a concentração final de ácido acético no solvente de 0,04%. Para analisar as frações, utilizaram-se os seguintes parâmetros de operação: spray voltage: 5 kV; sheath gas: 5 arb; aux gas: 5 arb; sweep gas: 5 arb; capillary temp: 175 °C; capillary voltage: 45 V; tube lens: 115 V; syringe pump: 10 µL min⁻¹.

4.5 Ensaios *in vivo*

O uso de animais de laboratório no presente estudo encontra-se aprovado, pois este trabalho é parte do projeto intitulado “Avaliação farmacológica de plantas medicinais em modelos *in vivo* de inflamação e nocicepção”, que obteve aprovação na Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA) por meio do processo nº 042/2016. O parecer de aprovação está anexado ao trabalho (ver ANEXO).

Para os ensaios *in vivo* foram utilizados camundongos adultos machos da linhagem *Balb/C* (peso entre 20 e 30 gramas) e da linhagem *Swiss* (peso entre 35 e 40 gramas). Antes dos ensaios, os animais foram mantidos dentro de gaiolas padronizadas (4 animais por gaiola) em sala com controle de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), ciclo claro/escuro (12:12 h) e livre acesso à comida e água.

Para avaliar a atividade antinociceptiva do EECv (cascas) foram realizados o teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético, o teste de hiperalgesia mecânica induzida por carragenina e o teste da formalina. O teste de coordenação motora também foi avaliado, uma vez que substâncias que promovem relaxamento muscular ou sedação pudessem estar

presentes no extrato, interferindo assim na avaliação da ação antinociceptiva. Já a atividade anti-inflamatória foi avaliada por meio do teste de edema de pata induzido por carragenina. Todos os ensaios *in vivo* foram executados no Biotério Central do INPA e em parceria com a Universidade Federal de Minas Gerais no Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas, cujos ensaios foram realizados no Laboratório de Dor e Analgesia, sob responsabilidade da professora Andrea de Castro Perez.

Nos ensaios de contorções abdominais induzidas por ácido acético, edema de pata induzido por carragenina e formalina foram utilizados camundongos *Balb/C*, enquanto que nos testes de coordenação motora e hiperalgesia mecânica induzida por carragenina foram utilizados animais *Swiss*. Em todos os ensaios cada grupo experimental consistiu de 4 a 6 animais e, nos ensaios que requeriam aparelhos específicos (coordenação motora e hiperalgesia mecânica induzida por carragenina), os animais foram submetidos previamente à ambientação necessária aos mesmos.

Para os ensaios onde ocorreu a administração de substâncias por via oral, os animais foram submetidos a um jejum de 4 horas antes de qualquer procedimento. Após os ensaios, os animais foram anestesiados com solução de cloridrato de xilazina a 2 % e cetamina (1:1) no volume de 2 mL/Kg, via intraperitoneal, e sacrificados por deslocamento cervical para posterior descarte, seguindo todas as normas da CEUA do INPA.

4.5.1 Teste de coordenação motora

A coordenação motora foi avaliada por meio do tempo em que o animal permaneceu caminhando no *rota-rod* durante 2 minutos (tempo de corte), segundo a metodologia descrita por Dunham e Miya (1957), com alterações. O *rota-rod* se trata de uma barra giratória horizontal, revestida de plástico antideslizante, suspensa a uma altura de 25 a 30 cm e com

rotação constante de 16 rpm. Os camundongos *Swiss* foram divididos em 3 grupos experimentais, que receberam pré-tratamento conforme descrição a seguir. O grupo 1 recebeu, via oral, o veículo (solução de etanol 70 % a 5 % em salina) no volume de 10 mL/Kg. O grupo 2 recebeu, via subcutânea, a xilazina na dose de 2 mg/Kg. O grupo 3 recebeu, via oral, o EECv (cascas) na dose de 300 mg/Kg. A coordenação motora foi avaliada imediatamente antes (basal), 30, 60 e 120 minutos após o pré-tratamento com o auxílio de cronômetro. Os animais foram submetidos a três sessões de treinamento no dia que antecedeu o experimento para haver a habituação ao aparelho.

4.5.2 Contorções abdominais induzidas por ácido acético

Como descrito previamente por Koster *et al* (1959), ácido acético a 0,9 % foi injetado (volume de 10 mL/Kg) na cavidade peritoneal dos camundongos *Balb/C* após estes receberem o pré-tratamento conforme cada grupo experimental. No grupo 1, os animais receberam o veículo (solução de etanol 70 % a 5 % em salina), via oral, no volume de 10 mL/Kg. O grupo 2 recebeu a indometacina, via oral, na dose de 10 mg/Kg. Nos grupos 3 e 4, os animais receberam por via oral o EECv (cascas) nas doses de 100 mg/Kg e 300 mg/Kg, respectivamente. O ácido acético a 0,9% foi administrado 1 hora depois do pré-tratamento em todos os grupos experimentais pela via intraperitoneal. Após a injeção, os animais foram colocados em uma caixa de plástico transparente com paredes fechadas, permitindo assim a observação pelo experimentador, e a intensidade do comportamento nociceptivo foi quantificada por meio da contagem do número total de contorções abdominais, características do comportamento nociceptivo, que ocorreram entre 0 a 20 minutos. A resposta contorsiva consistiu de contração do músculo abdominal com o estiramento dos membros posteriores. A resposta nociceptiva foi expressa como o número de contorções abdominais durante o período de observação.

4.5.3 Edema de pata induzido por carragenina

Segundo a metodologia descrita por Levy (1969), com modificações, foi administrado aos camundongos *Balb/C* pela via intraplantar na pata posterior direita uma dose de carragenina (300 µg/30 µL). Esta administração ocorreu 1 hora após o pré-tratamento por via oral dos grupos experimentais, conforme descrito em seguida. O grupo 1 recebeu o veículo (solução de etanol 70 % a 5 % em salina) no volume de 10 mL/Kg. O grupo 2 recebeu a indometacina na dose de 10 mg/Kg. O grupo 3 recebeu o EECv (cascas) na dose de 300 mg/Kg.

O edema de pata foi avaliado em um hidropletismômetro elétrico (Panlab, SLU). Este aparelho mede o volume líquido deslocado e o traduz de forma digital. O volume basal da pata posterior direita foi determinado antes da administração de qualquer substância. O volume da pata foi medido 1, 2, 3 e 4 horas após a injeção da carragenina. Os resultados foram apresentados como a variação do volume da pata (µL) em relação ao valor basal.

4.5.4 Hiperalgisia mecânica induzida por carragenina e avaliação da participação da via opioidérgica

O teste ocorreu tendo em vista o trabalho introdutório de Randall e Selitto (1957) e adaptado para camundongos por Kawabata *et al* (1992). Primeiramente, no grupo 1 os camundongos *Swiss* foram pré-tratados, por via oral, com o veículo (solução de etanol 70 % a 5 % em salina) no volume de 10 mL/Kg. No grupo 2 os animais foram pré-tratados, por via oral, com o EECv (cascas) na dose de 300 mg/Kg. Após 1 hora do pré-tratamento a hiperalgisia foi induzida por meio da administração intraplantar de carragenina (200 µg/20 µL) na pata posterior direita. Um analgesímetro foi utilizado para determinar o limiar nociceptivo, definido

como o peso em gramas necessário para causar resposta nociceptiva (retirada da pata). O valor de corte de 160 gramas foi usado para evitar lesões nas patas.

As leituras ocorreram em triplicata (obtendo-se a sua média) antes do pré-tratamento (leitura basal) e na terceira hora após a injeção de carragenina, que é o seu tempo máximo de resposta, e foram expressas como valor Δ do limiar nociceptivo, sendo este valor a diferença entre as médias obtidas. O valor Δ do limiar nociceptivo superior a 0 indica ação hiperálgica induzida pela carragenina e a sua diminuição indica ação antihiperálgica.

Para verificar o envolvimento da via opioidérgica, o ensaio foi feito com o grupo 1 recebendo o veículo da naltrexona (salina, via intraperitoneal) 30 minutos antes de receber o veículo do extrato (solução de etanol 70 % a 5 % em salina), no volume de 10 mL/Kg cada veículo; o grupo 2 recebeu o veículo da naltrexona, via intraperitoneal, no volume de 10 mL/Kg 30 minutos antes da administração do EECv (cascas), via oral, na dose de 300 mg/Kg; o grupo 3 recebeu a naltrexona, via intraperitoneal, na dose de 5 mg/Kg 30 minutos antes da administração do EECv (cascas) na dose de 300 mg/Kg. As leituras foram realizadas da mesma forma, antes e depois da injeção de carragenina, como descrito anteriormente para verificar se o possível efeito antinociceptivo é revertido pela naltrexona, um antagonista não específico dos receptores opioides.

4.5.5 Teste da formalina

Para o teste da formalina, foi adotada a metodologia de Hunskaar *et al* (1985), uma adaptação para camundongos do trabalho introdutório de Dubuisson e Dennis (1977), com modificações. Os camundongos *Balb/C* foram primeiramente pré-tratados e, algum tempo depois, receberam uma injeção intraplantar (30 μ L/pata) de formalina 2,5 % na pata posterior direita. No grupo 1, os animais receberam o veículo (solução de etanol 70 % a 5 % em salina),

via oral, no volume de 10 mL/Kg. O grupo 2 recebeu a indometacina, via oral, na dose de 10 mg/Kg. O grupo 3 recebeu a morfina, via oral, na dose de 10 mg/Kg. Por fim, o grupo 4 recebeu o EECv (cascas), via oral, na dose de 300 mg/Kg. Todos os grupos receberam a formalina após 1 hora do pré-tratamento. Em seguida, foi avaliado o tempo em segundos no qual o animal se manteve lambendo a pata injetada (*licking time*) durante dois intervalos de tempo após a administração da formalina: 0-5 minutos, definida como primeira fase ou dor neurogênica, e 15-30 minutos, definida como segunda fase ou dor inflamatória.

4.6 Análise estatística

Para os ensaios *in vitro*, os resultados obtidos foram processados no programa Excel e expressos como média \pm desvio padrão da média (DPM). Nos ensaios *in vivo*, os resultados obtidos foram analisados por meio do programa GraphPad 6.0 e expressos como média \pm DPM. As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram calculadas por análise de variância (ANOVA) e em seguida pelo teste de Bonferroni ($p < 0,05$ foi considerado significativo).

5. RESULTADOS

5.1 Rendimentos dos extratos obtidos

Após a extração, os rendimentos dos extratos foram calculados tomando-se como base o peso dos recipientes de armazenamento com e sem o produto, bem como a massa de matéria-prima utilizada no processo extrativo. Os valores estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2: Rendimentos dos extratos obtidos de piquiá

Extrato	Massa de matéria-prima utilizada (g)	Rendimento (%)	Massa final do extrato (g)
EHxCv (cascas)	280	2,36	6,61
EAcCv (cascas)	280	2,53	7,09
EECv (cascas)	280	27,41	76,75
EHCv (cascas/liofilização)	150	33,27	49,9
EHCv (cascas/spray dryer)	100	18,65	18,65
EHxCv (pool)	142	20,62	29,28
EAcCv (pool)	142	9,44	13,41
EECv (pool)	142	5,04	7,16
EHCv (pool/liofilização)	150	7,76	11,64
EHCv (pool/spray dryer)	100	3	3

Fonte: Gutemberg Soares

Como observado na Tabela 2, o EHCv (cascas/liofilização) foi o extrato que obteve o maior rendimento (33,27 %), seguido do EECv (cascas) (27,41 %) e do EHxCv (pool) (20,62 %). Por outro lado, o extrato com o menor rendimento foi o EHxCv (cascas) com um valor de 2,36 %.

5.2 Ensaios *in vitro*

5.2.1 Determinação de compostos fenólicos totais

Os valores obtidos para a percentagem de compostos fenólicos totais, bem como os valores de equivalente ao ácido gálico (Eq. ácido Gálico) estão expressos na Tabela 3.

Tabela 3: Teor de compostos fenólicos totais nos extratos obtidos de piquiá

Extrato (1 mg/mL)	% fenóis (média) ± DPM	Eq. ácido gálico (µg) (média) ± DPM
EHxCv (cascas)	3,73 ± 0,29	23,20 ± 2,98
EAcCv (cascas)	36,32 ± 0,28	349,16 ± 2,81
EECv (cascas)	36,78 ± 1,43	353,72 ± 14,31
EHCv (cascas/liofilização)	37,67 ± 1,73	362,66 ± 17,35
EHCv (cascas/spray dryer)	37,10 ± 0,23	357 ± 2,38
EHxCv (pool)	2,54 ± 0,15	11,35 ± 1,55
EAcCv (pool)	2,71 ± 0,21	13 ± 2,16
EECv (pool)	6,95 ± 0,61	55,47 ± 6,10
EHCv (pool/liofilização)	10,99 ± 0,53	95,81 ± 5,38
EHCv (pool/spray dryer)	11,91 ± 0,11	105 ± 1,13

Fonte: Gutemberg Soares

Por meio da Tabela 3, verifica-se que o extrato que possuiu o maior teor de compostos fenólicos totais foi o EHCv (cascas/liofilização) (37,67 %), seguido do EHCv (cascas/spray dryer) (37,10 %) e do EECv (cascas) (36,78 %). Em contrapartida, os extratos que apresentaram os menores valores foram o EHxCv (pool), EAcCv (pool) e EHxCv (cascas), com valores variando de 2,54 a 3,73 %.

Também é possível constatar que, de modo geral, os extratos obtidos a partir das cascas do fruto obtiveram teores maiores que os obtidos do *pool* de sementes e polpa, com exceção do EHxCv (cascas).

5.2.2 Determinação de flavonoides

Os valores obtidos para a percentagem de flavonoides, bem como os valores de equivalente à quercetina (Eq. quercetina) estão expressos na Tabela 4.

Tabela 4: Teor de flavonoides nos extratos obtidos de piquiá

Extrato (1 mg/mL)	% flavonoides (média) ± DPM	Eq. quercetina (µg) (média) ± DPM
EHxCv (cascas)	1,36 ± 0,26	1,83 ± 1,41
EAcCv (cascas)	3,15 ± 0,13	11,45 ± 0,73
EECv (cascas)	11,27 ± 0,20	55,25 ± 1,10
EHCv (cascas/liofilização)	9,41 ± 0,22	45,22 ± 1,20
EHCv (cascas/spray dryer)	8,69 ± 0,51	41,34 ± 2,79
EHxCv (<i>pool</i>)	0,71 ± 0,09	-1,70 ± 0,53
EAcCv (<i>pool</i>)	2,44 ± 0,43	7,66 ± 2,33
EECv (<i>pool</i>)	2,39 ± 0,69	7,39 ± 3,74
EHCv (<i>pool</i> /liofilização)	3,43 ± 0,05	12,98 ± 0,31
EHCv (<i>pool</i> /spray dryer)	3,83 ± 0,31	15,14 ± 1,68

Fonte: Gutemberg Soares

O extrato que obteve o maior teor de flavonoides conforme a tabela anterior foi o EECv (cascas), com um valor de 11,27 %. Em seguida, o EHCv (cascas/liofilização) e o EHCv (cascas/ *spray dryer*) apresentaram teores de 9,41 e 8,69 %, respectivamente. O extrato com menor resultado obtido foi o EHxCv (*pool*) (0,71 %).

5.2.3 Atividade antioxidante

5.2.3.1 Atividade sequestrante dos radicais ABTS•+

Os valores obtidos para a atividade sequestrante dos radicais ABTS•+ estão expressos na tabela a seguir:

Tabela 5: Atividade sequestrante dos radicais ABTS•+ dos extratos obtidos de piquiá

Extrato (100 µg/mL)	% inibição (média) ± DPM
EHxCv (cascas)	-2,45 ± 2,13
EAcCv (cascas)	96,14 ± 0,1
EECv (cascas)	95,74 ± 0,05
EHCv (cascas/liofilização)	95,6 ± 0,08
EHCv (cascas/spray dryer)	95,42 ± 0,12
EHxCv (pool)	-1,5 ± 1,6
EAcCv (pool)	-1,45 ± 1,05
EECv (pool)	78,88 ± 2,12
EHCv (pool/liofilização)	94,80 ± 0,15
EHCv (pool/spray dryer)	95,44 ± 0,14
DMSO	0 ± 1,12

Fonte: Gutemberg Soares

Como observado na Tabela 5, a maioria dos extratos de piquiá foram capazes de inibir os radicais ABTS•+, com percentagens de atividade variando de 78,88 a 96,14 %. As maiores taxas de inibição foram provenientes de extratos obtidos a partir das cascas do fruto, a saber o EAcCv (cascas) (96,14 %), o EECv (cascas) (95,74 %) e o EHCv (cascas/liofilização) (95,6 %).

Porém, os extratos mais polares provenientes do *pool* de sementes e polpa também apresentaram atividade satisfatória.

Uma vez analisados na concentração de 100 µg/mL, constatou-se que o EHxCv (cascas), o EHxCv (*pool*) e o EAcCv (*pool*) não foram eficazes em inibir o radical ABTS•+, se comparados aos demais. Portanto, os demais extratos foram diluídos e testados nas concentrações de 50 µg/mL, 25 µg/mL, 12,5 µg/mL, 6,25 µg/mL, 3,125 µg/mL, 1,5625 µg/mL, 0,78125 µg/mL e 0,390625 µg/mL de modo a se obter uma curva concentração-efeito e assim calcular a CI₅₀. Os resultados estão expressos na Tabela 6.

Tabela 6: Valores de CI₅₀ dos extratos obtidos de piquiá para o radical ABTS•+

Extrato	CI₅₀ (µg/mL) (média) ± DPM
EAcCv (cascas)	8,65 ± 0,03
EECv (cascas)	9,76 ± 0,01
EHCv (cascas/liofilização)	9,76 ± 0,1
EHCv (cascas/ <i>spray dryer</i>)	6,33 ± 0,58
EECv (<i>pool</i>)	50,83 ± 0,94
EHCv (<i>pool</i> /liofilização)	22,40 ± 2,51
EHCv (<i>pool</i> / <i>spray dryer</i>)	16,18 ± 0,26
Ácido gálico	3,54 ± 0,06

Fonte: Gutemberg Soares

De acordo com a Tabela 6, os menores valores de CI₅₀ foram alcançados pelo EHCv (cascas/*spray dryer*) (6,33 µg/mL) e pelo EAcCv (cascas) (8,65 µg/mL). O EECv (cascas) e o EHCv (cascas/liofilização) obtiveram o mesmo valor de 9,76 µg/mL.

Os demais extratos obtidos a partir do *pool* de sementes e polpas apresentaram valores de CI₅₀ maiores, quando comparados aos extratos provenientes das cascas e o ácido gálico (controle positivo).

5.2.3.2 Atividade sequestrante dos radicais DPPH•

Os valores obtidos para a atividade sequestrante dos radicais DPPH• estão expressos na Tabela 7.

Tabela 7: Atividade sequestrante dos radicais DPPH• dos extratos obtidos de piquiá

Extrato (100 µg/mL)	% inibição (média) ± DPM
EHxCv (cascas)	-4,53 ± 1,27
EAcCv (cascas)	83,22 ± 0,49
EECv (cascas)	81,5 ± 0,37
EHCv (cascas/liofilização)	79,41 ± 0,91
EHCv (cascas/ <i>spray dryer</i>)	80,72 ± 0,27
EHxCv (<i>pool</i>)	-3,41 ± 0,53
EAcCv (<i>pool</i>)	-7 ± 1,11
EECv (<i>pool</i>)	68,78 ± 3,42
EHCv (<i>pool</i> /liofilização)	79,12 ± 1,29
EHCv (<i>pool</i> / <i>spray dryer</i>)	79,52 ± 0,16
DMSO	0 ± 0,7

Fonte: Gutemberg Soares

Segundo os resultados expressos na Tabela 7, os maiores valores de inibição do radical DPPH• foram alcançados pelo EAcCv (cascas) (83,22 %), pelo EECv (cascas) (81,5 %) e pelo EHCv (cascas/*spray dryer*) (80,72 %). Assim como os demais extratos, o EHCv (cascas/liofilização) e os extratos mais polares provenientes do *pool* também apresentaram atividade eficaz com notáveis percentagens de inibição.

À exceção do EHxCv (cascas), EHxCv (*pool*) e EAcCv (*pool*), que não foram eficazes em inibir o radical DPPH•, os demais extratos foram diluídos e testados nas concentrações de 50 µg/mL, 25 µg/mL, 12,5 µg/mL, 6,25 µg/mL, 3,125 µg/mL, 1,5625 µg/mL, 0,78125 µg/mL

e 0,390625 µg/mL de modo a se obter uma curva concentração-efeito e assim calcular a CI₅₀.

Os resultados estão expressos na Tabela 8.

Tabela 8: Valores de CI₅₀ dos extratos obtidos de piquiá para o radical DPPH•

Extrato	CI₅₀ (µg/mL) (média) ± DPM
EACv (cascas)	5,43 ± 0,1
EECv (cascas)	5,33 ± 0,02
EHCv (cascas/liofilização)	5,51 ± 0,07
EHCv (cascas/spray dryer)	5,92 ± 0,18
EECv (pool)	68,56 ± 2,83
EHCv (pool/liofilização)	34,33 ± 4,63
EHCv (pool/spray dryer)	23,91 ± 1,41
Ácido gálico	3,4 ± 0,1

Fonte: Gutemberg Soares

De acordo com a Tabela 8, os menores valores de CI₅₀ foram alcançados pelo EECv (cascas) (5,33 µg/mL), pelo EACv (cascas) (5,43 µg/mL) e pelo EHCv (cascas/liofilização) (5,51 µg/mL). Os demais extratos obtidos a partir do *pool* de sementes e polpa apresentaram valores de CI₅₀ maiores, se comparados aos demais extratos e o ácido gálico (controle positivo).

Após a realização dos ensaios de determinação de compostos fenólicos totais, determinação de flavonoides e os ensaios de atividade antioxidante (radicais ABTS•+ e DPPH•), o extrato etanólico obtido a partir das cascas do fruto, EECv (cascas), foi considerado o mais bioativo por ter apresentado o maior teor de flavonoides e o menor valor de CI₅₀ para o radical DPPH• dentre todos os extratos.

Nos outros dois fatores levados em conta para determinar o extrato mais bioativo, o extrato hidroetanólico seco por liofilização obtido a partir das cascas do fruto, EHCv (cascas/liofilização), foi o que apresentou o maior teor de compostos fenólicos totais. Por outro

lado, o extrato hidroetanólico das cascas do fruto seco por *spray dryer*, EHCv (cascas/*spray dryer*), foi o que apresentou o menor valor de CI₅₀ para o radical ABTS•+.

Portanto, dos quatro critérios selecionados para definição do extrato mais bioativo, o EECv (cascas) atingiu dois (maior teor de flavonoides e menor valor de CI₅₀ para o radical DPPH•), sendo definido como o extrato mais bioativo e prosseguindo para os demais ensaios.

5.3 Estudos químicos

5.3.1 Prospecção fitoquímica

Os ensaios de prospecção fitoquímica foram realizados de modo a detectar qualitativamente a presença de algumas classes de substâncias no EECv (cascas), apresentadas na Tabela 9.

Tabela 9: Classes de substâncias encontradas no EECv (cascas)

Classe	Presença
Compostos fenólicos	+
Antraquinonas livres	-
Cumarinas	-
Taninos condensados	+
Antocianinas, antocianidinas, flavonas, flavonóis, xantonas, chalconas, auronas e flavononóis.	-
Flavonóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas (livres ou seus heterosídeos)	+
Saponinas	+

Fonte: Gutemberg Soares

Por meio da Tabela 9, verifica-se que no EECv (cascas) foram encontrados compostos fenólicos, taninos condensados, flavonóis, flavanonas, flavanonóis, xantonas e saponinas.

5.3.2 Espectrometria de massas com ionização por *electrospray* (ESI-MS)

Após obtenção dos espectros, houve comparação com a literatura para a identificação de alguns compostos presentes no EECv (cascas) por meio dos picos, conforme a Tabela 10.

Tabela 10: Compostos detectados no EECv (cascas) por ESI-MS

Compostos	[M-H] ⁻ (m/z)	Referências
Ácido vanílico	167	Sun <i>et al</i> (2007)
Ácido gálico	169	Roesler <i>et al</i> (2008), Chisté <i>et al</i> (2012)
Xantoxilina	195	Malta <i>et al</i> (2013)
Brevifolina	247	Zhu <i>et al</i> (2015)
Carboxilato de brevifolina	291	Zhu <i>et al</i> (2015)
Ácido elágico	301	Chisté <i>et al</i> (2012), Malta <i>et al</i> (2013)
Ácido cafeoilchiquímico	335	Bastos <i>et al</i> (2007)
Ácido <i>p</i> -coumaroilquínico	337	Chisté <i>et al</i> (2012), Malta <i>et al</i> (2013), Zhu <i>et al</i> (2015)
Feruloilhexose	355	Malta <i>et al</i> (2013)
Quercetina-hexosídeo	463	Malta <i>et al</i> (2013), Silva <i>et al</i> (2014)
Apigenina	577	Silva <i>et al</i> (2014)
desoxihexosilhexosídeo		
Quercetina galoil-hexosídeo	615	Silva <i>et al</i> (2014)
Galoil hexahidroxidifenoil-hexosídeo	633	Chisté <i>et al</i> (2012), Zhu <i>et al</i> (2015)
Derivados monoacíclicos de quercetina diglicosilada	761	Pereira <i>et al</i> (2015)
Ácido tetragaloilquínico	799	Pereira <i>et al</i> (2015)

Fonte: Gutemberg Soares

Como mostrado na Figura 3, o extrato apresentou como compostos majoritários o ácido gálico (m/z 169) e o ácido *p*-coumaroilquínico (m/z 337).

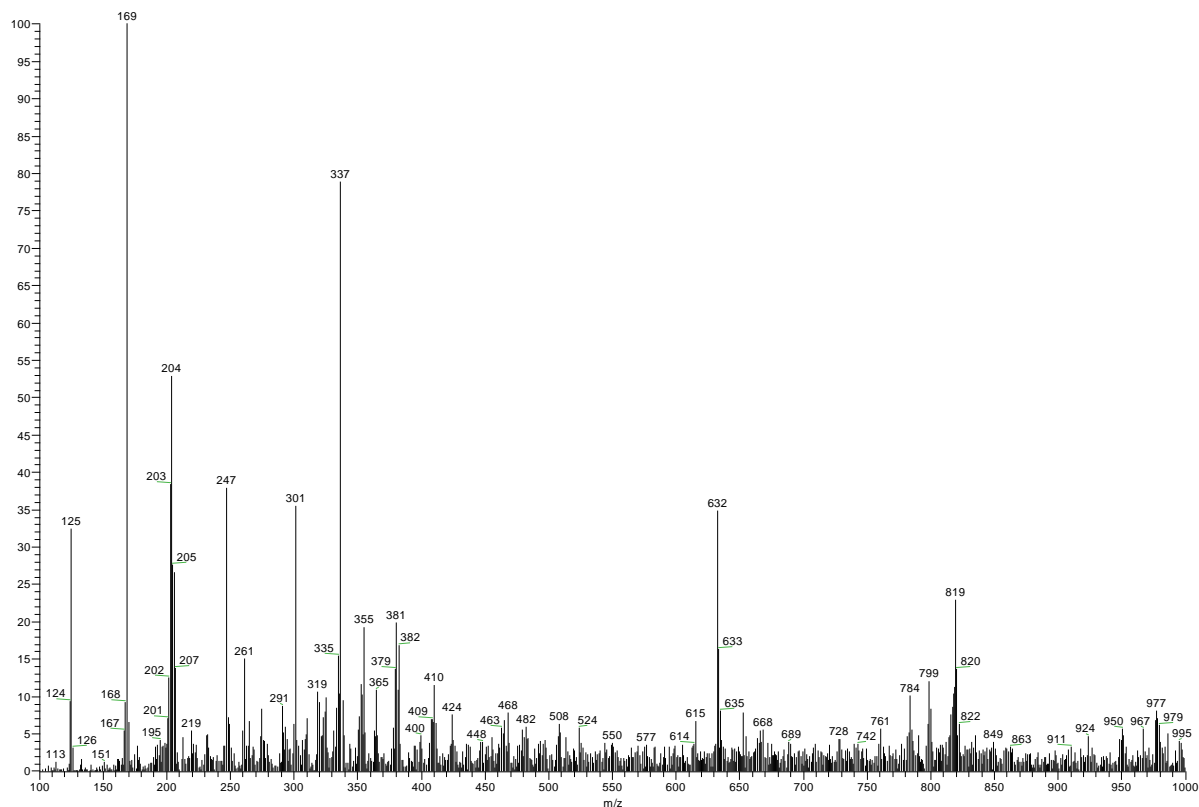


Figura 3 – Espectros obtidos do EECv (cascas) por ESI-MS. A análise espectrométrica ocorreu por meio de injeção direta do extrato através da bomba seringa do próprio equipamento. Modo operante negativo.

5.4 Ensaios *in vivo*

5.4.1 Teste de coordenação motora

Ao observar a Figura 4, visualiza-se que os animais pertencentes ao grupo 1 (controle negativo) permaneceram caminhando na barra giratória durante quase o tempo total de corte (2 minutos) antes de receberem o pré-tratamento com o veículo (solução de etanol 70 % a 5 % em salina, via oral, volume de 10 mL/Kg) e 30, 60 e 120 minutos após o pré-tratamento. Ou seja,

os animais desse grupo não apresentaram nenhuma dificuldade locomotora para se manter no aparelho.

Já os animais pertencentes ao grupo 2 haviam recebido, como pré-tratamento, a xilazina (via subcutânea, dose de 2 mg/Kg). Antes do pré-tratamento, esses animais permaneceram caminhando na barra giratória durante o tempo total de corte. Porém, ao serem colocados no aparelho 30 e 60 minutos após o pré-tratamento, o tempo de permanência no aparelho diminuiu significativamente ($p < 0,001$) para cerca de 25 segundos, devido ao efeito central da xilazina administrada. Após 120 minutos do pré-tratamento, os animais desse grupo voltaram a permanecer caminhando por quase o tempo total de 2 minutos.

Os animais do grupo 3 receberam o EECv (cascas) (via oral, dose de 300 mg/Kg) e, da mesma forma como no grupo 1, permaneceram caminhando por quase o tempo total na barra giratória antes e depois de 30, 60 e 120 minutos do pré-tratamento.

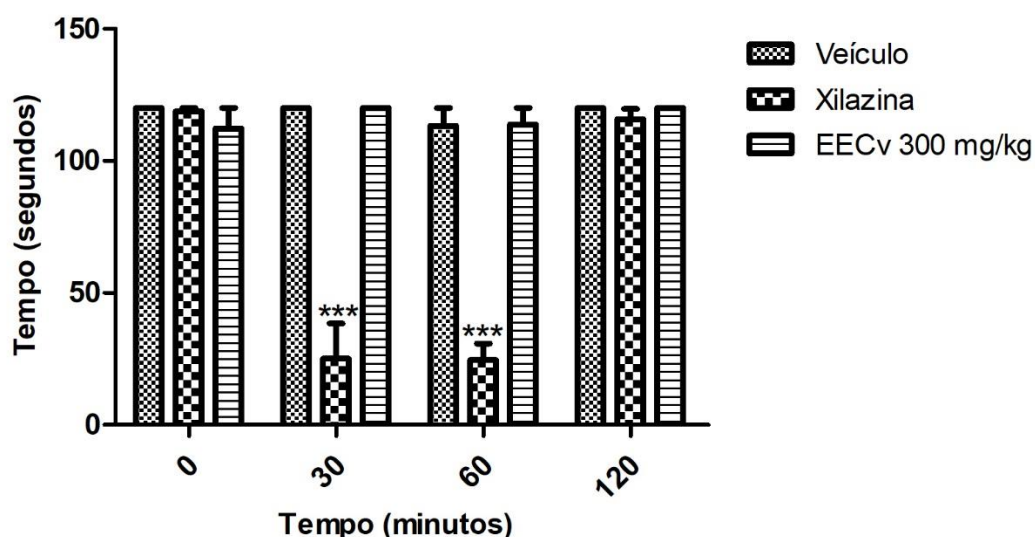


Figura 4 – Efeito do EECv (cascas) e do seu veículo no tempo de permanência no *rota-rod* em camundongos. Animais pré-tratados com o veículo (solução de etanol 70 % a 5 % em salina, via oral, volume de 10 mL/Kg) no Grupo 1, xilazina (via subcutânea, dose de 2 mg/Kg) no Grupo 2 e EECv (cascas) (via oral, dose de 300 mg/Kg) no Grupo 3. As leituras foram realizadas antes do pré-tratamento (leitura basal) e 30, 60 e 120 minutos após o pré-tratamento. Cada coluna representa a média \pm DPM do tempo de permanência em segundos no *rota-rod*. *** representa significância estatística $P < 0,001$, quando comparado ao Grupo 1 (controle negativo).

5.4.2 Contorções abdominais induzidas por ácido acético

Como pode ser observado na Figura 5, os animais do grupo 2, que receberam como pré-tratamento a indometacina (via oral, dose de 10 mg/Kg), apresentaram uma redução significativa ($p < 0,05$) do número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, quando comparados com os animais do grupo 1 (controle negativo), que receberam o veículo (solução de etanol 70 % a 5 % em salina, via oral, volume de 10 mL/Kg) no pré-tratamento.

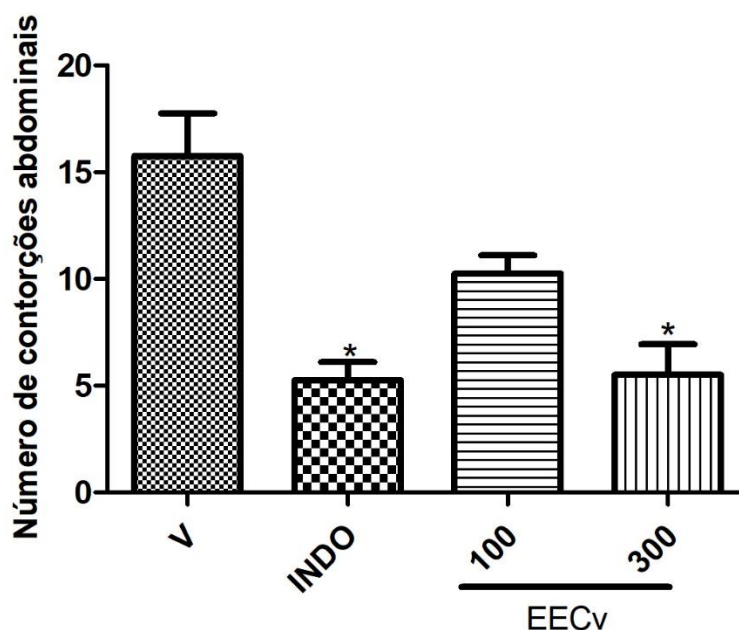


Figura 5 – Efeito do EECv (cascas) no número de contorções abdominais induzidas por ácido acético 0,9% em camundongos. Animais pré-tratados com o veículo (solução de etanol 70 % a 5 % em salina, via oral, volume de 10 mL/Kg) no Grupo 1, indometacina (via oral, dose de 10 mg/Kg) no Grupo 2, EECv (cascas) (via oral, dose de 100 mg/Kg) no Grupo 3 e EECv (cascas) (via oral, dose de 300 mg/Kg) no Grupo 4. As leituras foram realizadas depois de 1 hora do pré-tratamento, durante o tempo de 0-20 minutos logo após a injeção intraperitoneal de ácido acético a 0,9 %. Cada coluna representa a média ± DPM do número de contorções abdominais. * representa significância estatística $P < 0,05$, quando comparado ao Grupo 1 (controle negativo). V: veículo e INDO: indometacina.

Com relação ao EECv (cascas), apenas os animais do grupo 4, que receberam o extrato na dose de 300 mg/Kg, apresentaram uma ação antinociceptiva ao reduzir significativamente ($p < 0,05$) o número de contorções abdominais, quando comparados ao grupo 1. O EECv (cascas) na dose de 100 mg/Kg, que foi administrado aos animais do grupo 3, não foi eficaz em reduzir o comportamento nociceptivo induzido pela ação do ácido acético na cavidade intraperitoneal. No referido ensaio, a indometacina e o EECv (cascas) na dose de 300 mg/Kg apresentaram ação semelhante em diminuir o número de contorções abdominais.

5.4.3 Edema de pata induzido por carragenina

A Figura 6 mostra as respostas dos diferentes pré-tratamentos durante o ensaio do edema de pata induzido por carragenina.

No grupo 1 (controle negativo), no qual os animais foram pré-tratados com o veículo (solução de etanol 70% a 5 % em salina, via oral, volume de 10 mL/Kg), o volume do edema produzido pela administração de carragenina (300 μ g/30 μ L) alcançou valor máximo já na primeira hora e se manteve praticamente semelhante ao longo de todo o ensaio.

O grupo 2, pré-tratado com a indometacina (via oral, dose de 10 mg/Kg), apresentou na primeira hora um pico no volume do edema formado, seguido da diminuição significativa desse valor na segunda ($p < 0,001$), terceira ($p < 0,001$) e quarta horas ($p < 0,001$), quando comparado com o grupo 1. O efeito do extrato foi similar ao observado no grupo tratado com a indometacina, uma vez que no grupo 3 também houve um pico no volume do edema formado na primeira hora e subsequente diminuição do mesmo nas próximas horas.

A administração do EECv (cascas) (via oral, dose de 300 mg/Kg) no grupo 3 reduziu significativamente o volume do edema de pata em relação ao grupo não tratado durante a segunda ($p < 0,001$), terceira ($p < 0,001$) e quarta horas ($p < 0,001$), quando comparado ao

grupo 1. Portanto, o EECv (cascas) demonstrou uma ação anti-inflamatória e antiedematogênica no modelo de edema induzido por carragenina.

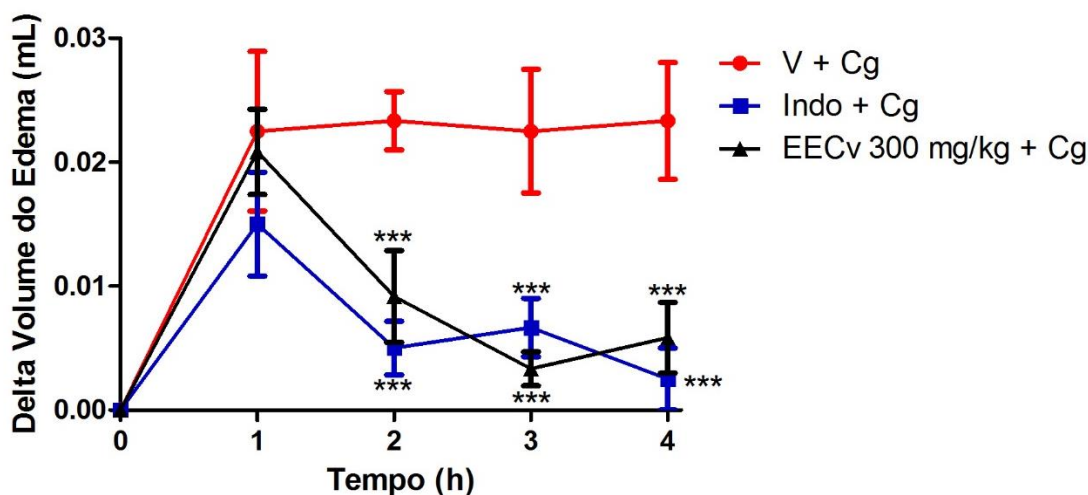


Figura 6 – Efeito do EECv (cascas) na inflamação no teste do edema de pata induzido por carragenina em camundongos. Animais pré-tratados com o veículo (solução de etanol 70 % a 5 % em salina, via oral, volume de 10 mL/Kg) no Grupo 1, indometacina (via oral, dose de 10 mg/Kg) no Grupo 2 e EECv (cascas) (via oral, dose de 300 mg/Kg) no Grupo 3. As leituras foram realizadas antes do pré-tratamento (leitura basal) e 1, 2, 3 e 4 horas após a injeção intraplantar de carragenina (300 µg/30 µL) na pata posterior direita. Cada coluna representa a média ± DPM do valor Δ da variação de volume do edema expresso em mililitros. *** representa significância estatística $P < 0,001$, quando comparado ao Grupo 1 (controle negativo). V: veículo, Cg: carragenina e Indo: indometacina.

5.4.4 Hiperalgisia mecânica induzida por carragenina e avaliação da participação da via opioidérgica

Conforme a Figura 7, a administração de EECv (cascas) por via oral na dose de 300 mg/Kg durante o pré-tratamento do grupo 2 produziu uma ação antinociceptiva contra a hiperalgisia induzida pela administração intraplantar de carragenina (200 µg/20 µL) na pata posterior direita, uma vez que o efeito do extrato diminuiu significativamente ($p < 0,01$) o valor Δ do limiar nociceptivo, quando comparado com o grupo 1 (controle negativo), que foi pré-

tratado, por via oral, com o veículo (solução de etanol 70 % a 5 % em salina, volume de 10 mL/Kg).

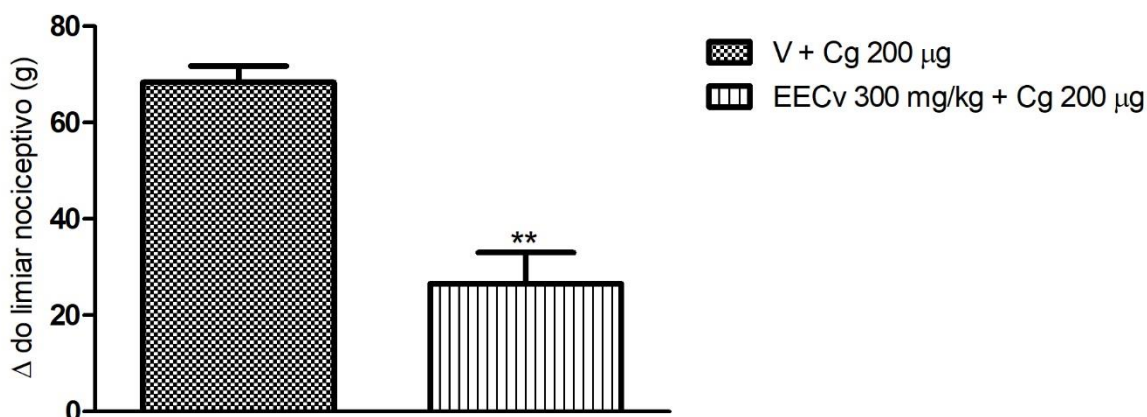


Figura 7 – Efeito do EECv (cascas) na hiperalgia induzida por carragenina em camundongos. Animais pré-tratados com o veículo (solução de etanol 70 % a 5 % em salina, via oral, volume de 10 mL/Kg) no Grupo 1 e EECv (cascas) (via oral, dose de 300 mg/Kg) no Grupo 2. As leituras foram realizadas antes do pré-tratamento (leituras basal) e na terceira hora após a injeção de carragenina (200 μg/20 μL) na pata posterior direita, que é o seu tempo máximo de resposta. Cada coluna representa a média ± DPM do valor Δ do limiar nociceptivo expresso em gramas. ** representa significância estatística $P < 0,01$, quando comparado ao Grupo 1 (controle negativo). V: veículo e Cg: carragenina.

Por meio da Figura 8, é possível visualizar que no grupo 2 houve uma ação antinociceptiva, uma vez que o EECv (cascas) (via oral, dose de 300 mg/Kg) administrado reverteu significativamente ($p < 0,001$) a hiperalgia induzida pela administração intraplantar de carragenina (200 μg/20 μL), quando comparado com o grupo 1 (controle negativo), que recebeu apenas os veículos da naltrexona (salina, via intraperitoneal) e do extrato (solução de etanol 70 % a 5 % em salina, via oral), ambos no volume de 10 mL/Kg. Sendo assim, os veículos da naltrexona e do extrato não interferiram na ação antinociceptiva do EECv (cascas).

No grupo 3, a naltrexona (via intraperitoneal, dose de 5 mg/Kg), quando administrada 30 minutos antes do extrato, antagonizou o efeito do EECv (cascas) (via oral, dose de 300 mg/Kg). Isso é observado pelo aumento do valor Δ do limiar nociceptivo, o que demonstra uma

reversão parcial do efeito antinociceptivo do extrato mediada por um antagonista não específico dos receptores opioides.

Portanto, é possível sugerir que no mecanismo de ação antinociceptivo do EECv (cascas) há a participação da via opioidérgica.

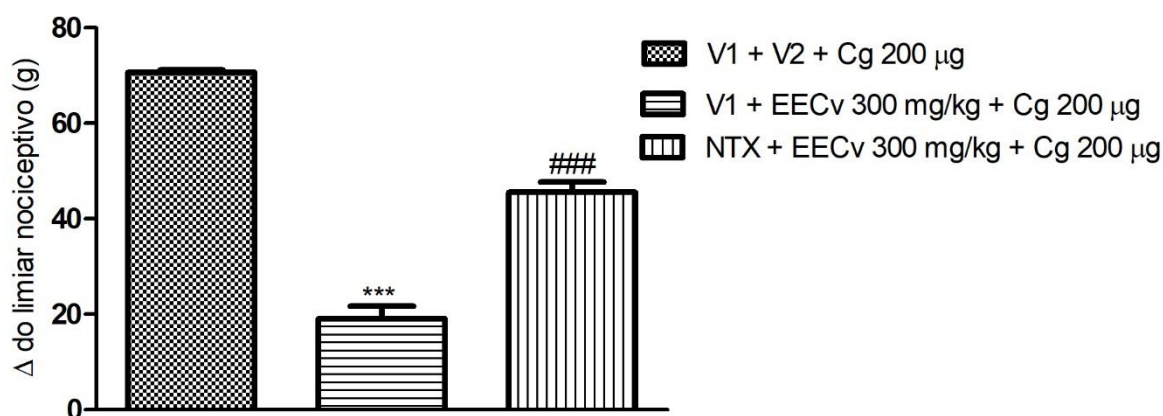


Figura 8 – Avaliação da participação da via opioidérgica no mecanismo de ação antinociceptivo do EECv (cascas) em camundongos. Animais pré-tratados com os veículos da naltrexona (salina, via intraperitoneal, volume de 10 mL/Kg) e do extrato (solução de etanol 70 % a 5 % em salina, via oral, volume de 10 mL/Kg) no Grupo 1, veículo da naltrexona (salina, via intraperitoneal, volume de 10 mL/Kg) e EECv (cascas) (via oral, dose de 300 mg/Kg) no Grupo 2 e naltrexona (via intraperitoneal, dose de 5 mg/Kg) e EECv (cascas) (via oral, dose de 300 mg/Kg) no Grupo 3. As leituras foram realizadas antes do pré-tratamento (leitural basal) e na terceira hora após a injeção de carragenina (200 µg/20 µL) na pata posterior direita, que é o seu tempo máximo de resposta. Cada coluna representa a média ± DPM do valor Δ do limiar nociceptivo expresso em gramas. *** representa significância estatística $P < 0,001$, quando comparado ao Grupo 1 (controle negativo). V1: veículo da naltrexona, V2: veículo do EECv (cascas), Cg: carragenina e NTX: naltrexona. ### representa significância estatística $P < 0,001$, quando comparado ao Grupo 2.

5.4.5 Teste da formalina

As Figuras 9 e 10 mostram, respectivamente, a primeira e segunda fase do teste da formalina. Na primeira fase (0-5 minutos após a injeção de formalina) os animais do grupo 2, que receberam como pré-tratamento a indometacina (via oral, dose de 10 mg/Kg), não demonstraram uma diminuição no tempo de lambida da pata posterior direita, quando

comparados com o grupo 1 (controle negativo) tratado com o veículo (solução de etanol 70 % a 5 % em salina, via oral, volume de 10 mL/Kg).

Já os animais do grupo 3, que receberam como pré-tratamento a morfina (via oral, dose de 10 mg/Kg), obtiveram uma redução significativa ($p < 0,05$) no tempo de lambida da pata, quando comparados com o grupo 1.

De forma semelhante ao grupo 2, os animais do grupo 4, que receberam o EECv (cascas) (via oral, dose de 300 mg/Kg) como pré-tratamento, não apresentaram uma diminuição no tempo de lambida da pata posterior direita após a administração da formalina, quando comparados com o grupo 1.

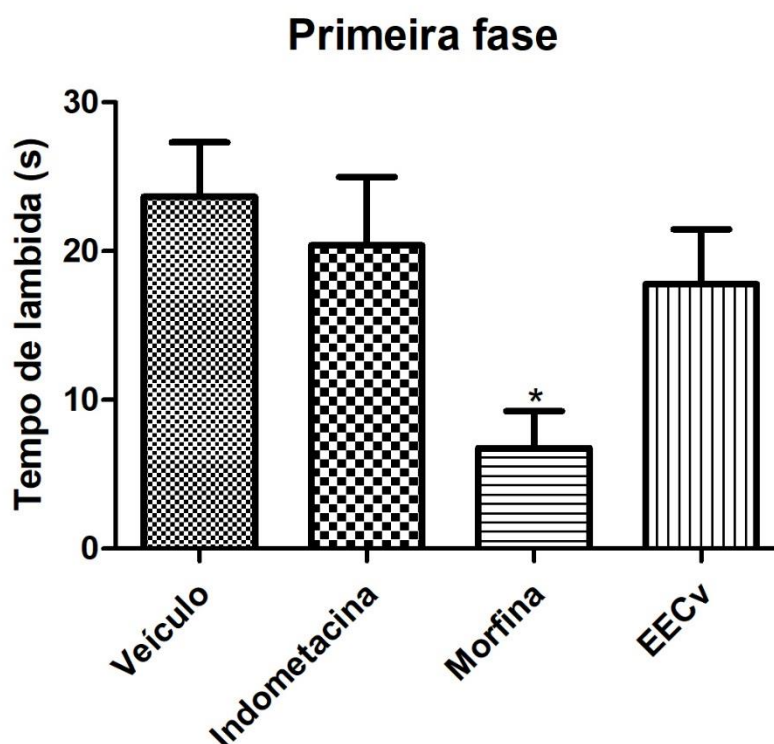


Figura 9 – Efeito do EECv (cascas) no tempo de lambida da pata dos camundongos na primeira fase do teste da formalina. Animais pré-tratados com o veículo (solução de etanol 70 % a 5 % em salina, via oral, volume de 10 mL/Kg) no Grupo 1, indometacina (via oral, dose de 10 mg/Kg) no Grupo 2, morfina (via oral, dose de 10 mg/Kg) no Grupo 3 e EECv (cascas) (via oral, dose de 300 mg/Kg) no Grupo 4. As leituras foram realizadas depois de 1 hora do pré-tratamento, durante o tempo de 0-5 minutos logo após a injeção intraplantar de formalina a 2,5 % na pata posterior direita. Cada coluna representa a média \pm DPM do tempo de lambida em segundos. * representa significância estatística $P < 0,05$, quando comparado ao Grupo 1 (controle negativo).

No que se refere à segunda fase do teste (15-30 minutos após a injeção de formalina), houve uma diminuição significativa no tempo de lambida da pata posterior direita nos mesmos animais dos grupos 2 ($p < 0,05$), 3 ($p < 0,01$) e 4 ($p < 0,05$), quando comparados com o grupo 1 (controle negativo).

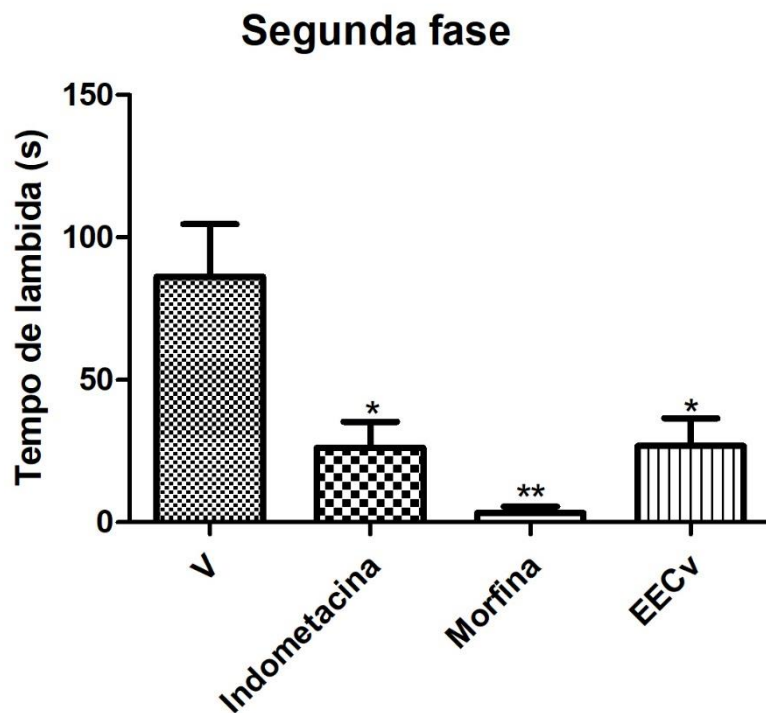


Figura 10 – Efeito do EECv (cascas) no tempo de lambida da pata dos camundongos na segunda fase do teste da formalina. Animais pré-tratados com o veículo (solução de etanol 70 % a 5 % em salina, via oral, volume de 10 mL/Kg) no Grupo 1, indometacina (via oral, dose de 10 mg/Kg) no Grupo 2, morfina (via oral, dose de 10 mg/Kg) no Grupo 3 e EECv (cascas) (via oral, dose de 300 mg/Kg) no Grupo 4. As leituras foram realizadas depois de 1 hora do pré-tratamento, durante o tempo de 15-30 minutos logo após a injeção intraplantar de formalina a 2,5 % na pata posterior direita. Cada coluna representa a média \pm DPM do tempo de lambida em segundos. * representa significância estatística $P < 0,05$ e ** $P < 0,01$, quando comparados ao Grupo 1 (controle negativo).

6. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

No presente trabalho, o estudo possuiu como ponto de partida a *Caryocar villosum*, conhecida popularmente como piquiá. O uso medicinal dessa árvore se refere à aplicação do fruto e das cascas do caule para o tratamento de algumas doenças, tais como micoses, filariose e tumores externos (MAGID *et al*, 2008). Não menos importante, o óleo do fruto é utilizado para combater dermatofitoses no Nordeste brasileiro (CHISTÉ *et al*, 2012) e, além disso, Galuppo (2004) documentou o seu uso tradicional para a cura de doenças dolorosas e inflamatórias na comunidade de Piquiatuba, localizada no estado do Pará.

Diante dos registros a respeito do uso medicinal de diferentes partes da *C. villosum*, objetivou-se avaliar as atividades antinociceptiva e anti-inflamatória de um extrato obtido a partir dessa espécie amazônica.

Sendo assim, foram obtidos dez extratos de duas diferentes matérias-primas da *C. villosum* – cascas do fruto e *pool* de sementes e polpa –, os quais foram analisados quanto ao seu teor de compostos fenólicos e flavonoides e quanto à sua atividade antioxidante, por meio da atividade sequestrante dos radicais DPPH• e ABTS•+. A eleição de um extrato, definido como o mais bioativo, levou em consideração as maiores concentrações das substâncias quantificadas, bem como os menores valores de CI₅₀ para os ensaios de ação antioxidante.

Após a realização dos primeiros testes, o extrato etanólico obtido a partir das cascas do fruto, EECv (cascas), foi declarado o mais bioativo dentre todos os extratos, pois apresentou o maior teor de flavonoides (11,27%) (Tabela 4) e o menor valor de CI₅₀ para o radical DPPH• (5,33 µg/mL) (Tabela 8).

A capacidade antioxidante do EECv (cascas) se fundamenta no fato de que no extrato existem substâncias doadoras de elétrons ou hidrogênio e que, por sua vez, sequestram o radical DPPH•. A solução de radical DPPH• possui uma cor violeta e que, na presença de uma

substância antioxidante, se torna amarela, uma vez que a absorbância da reação diminui. Isso ocorre devido à captura dos elétrons desemparelhados dos átomos de nitrogênio, que estão presentes na solução do radical DPPH•, quando estes recebem átomos de hidrogênio oriundos de compostos antioxidantes (SUCUPIRA *et al*, 2012).

Apesar do EECv (cascas) não ter alcançado o menor valor de CI₅₀ no teste do radical ABTS•+, o mesmo também apresentou atividade antioxidante para esse ensaio. Da mesma forma como para o radical DPPH•, há no extrato substâncias doadoras de elétrons e capazes de capturar o cátion ABTS•+, que naturalmente possui a cor azul esverdeada. Com isso, o cátion é reduzido a ABTS, o qual possui sua cor modificada devido a diminuição da absorbância na reação (SUCUPIRA *et al*, 2012).

O efeito antioxidante do EECv (cascas) visualizado nos ensaios está intimamente relacionado com a presença de compostos fenólicos (entre eles os flavonoides) no extrato e, posteriormente, será discorrido como esses metabólitos secundários presentes em plantas desencadeiam suas propriedades farmacológicas, não apenas no que se refere à ação antioxidante, mas também anti-inflamatória e antinociceptiva.

De fato, medicamentos com atividade anti-inflamatória, antineoplásica, antidiabética, antinecrótica, neuroprotetora e hepatoprotetora demonstram deter um efeito antioxidante como parte do seu mecanismo de ação (KUMAR e JAIN, 2014). Portanto, para a eleição do extrato que viria a ser submetido aos ensaios farmacológicos *in vivo*, considerou-se o teor de compostos fenólicos e flavonoides presentes no extrato e sua consequente atividade antioxidante.

Dessa forma, após a definição do EECv (cascas) como o extrato mais bioativo, o mesmo prosseguiu para a avaliação das atividades anti-inflamatória e antinociceptiva em modelos animais. Nunca antes foram avaliadas as atividades anti-inflamatória e antinociceptiva *in vivo* de um extrato obtido da *Caryocar villosum*. Sendo assim, o primeiro ensaio realizado foi o de contorções abdominais induzidas por ácido acético.

O comportamento animal característico presente no modelo de dor visceral, que envolve contrações abdominais, torções dos músculos dorsoabdominais e agitação do corpo, é induzido após a administração intraperitoneal de algum agente irritante, como o ácido acético. Tal modelo experimental é útil para a detecção de analgésicos fracos gerais, mas possui baixa especificidade, algo que pode ser melhorado com a execução prévia do teste de coordenação motora para descartar substâncias que influenciam na locomoção do animal (LE BARS *et al*, 2001).

Substâncias que não necessariamente possuem atividade analgésica, como bloqueadores adrenérgicos, relaxantes musculares e anti-histamínicos, apresentam positividade neste ensaio. Porém, uma vez que substâncias analgésicas conseguem inibir as contrações abdominais, tal método é utilizado como um *screening* de atividade antinociceptiva (LE BARS *et al*, 2001).

O teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético é um modelo de dor visceral utilizado para avaliar substâncias antinociceptivas de ação periférica em um processo de dor inflamatória aguda que acomete as camadas subcutânea e muscular da parede abdominal e os órgãos viscerais subdiafragmáticos. Na modulação da dor, é possível o estudo dos mecanismos que envolvem a ação do sistema opioidérgico e a produção de prostaglandinas via cicloxigenase, por meio da liberação de ácido araquidônico, após lesão tecidual por um agente químico (REICHERT *et al*, 2001; DE VASCONCELOS *et al*, 2011; MA *et al*, 2015).

As principais prostaglandinas produzidas e liberadas durante o processo nociceptivo causado pelo ácido acético são a PGE₂ e PGF_{2α}, porém, outras substâncias também são atuantes, a exemplo da substância P, bradicinina, serotonina, capsaicina, aminas do sistema simpático e interleucinas, como a IL-1β e TNF-α. Todos esses componentes facilitam o estímulo dos nociceptores (DERAEDT *et al*, 1980; DUARTE *et al*, 1988; RIBEIRO *et al*, 2000). Portanto, a interferência na ação dessas substâncias pode resultar em ação antinociceptiva, o qual é visualizada por meio da diminuição do número de contorções abdominais durante o tempo

analisado. Esse resultado é alcançado por meio do pré-tratamento com opioides, inibidores da cicloxigenase e produtos naturais (GAWADE, 2012; PAVAO-DE-SOUZA *et al*, 2012).

Para avaliação do possível efeito antinociceptivo do EECv (cascas), o extrato foi testado por via oral nas doses de 100 mg/Kg e 300 mg/Kg. Apenas a dose de 300 mg/Kg apresentou uma redução significativa ($p < 0,05$) do número de contorções abdominais, quando comparada com o grupo 1 (controle negativo), que recebeu o veículo (Figura 5). A dose de 100 mg/Kg não foi eficaz e não diferiu do grupo 1.

O mecanismo pelo qual o EECv (cascas) atuou possivelmente ocorreu devido a inibição da síntese ou ação de mediadores inflamatórios. Isso seria provável em relação às prostaglandinas, já que essas substâncias exercem papel fundamental na gênese da dor inflamatória aguda. Tal efeito poderia ser resultante da inibição da cicloxigenase ou das citocinas, moléculas responsáveis por ações pró-inflamatórias em geral, como o recrutamento celular para o foco inflamatório e a quebra de fosfolípidos de membrana para a produção de ácido araquidônico, o substrato da síntese de prostaglandinas.

Além disso, a morfina, da classe dos opioides, tem efeito antinociceptivo no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético (SMITH *et al*, 1982). Portanto, um outro mecanismo pelo qual o EECv (cascas) atuou no mesmo teste poderia envolver a participação da via opioidérgica.

Em razão dos métodos que avaliam a atividade antinociceptiva serem ensaios comportamentais (SILVA *et al*, 2013), foi importante realizar o ensaio de coordenação motora para o EECv (cascas).

O teste de *rota-rod* é o método tradicional para avaliar a coordenação motora de camundongos e ratos, no qual os animais são colocados em uma barra suspensa giratória e são analisados quanto ao tempo que permanecem caminhando sem cair. No que concerne aos testes comportamentais em modelos animais, sabe-se que é preciso interpretar a resposta

comportamental para avaliar a atividade biológica desejada. Entretanto, comportamento é visto por meio de ações e estas, por sua vez, exigem capacidade motora eficaz para serem executadas (DEACON, 2013).

A redução na coordenação motora pode ser causada devido à presença de compostos no extrato que causam efeitos tóxicos ou sedativos. Além do mais, sabe-se que substâncias que não possuem necessariamente ação analgésica podem interferir na resposta motora, como bloqueadores adrenérgicos e relaxantes musculares (LE BARS *et al*, 2001; JOANNA *et al*, 2014).

Sendo assim, o teste de coordenação motora foi realizado para verificar se o EECv (cascas) possui em sua composição algum componente que desencadeie incoordenação motora, comprometendo assim as respostas (como a lambida da pata no teste da formalina ou a retirada da pata na hiperalgesia mecânica induzida por carragenina) nos ensaios que avaliam a atividade antinociceptiva, excluindo assim a possibilidade do possível efeito antinociceptivo do extrato ser um falso positivo e decorrente de sedação ou relaxamento muscular.

Como observado pelos resultados, o EECv na dose de 300 mg/Kg não produziu relaxamento muscular ou sedação, uma vez que os animais que receberam o extrato permaneceram caminhando na barra giratória antes e após o pré-tratamento durante o tempo total da avaliação motora, sem apresentar diferenças significativas com o grupo que recebeu apenas o veículo (controle negativo) (Figura 4). Da mesma forma, o veículo utilizado no extrato não desencadeou qualquer alteração motora.

Isso significa que a atividade antinociceptiva, anteriormente observada no ensaio de contorções abdominais induzidas por ácido acético, não foi decorrente à presença de algum componente no EECv (cascas) que causasse incoordenação motora. Além disso, os possíveis efeitos a serem observados nos ensaios comportamentais de atividade antinociceptiva subsequentes não seriam associados a uma redução da capacidade motora por parte do extrato.

De modo a verificar se ação antinociceptiva do EECv (cascas), observada no ensaio de contorções abdominais induzidas por ácido acético, poderia ser decorrente de uma ação anti-inflamatória, o ensaio de edema de pata induzido por carragenina foi realizado em seguida.

O edema de pata induzido por carragenina é um modelo de inflamação animal muito consolidado no que diz respeito à busca por novos agentes anti-inflamatórios naturais ou sintéticos. Esta metodologia é bastante utilizada para o estudo dos mecanismos envolvidos na inflamação e muitos AINES apresentam eficácia tanto nos modelos que utilizam camundongos quanto naqueles que utilizam ratos (POSADAS *et al*, 2004; MUHAMMAD *et al*, 2012).

A inflamação é um processo natural de defesa do organismo, em resposta ao dano celular e injúria tecidual, desencadeado para combater o agente nocivo e sua disseminação, bem como remover as células e tecidos danificados para reestabelecer a homeostasia. Essa reação causa eritema, dor, edema, calor e perda da função, mediante à liberação de diversos mediadores pró-inflamatórios e o aumento da permeabilidade vascular, que levam ao extravasamento de líquido e migração de células inflamatórias (HAFEEZ *et al*, 2013; GUPTA *et al*, 2015).

Essa sequência de eventos se inicia quando os leucócitos presentes na corrente sanguínea reconhecem e respondem ao estímulo nocivo. Em seguida, moléculas de adesão são expressas ao longo da parede dos vasos e favorecem a migração de outras células inflamatórias que estão em outros sítios para o foco reativo (SILVA *et al*, 2011).

Associadamente, as células residentes liberam diversos mediadores inflamatórios como a PGE₂, TXA₂, IL-1 β , IL-1, IL-6, TNF- α , leucotrienos LTD₄, NO, entre outros, que causam a vasodilatação por modificação do tônus vascular. Logo após, ocorre o recrutamento de leucócitos no local inflamado, devido à permeabilidade ampliada nos vasos sanguíneos, e consequente infiltração celular. Tais células migratórias também liberam mediadores inflamatórios que ajudam a manter este ciclo até a sua resolução (SILVA *et al*, 2011).

Sendo assim, após a injeção subcutânea de carragenina nas patas dos animais, a resposta a todos esses processos é visualizada por meio da medição do edema formado, o qual pode ser inibido por substâncias que modulam o processo inflamatório (MORRIS, 2003).

A formação do edema neste modelo de inflamação animal ocorre de forma bifásica, no qual a fase inicial, que ocorre até 2 horas depois da injeção de carragenina, é caracterizada pela vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e um edema não-fagocítico. A fase tardia ocorre a partir da segunda hora após ação da carragenina e se manifesta por uma intensa formação de edema. A primeira fase é mediada pela liberação de histamina, bradicinina e serotonina, ao passo que a segunda fase ocorre devido à grande produção de prostaglandinas (MUHAMMAD *et al*, 2012).

Por meio dos resultados obtidos no ensaio do edema de pata induzido por carragenina, a administração por via oral do EECv (cascas), na dose de 300 mg/Kg, reduziu significativamente ($p < 0,001$) a formação do edema quando comparado ao grupo que recebeu o veículo (controle negativo) (Figura 6). Tal efeito foi observado a partir da segunda hora após a administração intraplantar de carragenina e perdurou até a quarta hora, sendo semelhante ao efeito observado pela indometacina (controle positivo), um anti-inflamatório não esteroideal inibidor da cicloxigenase.

Portanto, o EECv (cascas) apresentou atividade anti-inflamatória e antiedematogênica possivelmente devido à inibição da síntese de prostaglandinas, efeito este decorrente da inibição da cicloxigenase ou outra via da inflamação.

Conforme já descrito anteriormente, a injeção de carragenina na pata posterior direita em modelos experimentais desencadeia a produção e liberação de diversos mediadores, sobretudo as prostaglandinas em uma fase mais tardia, que culminam em inflamação, hiperalgesia e formação de edema. Sendo assim, AINES são eficazes em modular esses processos (RAHMAN e DICKENSON, 2013; GUPTA *et al*, 2015).

Também foi demonstrado que os opioides, como a morfina, por meio de mecanismos diferentes das dos AINES, podem diminuir a hiperalgesia, hipertermia e a formação de edema, os quais foram decorrentes da injeção de carragenina na pata de ratos. A administração prévia com naltrexona, um antagonista não seletivo dos receptores opioides, reverteu os efeitos da morfina (JORIS *et al*, 1990).

Embora já constatado o efeito anti-inflamatório e antiedematogênico do EECv (cascas) no teste do edema de pata induzido por carragenina, que contribuem também para a atividade antinociceptiva demonstrada no ensaio de contorções abdominais induzidas por ácido acético, não se excluiu a possibilidade de que o mecanismo de ação do efeito antinociceptivo do extrato também envolvesse outras vias além das referentes aos processos inflamatórios. Em função disso, foi visado o teste de hiperalgesia mecânica induzida por carragenina.

Ensaio que avaliam a atividade antinociceptiva por meio de estímulo mecânico geralmente alvejam a pata do animal, e mais raramente a cauda, para receber uma pressão de força gradativa. O aparelho utilizado nesses testes permite medir as pressões aplicadas e interromper o processo quando um limite de força é atingido, de modo a evitar lesões no membro do animal (LE BARS *et al*, 2001).

Uma vez que a pressão aumente ao ponto de ser capaz de estimular os nociceptores, é possível observar o comportamento característico de reação à dor do animal, no qual primeiramente há um movimento reflexo de retirada da pata, seguida de movimentos na tentativa de se libertar do aparelho e finalmente uma reação vocalizada. Porém, as primeiras formas como o ensaio era realizado possuíam baixa sensibilidade e outras desvantagens relatadas. Foi quando Randall e Selitto (1957) sugeriram comparar os resultados do teste obtidos entre uma pata saudável e outra previamente inflamada por meio da injeção de algum agente flogístico, principalmente a carragenina (LE BARS *et al*, 2001).

Sendo assim, o modelo experimental de hiperalgesia mecânica induzida por carragenina se baseia no fato de que a inflamação diminui o limiar de reação à dor por meio da sensibilização dos neurônios sensoriais, podendo essa reação ser modificada por meio de analgésicos narcóticos e não-narcóticos (SILVA *et al*, 2013).

No presente estudo, o ensaio de hiperalgesia mecânica induzida por carragenina foi utilizado com o objetivo de verificar se o mecanismo do efeito antinociceptivo do EECv (cascas) envolvia a participação da via opioidérgica.

Como visto nos resultados, o pré-tratamento com o EECv (cascas) por via oral, na dose de 300 mg/Kg, diminuiu significativamente ($p < 0,01$) o valor Δ limiar nociceptivo após 3 horas da administração intraplantar de carragenina, quando comparado com o grupo que recebeu somente o veículo como pré-tratamento (Figura 7). Logo, o EECv (cascas) foi capaz de reverter a hiperalgesia causada pela carragenina.

Após esse primeiro momento do ensaio, foi realizada a administração de naltrexona 30 minutos antes do pré-tratamento com o EECv (cascas) e, após 1 hora do tratamento com o extrato, foi administrada a carragenina.

Com a leitura realizada após a terceira hora da administração da carragenina, foi possível verificar que o efeito antinociceptivo do extrato visualizado anteriormente foi revertido parcialmente, uma vez que o limiar nociceptivo para o reflexo de retirada da pata diminuiu, quando comparado com o grupo que não recebeu a naltrexona antes do tratamento com o extrato (Figura 8). Portanto, ficou demonstrado assim que a ação antinociceptiva do EECv (cascas) também envolve a participação da via opioidérgica.

O avanço das pesquisas tornou mais clara a interação entre receptores opioides periféricos e a inflamação durante a ação analgésica. Nos processos inflamatórios, ocorre o aumento da síntese de receptores opioides nos neurônios ganglionares da raiz dorsal, além do

aumento do transporte e acúmulo desses receptores nos terminais periféricos dos neurônios sensoriais (SEHGAL *et al*, 2011).

Além disso, peptídeos opioides, como a β -endorfina e a Met-enkefalina, estão presentes em células imunológicas, mastócitos e queratinócitos, que após influência de quimiocinas e moléculas de adesão, migram e se acumulam nos tecidos inflamados. Após chegarem nesses sítios, outras substâncias, como as citocinas, o fator de liberação de corticotropina e o próprio estresse, induzem essas células a liberarem seus peptídeos opioides. Após se ligarem nos receptores opioides periféricos, esses peptídeos exercem ação antinociceptiva ao diminuir a excitabilidade neuronal e inibir a liberação de substâncias, tais como a substância P e o CGRP, importantes na geração da dor (SEHGAL *et al*, 2011)

O efeito antinociceptivo do EECv (cascas) na via opioidérgica poderia ser decorrente à uma ação direta de ativação dos receptores opioides periféricos ou de forma indireta, no qual haveria a modulação dos eventos que estimulam a liberação de peptídeos opioides endógenos no tecido inflamado.

Por fim, o teste da formalina foi conduzido para corroborar os resultados vistos nos demais testes e também fornecer mais detalhes acerca dos mecanismos pelos quais o EECv (cascas) atua.

O teste da formalina é utilizado para avaliar a resposta animal à uma dor moderada e contínua, decorrente de um dano tecidual. Uma vez administrada na pata posterior direita, a formalina induz um comportamento bifásico bem característico, no qual o animal lambe ou morde a pata acometida. Tal comportamento acontece devido a um estímulo nocivo persistente e que causa alterações locais no local da injeção (KATSUYAMA *et al*, 2015).

Na primeira fase (dor neurogênica), que ocorre nos primeiros 5 minutos após a administração de formalina, há a ativação direta dos nociceptores aferentes primários pela formalina, predominantemente das fibras C. Por outro lado, a segunda fase (dor inflamatória),

que ocorre entre 15 e 30 minutos após a administração do agente nocivo, corresponde a uma reação inflamatória periférica mediada pela liberação de mediadores locais tais como prostaglandinas, bradicinina, histamina e serotonina (TJØLSEN *et al*, 1992; BATISTA *et al*, 2016).

Na primeira fase, o glutamato é o principal neurotransmissor excitatório liberado. Porém, outras substâncias importantes participam na sinalização nociceptiva como a substância P, o BDNF, o CGRP e a somatostatina (DUBIN e PATAPOUTIAN, 2010; KWON *et al*, 2014). Uma vez ligada aos receptores B₁ e B₂, a bradicinina desenvolve papel importante na sinalização da dor tanto na primeira quanto na segunda fase. O uso de antagonista dos receptores de bradicinina resulta em ação antinociceptiva em ambas as fases (CORRÊA e CALIXTO, 1993).

Os mediadores inflamatórios liberados na segunda fase também levam a uma sensibilização dos nociceptores periféricos, ou seja, ocorre a diminuição do seu limiar para ativação. Como consequência haverá o aumento da resposta ao estímulo nocivo e o desencadeamento de novas descargas. Todas essas ações reforçam ainda mais a transmissão sináptica no corno dorsal da medula e fecham a integração entre os nociceptores periféricos e a sinalização central espinal/supraespinal (RAHMAN e DICKENSON, 2013; SUN *et al*, 2013; BATISTA *et al*, 2016).

É importante relatar que as diferentes fases no teste da formalina exibem diferentes mecanismos pelos quais a nocicepção é gerada, uma vez que diferentes classes de medicamentos agem em cada uma delas. Sendo assim, o tempo de lambida da pata na primeira fase é inibido por analgésicos opioides de ação central, como a morfina e a codeína, e não opioides, como o nefopam. A segunda fase é inibida não somente por AINES, como a indometacina, e corticoides, mas também por opioides de ação central e periférica (HUNSKAAR e HOLE, 1987; MALMBERG e YAKSH, 1992; OLUYOMI *et al*, 1992).

O EECv (cascas), ao ser administrado por via oral na dose de 300 mg/Kg, apresentou ação antinociceptiva eficaz somente na segunda fase do teste da formalina, reduzindo significativamente ($p < 0,05$) a dor inflamatória. Levando em consideração que esse mesmo extrato também demonstrou atividade anti-inflamatória no teste do edema de pata induzida por carragenina, o efeito antinociceptivo no teste da formalina se manifestou novamente relacionado com uma ação anti-inflamatória, como, por exemplo, a redução da ação ou produção de mediadores inflamatórios, principalmente as prostaglandinas, por meio da inibição da cicloxigenase (FARSAM *et al*, 2000). Porém, outros componentes atuantes na segunda fase poderiam estar sendo inibidos.

Ademais, tendo em vista que o EECv (cascas) apresentou efeito apenas na segunda fase do teste da formalina, sugere-se que esse extrato não possua ação central como a morfina, mas apenas ação periférica (ROSLAND *et al*, 1990). Esse possível efeito antinociceptivo periférico do extrato é consistente com o fato de que, ao ser testado na dose de 300 mg/Kg, o mesmo alcançou ação antinociceptiva no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético. Sabe-se que esse modelo de dor visceral permite a avaliação da ação antinociceptiva por mecanismos periféricos (REICHERT *et al*, 2001; SOUSA *et al*, 2012).

Muitos trabalhos em animais demonstram que os receptores opioides periféricos desencadeiam ambas as ações anti-inflamatória e antinociceptiva em tecidos inflamados, uma vez que o número de receptores opioides periféricos parece aumentar frente a uma reação inflamatória. Além disso, a administração de agonistas opioides em tecidos inflamados periféricos resulta no alívio da dor, ação essa revertida pela naloxona (VADIVELU *et al*, 2011). No presente trabalho foi constatada a participação da via opioidérgica no mecanismo de ação do EECv (cascas), uma vez que a ação antinociceptiva do extrato foi revertida parcialmente com a administração prévia de naltrexona, um antagonista não específico dos receptores opioides, no ensaio de hiperalgesia mecânica induzida por carragenina.

A busca por substâncias que atuam seletivamente no sistema opioidérgico periférico vem ganhando importância, dado que a ação de opioides sobre os receptores presentes no cérebro desencadeia efeitos adversos, tais como constipação, náuseas e vômitos, além do desenvolvimento de tolerância e dependência química (VADIVELU *et al*, 2011). Sendo assim, o efeito do EECv (cascas) sobre os receptores opioides periféricos resultaria em menos problemas relacionados aos efeitos de nível central.

Com tudo o que foi explanado até então, reforçou-se a proposição de que o EECv (cascas) possui atividade anti-inflamatória por inibição da síntese de prostaglandinas e antinociceptiva por modulação de receptores opioides periféricos e peptídeos opioides endógenos.

Os efeitos biológicos desencadeados por produtos naturais obtidos de plantas medicinais ocorrem mediante a presença de compostos presentes nos extratos, sejam eles um conjunto de determinada classe fitoquímica ou substâncias isoladas, que podem dar origem a novas moléculas bioativas. Por isso, é importante a detecção de tais compostos e relacioná-los com os ensaios farmacológicos (FILHO e YUNES, 1998).

De acordo com os resultados obtidos na prospecção fitoquímica do EECv (cascas), as classes de compostos de origem vegetal encontrados foram os compostos fenólicos e as saponinas. Dentre os tipos de compostos fenólicos detectados estavam os taninos condensados e os flavonoides, sendo este último representado por flavonóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas (Tabela 9).

Esses resultados estão de acordo com estudos prévios, nos quais compostos fenólicos e saponinas foram identificadas e/ou quantificadas em extratos feitos com a *Caryocar villosum*. No que se refere aos extratos obtidos a partir das cascas do fruto (a mesma matéria-prima do extrato submetido aos ensaios *in vivo* no presente trabalho), nos extratos etanólico e hidroetanólico foram quantificados compostos fenólicos e flavonoides (YAMAGUCHI *et al*,

2017). Saponinas também foram isoladas do extrato metanólico obtido a partir das cascas do fruto (MAGID *et al*, 2006a).

Os demais trabalhos encontrados na literatura foram feitos com extratos obtidos da polpa e das cascas do caule da *C. villosum*, matérias-primas diferentes das utilizadas para a obtenção do EECv (cascas). Porém, eles também observaram a presença de compostos fenólicos (ALMEIDA *et al*, 2012), saponinas (MAGID *et al*, 2006b), taninos e flavonoides (CHISTÉ *et al*, 2014) na espécie.

Os compostos fenólicos, como os flavonoides e os taninos, estão presentes em diversas plantas e são estudados tendo em vista as suas propriedades farmacológicas, que envolvem as atividades antioxidante, anti-inflamatória, antiagregante plaquetária, antitumoral, dentre outras. Devido a isso, essa classe de metabólitos secundários vegetais é visada para a prevenção de doenças cancerígenas, cardiovasculares e neurológicas (SILVA *et al*, 2010; CAROCHO e FERREIRA, 2013).

A capacidade antioxidante dos compostos fenólicos advém do fato de tais moléculas serem boas doadoras de hidrogênio ou elétrons, interagindo assim com EROs e ERNs para convertê-los em produtos termodinamicamente mais estáveis, o que interrompe a formação de novos radicais livres (ANGELO e JORGE, 2007). Outros fatores relacionados à ação antioxidante dos compostos fenólicos se referem à sua estrutura química, que permite estabilizar os radicais por deslocamento, e sua habilidade de quelar íons metálicos envolvidos na produção de radicais livres (PEREIRA *et al*, 2009).

Por fim, compostos fenólicos podem inibir enzimas envolvidas na formação de radicais livres, tais como isoformas do citocromo P450, xantina oxidase, lipoxigenase e cicloxigenase. Como consequência desse mecanismo de atividade antioxidante, os compostos fenólicos também exercem ação anti-inflamatória, sendo essa atividade biológica bastante estudada entre os flavonoides (PEREIRA *et al*, 2009).

Para os flavonoides, em específico, já foi relatada sua ação como agentes antioxidantes e antinociceptivos, pois podem inibir diversas enzimas relacionadas com a produção de EROs, a exemplo da cicloxigenase, lipoxigenase, glutathione S-transferase, NADPH oxidase, succinoxidase mitocondrial e monoxigenase microsomal (VELÁZQUEZ-GONZÁLEZ *et al*, 2014).

A atividade antioxidante de flavonoides também está associada com sua capacidade de inibir a COX-2, fosfatidilinositol-3-quinase, fosfatidilinositol-5-quisane, tirosina quinase e treonina quinase, todas essas enzimas atuantes no processo inflamatório e que modulam direta ou indiretamente a sinalização da dor (VELÁZQUEZ-GONZÁLEZ *et al*, 2014).

Sendo assim, a ação anti-inflamatória dos compostos fenólicos está relacionada à prevenção da produção de EROs por leucócitos (AZUMA *et al*, 1986). No modelo de edema de pata induzido por carragenina, há o aumento da expressão de óxido nítrico sintase induzível (iNOS) via ativação do NF- κ B, o que produz NO e vários outros radicais livres (formados a partir da combinação com o NO). O resultado final desses eventos leva à formação do edema. Porém, a inibição da síntese de NO reduz a inflamação induzida pela carragenina (KATAOKA *et al*, 2012).

Com relação às saponinas, diversas atividades já foram atribuídas a essa classe de substâncias, tais como antiflogística, antialérgica, imunomoduladora, hipoglicemiante, hipolipemiante, antineoplásica, antifúngica, entre outras (LACAILLE-DUBOIS e WAGNER, 1996; THAKUR *et al*, 2011).

Alberto *et al* (2009) demonstraram que compostos fenólicos possuem a capacidade de inibir a COX-1 e COX-2, enzimas relacionadas com a produção de mediadores inflamatórios, principalmente a PGE₂. No mesmo trabalho, a inibição enzimática das duas isoformas da cicloxigenase foi proporcional ao aumento da concentração dos compostos fenólicos presentes nos extratos testados. Além disso, no referido trabalho, os extratos exibiram atividade

antioxidante como doadores de hidrogênio nos ensaios de atividade sequestrante dos radicais ABTS^{•+} e DPPH[•], efeitos esses relacionados também com a presença de compostos fenólicos.

Portanto, a ação anti-inflamatória do EECv (cascas) na dose de 300 mg/Kg (via oral), observada no ensaio de edema de pata induzido por carragenina, pode ser relacionada com a presença de compostos fenólicos no extrato, como taninos condensados e flavonoides. Tal atividade biológica seria decorrente da capacidade dessas substâncias de inibir a ciclooxigenase (ALBERTO *et al*, 2009).

Além disso, a atividade antioxidante do extrato, também relacionada com a presença de compostos fenólicos, nos ensaios dos radicais ABTS^{•+} e DPPH[•] também colaboraria parcialmente com uma atividade anti-inflamatória, uma vez que espécies reativas são liberadas na inflamação e, portanto, potencializam a resposta inflamatória (CARNIGLIA *et al*, 2017).

Da mesma forma, o efeito antinociceptivo do EECv (cascas) na dose de 300 mg/Kg (via oral), observado nos ensaios de contorções abdominais induzidas por ácido acético, hiperalgesia mecânica induzida por carragenina e na segunda fase do teste da formalina, pode ser decorrente das atividade anti-inflamatória e antioxidante exercidas por compostos fenólicos no extrato, através dos mecanismos já discutidos anteriormente e que envolvem a inibição da produção de mediadores pró-inflamatórios como as prostaglandinas e os radicais livres.

Os resultados obtidos na análise por ESI-MS do presente estudo indicaram que as substâncias majoritárias presentes no EECv (cascas) foram o ácido gálico e o ácido *p*-coumaroilquínico (Figura 3), dois compostos fenólicos já encontrados em extratos obtidos a partir da polpa da *Caryocar villosum* (CHISTÉ *et al*, 2012).

O ácido gálico, ou ácido 3,4,5-trihidroxibenzoico, é um metabólito secundário presente na maioria das plantas superiores e pode ser encontrado na forma livre ou complexado com outras moléculas. Juntamente com seus derivados, está contido em várias partes da planta, tais como frutos, sementes, galhos, folhas, raízes, dentre outras. É conhecido por sua atividade

antioxidante, porém também detém outras ações como a anti-inflamatória, anticancerígena e antimicrobiana (DAGLIA *et al*, 2014; FERNANDES e SALGADO, 2016). Suas ações farmacológicas estão relacionadas com a inibição da via de sinalização do NF- κ B, COX-2, histona acetiltransferase e o receptor potencial transitório canônico do tipo 5 (TREVISAN *et al*, 2014).

É possível encontrar na literatura pesquisas que fundamentam a contribuição do ácido gálico para as atividades anti-inflamatória e antinociceptiva do EECv (cascas) no presente trabalho.

Fras *et al* (2018) verificaram o efeito antinociceptivo do extrato hidroetanólico das folhas de *Tocoyena formosa* em camundongos. As doses administradas aos animais inibiram o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético, o tempo de lambida da pata nas duas fases do teste da formalina e a hiperalgesia mecânica induzida por formalina, além de aumentarem o tempo de latência na placa quente. Na análise fitoquímica do extrato foi detectada a presença de ácido gálico e ácido elágico, também presente no EECv (cascas), entre outros compostos. Os autores também concluíram que a atividade antinociceptiva constatada envolvia os sistemas opioidérgico, glutamatérgico, vanilóide e NO/guanosina 3'5'-monofosfato cíclico.

No trabalho realizado por Raafat e Samy (2014), camundongos foram submetidos a um modelo de dor neuropática diabética induzida por aloxana e avaliados quanto ao possível efeito antinociceptivo do extrato etanólico das cascas do fruto da *Punica granatum* e do ácido gálico, que foi considerado o composto mais ativo do extrato por meio do fracionamento bioguiado. Como resultados, tanto o extrato quanto o ácido gálico foram capazes de aumentar o tempo de latência dos animais nos testes de placa quente e retirada da cauda, inibindo assim a hiperalgesia decorrente da diabetes. Os efeitos do extrato foram atribuídos à presença do ácido gálico, sendo

considerada também a atividade antioxidante do extrato como parte do seu mecanismo antinociceptivo.

As atividades antinociceptiva e anti-inflamatória para o extrato metanólico do fruto de *Bridelia retusa* foram avaliadas por Kumar e Jain (2014) em modelos animais. A administração do extrato diminuiu o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético e o tempo de lambida da pata apenas na segunda fase do teste da formalina. No que diz respeito à ação anti-inflamatória, o extrato inibiu a formação do edema nos testes de edema de pata induzida por carragenina, histamina, serotonina, ácido araquidônico e formalina; e no teste de edema de orelha induzida por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato.

Ademais, o número total de leucócitos na pata inflamada por carragenina reduziu nos animais que foram pré-tratados com o extrato, como também houve uma diminuição da atividade da mieloperoxidase (MPO), uma enzima presente em leucócitos envolvida na produção de EROs. Sendo assim, os efeitos farmacológicos do extrato metanólico do fruto de *Bridelia retusa* foram fortemente atribuídos ao ácido gálico e ácido elágico presentes no extrato, tidos como os principais contribuintes da atividade anti-inflamatória (KUMAR e JAIN, 2014).

Um estudo realizado com o fruto da *Punica granatum* por BenSaad *et al* (2014) verificou que o extrato etanólico produziu efeito antinociceptivo ao reduzir o número de contorções no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético, aumentar o tempo de latência no teste da retirada da cauda e diminuir a hiperalgesia induzida por carragenina. Tais efeitos foram atribuídos à presença de ácido gálico, ácido elágico e punicalaginas A e B no extrato.

Posteriormente, BenSaad *et al* (2017) isolaram o ácido gálico da fração em acetato de etila do extrato etanólico do fruto da *Punica granatum* e o avaliaram quanto a sua atividade anti-inflamatória em teste *in vitro* de inflamação induzida por LPS utilizando células. Como resultado, as células tratadas com o ácido gálico apresentaram uma inibição da produção de

nitrito (um produto do NO), PGE₂ e IL-6, todos mediadores inflamatórios produzidos pela presença de LPS, que foram quantificados no meio celular.

Em um modelo de cistite hemorrágica induzida por ciclofosfamida, o ácido gálico administrado aos camundongos apresentou ações antinociceptiva e anti-inflamatória, reduzindo a formação do edema e a hemorragia provocados pela ciclofosfamida, além de diminuir a peroxidação lipídica no fígado (BOEIRA *et al*, 2011).

Trevisan *et al* (2014) avaliaram a possível ação antinociceptiva e antiedematogênica do ácido gálico como um antagonista dos canais iônicos TRPA1 em modelos animais de dor. Sabe-se que esses receptores, presentes nos terminais nociceptores, são responsáveis por produzir novos potenciais de ação e contribuir com a dor inflamatória, uma vez que são ligados por diversos mediadores inflamatórios (FISCHER *et al*, 2017; PINHO-RIBEIRO *et al*, 2017).

Como resultados, o ácido gálico foi capaz de diminuir o influxo de Ca²⁺ induzido por cinamaldeído nos sinaptossomas de camundongos. Tal efeito de antagonismo não foi relacionado com a atividade antioxidante do ácido gálico, demonstrada pelo teste do radical DPPH•. Foi demonstrada também a ação do ácido gálico em reduzir a nocicepção espontânea induzida por cinamaldeído e isotiocianato de alila, agonistas dos TRPA1, além da redução do edema e nocicepção induzidos pela administração de peróxido de hidrogênio. Por fim, o tratamento com o ácido gálico nos animais levou a uma redução da alodinia mecânica e edema induzidos por carragenina em um modelo de dor inflamatório, bem como a alodinia mecânica e térmica sensível ao frio em um modelo de dor neuropática (TREVISAN *et al*, 2014).

O efeito anti-inflamatório do ácido gálico contribuiu para uma ação gastroprotetora e foi demonstrado no modelo de lesão gástrica causada por isquemia/reperfusão em ratos. A análise dos tecidos da mucosa gástrica por *western blotting* revelou que os animais que receberam o ácido gálico como pré-tratamento apresentaram uma diminuição da expressão de iNOS, uma enzima pró-inflamatória produtora de NO (MARD *et al*, 2015).

Finalmente, os camundongos pré-tratados com ácido gálico apresentaram uma melhora significativa dos sintomas no modelo de colite ulcerativa induzida por sulfato de sódio dextrana. Tal resultado foi decorrente da diminuição da expressão de mediadores inflamatórios, como a iNOS, COX-2 e citocinas pró-inflamatórias, além da diminuição da atividade da MPO (PANDURANGAN *et al*, 2015).

Com relação ao ácido *p*-coumaroilquínico, trata-se de um ácido fenólico pertencente à classe dos ácidos clorogênicos (CGAs). Os CGAs são ésteres formados entre ácidos hidroxicinâmicos, como o cafeico, ferúlico e o *p*-cumárico, e o ácido quínico. Além do *p*-coumaroilquínico, outras estruturas conjugadas ocorrem, tais como como os ácidos cafeoilquínico, dicafeoilquínico e feruloilquínico (FARAH e DONANGELO, 2006; LIANG e KITTS, 2016).

São encontrados principalmente nos grãos de café, mas também em outros vegetais, frutas e ervas. Os efeitos benéficos decorrentes do consumo desses alimentos são relacionados em parte com à presença de CGAs, os quais carregam evidências de possuírem atividades biológicas como a anti-inflamatória, antioxidante e antibacteriana (LIANG e KITTS, 2016). Além disso, já foi demonstrado que os seus derivados 1,5- γ -quinolactônicos possuem atividade hipoglicemiante e nos receptores opioides μ e de adenosina (FARAH e DONANGELO, 2006).

Devido a sua estrutura química, todos os CGAs são potenciais antioxidantes atuantes como doadores de átomos de hidrogênio, o que leva à erradicação da produção de radicais livres. Sendo assim, esses compostos podem capturar radicais DPPH•, ABTS•+, hidroxila, superóxido (O_2^-) e peroxinitrito ($ONOO^-$). Em seguida, os mesmos sofrem oxidação e é formado o seu radical fenoxila, o qual é estabilizado por ressonância (LIANG e KITTS, 2016).

Quanto às ações anti-inflamatórias, já foi demonstrado em diversos estudos que os CGAs podem reduzir a expressão e produção de mediadores pró-inflamatórios, tais como IL-

1 β , IL-8, IL-6, entre outros, em células estimuladas com IFN- γ , TNF- α e LPS. Também podem inibir a expressão de COX-2 por inibir a sinalização via NF- κ B (LIANG e KITTS, 2016).

A maioria dos trabalhos que demonstram a atividade antioxidante e anti-inflamatória dos CGAs utilizaram o ácido 5-cafeoilquínico (LIANG e KITTS, 2016). Porém, os efeitos antioxidante e anti-inflamatório do EECv (cascas) constatados no presente trabalho, que também contribuíram para a sua atividade antinociceptiva, podem estar relacionados ao ácido *p*-coumaroilquínico, devido as características químicas e farmacológicas relatadas para os CGAs.

Portanto, as ações antinociceptiva e anti-inflamatória do EECv (cascas) estão atribuídas à presença de compostos fenólicos no extrato, principalmente o ácido gálico e ácido *p*-coumaroilquínico, tidos como os compostos majoritários e que contribuem para as ações farmacológicas observadas neste estudo. Tal proposição é válida, visto que os compostos fenólicos modulam direta e indiretamente os mecanismos relacionados à dor, inflamação e estresse oxidativo.

7. CONCLUSÃO

O extrato etanólico obtido das cascas do fruto da *C. villosum* apresentou atividade anti-inflamatória, ao reduzir a formação do edema na fase tardia do teste do edema de pata induzida por carragenina, e antinociceptiva, ao inibir o número de contorções induzidas por ácido acético, a hiperalgesia mecânica induzida por carragenina e o tempo de lambida da pata na segunda fase do teste de da formalina.

Esses efeitos farmacológicos são provavelmente devido à inibição de mediadores inflamatórios, principalmente as prostaglandinas. Já a ação antinociceptiva periférica pode também ser decorrente da atividade anti-inflamatória e também envolve a participação da via opioidérgica, seja por ativação direta de receptores opioides ou modulação da ação de peptídeos opioides endógenos. As atividades farmacológicas do EECv (cascas) estão atribuídas à presença de compostos fenólicos, sendo os ácidos gálico e *p*-coumaroilquínico as principais substâncias detectadas.

Indubitavelmente, são necessários o isolamento das moléculas presentes no extrato, para esclarecer qual ou quais compostos são responsáveis pelos efeitos anti-inflamatórios e antinociceptivos do EECv (cascas), bem como estudos mais específicos que elucidam e comprovam os seus mecanismos de ação envolvidos no processo nociceptivo e inflamatório.

Os resultados obtidos neste trabalho atestam o uso popular medicinal não apenas do óleo da *Caryocar villosum*, mas também das cascas do seu fruto, podendo estas partes da planta serem utilizadas para o tratamento e alívio de enfermidades de natureza dolorosa e inflamatória, o que possibilita a essa espécie a oportunidade de ser estudada tecnologicamente para a obtenção de um fitomedicamento.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AICH, A.; AFRIN, L. B.; GUPTA, K. Mast cell-mediated mechanisms of nociception. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 12, p. 29069–29092, 2015.

AINSWORTH, E. A; GILLESPIE, K. M. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin-Ciocalteu reagent. **Nature protocols**, v. 2, n. 4, p. 875–877, 2007.

ALBERTO, M. R.; ZAMPINI, I. C.; ISLA, M. I. Inhibition of cyclooxygenase activity by standardized hydroalcoholic extracts of four Asteraceae species from the Argentine Puna. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 42, n. 9, p. 787–790, 2009.

AL-KHRASANI, M. et al. The central versus peripheral antinociceptive effects of mu-opioid receptor agonists in the new model of rat visceral pain. **Brain Res Bull**, v. 87, p. 238–243, 2012.

ALMEIDA, M. R. et al. Antigenotoxic Effects of Piquiá (*Caryocar villosum*) in Multiple Rat Organs. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 67, n. 2, p. 171–177, 2012.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1–9, 2007.

ASCARI, J.; TAKAHASHI, J. A.; BOAVENTURA, M. A. D. The Phytochemistry and Biological Aspects of Caryocaraceae Family. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 15, n. 2, p. 293–308, 2013.

AZUMA, Y. et al. Pharmacological studies on the anti-inflammatory action of phenolic compounds. **J Dent Res**, v. 65, n. 1, p. 53-56, 1986.

BALIKI, M. N.; APKARIAN, A. V. Nociception, Pain, Negative Moods, and Behavior Selection. **Neuron**, v. 87, n. 3, p. 474–491, 2015.

BARANIUK, J. N. Rise of the sensors: Nociception and pruritus. **Current Allergy and Asthma Reports**, v. 12, n. 2, p. 104–114, 2012.

BARRETO, G. P. M.; BENASSI, M. T.; MERCADANTE, A. Z. Bioactive compounds from several tropical fruits and correlation by multivariate analysis to free radical scavenger activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 10, p. 1856–1861, 2009.

BASBAUM, A. I.; CLANTON, C. H.; FIELDS, H. L. Opiate and stimulus-produced analgesia: functional anatomy of a medullospinal pathway. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 73, n. 12, p. 4685–4688, 1976.

BASTOS, D. H. M. et al. Phenolic antioxidants identified by ESI-MS from yerba maté (*Ilex paraguariensis*) and green tea (*Camelia sinensis*) extracts. **Molecules**, v. 12, n. 3, p. 423–432, 2007.

BATISTA, E. K. F. et al. Atividades antinociceptiva e antiinflamatória do extrato etanólico de *Luehea divaricata*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 2, p. 433–441, 2016.

BEFORT, K. Interactions of the opioid and cannabinoid systems in reward: Insights from knockout studies. **Frontiers in Pharmacology**, v. 6, n. 6, p. 1–15, 2015.

BENSAAD, L. A. et al. Anti-inflammatory potential of ellagic acid, gallic acid and punicalagin A&B isolated from *Punica granatum*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 17, n. 1, p. 1–10, 2017.

BENSAAD, L.; HWI, K. K.; QUAH, T. Evaluation of the antinociceptive effect of the ethanolic extract of *Punica granatum*. **African journal of traditional, complementary, and alternative medicines : AJTCAM**, v. 11, n. 3, p. 228–33, 2014.

BERRENDERO, F. et al. Neurobiological mechanisms involved in nicotine dependence and reward: participation of the endogenous opioid system. **Neurosci Biobehav Rev**, v. 35, n. 2, p. 220–231, 2010.

BJURSTROM, M. F.; GIRON, S. E.; GRIFFIS, C. A. Cerebrospinal Fluid Cytokines and Neurotrophic Factors in Human Chronic Pain Populations: A Comprehensive Review. **Pain Practice**, v. 16, n. 2, p. 183–203, 2016.

BOEIRA, V. T. et al. Effects of the hydroalcoholic extract of *Phyllanthus niruri* and its isolated compounds on cyclophosphamide-induced hemorrhagic cystitis in mouse. **Naunyn Schmiedeberg's Arch Pharmacol**, v. 384, n. 3, p. 265-275, 2011.

BUJALSKA-ZADROŻNY, M. et al. Dose-depending effect of intracerebroventricularly administered bradykinin on nociception in rats. **Pharmacological Reports**, v. 65, n. 4, p. 1006–1011, 2013.

CARNIGLIA, L. et al. Neuropeptides and Microglial Activation in Inflammation, Pain, and Neurodegenerative Diseases. **Mediators of Inflammation**, p. 1–23, 2017.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. The role of phenolic compounds in the fight against cancer - a review. **Anticancer Agents Med Chem**, v. 13, n. 8, p. 1236-1258, 2013.

CARR, F. B.; ZACHARIOU, V. Nociception and pain: lessons from optogenetics. **Frontiers in behavioral neuroscience**, v. 8, p. 1–6, 2014.

CARVALHO, W. A.; LEMÔNICA, L. Mecanismos celulares e moleculares da dor inflamatória. Modulação periférica e avanços terapêuticos. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 48, n. 2, p. 137–58, 1998.

CAYLA, C. et al. Impaired nociception and peripheral opioid antinociception in mice lacking both kinin B1 and B2 receptors. **Anesthesiology**, v. 116, n. 2, p. 448–57, 2012.

CHAKIATH, R. J. et al. Descending pain modulation in irritable bowel syndrome (IBS): a systematic review and meta-analysis. **Systematic reviews**, v. 4, p. 175–180, 2015.

CHANG, C. C. et al. Estimation of Total Flavonoid Content in Propolis by Two Complementary Colorimetric Methods. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 10, n. 3, p. 178–182, 2002.

CHEN, L.; YANG, G.; GROSSER, T. Prostanoids and inflammatory pain. **Prostaglandins and Other Lipid Mediators**, v. 104–105, p. 58–66, 2013.

CHIOU, L. C.; HU, S. S. J.; HO, Y. C. Targeting the cannabinoid system for pain relief? **Acta Anaesthesiologica Taiwanica**, v. 51, n. 4, p. 161–170, 2013.

CHISTÉ, R. C. et al. The potential of extracts of *Caryocar villosum* pulp to scavenge reactive oxygen and nitrogen species. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1740–1749, 2012.

CHISTÉ, R. C.; DE TOLEDO BENASSI, M.; MERCADANTE, A. Z. Efficiency of different solvents on the extraction of bioactive compounds from the amazonian fruit *Caryocar villosum*

and the effect on its antioxidant and colour properties. **Phytochemical Analysis**, v. 25, n. 4, p. 364–372, 2014.

CHISTÉ, R. C.; MERCADANTE, A. Z. Identification and quantification, by HPLC-DAD-MS/MS, of carotenoids and phenolic compounds from the Amazonian fruit *Caryocar villosum*. **Journal Of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 5884–5892, 2012.

CLAUDINO, Rafaela Franco. **Caracterização farmacológica e molecular dos mecanismos envolvidos no edema de pata induzido pela prostaglandina E₂ (PGE₂) em camundongos**. 2006. 99 f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Pós-graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

CLAY, J. W.; SAMPAIO, P. T. B.; CLEMENTE, C. R. **Biodiversidade Amazônica: valorização da biodiversidade**. Edição do Autor, Manaus, 2000, 12 p.

COBELLI, N. et al. Mediators of the inflammatory response to joint replacement devices. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 7, n. 10, p. 600–608, 2011.

CORRÊA, C. R.; CALIXTO, J. B. Evidence for participation of B1 and B2 kinin receptors in formalin-induced nociceptive response in the mouse. **British Journal of Pharmacology**, v. 110, n. 1, p. 193–198, 1993.

CORTELLI, P. et al. Nociception and autonomic nervous system. **Neurological Sciences**, v. 34, s41–s46, 2013.

COSTA, Aluisio Fernandes. **Farmacognosia Experimental**. 3ª Edição. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa, 2002, 992 p.

COUTAUX, A. et al. Hyperalgesia and allodynia: Peripheral mechanisms. **Joint Bone Spine**, v. 72, n. 5, p. 359–371, 2005.

CRISTINO, L. et al. Orexin-A and Endocannabinoid Activation of the Descending Antinociceptive Pathway Underlies Altered Pain Perception in Leptin Signalling Deficiency. **Neuropsychopharmacology**, v. 41, n. 2, p. 508–520, 2016.

DAGLIA, M. et al. Polyphenols: well beyond the antioxidant capacity: gallic acid and related compounds as neuroprotective agents: you are what you eat! **Curr Pharm Biotechnol**, v. 15, n. 4, p. 362-372, 2014.

DE VASCONCELOS, D. I. B. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of ouabain in mice. **Mediators of Inflammation**, v. 2011, 2011.

DEACON, R. M. J. Measuring Motor Coordination in Mice. **Journal of Visualized Experiments**, n. 75, p. 1–8, 2013.

DERAEDT, R. et al. Release of prostaglandins E and F in an algogenic reaction and its inhibition. **Eur J Pharmacol**, v. 61, n. 11, p. 17-24, 1980.

DUARTE, I. D.; NAKAMURA, M.; FERREIRA, S. H. Participation of the sympathetic system in acetic acid-induced writhing in mice. **Braz J Med Biol Res**, v. 21, n. 2, p. 341-343, 1988.

DUBIN, A. E.; PATAPOUTIAN, A. Nociceptors: The sensors of the pain pathway. **Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 11, p. 3760–3772, 2010.

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**, v. 4, p. 161–174, 1977.

DUNHAM, N. W.; MIYA, T. S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **Journal of the American Pharmaceutical Association**, v. 46, n. 3, p. 208–209, 1957.

FARAH, A.; DONANGELO, C. M. Phenolic compounds in coffee. **Brazilian Journal of Plants Physiology**, v. 18, n. 1, p. 23–36, 2006.

FARSAM, H. et al. Anti-inflammatory and analgesic activity of Biebersteinia multifida DC. root extract. **J Ethnopharmacol**, v. 71, n. 3, p. 443-447, 2000.

FEIN, A. **Nociceptores: as células que sentem dor**. Dor On Line, Ribeirão Preto, 2011, 106 p.

FERNANDES, F. H.; SALGADO, H. R. Gallic Acid: Review of the Methods of Determination and Quantification. **Crit Rev Anal Chem**, v. 46, n. 3, p. 257-265, 2016.

FERREIRA, N. et al. Dor e Analgesia em Doente Crítico. **Revista Clínica Hospital Prof Doutor Fernando Fonseca**, v. 2, n. 2, p. 17–20, 2014.

FIELDS, H. L.; BASBAUM, A. I. Central nervous system mechanisms of pain modulation. In: Wall, P, D.; Melzack, R. (eds), *Textbook of Pain*, 4th edition, Churchill Livingstone, 1999, cap. 11, p. 309–329.

FILHO, V. C.; 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**, v. 21, n. 1, p. 99–105, 1998.

FISCHER, L. et al. TRPA1, substance P, histamine and 5-hydroxytryptamine interact in an interdependent way to induce nociception. **Inflammation Research**, v. 66, n. 4, p. 311–322, 2017.

FLORES, M. P.; DE CASTRO, A. P. C. R.; NASCIMENTO, J. S. Analgésicos Tópicos. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 62, n. 2, p. 244–252, 2012.

FONT, L.; LUJÁN, M. Á.; PASTOR, R. Involvement of the endogenous opioid system in the psychopharmacological actions of ethanol: the role of acetaldehyde. **Frontiers in behavioral neuroscience**, v. 7, n. 93, p. 1–10, 2013.

FRAS, C. et al. Phytochemical profile and mechanisms involved in the anti-nociception caused by the hydroethanolic extract obtained from *Tocoyena formosa* (Cham. & Schltdl.) K. Schum (Jenipapo-bravo) leaves in mice. **Biomed Pharmacother**, v. 97, n. 1, p. 321–329, 2018.

FRIAS, B.; MERIGHI, A. Capsaicin, nociception and pain. **Molecules**, v. 21, n. 6, p. 1–33, 2016.

GALUPPO, Silvia Carla. **Documentação do uso e valorização do óleo de piquiá (*Caryocar villosum* (Aubl.) Pers) e do leite do Amapá-doce (*Brosimum parinarioides* Ducke) para a comunidade de Piquiatuba, Floresta Nacional do Tapajós. Estudos físicos, químicos, fitoquímicos e farmacológico..** 2004. 108 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais) Universidade Federal Rural da Amazônia, Belém.

GAWADE, S. Acetic acid induced painful endogenous infliction in writhing test on mice. **Journal of Pharmacology and Pharmacotherapeutics**, v. 3, n. 4, p. 348, 2012.

GODOY, Helena Teixeira Godoy. Estudo de carotenóides e pró-vitamina A em alimentos. 1993. 210 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas.

GUPTA, A. K. et al. Analgesic and anti-inflammatory properties of gelsolin in acetic acid induced writhing, tail immersion and carrageenan induced paw edema in mice. **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, 2015.

HAFEEZ, A. et al. Evaluation of Carrageenan induced anti-inflammatory activity of ethanolic extract of bark of *Ficus virens* Linn. in swiss albino mice. **The Journal of Phytopharmacology JPHYTO**, v. 2, n. 3, p. 39–43, 2013.

HEADRICK, J. P. et al. Opioid receptors and cardioprotection - “opioidergic conditioning” of the heart. **British Journal of Pharmacology**, v. 172, n. 8, p. 2026–2050, 2015.

HEMINGTON, K. S.; COULOMBE, M. A. The periaqueductal gray and descending pain modulation: Why should we study them and what role do they play in chronic pain? **Journal of Neurophysiology**, n. 2014, p. 2080–2083, 2015.

HERSINI, K. J. et al. Microdialysis of inflammatory mediators in the skin: A review. **Acta Dermato-Venereologica**, v. 94, n. 5, p. 501–511, 2014.

HUNSKAAR, S.; FASMER, O. B.; HOLE, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, n. 1, p. 69–76, 1985.

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

INUTSUKA, A. et al. The integrative role of orexin/hypocretin neurons in nociceptive perception and analgesic regulation. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–15, 2016.

JOANNA, L. et al. The antinociceptive effect of 4-substituted derivatives of 5-(4-chlorophenyl)-2-(morpholin-4-ylmethyl)-2,4-dihydro-3H-1,2,4-triazole-3-thione in mice. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 387, n. 4, p. 367–375, 2014.

JOHNSON, C. Research tools for the measurement of pain and nociception. **Animals**, v. 6, n. 11, p. 1–10, 2016.

JORIS, J. et al. Opiates suppress carrageenan-induced edema and hyperthermia at doses that inhibit hyperalgesia. **Pain**, v. 43, n. 1, p. 95-103, 1990.

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

KATAOKA, T. et al. Protective effects of radon inhalation on carrageenan-induced inflammatory paw edema in mice. **Inflammation**, v. 35, n. 2, p. 713-722, 2012.

KATSUYAMA, S. K. et al. Effect of plantar subcutaneous administration of bergamot essential oil and linalool on formalin-induced nociceptive behavior in mice. **Biomedical research (Tokyo, Japan)**, v. 36, n. 1, p. 47–54, 2015.

KATZ, J.; ROSENBLOOM, B. N. The golden anniversary of Melzack and Wall's gate control theory of pain: Celebrating 50 years of pain research and management. **Pain Research and Management**, v. 20, n. 6, p. 285–286, 2015.

KAUFMAN, G. N. et al. Nociceptive tolerance is improved by bradykinin receptor B1 antagonism and joint morphology is protected by both endothelin type A and bradykinin receptor B1 antagonism in a surgical model of osteoarthritis. **Arthritis Research & Therapy**, v. 13, n. 3, p. 1–11, 2011.

KAWABATA, A.; NISHIMURA, Y.; TAKAGI, H. L-Leucyl-L-arginine, naltrindole and D-arginine block antinociception elicited by L-arginine in mice with carrageenin-induced hyperalgesia. **Br J Pharmacol**, v. 107, n. 4, p. 1096-1101, 1992.

KLAUMANN, P. R.; WOUK, A. F. P. F.; SILLAS, T. Pathophysiology of pain. **Archives of Veterinary Science**, v. 13, n. 1, p. 1–12, 2008.

KLENOWSKI, P.; MORGAN, M.; BARTLETT, S. E. The role of δ -opioid receptors in learning and memory underlying the development of addiction. **British Journal of Pharmacology**, v. 172, n. 2, p. 297–310, 2015.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; BEER, D. E. J. Acetic acid for analgesic screening. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 18, p. 412–415, 1959.

KRUSTEV, E.; RIOUX, D.; MCDUGALL, J. J. Mechanisms and Mediators That Drive Arthritis Pain. **Current Osteoporosis Reports**, v. 13, n. 4, p. 216–224, 2015.

KULMATYCKI, K. M.; JAMALI, F. Drug disease interactions: role of inflammatory mediators in pain and variability in analgesic drug response. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical sciences**, v. 10, n. 4, p. 554–566, 2007.

KUMAR, T.; JAIN, V. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Bridelia retusa* methanolic fruit extract in experimental animals. **ScientificWorld Journal**, v. 2014, p. 1-12, 2014.

KUPRASH, D. V.; NEDOSPASOV, S. A. Molecular and cellular mechanisms of inflammation. **Biochemistry**, v. 81, n. 11, p. 1237–1239, 2016.

KWON, M. et al. The Role of Descending Inhibitory Pathways on Chronic Pain Modulation and Clinical Implications. **Pain Practice**, v. 14, n. 7, p. 656–667, 2014.

LACAILLE-DUBOIS M. A.; WAGNER, H. A review of the biological and pharmacological activities of saponins. **Phytomedicine**, v. 2, n. 4, p. 363-386, 1996.

LAJILI, S. et al. In vitro immunomodulatory activity and in vivo anti-inflammatory and analgesic potential with gastroprotective effect of the Mediterranean red alga *Laurencia obtusa*. **Pharm Biol**, v. 54, n. 11, p. 2486–2495, 2016.

LAU, B. K.; VAUGHAN, C. W. Descending modulation of pain: The GABA disinhibition hypothesis of analgesia. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 29, p. 159–164, 2014.

LAW, P. Y.; REGGIO, P. H.; LOH H. H. Opioid receptors: toward separation of analgesic from undesirable effects. **Trends Biochem Sci**, v. 38, n. 6, p.275–282, 2013.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. W. Animal models of nociception. **Pharmacological reviews**, v. 53, n. 4, p. 597–652, 2001.

LEAL, J. S. et al. Pequiá-Based Nanoemulsion Highlights an Important Amazon Fruit (*Caryocar villosum* (aubl.) pers.). **Journal of Nanomedicine Research**, v. 4, n. 1, p. 1–4, 2016.

LEE, C. W. S.; HO, I. K. Sex differences in opioid analgesia and addiction: interactions among opioid receptors and estrogen receptors. **Molecular Pain**, v. 9, n. 45, p. 1–10, 2013.

LESNIAK, A.; LIPKOWSKI, A. W. Opioid peptides in peripheral pain control. **Acta Neurobiologiae Experimentalis**, v. 71, n. 1, p. 129–138, 2011.

LEVY, L. Carrageena paw edema in the mouse. **Life Sci**, v. 18, n. 11, p. 601–606, 1969.

LIANG, N.; KITTS, D. D. Role of chlorogenic acids in controlling oxidative and inflammatory stress conditions. **Nutrients**, v. 8, n. 1, p. 1–20, 2016.

LIM, J. Y.; PARK, C. K.; HWANG, S. W. Biological Roles of Resolvins and Related Substances in the Resolution of Pain. **BioMed Research International**, p. 1–14, 2015.

LINLEY, J. E. et al. Understanding inflammatory pain: Ion channels contributing to acute and chronic nociception. **Pflugers Archiv European Journal of Physiology**, v. 459, n. 5, p. 657–669, 2010.

LINNMAN, C. et al. Neuroimaging of the periaqueductal gray: State of the field. **NeuroImage**, v. 60, n. 1, p. 505–522, 2012.

LIU, H. et al. Role of the cerebrospinal fluid-contacting nucleus in the descending inhibition of spinal pain transmission. **Experimental Neurology**, v. 261, p. 475–485, 2014.

MA, S. et al. Analgesic Effect of Chinese Herbal Formula Hua-Jian-Ba-Du Ointment on Visceral Pain in Mice Induced by Acetic Acid. **Integr Cancer Ther**, v. 14, n. 3, p. 282-290, 2015.

MAGID, A. A. et al. Phenolic glycosides from the stem bark of *Caryocar villosum* and *C. glabrum*. **Journal of Natural Products**, v. 71, n. 5, p. 914–917, 2008.

MAGID, A. A. et al. Triterpenoid Saponins from the Fruits of *Caryocar villosum*. **J. Nat. Prod.**, v. 69, p. 919–926, 2006a.

MAGID, A. A. et al. Triterpenoid saponins from the stem bark of *Caryocar villosum*. **Phytochemistry**, v. 67, n. 19, p. 2096–2102, 2006b.

MALMBERG, A. B.; YAKSH, T. L. Antinociceptive actions of spinal nonsteroidal anti-inflammatory agents on the formalin test in the rat. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 263, n. 1, p. 136-146, 1992.

MALTA, L. G. et al. Assessment of antioxidant and antiproliferative activities and the identification of phenolic compounds of exotic Brazilian fruits. **Food Research International**, v. 53, n. 1, p. 417–425, 2013.

MARD, S. A. et al. The anti-inflammatory and anti-apoptotic effects of gallic acid against mucosal inflammation- and erosions-induced by gastric ischemia-reperfusion in rats. **Vet Res Forum**, v. 6, n. 4, p. 305–311, 2015.

MARTINS, R. L.; GRIBEL, R. Polinização de *Caryocar villosum* (Aubl.) Pers. (Caryocaraceae) uma árvore emergente da Amazônia Central. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 30, n. 1, p. 37–45, 2007.

MARTINS, R. T. et al. Receptores opioides até o contexto atual. **Revista Dor**, v. 13, n. 1, p. 75–79, 2012.

MARX, F.; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. Chemical composition of the fruit pulp of *Caryocar villosum*. **Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und -Forschung A**, v. 204, n. 6, p. 442–444, 1997.

MATOS, Francisco José de Abreu. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. 2ª Edição. Editora UFC, Fortaleza, 1997, 141 p.

MATTOS, Renata Ruggier de. **Efeitos da morfina em fases distintas da gestação de ratas: comportamento materno, desenvolvimento físico e neurocomportamental das proles e biologia molecular dos receptores opioides**. 2014. 187 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo.

MELZACK, R.; WALL, P. D. Pain Mechanism: A new Theory. **Science**, v. 150, n. 3699, p. 971-979, 1965.

MERRER, J. L. et al. Reward processing by the opioid system in the brain. **Physiol Rev**, v. 89, n. 4, p. 1379–1412, 2009.

MOLYNEUX, P. The Use of the Stable Free Radical Diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for Estimating Antioxidant Activity. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 26, n. 2, p. 211–219, 2004.

MOMIN, A.; MCNAUGHTON, P. A. Regulation of firing frequency in nociceptive neurons in pro-inflammatory mediators. **Exp Brain Res**, v. 196, p. 45–52, 2009.

MORAIS, Luiz Roberto Barbosa; GUTJAHR, Ekkehard. **Química de Oleaginosas: valorização da biodiversidade**. Edição do Autor, Belém, 2012, 75 p.

MORGAN, M. M.; CHRISTIE, M. J. Analysis of opioid efficacy , tolerance , addiction and dependence from cell culture to human. **Br J Pharmacol**, v. 164, n. 4, p. 1322-1334, 2011.

MORRIS, C. J. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. **Methods Mol Biol**, v. 225, p. 115-121, 2003.

MUHAMMAD, N.; SAEED, M.; KHAN, H. Antipyretic, analgesic and anti-inflammatory activity of *Viola betonicifolia* whole plant. **BMC Complement Altern Med**, v. 12, n. 59, 2012.

NAKAMURA, Y. et al. Activation of transient receptor potential ankyrin 1 evokes nociception through substance P release from primary sensory neurons. **Journal of Neurochemistry**, v. 120, n. 6, p. 1036–1047, 2012.

NASH B.; MEUCCI, O. Functions of the chemocine receptor CXCR4 in the central nervous system and its regulation by μ -opioid receptors. **Int Rev Neurobio**, v. 118, p. 105–128, 2014.

NINKOVIĆ, J.; ROY, S. Role of the mu opioid receptor in opioid modulation of immune function. **Amino Acids**, v. 45, n. 1, p. 9–24, 2014.

NOBLE, F.; LENOIR, M.; MARIE, N. The opioid receptors as targets for drug abuse medication. **British Journal of Pharmacology**, v. 172, n. 16, p. 3964–3979, 2015.

NUNOMURA, R. C. S.; OLIVEIRA, V. G.; NUNOMURA, S. M. Characterization of Bergenin in *Endopleura uchi* Bark and its anti-inflammatory activity. **J Braz Chem Soc**, v. 20, n. 6, p. 1060–1064, 2009.

OLIVEIRA, M. A. et al. Aplicação De Terpenos Como Agentes Analgésicos: Uma Prospecção Tecnológica. **GEINTEC-Gestão, Inovação e Tecnologias**, v. 4, n. 4, p. 1292–1298, 2014.

OLUYOMI, A. O.; HART, S. L.; SMITH, T. W. Differential antinociceptive effects of morphine and methylnorphine in the formalin test. **Pain**, v. 49, n. 3, p. 415-418, 1992.

OSSIPOV, M. H.; DUSSOR, G. O.; PORRECA, F. Central modulation of pain. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 120, n. 11, p. 3779–3787, 2010.

OSSIPOV, M. H.; MORIMURA, K.; PORRECA, F. Descending pain modulation and chronification of pain. **Curr Opin Support Palliat Care**, v. 8, n. 2, p. 143–151, 2014.

PANDURANGAN, A. K. et al. Gallic acid suppresses inflammation in dextran sodium sulfate-induced colitis in mice: Possible mechanisms. **Int Immunopharmacol**, v. 28, n. 2, p. 1034–1043, 2015.

PASTERNAK, G. W. Opiate Pharmacology and Relief of Pain. **J Clin Oncol**, v. 32, n. 16, p. 1655–1661, 2014.

PAVAO-DE-SOUZA, G. F. et al. Acetic acid- and phenyl-p-benzoquinone-induced overt pain-like behavior depends on spinal activation of MAP kinases, PI₃K and microglia in mice. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 101, n. 3, p. 320–328, 2012.

PEREIRA, D. M. et al. Phenolics: From chemistry to biology. **Molecules**, v. 14, n. 6, p. 2202–2211, 2009.

PEREIRA, F. C. et al. A single exposure to morphine induces long-lasting hyporeactivity of rat caudate putamen dopaminergic nerve terminals. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1, p. 414–423, 2004.

PEREIRA, V. V. et al. Impressão digital de espécies de *Byrsonima* utilizando espectrometria de massas com ionização por eletrospray. **Revista Virtual de Química**, v. 7, n. 6, p. 2539–2548, 2015.

PINHO-RIBEIRO, F. A.; VERRI, W. A.; CHIU, I. M. Nociceptor Sensory Neuron–Immune Interactions in Pain and Inflammation. **Trends in Immunology**, v. 38, n. 1, p. 5–19, 2017.

PIOMELLI, D.; SASSO, O. Peripheral gating of pain signals by endogenous lipid mediators. **Nature Neuroscience**, v. 17, n. 2, p. 164–174, 2014.

POLONINI, H. C. et al. Amazon native flora oils: in vitro photoprotective activity and major fatty acids constituents. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 93, n. 1, p. 102–108, 2012.

POSADAS, I. et al. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. **British Journal of Pharmacology**, v. 142, n. 2, p. 331–338, 2004.

RAAFAT, K.; SAMY, W. Amelioration of diabetes and painful diabetic neuropathy by *Punica granatum* L. Extract and its spray dried biopolymeric dispersions. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, P. 1-12, 2014.

RAHMAN, W.; DICKENSON, A. H. Voltage gated sodium and calcium channel blockers for the treatment of chronic inflammatory pain. **Neuroscience Letters**, v. 557, p. 19–26, 2013.

RANDALL, L. O.; SELITTO, J. J. A method for measurement of analgesic activity of inflamed tissue. **Arch Int Pharmacodyn Ther**, v. 111, n. 4, p. 409-419, 1957.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. 7ª Edição, Editora Elsevier, Rio de Janeiro, 2012, 808 p.

RAZIQ, N. et al. Pharmacological basis for the use of *Hypericum oblongifolium* as a medicinal plant in the management of pain, inflammation and pyrexia. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, n. 41, p. 1–7, 2016.

REICHERT, J. A. et al. Peripheral and preemptive opioid antinociception in a mouse visceral pain model. **Pain**, v. 89, n. 2-3, p. 221-227, 2001.

REYNOLDS, D. V. Surgery in the rat during electrical analgesia induced by focal brain stimulation. **Science**, v. 164, p. 444–445, 1969.

RIBEIRO, R. A. et al. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **Eur J Pharmacol**, v. 387, n. 1, p. 111-118, 2000.

ROESLER, R. et al. Antioxidant activity of *Caryocar brasiliense* (pequi) and characterization of components by electrospray ionization mass spectrometry. **Food Chemistry**, v. 110, n. 3, p. 711–717, 2008.

ROSLAND, J. H. et al. The formalin test in mice: effect of formalin concentration. **Pain**, v. 42, n. 2, p. 235-242, 1990.

SANTOS, P. M. et al. Perfil de flavonóides e avaliação do potencial antioxidante e citotóxico de *Bauhinia purpurea* (Fabaceae) da Região Amazônica. **Quim Nova**, v. 37, n. 1, p. 89–94, 2014.

SARMENTO-NETO, J. F. et al. Analgesic potential of essential oils. **Molecules**, v. 21, n. 1, p. 1–29, 2016.

SEHGAL, N.; SMITH, H. S.; MANCHIKANTI, L. Peripherally acting opioids and clinical implications for pain control. **Pain physician**, v. 14, n. 3, p. 249–258, 2011.

SERHAN, C. N. et al. Novel anti-inflammatory – Pro-resolving mediators and their receptors. **Curr Top Med Chem**, v. 11, n. 6, p. 629–647, 2011.

SERHAN, C. N. Pro-resolving lipid mediators are leads for resolution physiology. **Nature**, v. 510, p. 92–101, 2014.

SHANG, Y.; FILIZOLA, M. Opioid receptors: structural and mechanistic insights into pharmacology and signaling. **Eur J Pharmacol**, v. 763, p. 206–213, 2015.

SILVA, J. C. et al. Modelos experimentais para avaliação da atividade antinociceptiva de produtos naturais : uma revisão. **Rev . Bras. Farm**, v. 94, n. 1, p. 18–23, 2013.

SILVA, L. R.; TEIXEIRA, R. Phenolic profile and biological potential of *Endopleura uchi* extracts. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 8, n. 11, p. 889–897, 2015.

SILVA, M. L. C. et al. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3, p. 669–682, 2010.

SILVA, M. P. et al. Inhibition of carrageenan-induced expression of tissue and plasma prekallikreins mRNA by low level laser therapy in a rat paw edema model. **Brazilian Journal of Physical Therapy**, v. 15, n. 1, p. 1–7, 2011.

SILVA, N. A. et al. Phenolic compounds and carotenoids from four fruits native from the Brazilian Atlantic forest. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 22, p. 5072–5084, 2014.

SIMÕES, Claudia Maria Oliveira. **Farmacognosia: da Planta ao Medicamento**. 6ª Edição. Editora UFRGS, Porto Alegre, 2010, 1104 p.

SMITH, T. W. et al. Peripheral antinociceptive effects of N-methyl morphine. **Life Sci**, v. 31, n. 12-13, p. 1205-1208, 1982.

SOARES, N. P. et al. Técnicas de prospecção fitoquímica e sua importância para o estudo de biomoléculas derivadas de plantas. **Enciclopédia Biosfera Centro Científico Conhecer**, v. 13, n. 24, p. 991-1010, 2016.

SOBCZAK, M. et al. Physiology, signaling, and pharmacology of opioid receptors and their ligands in the gastrointestinal tract: Current concepts and future perspectives. **Journal of Gastroenterology**, v. 49, n. 1, p. 24–45, 2014.

SOUSA, L. H. A. et al. Avaliação da ação analgésica do extrato hidroalcoólico de *Chenopodium ambrosioides* L. em ensaios pré-clínicos. **Rev Ciênc Saúde**, v. 14, n. 1, p. 73–82, 2012.

SREEKEESON, D. P.; MAHOMOODALLY, M. F. Ethnopharmacological analysis of medicinal plants and animals used in the treatment and management of pain in Mauritius. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 157, p. 181–200, 2014.

STEVENS, C. W. The evolution of vertebrate opioid receptors. **Front Biosci**, v. 14, p. 1247–1269, 2009.

SUBIRÁN, N.; CASIS, L.; IRAZUSTA, J. Regulation of male fertility by the opioid system. **Molecular Medicine**, v. 17, n. 7–8, p. 846–853, 2011.

SUCUPIRA, N. R. et al. Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos. **Revista Unopar Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 14, n. 4, p. 263–269, 2012.

SUN, J. et al. Screening non-colored phenolics in red wines using liquid chromatography/ultraviolet and mass spectrometry/mass spectrometry libraries. **Molecules**, v. 12, n. 3, p. 679–693, 2007.

SUN, Y. H. et al. Synergistic Analgesia of Duloxetine and Celecoxib in the Mouse Formalin Test: A Combination Analysis. **PLoS ONE**, v. 8, n. 10, p. 1–13, 2013.

TACON, L. A.; FREITAS, L. A. P. Box-Behnken design to study the bergenin content and antioxidant activity of *Endopleura uchi* bark extracts obtained by dynamic maceration. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 23, n. 1, p. 65–71, 2013.

THAKUR, M. et al. Chemistry and pharmacology of saponins: special focus on cytotoxic properties. **Botanics: Targets and Therapy**, v. 1, n. 1, p. 19-29, 2011.

TJØLSEN, A. et al. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, v. 51, n. 1, p. 5-17, 1992.

TOMIM, D. H. et al. The Pronociceptive Effect of Paradoxical Sleep Deprivation in Rats: Evidence for a Role of Descending Pain Modulation Mechanisms. **Molecular Neurobiology**, v. 53, n. 3, p. 1706–1717, 2016.

TORIYABE, M. et al. Contribution of interaction between nitric oxide and cyclooxygenases to the production of prostaglandins in carrageenan-induced inflammation. **Anesthesiology**, v. 101, n. 4, p. 983–990, 2004.

TRANG, T. et al. Pain and Poppies: the good, the bad ,and the ugly of opioid analgesics. **J Neurosci**, v. 35, n. 41, p. 13879–13888, 2015.

TREVISAN, G. et al. Gallic acid functions as a TRPA1 antagonist with relevant antinociceptive and antiedematogenic effects in mice. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 387, n. 7, p. 679–689, 2014.

VADIVELU, N.; MITRA, S.; HINES, R. L. Peripheral opioid receptor agonists for analgesia: A comprehensive review. **Journal of Opioid Management**, v. 7, n. 1, p. 55–68, 2011.

VALENTE, Paula Mara Rodrigues. **Potencial fungicida de extrato foliar de Caryocar villosum (Aubl.) Pers (Caryocaraceae)**. 2012. 87 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia e Recursos Naturais) - Escola Superior de Ciências da Saúde, Universidade do Estado do Amazonas, Manaus.

VANEGAS, H. A aspirina, os opiáceos e a maconha no sistema endógeno de controle da dor. **Estudos Avançados**, v. 27, n. 77, p. 23–27, 2013.

VELÁZQUEZ-GONZÁLEZ, C. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Geranium bellum* and its isolated compounds. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, n. 1, 2014.

VERMA, V.; SHEIKH, Z.; AHMED, A. S. Nociception and role of immune system in pain. **Acta Neurologica Belgica**, v. 115, n. 3, p. 213–220, 2015.

VILLARREAL, C. F. et al. The peripheral pro-nociceptive state induced by repetitive inflammatory stimuli involves continuous activation of protein kinase A and protein kinase C epsilon and its NaV1.8 sodium channel functional regulation in the primary sensory neuron. **Biochemical Pharmacology**, v. 77, n. 5, p. 867–877, 2009.

WATKINS, L. R.; MAYER, D. J. Organization of endogenous opiate and nonopiate pain control systems. **Science**, v. 216, p. 1185–1192, 1982.

WEI, F.; DUBNER, R.; REN, K. Nucleus reticularis gigantocellularis and nucleus raphe magnus in the brain stem exert opposite effects on behavioral hyperalgesia and spinal Fos protein expression after peripheral inflammation. **Pain**, v. 80, n. 1–2, p. 127–141, 1999.

WUERTZ, K.; HAGLUND, L. Inflammatory mediators in intervertebral disk degeneration and discogenic pain. **Global spine journal**, v. 3, n. 3, p. 175–184, 2013.

XAVIER, W. K. S. et al. Topical anti-inflammatory action of Caryocar villosum oil (Aubl) Pers. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 1, n. 3, p. 62–67, 2011.

XAVIER, William Kalhy Silva. **Aproveitamento de recursos naturais da biodiversidade amapaense: óleo fixo do piquiá (*Caryocar villosum* (Aubl) Pers.) como anti-inflamatório tóxico**. 2011. 93 f. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Tropical), Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Universidade Federal do Amapá, Macapá.

XIAO, X. et al. Natural Flavonoids as Promising Analgesic Candidates: A Systematic Review. **Chemistry and Biodiversity**, v. 13, n. 11, p. 1427–1440, 2016.

YAMAGUCHI, K. K. L. et al. Avaliação in vitro da Atividade Fotoprotetora de Resíduos de Frutas. **Scientia Amazonia**, v. 5, n. 1, p. 109–116, 2016.

YAMAGUCHI, K. K. L. et al. HPLC-DAD profile of phenolic compounds, cytotoxicity, antioxidant and anti-inflammatory activities of the Amazon fruit *Caryocar villosum*. **Quim Nova**, v. 40, n. 5, p. 483–490, 2017.

YANG, J. et al. The role of brain-derived neurotrophic factor in experimental inflammation of mouse gut. **European Journal of Pain**, v. 14, n. 6, p. 574–579, 2010.

ZHU, M.; DONG, X.; GUO, M. Phenolic profiling of *duchesnea indica* combining macroporous resin chromatography (MRC) with HPLC-ESI-MS/MS and ESI-IT-MS. **Molecules**, v. 20, n. 12, p. 22463–22475, 2015.

ANEXO – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



PRESIDÊNCIA DA REPÚBLICA
MINISTÉRIO DA CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO
INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA
ASSESSORIA DE APOIO AOS ÓRGÃOS COLEGIADOS
COMISSÃO DE ÉTICA EM PESQUISA NO USO DE ANIMAIS

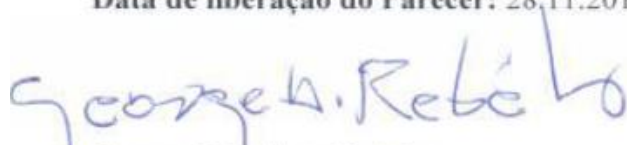
PARECER CONSUBSTANCIADO E CERTIFICADO SOBRE PROTOCOLOS DE PESQUISAS NO USO DE ANIMAIS

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**Avaliação farmacológica de plantas medicinais em modelos in vivo de inflamação e nocicepção**", registrada com o nº **042/2016**, sob a responsabilidade de **GUTEMBERG SOARES** - que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao *filo Chordata, subfilo Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei Nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) do INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS DA AMAZÔNIA - INPA, em reunião de 24/11/2016.

Finalidade	<input type="checkbox"/> Ensino <input checked="" type="checkbox"/> Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/12/2016 a 01/02/2018
Espécie/linhagem/raça	Camundongo BALC / C
Número de animais	96
Peso/Idade	25 a 30g / 4 a 5 Semanas
Sexo	M / F
Origem	Biotério Central do INPA

Data de liberação do Parecer: 28.11.2016


George Henrique Rebelo
Presidente CEUA-INPA
PO n. 079/2015