



REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA (RENORBIO)
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO

FERNANDO CÉSAR VILHENA MOREIRA LIMA

**EFEITO DE *Arrabidaea chica* Verlot NA DOR NEUROPÁTICA
PÓS-TRAUMÁTICA EM RATOS**

São Luís

2017

FERNANDO CÉSAR VILHENA MOREIRA LIMA

**EFEITO DE *Arrabidaea chica* Verlot NA DOR NEUROPÁTICA PÓS-TRAUMÁTICA
EM RATOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) como requisito final à obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientadora: Profa. Dra. Marilene Oliveira da Rocha Borges.

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria do Socorro de Sousa Cartágenes.

Área de concentração: Biotecnologia em Recursos Naturais

São Luís

2017

**EFEITO DE *Arrabidaea chica* Verlot NA DOR NEUROPÁTICA
PÓS-TRAUMÁTICA EM RATOS**

Moreira Lima, Fernando César Vilhena.

Efeito de *Arrabidaea chica* Verlot na dor neuropática pós-traumática em ratos / Fernando César Vilhena Moreira Lima. – São Luís, MA, 2017.

79 f.

Orientadora: Dra. Marilene Oliveira da Rocha Borges.

Co-orientadora: Dra. Maria do Socorro de Sousa Cartágenes.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO/CCBS), Universidade Federal do Maranhão, 2017.

1. *Plantas medicinais*. 2. *Arrabidaea chica* Verlot. 3. Dor neuropática.

CDU 615.32: 616.053



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO

Fundação Instituída nos Termos da Lei nº 5.152, de 21/10/1966 - São Luís - Maranhão

CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE – CCBS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA



Coordenação Geral - Universidade Federal Rural de Pernambuco
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n – Dois Irmãos – CEP: 52171-900 Recife-PE

Telefone (81) 3320-6050, 3320-6051 E-mail: renorbio@prppg.ufrpe.br

Homepage: <http://www.renorbio.org.br>

FOLHA APROVAÇÃO DEFESA DE TESE

ALUNO: Fernando César Vilhena Moreira Lima

TÍTULO DO PROJETO: “EFEITO DE *Arrabidaea chica* VERLOT NA DOR NEUROPÁTICA PÓS-TRAUMÁTICA EM RATOS”.

PROFESSORA ORIENTADORA: Marilene Oliveira da Rocha Borges

BANCA EXAMINADORA:

CONCEITO

ASSINATURA

Prof^ª. Dr^ª. Marilene Oliveira da Rocha Borges – UFMA
(Presidente)

Prof^ª. Dr^ª. Aldeidia Pereira de Oliveira – UFPI
(Titular)

Prof. Dr. Antônio Carlos Romão Borges – UFMA
(Titular)

Prof^ª. Dr^ª. Denise Fernandes Coutinho Moraes – UFMA
(Titular)

Prof^ª. Dr^ª. Maria Nilce de Sousa Ribeiro – UFMA
(Titular)

DATA DA APROVAÇÃO: 6 de dezembro de 2017

HORÁRIO: Às 08:00h.

LOCAL: Prédio de Pós-Graduação do CCBS.

Aos meus pais Sebastião Moreira Lima
Irmão e Doralice Vilhena Moreira Lima,
que iluminaram o caminho da minha vida
e a Silvia Tereza, Fernando Júnior, Caio
Victor e Gabriel pelo carinho, apoio,
segurança e incentivo em todos os
momentos. Dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

À Deus, luz e salvação, sustentáculo de nossas vidas, por isso nada tememos.

Àqueles com quem compartilho minha vida, meus sonhos, minhas angústias, meu amor, minhas tristezas e alegrias e chamo de FAMÍLIA: Silvia Tereza, companheira e amiga; Fernando Júnior e Caio Victor, meus filhos e Gabriel, meu neto. Vocês me impulsionaram a sempre seguir em frente e nunca desistir dos meus sonhos.

À professora Dr^a. Marilene Oliveira da Rocha Borges, pelo empenho na orientação, acolhida e ajuda com precisas e incisivas pontuações.

À professora Dr^a. Maria do Socorro de Sousa Cartágenes, minha co-orientadora e, sobretudo, uma querida e grande amiga-irmã, pela pessoa e profissional que é. Obrigado por sua dedicação, que a fez por muitas vezes, deixar de lado seus momentos de descanso para me ajudar. Sem seu apoio, confiança e amizade nada disso seria possível.

Ao professor Dr. Lívio Martins Costa Júnior pelo competente trabalho ao curso de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), Ponto Local: Universidade Federal do Maranhão (UFMA).

A todos os professores do Curso de Pós-Graduação do RENORBIO, que contribuíram na minha formação e na composição desta tese.

À Prof^a. Dr^a. Maria Nilce de Sousa Ribeiro pelas valiosas sugestões ao longo da pesquisa.

À secretária do RENORBIO, Camila Rocha, pela eficiência, atenção e disponibilidade.

Ao Marcus Vinicius Viegas Lima, pelo companheirismo nos momentos de discussão dos artigos.

Ao Abner Freire e Nathália Lima, alunos de iniciação científica do LEED/UFMA pela dedicação, persistência e credibilidade, vocês foram fundamentais para que este projeto tivesse êxito, muito obrigado!

Aos colegas de turma, pelas trocas de informações e pelos momentos de descontração no decorrer do curso.

À Prof^a. Lilaléa França, por todo o suporte e amizade, estando sempre pronta a me ajudar em todos os processos que envolveram o doutorado.

À Fundação de Amparo à pesquisa do Estado do Maranhão (FAPEMA), pelo apoio financeiro fornecido para o desenvolvimento desta pesquisa.

A todos os amigos, colegas de trabalho que acompanharam minha caminhada e que sempre me incentivaram, ajudando e torcendo por mim.

Enfim, a todos que direta ou indiretamente colaboraram para realização deste trabalho. O meu muito obrigado.

Os ganhos ou os danos dependem da perspectiva e possibilidades de quem vai tecendo a sua história. A vida não está aí apenas para ser suportada nem vivida, mas elaborada. Eventualmente reprogramada. Conscientemente executada. Muitas vezes ousada.

Lya Luft

RESUMO

A dor neuropática (DN) é causada por uma lesão ou doença do sistema nervoso somatossensorial, que acomete cerca de 8% da população mundial, sendo seu manejo considerado um grande desafio, devido a sua complexidade e à ausência de medicação específica. Na busca de novas terapias para a DN, surge neste cenário a espécie vegetal *Arrabidaea chica* Verlot, conhecida popularmente por carajirú e pariri, cujas propriedades anti-inflamatórias são cientificamente comprovadas. O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia do extrato etanólico e frações de *A. chica* em modelo experimental de DN, induzida por compressão do nervo ciático em ratos (*Rattus norvegicus*). O extrato (EEAC) foi obtido a partir da maceração do pó das folhas secas da planta com etanol, seguido do fracionamento com solvente de diferentes polaridades, para a obtenção das frações hexânica (FH), clorofórmica (FC), acetato de etila (FAE) e butanólica (FBU). A abordagem fitoquímica das frações foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência para identificar a presença dos principais compostos nas FC e FAE. Para investigar o efeito do EEAC e frações na DN foram realizados testes comportamentais para avaliar o grau de hiperalgesia térmica, alodinia mecânica e atividade locomotora, além da determinação da concentração sérica das enzimas catalase, superóxido dismutase (SOD), glutatona peroxidase e citocina IL-1 β . O tratamento foi realizado diariamente, por via oral, com o EEAC (500 mg/Kg) e as frações (1mg /Kg), durante 10 a 15 dias. A gabapentina foi utilizada como fármaco padrão nos experimentos. A avaliação da hiperalgesia térmica mostrou que a administração do EEAC aumentou significativamente o limiar de percepção de dor em 48,3% ao final do tratamento. Em relação à alodinia mecânica os animais tratados com o EEAC apresentaram diminuição significativa de 48,6% e os grupos tratados com as FC e FAE apresentaram melhora de 49,5% e 46,9%, respectivamente, na alodinia, ao final dos tratamentos. Quanto à atividade locomotora (Rotarod), os animais induzidos com dor neuropática e tratados com o EEAC e frações apresentaram melhora significativa da marcha, reestabelecendo o escore de padrão normal. Na avaliação comportamental de descarga de peso (Weight bearing), os grupos tratados com as FC, FAE e FBU apresentaram aumento do limiar nociceptivo em todos os tempos avaliados, sendo que no 15º dia induziram um aumento de 73,7%, 41,4% e 43,1% no limiar nociceptivo respectivamente. A avaliação do efeito antioxidante sistêmico das frações, mostrou que houve redução de 88,1% na concentração de catalase com ambas FC e FBU e, redução da atividade da enzima SOD pelas FC (85%), FH (70%), FAE (60%) e FB (34%). Porém, não houve alteração na concentração sérica da glutatona peroxidase. As FAE, FBU, FH e FC também reduziram a citocina IL-1 β , com inibição de 57,8%, 51,4%, 51,2% e 24,7%, respectivamente. Os resultados deste estudo sugerem que extrato etanólico de *A. chica* e suas frações apresentam potencial terapêutico para o tratamento de dores neuropáticas e/ou como adjuvantes no tratamento convencional das mesma.

Palavras-chave: Plantas medicinais. *Arrabidaea chica* Verlot. Dor neuropática.

ABSTRACT

Neuropathic pain (NP) is caused by an injury or disease of the somatosensory nervous system, which affects about 8% of the world population. Its management is considered a great challenge because its complexity and the absence of specific medication. In the search for new therapies, *Arrabidaea chica* Verlot, popularly known as carajirú and pariri, whose anti-inflammatory properties are scientifically proven, appears in this scenario. This study aimed to evaluate the efficacy of ethanolic extract and fractions of *Arrabidaea chica* (*A. chica*) in an experimental model of NP, induced by sciatic nerve compression in rats (*Rattus norvegicus*). The extract (EEAC) was obtained from dried leaves of the plant extracted by maceration with ethanol, followed by solvent fractionation of different polarities to obtain hexane (FH), chloroform (CF), ethyl acetate (FAE) and butanolic (FBU). The phytochemical approach of the fractions was performed by high performance liquid chromatography to identify the presence of the main compounds in AED and CF. To investigate the effect of EEAC and fractions on NP, behavioral tests were performed to evaluate the degree of thermal hyperalgesia, mechanical allodynia and locomotor activity, as well as the determination of the serum concentration of the enzymes catalase, superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase and cytokine IL-1 β . The treatment was performed daily, orally, with EEAC (500 mg/kg) and fractions (1mg / kg) for 10 to 15 days. Gabapentin was used as the standard drug in the experiments. The evaluation of thermal hyperalgesia showed that EEAC significantly increased the pain perception threshold by 48.3% at the end of treatment. Considering mechanical allodynia, the rats treated with the EEAC showed a significant decrease of 48.6% and those treated with the CF and FAE showed improvement of 49.5% and 46.9%, respectively, in allodynia. Regarding locomotor activity (Rotarod), the animals treated with EEAC and fractions showed a significant improvement in gait, reestablishing normal pattern score. In the behavioral evaluation of weight-bearing, the groups treated with CF, FAE and FBU presented nociceptive threshold increase at all times evaluated. On the 15th day, they induced an increase of 73.7%, 41.4% and 43.1% in nociceptive threshold. The evaluation of the systemic antioxidant effect of the fractions showed that there were a reduction of 88.1% in catalase concentration, with both FC and FBU, and a reduction of SOD activity by CF (85%), FH (70%), FAE (60%) and FBU (34%). However, there was no change in the serum concentration of glutathione peroxidase. FAE, FBU, FH and CF also reduced cytokine IL-1 β , with inhibition of 57.8%, 51.4%, 51.2% and 24.7%, respectively. In conclusion, the results of this study suggest that ethanolic extract of *A. chica* and its fractions present therapeutic potential for the treatment of neuropathic pains and/or as adjuvant in the conventional treatment of them.

Keywords: Medicinal plants. *Arrabidaea chica* Verlot. Neuropathic pain.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	- <i>Arrabidaea chica</i> - Horto Medicinal da Universidade Federal do Maranhão (UFMA).....	19
Quadro 1	- Sinais e sintomas associados à dor neuropática.....	28
Quadro 2	- Tratamento farmacológico da dor neuropática, adaptado das diretrizes para o tratamento da DN segundo Neuropathic Pain Special Interest Group.....	28
Tabela 1	- Teste de abordagem fitoquímica das classes de compostos no extrato etanólico (EEAC) e frações das folhas de <i>Arrabidaea chica</i>	46
Tabela 2	- Teores de polifenólicos (TPC) e flavonoides totais (TFLT) das frações do extrato etanólico das folhas de <i>A. chica</i> (EEAC).....	47
Figura 2	- Perfil cromatográfico por CLAE/UV-Vis, a 254 nm da fração hexânica do extrato etanólico das folhas de <i>A. chica</i> (FH).....	47
Figura 3	- Perfil cromatográfico por CLAE/UV-Vis, a 254 nm da FAE (fração acetato de etila do extrato etanólico das folhas de <i>A. chica</i>).....	48
Tabela 3	- Substâncias identificadas na FAE (fração acetato de etila do extrato etanólico das folhas de <i>A. chica</i>) por CLAE/UV-Vis, a 254 nm.....	48
Tabela 4	- Tentativa de identificação de substâncias da FH (fração hexânica do extrato etanólico das folhas de <i>A. chica</i>) por CLAE/DAD/EM/EM.....	49
Figura 4	- Efeito da administração via oral do EEAC na hiperalgesia térmica (Placa quente) em modelo experimental de dor neuropática em ratos.....	50
Figura 5	- Efeito da administração via oral do EEAC na alodinia mecânica (Von Frey) em modelo experimental de dor neuropática em ratos.....	51
Figura 6	- Efeito da administração via oral do EEAC na deambulação (Rotarod) em modelo experimental de dor neuropática em	

	ratos.....	52
Figura 7	- Efeito da administração via oral das frações EEAC na alodinia mecânica (Von Frey) em modelo experimental de dor neuropática em ratos.	53
Figura 8	- Efeito da administração via oral das frações EEAC na deambulação (Rotarod) em modelo experimental de dor neuropática em ratos.	54
Figura 9	- Efeito da administração via oral das frações EEAC na distribuição do peso nas patas traseiras (<i>Weigth-bearing</i>) em modelo experimental de dor neuropática em ratos.....	55
Figura 10	- Efeito da administração via oral das frações EEAC na atividade da enzima catalase, em modelo experimental de dor neuropática em ratos.	56
Figura 11	- Efeito da administração via oral das frações EEAC na atividade da enzima superóxido dismutase, em modelo experimental de dor neuropática em ratos.....	57
Figura 12	- Efeito da administração via oral das frações EEAC na atividade da enzima glutatona, em modelo experimental de dor neuropática em ratos.....	58
Figura 13	- Efeito da administração via oral das frações EEAC nos níveis da citocina IL1 em modelo experimental de dor neuropática em ratos.....	58

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

(AlCl₃) - Cloreto de alumínio

(HO•-) - Ânion hidroxil

(O₂^{•-}) - Radical superóxido

(O₂•-) - Ânion superóxido

AMPA - Ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico

CAT- Catalase

CLAE/UV-Vis - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de Ultravioleta visível

CO₂ - Dióxido de Carbono

COX-2 - Ciclooxygenase-2

CuSO₄ .5H₂O - Sulfato de cobrepentahidratado

DL₅₀ - Dose letal 50%

DN - Dor neuropática

DNA - Ácido dextribonucleico

EDTA - Ácido etilenodiaminotetra-acético

EEAC - Extrato etanólico das folhas de *Arrabidaea chica* Verlot

EFNS - European Federation of Neurological Societies

FAE - Fração acetato de etila

FBU - Fração butanólica

FC - Fração clorofórmica

FH - Fração hexânica

GABA - Ácido gama amino butírico

GPx - Glutaciona peroxidase

GSH - Glutaciona reduzida

GSSG - Glutaciona oxidada

GST - Glutaciona S-transferase

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

IASP - Associação Internacional para o Estudo da Dor

IL-33 - Interleucina-33

IASP - International Association for the Study of Pain

IL-1 β - Interleucina-1 β

IL6 - Interleucina 6

IRDN - Inibidores da recaptação de dopamina e noradrenalina.

IRSN - Inibidores da recaptação de serotonina e noradrenalina.

$\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - Tartarato de sódio e potássio tetrahidratado

LNRP - Limiar nociceptivo de retirada da pata

LNRPA - Limiar nociceptivo de retirada da pata afetada

LNRPC - Limiar nociceptivo de retirada da pata contralateral

NaHCO_3 - Bicarbonato de sódio

NaOH - Hidróxido de sódio

NeuPSIG - Neuropathic Pain Special Interest Group

NMDA - N-metil-D-aspartato

NO - Óxido nítrico

PGE – Prostaglandinas

PNPIC - Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares

PNPMF - Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos

PNPMF - Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos

PPA - Peso da pata afetada

PPC - Peso da pata contralateral

ROS - Espécies reativas de oxigênio

SOD - Superóxido dismutase

TFLT - Teor de flavonoides totais

TFT - Teor de fenólicos totais

$\text{TNF}\alpha$ - Fator de necrose tumoral α

UVA - Ultravioleta A

UVB - Ultravioleta B

V.o. - Via oral

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REFERENCIAL TEÓRICO	19
2.1	Espécie vegetal <i>Arrabidaea chica</i> (Humb. & Bonpl.) Verlot	19
2.2	Dor neuropática	25
2.3	Mecanismos oxidativo e dor neuropática	29
2.4	Citocinas e dor	31
3	OBJETIVOS	33
3.1	Geral	33
3.2	Específicos	33
4	MATERIAIS E MÉTODOS	34
4.1	Espécie vegetal	34
4.2	Obtenção do extrato etanólico das folhas de <i>Arrabidaea chica</i>	34
4.3	Fracionamento extrato etanólico das folhas de <i>Arrabidaea chica</i> ...	34
4.4	Caracterização química do extrato etanólico e frações de <i>Arrabidaea chica</i>	35
4.4.1	Abordagem fitoquímica do extrato e frações de A. chica.....	35
4.5	Testes de atividade farmacológica	37
4.5.1	Animais.....	37
4.5.2	Caracterização do tipo de estudo e seleção da amostra.....	37
4.5.3	Delineamentos experimentais.....	38
4.6	Modelo experimental de cialgia	39
4.7	Análise comportamental	39
4.7.1	Hiperalgisia térmica - Teste da Placa Quente.....	39
4.7.2	Deambulação forçada - Teste de Rotarod.....	40
4.7.3	Alodínia mecânica - Teste de Von Frey.....	40
4.7.4	Incapacidade funcional - Teste de Weight Bearing.....	41
4.8	Análises Bioquímicas	41
4.8.1	Coleta de sangue.....	41
4.8.2	Dosagem da citocina IL-1 β	42
4.8.3	Quantificação de proteínas.....	42
5	ANÁLISE ESTATÍSTICA	45
6	RESULTADOS	46

6.1	Fracionamento do extrato etanólico das folhas de <i>Arrabidaea chica</i>	46
6.2	Caracterização química do extato etanólico e frações de <i>Arrabidaea chica</i>	46
6.3	Análise da FH e FAE por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de Ultravioleta visível (CLAE/UV-vis)	47
6.4	Análise da fração hexânica (FH) por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas (CLAE/DAD/EM/EM)	48
6.5	Avaliação do efeito do extrato de <i>Arrabidaea chica</i> (EEAC) na dor neuropática	49
6.5.1	Hiperalgisia térmica – Teste da Placa Quente.....	49
6.5.2	Avaliação da alodínia mecânica – Von Frey.....	50
6.5.3	Avaliação da deambulação forçada – Rotarod.....	51
6.6	Efeito das frações da <i>Arrabidaea chica</i> na dor neuropática	52
6.6.1	Análise da alodínia mecânica nos animais tratados com as frações do EEAC após a indução da DN – Teste de Von Frey.....	52
6.6.2	Análise da atividade locomotora dos animais tratados com as frações do EEAC após indução da DN – Teste Rotarod.....	53
6.6.3	Avaliação da distribuição do peso nas patas traseiras após indução da dor neuropática – Teste Weigth-Bearing nos animais tratados com as frações do EEAC.....	55
6.6.4	Determinação da atividade da catalase nos animais tratados com as frações do EEAC.....	56
6.6.5	Determinação da atividade da superóxido dismutase nos animais tratados com as frações do EEAC.....	57
6.6.6	Determinação da atividade da glutationa nos animais tratados com as frações do EEAC.....	57
6.6.7	Efeito das frações do EEAC sobre a citocina IL1.....	58
7	DISCUSSÃO	60
8	CONCLUSÃO	67
	REFERÊNCIAS	68

1 INTRODUÇÃO

Ao longo do processo histórico evolutivo do homem, as plantas medicinais sempre desempenharam papel importante na busca pelo alívio dos seus males, sendo considerada como os primeiros recursos terapêuticos utilizados a partir de experiências populares disseminadas pelas diferentes etnias ao redor do mundo (RODRIGUES; CARVALHO, 2014). Nesse sentido, a Organização Mundial de Saúde (OMS) considera que 80% da população mundial faz uso de algum tipo de planta medicinal (CARNEIRO et al., 2014).

Os compostos derivados de planta são empregados na terapia moderna, além de desempenhar um papel importante para a síntese de moléculas mais complexas. Estima-se que cerca de 30% dos medicamentos disponíveis são derivados de fontes naturais, principalmente de plantas e microrganismos. Em algumas áreas terapêuticas, por exemplo, na oncologia a quantidade de medicamentos derivados de plantas atinge 60% (NEWMAN; CRAGG, 2016; MISHRA; TIWARI, 2011).

A biodiversidade brasileira está entre as maiores do mundo compreendendo mais de 45.000 espécies de plantas superiores (20-22% do total existente no planeta), 4.747 algas, 1.524 de briófitas, 5.652 fungos, 30 gimnospermas, 1.239 samambaias e licófitas e 32.715 angiospermas (GONÇALVES, 2014).

Em função desta biodiversidade, da grande influência de sua colonização étnica, e/ou por representar como um recurso acessível aos cuidados básicos de saúde, a população brasileira tem uma longa tradição no uso de plantas medicinais para o tratamento de diferentes doenças agudas e crônicas. Muitas destas plantas na forma de infuso ou decocto de suas folhas, caules e raízes são utilizadas para o controle de diferentes tipos de dores, muitas das quais tem trabalhos científicos comprovando essas ações (VALLI et al., 2013; DUTRA et al., 2016).

Dentre essas espécies, destacamos *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) Verlot da família *Bignoniaceae*, conhecida popularmente por vários nomes nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, mais especialmente como carajirú e pariri, e é amplamente utilizada na medicina tradicional como planta medicinal para tratar processos inflamatórios, dores abdominais, distúrbios gastrointestinais, enterocolite,

leucemias, anemias (CORRÊA, 1984), infecções fúngicas e herpes, assim como utilizada na limpeza de feridas crônicas (LORENZI; MATOS, 2002).

A espécie *Arrabidaea chica* compõe a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS) publicada pelo Ministério da Saúde em 2009 com finalidade de orientar estudos e pesquisas que possam subsidiar a elaboração de um elenco de plantas medicinais e fitoterápicos a serem disponibilizados para uso da população, com segurança e eficácia para o tratamento de determinada doença (BRASIL, 2009).

A RENISUS consta de 71 plantas que fazem parte das ações normativas e regulamentarias do Ministério da Saúde, baseada nas diretrizes da OMS, com destaque a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) (BRASIL, 2006a), Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) (BRASIL, 2006b), e o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) (BRASIL, 2009), que visam garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional.

Estudos farmacológicos e biológicos de *A. chica* demonstram ações hipotensora, anti-inflamatória, diurética, cicatrizante, antimicrobiana, antitumoral, antioxidante e antiprotozoária (LIMA et al., 2010; JORGE et al., 2008, CARTÁGENES et al., 2009; AMARAL et al., 2012, RODRIGUES et al., 2014, MICHEL et al., 2015), mas não encontramos dados publicados de ação antinociceptiva da espécie vegetal na profilaxia e tratamento da dor neuropática em modelo animal.

A dor neuropática é uma categoria clínica causada por lesão ou doença do sistema nervoso somatossensorial e inclui várias condições crônicas que, em conjunto, atingem até 8% da população mundial (GILRON; BARON; JENSEN, 2015). É uma patologia debilitante que afeta a qualidade de vida, a saúde física e mental dos pacientes e representa um grande desafio no seu manejo clínico (SCHMADER, 2002; GILRON; BARON; JENSEN, 2015).

Devido à complexidade dos mecanismos envolvidos na dor neuropática, não dispomos no mercado de medicamentos ideais, com fármacos específicos que apresente uma ação periférica e central com o mínimo de efeitos adversos (BAHAREH; HOSSEIN, 2012). Considerando ainda o grande impacto

socioeconômico decorrente da dor neuropática, é essencial o desenvolvimento de novos antinociceptivos seguros com efeitos colaterais reduzidos, para o emprego de terapias eficazes, com menos efeitos adversos e que proporcionam uma maior adesão ao tratamento pelos pacientes.

Nessa perspectiva, a espécie vegetal *A. chica* Verlot, aparece como uma fonte promissora nas pesquisas de substâncias ativas com potencial que possam garantir uma terapia eficaz e segura para tratamento da dor neuropática. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficácia da atividade antinociceptiva do extrato e das frações de *A. chica* Verlot, em modelo experimental de dor neuropática em ratos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Espécie vegetal *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) Verlot

A família Bignoniaceae a qual pertence a espécie vegetal *A. chica* (Humb. & Bonpl.) Verlot está representada com cerca de 120 gêneros e 800 espécies distribuídas principalmente nas regiões tropicais e subtropicais do planeta com dois grandes centros de distribuição geográfica, no Brasil e o Continente Africano (LORENZI; MATOS, 2002).

No Brasil, a família apresenta-se com o maior número de espécies, ocorrendo desde a Amazônia até o Rio Grande do Sul, não possuindo um habitat único, podem ser encontradas no Cerrado, Mata Atlântica e Amazônica (GENTRY, 1990; JOLY, 1993).

A. chica Verlot (FIGURA 1) é uma planta arbórea disseminada do sul do México ao Brasil, particularmente na Bacia Amazônica (CORRÊA, 1931; TAKEMURA et al., 1995), conhecida popularmente por vários nomes nas diversas etnias e tribos indígenas das regiões Norte e Nordeste do Brasil como: carajirú, cipó cruz, pariri, crajiru, carajuru, coá-pyranga, guajuru, guajuru-piranga, pyranga (CORRÊA, 1931; 1984; VAN DEN BERG, 2003) e tem como sinônimos científicos: *Fridericia chica* (Bonpl.) L.G. Lohmann, *Lundia chica* (Bonpl.) Seem, e *Bignoniachica* Bonpl.

Figura 1 - Aspecto geral de *Arrabidaea chica* (H&B) Verlot cultivada no Horto Medicinal do Herbário Ático Seabra na Cidade Universitária Dom Delgado, Universidade Federal do Maranhão (UFMA).



Fonte: Autor.

Os nativos amazônicos utilizam um corante vermelho obtido por decocção ou por fermentação das folhas frescas de *Arrabidaea chica*, para tingir fibras de palmeira amazônica e para fazer pinturas faciais e corporais, que fazem parte dos rituais nativos e dos eventos de vida indígena. As pinturas constituem peles distintas ou "sociais" que denotam organização social e relações com a natureza (LORENZI; MATOS, 2002). Esses habitantes tradicionalmente usam o chá das folhas de *A. chica* para tratar inflamação da pele, distúrbios gastrointestinais, dores abdominais, diarreia sanguinolenta, enterocolite, leucemia, anemia e albuminúria (CORRÊA, 1984). Além disso, os índios da Amazônia usam a decocção das folhas para limpar feridas crônicas e tratar infecções fúngicas e herpes (LORENZI; MATOS, 2002).

As mulheres da tribo Ingaricó, no Rio Cotingo, em Roraima, Brasil, utilizam as folhas de *A. chica* misturada com óleo aromático para dar brilho e perfume à pele (JUNIOR, 1981).

Devido às propriedades cicatrizantes e anti-inflamatória, o extrato de crajiru é indicado para tratamento de acnes, através de sabonetes (COSTA; SILVA, 1989). O extrato de *A. chica* também pode ser utilizado em cremes e xampus (REVILLA, 2002).

Investigações etnobotânicas têm mostrado que o chá das folhas de *A. chica* é utilizado tradicionalmente no tratamento de diversas doenças como: úlceras, cólicas intestinais, afecções da pele, anemias e leucemias, piodermites, enterocolites, albuminúria, conjuntivite, diabetes mellitus e icterícia. Algumas tribos amazônicas a utilizam contra conjuntivite, picadas de insetos e para fazer tatuagens (BORRÁS, 2003; BARBOSA, et al., 2008).

No estado do Maranhão, região Nordeste do Brasil, onde é conhecida como pariri, esta espécie vegetal é empregada no tratamento de cálculos renais, cólicas abdominais e da hipertensão arterial sistêmica (RÊGO, 1995).

A espécie apresenta diversas variedades, que se distinguem pela morfologia das folhas (CORRÊA, 1984; BEHRENS; TELLIS; CHAGAS, 2012).

A. chica é facilmente cultivada e tem rápido crescimento. No estado do Amazonas, a variedade que predomina no uso tradicional é conhecida como variedade I, de acordo com a Embrapa Amazônia Ocidental. As folhas desta variedade são finas e crescem para cima, tornando *A. chica* adequada para cultivo em jardins. Outras variedades (denominadas variedades II e III) têm folhas mais largas com tendência a crescer horizontalmente. As três variedades de *A. chica* têm

coloração verde quando frescas, mas após a secagem tornam-se vermelhas acastanhadas. A coloração avermelhada é devido à oxidação natural dos componentes que estão presentes na planta (SCHIOZER et al., 2012).

Em 1927, Chapman e colaboradores foram os primeiros pesquisadores a estudar as folhas frescas de *A. chica* e isolaram um pigmento vermelho, o qual era usado pelos índios em suas pinturas corporais e o identificaram como uma 3-desoxiantocianidina, a carajurina, substância da classe das antocianinas (CHAPMAN; PERKING; ROBINSON, 1927). Por sua vez, Grenard (1987) publicou que as propriedades tintoriais da espécie são devidas a dois pigmentos flavônicos: a carajurina, que é o pigmento principal e a carajurona. Em 1998, Harborne e Willians propuseram que a ocorrência do pigmento carajurina na família Bignoniaceae era provavelmente restrita à espécie *A. chica* (HARBORNE; WILLIANS, 1998).

Takemura et al. (1995) isolaram das folhas a carajuflavona (6,7,3',4'-tetrahydroxi-5-metoxiflavona), além de luteolina. Em 2008, Barbosa e colaboradores detectaram no extrato etanólico das folhas, as seguintes classes de metabólitos secundários: antocianidinas, antocianinas, antraquinonas, catequinas, ácidos orgânicos, açúcares redutores, esteroides, xantonas, taninos, flavanóis, assim como isolaram deste extrato dois flavonoides, o canferol e vicenina-2 (BARBOSA et al., 2008).

Zorn et al. (2001) isolaram via fracionamento biomonitorado das folhas de *A. chica*, as 3-desoxiantocianidinas; 6,7,3'-trihidroxi-5,4'-dimetoxi-flavilium, 6,7,3',4'-tetrahydroxi-5-metoxi-flavilium e a conhecida 6,7-dihidroxi-5,4'-dimetoxi-flavilium (carajurina) e a flavona acetina, além da revisão da estrutura da carajurona, enquanto Devia et al. (2002) isolaram 02 novas substâncias: 3-deoxiantocianidinas (6,7,3',4'-tetrahydroxi-5-metoxiflavilium e 6,7,4'-trihidroxi-5-metoxiflavilium) além de confirmar a estrutura da carajurina, que já havia sido previamente isolado das folhas secas de *A. chica*.

Abordagem fitoquímica da tintura das folhas de *A. chica* indicou a presença de classes químicas tais como: açúcares redutores, antocianidinas, antocianinas, antraquinonas, esteroides, triterpenóides, fenóis, flavanonóis, flavanóis, flavanonas, saponinas e taninos catéquicos (ALVES et al., 2010), resultados corroborados por Ribeiro et al. (2012).

Recentemente Cortez de Sá et al. (2016) demonstraram a presença de triterpenos, compostos fenólicos, flavonoides, taninos e antocianinas nas folhas e flavonoides, taninos e antocianinas nos caules da espécie.

A presença de cálcio, fósforo, manganês e ferro foi demonstrada no extrato aquoso da espécie por Kalil Filho, Kalil e Luz (2000) e Paes (2004).

Amaral et al. (2012) isolaram do extrato etanólico das folhas de *Arrabidaea chica*, a flavona luteolina, que demonstrou ação diurética.

Os teores de polifenólicos e flavonoides totais nas folhas foram determinados, com valores de 10,2 mg/g e 0,06 mg/g, respectivamente por Silva et al. (2007).

Schiozer et al. (2012) utilizaram impressão digital via espectrometria de massas com ionização por *electrospray* (ESI(+)-MS) para diferenciar variedades de *Arrabidaea chica*, cultivadas na região Amazônica, usando 3-desoxiantocianidinas presentes nas folhas como marcadores e verificaram diferentes intensidades relativas destas substâncias em cada variedade.

Usando método extrativo com CO₂ supercrítico seguido de etanol e água como solventes, pesquisadores obtiveram melhores rendimentos extrativos das folhas de *A. chica* com maiores concentrações de compostos fenólicos, especialmente as 3-desoxiantocianidinas e da flavona, luteolina (PAULA et al., 2013; 2014).

A composição fenólica do extrato etanólico antioxidante das folhas de *Arrabidaea chica* foi determinada utilizando cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (LC-DAD) e cromatografia líquida de alta eficiência, acoplado a ionização por *electrospray*, acoplado a espectrometria de massas sequencial (LC-ESI-MS/MS), identificando as substâncias: isoscutelareina, 6-hydroxiluteolina, hispidulina e escutelareina (SIRAICH et al., 2013a).

Rodrigues et al. (2014) identificaram do extrato hexânico das folhas de *A. chica* por cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massas (CG/EM) ácidos graxos (ácido *n*-hexadecanóico, ácido octadecanóico, ácido linoleico, e ácido linolênico), esteróides (estigmasterol, gamma-sitosterol e campesterol), além de fitol e vitamina E. Os autores demonstraram ainda que uma fração deste extrato é bioativa as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* e *L. infantum*.

Os estudos farmacológicos e biológicos de extratos e frações das folhas de *A. chica*, já comprovaram diversas ações. Ação antiedematogênica em

camundongos (ANDRADE et al., 1997), antimicrobiana (LIMA et al., 2003); antifúngica (*Trichophyton mentagrophytes*) do extrato etanólico das folhas de *A. chica* e sugerem que as quinonas e xantonas presentes no extrato estão relacionadas a ação (BARBOSA et al., 2008) e na inibição do crescimento de *Candida albicans* (RIBEIRO, 2008), hipotensora, e que os mecanismos envolvidos na hipertensão arterial decorre do bloqueio dos canais de cálcio tipo L. (CARTÁGENES, 2009; CARTÁGENES et al., 2009; CARTÁGENES et al., 2014); antiangiogênica (GARRIDO, 2006) e anti-hepatotóxica (SOUSA, 2013).

Há evidências que uma formulação em gel de extrato das folhas de *A. chica* apresentou ação cicatrizante (PAES, 2004). Mais tarde estudos confirmaram a ação cicatrizante do extrato etanólico em modelos de cicatrização, dérmica e gástrica, em ratos diabéticos, assim como o estudo da influência da técnica de microencapsulação do extrato na preservação da atividade cicatrizante, evidenciada através de estudos em cultura de fibroblastos, síntese do colágeno e estímulo a vascularização demonstrando, portanto, ações antiulcerogênicas e cicatrizantes (JORGE, 2008; JORGE et al., 2008; JORGE, 2013).

Estudos de Jorge et al. (2008) observaram ainda uma aceleração da cicatrização da pele após o uso do extrato das folhas de *A. chica* padronizado com as antocianinas carajurina e carajurona. Sousa (2013) demonstrou a estabilidade do extrato seco e formulações de bases semissólidas, contendo *A. chica* para uso em cicatrização.

Por sua vez, Aro et al. (2013) confirmaram que aplicação tópica do extrato etanólico de *A. chica* melhorou a organização das fibras de colágeno em lesões do tendão calcâneo em modelo animal, favorecendo a cicatrização.

O extrato etanólico das folhas e as frações diclorometânica e acetato de etila deste extrato apresentaram ação antioxidante. As frações hexânica, diclorometânica e acetato de etila, além luteolina, flavona isolada da fração diclorometânica demonstraram ação diurética (AMARAL et al., 2012). Mais tarde Siraich et al. (2013a), utilizando vários modelos antioxidantes, confirmaram a ação antioxidante. Esta atividade pode ser atribuída pela presença de vários compostos no extrato vegetal (isoscutelareína, 6-hidroxluteolina, hispidulina, scutelareína, luteolina e apigenina). Estudos também demonstraram ação foto protetora contra a radiação UVA + UVB, sugerindo um potencial uso na indústria cosmética (SIRAICH et al., 2013b).

Atividade antitumoral tanto *in vitro* como *in vivo* foram demonstradas em extratos de *A. chica*. Lima et al. (2010) analisaram o extrato metanólico hidrolisado, com maior concentração de carajurina, o qual apresentou ação antiproliferativa seletiva para as células tumorais (NCI-460 - pulmão e MCF-7 - mama). Ribeiro *et al.* (2012), utilizando modelo *in vivo* com os extratos etanólico e aquoso (via oral) demonstraram redução do desenvolvimento do tumor de Ehrlich.

Atividade anti-inflamatória foi descrita usando várias abordagens experimentais e sistemas. Oliveira et al. (2009) demonstraram através da análise histopatológica que o extrato aquoso de *A. chica* possui atividade inibitória para o infiltrado de granulócitos e miocitólise induzidos pelas toxinas dos venenos das serpentes amazônicas *Brothrops atrox* e *Crotalus durissus ruruima*.

Michel et al. (2015) sugerem uma nova atividade inibitória do extrato de *A. chica* no componente angiogênico de tecido recém-formado, assim como a ação anti-inflamatória. O uso do extrato aquoso e etanólico em ratos com implante de esponja reduziram o teor de hemoglobina e inibiram o influxo de neutrófilos nos implantes além de mostrar atividade antiproliferativa e como agente antitumoral. Essa atividade está associada a uma ação pró-apoptótica observada pela fragmentação do ácido dextroribonucleico (DNA) das linhagens de células HL60 e Jurkat. O potencial farmacológico do extrato de *A. chica* pode ser atribuído aos compostos luteolina e canferol da classe dos flavonoides.

Estudos realizados por Rodrigues et al. (2014) sugerem ação antiprotozoária da fração B2 do extrato hexânico de *A. chica* contra *Leishmania amazonensis* e *L. infantum* e que os ácidos graxos e esteroides presentes no extrato estão envolvidos na atividade antileishmanial. Cortez de Sá et al. (2016) demonstraram que o extrato etanólico das folhas de *A. chica* apresenta ação *leishmanial* nas formas promastigotes de *Leishmania amazonenses*.

Estudos de toxicidade tornam-se essenciais para conhecer o potencial terapêutico e a toxicidade das plantas medicinais. No caso das plantas medicinais os seus riscos toxicológicos devem ser observados (CAMPOS et al., 2016).

Longo (2007) realizou no extrato aquoso e frações (clorofórmica e butanólica) das partes aéreas da *A. chica* avaliação mutagênica, genotóxica/antigenotóxica através do teste cometa *in vitro* e *in vivo*. Testes *in vitro* apresentaram genotoxicidade no extrato bruto, mas nos testes *in vivo* o extrato bruto e frações não apresentaram genotoxicidade nos dois tratamentos. Na avaliação

antigenotóxica os extratos brutos e as frações clorofórmica e butanólica protegeram o DNA contra danos gerados pelo peróxido de hidrogênio. O extrato bruto e frações não apresentaram mutagenicidade no teste de micronúcleos em medula óssea de camundongos.

Testes de toxicidade aguda realizados *in vivo* com o extrato etanólico *A. chica* com doses nas concentrações (0,5 a 2,0 g/Kg) não evidenciaram nenhum sinal ou sintoma de toxidade ou alterações histopatológicas (CARTÁGENES et al., 2014; MAFIOLETI et al., 2013; SANTOS et al., 2013).

Diante do exposto, ressalta-se que não foi encontrado na literatura especializada o uso do extrato etanólico de *A. chica* com ação antinociceptiva no tratamento da dor neuropática o que justifica o interesse do nosso grupo Laboratório Experimental de Estudo da Dor (LEED) em estudar a ação antinociceptiva do extrato e suas frações na dor neuropática em ratos.

2.2 Dor neuropática

A dor desempenha um importante papel fisiológico de proteção frente a um estímulo danoso ou nocivo, tornando-se essencial à vida. Ela pode persistir mesmo com a solução da causa inicial e tornar-se mais que um sintoma, uma doença (MACHELSKA, 2011). Os mecanismos moleculares e celulares que estão subjacentes ao seu desenvolvimento e manutenção não são completamente compreendidos, mas envolvem excitabilidade anormal no corno dorsal da medula espinhal (FREYNHAGEN; BENNETT, 2009).

A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) define a dor neuropática (DN) como sendo “[...] causada por uma lesão ou doença do sistema nervoso somatossensorial [...]” sendo normalmente manifestada por dor intensa e persistente, podendo ser espontânea, associada a sensações de queimação e alfinetadas, hiperalgesia e/ou alodinia (JENSEN; BARON; HAANPÄÄM, 2011).

A DN é uma dor não-adaptativa decorrente da estimulação inadequada dos nociceptores que são terminações nervosas livres, localizados na pele e em diversos tecidos do corpo sensíveis a estímulos, sejam eles mecânicos, térmicos e químicos (ROWLAND; PEDLEY, 2011). Além do sofrimento relacionado com a DN há associação com depressão, distúrbios do sono e alterações na capacidade funcional dos pacientes. É uma dor crônica debilitante que afeta a qualidade de vida,

a saúde física e mental dos pacientes e representa um grande desafio no seu manejo clínico (GILRON; BARON; JENSEN, 2015).

Os dados epidemiológicos da DN são particularmente difíceis, devido à diversidade de entidades clínicas relacionadas ao estudo. No entanto, a validação de uma série de ferramentas de avaliação para a identificação da dor com características neuropáticas (BOUHASSIRA; ATTAL, 2011; HAANPAÄ et al., 2011; GILRON; BARON; JENSEN, 2015), tem facilitado os estudos epidemiológicos que estimam a prevalência de dor neuropática em torno de 7% a 8% da população mundial (BOUHASSIRA et al., 2008; TORRANCE et al., 2006).

No Brasil, a prevalência está estimada em 5% da população (SCHMIT et al., 2009). Estudo realizado por Morais Vieira et al. (2012) na cidade de São Luís – MA em 2011, apresentou uma prevalência de 10% na amostra estudada.

A DN resulta em uma neuroplasticidade central e periférica que inclui alterações na expressão e função dos canais de sódio, aumento do influxo celular de cálcio, alteração das respostas ao glutamato, reestruturação organizacional celular, dentre outros fatores (BASBAUM et al., 2009; COSTIGAN; SCHOLZ; WOOLF, 2009; AUSTIN; MOALEM, 2010; COHEN; MAO, 2014).

As alterações neuronais responsáveis pela DN já são conhecidas e englobam a geração anormal de impulsos nervosos nas fibras de pequeno calibre do tipo C e A δ , plasticidade neural, a formação de novos engramas de fibras nervosas em locais não usuais, o brotamento de fibras do sistema nervoso periférico simpático, a diminuição da atividade ou perda dos neurônios inibitórios, a intensificação da atividade facilitadora descendente e a diminuição da atividade inibitória descendente da transmissão dolorosa (LEONARD et al., 2009).

Essas alterações são acompanhadas por mudanças na síntese de neurotransmissores e na expressão e na sinalização de receptores e canais iônicos, levando à sensibilização periférica e central, que se caracteriza pela diminuição do limiar doloroso e aumento da resposta aos estímulos centrais e periféricos (MACHELSKA, 2011).

A lesão inicial do nervo obedece à cascata inflamatória que resulta no aumento da perfusão local, no aumento da permeabilidade capilar e na concentração e ativação das células imunológicas inatas. No entanto, substâncias imunoativas liberadas no local da lesão podem iniciar uma reação imunológica sistêmica pela ativação das células da micróglia e astrócitos, células gliais

localizadas na medula espinhal e no cérebro, que parecem ter grande importância na nocicepção (VALLEJO et al., 2010).

Os mecanismos fisiopatológicos da dor neuropática envolvem uma série de eventos decorrentes da reorganização da medula espinhal a partir de alterações na transmissão sináptica provocada pela lesão e ativação dos neurônios intactos e células gliais (astrócitos e micróglia) (INOUE; TSUDA, 2009; AKIMOTO; HONDA et al., 2013). A alteração das células da glia ativa citocinas pró-inflamatórias nociceptivas como o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), a interleucina-1 β (IL-1 β) e a interleucina-33 (IL-33) que são liberadas e por sua vez ativam e / ou sensibilizam neurônios nociceptivos na medula espinhal, contribuindo para o surgimento da dor neuropática (MILLIGAN; WATKINS, 2009; MALEK et al., 2015; LONGHI-BALBINOT et al., 2016; ZARPELON et al., 2016). Além disso, ocorre aumento da expressão dos canais de íons de sódio e cálcio que induz descargas ectópicas nesses neurônios, promovendo a ativação dos receptores dos neurônios da haste dorsal central, inicialmente do receptor de AMPA (ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolepropiónico).

Os receptores de AMPA quando ativados promovem uma despolarização que permite eliminar o bloqueio exercido pelo magnésio sobre o canal de íons do receptor de NMDA (N-metil-D-Aspartato), ocasionando a entrada de íons de cálcio nos neurônios. A estimulação potencializada e contínua dos receptores de NMDA nos neurônios do corno posterior da medula espinhal produz sensibilização central (WOOLF, 2011).

Assim, alterações nos canais iônicos, receptores e sinapses nervosas, bem como na distribuição de neurotransmissores e neuromediadores, permitem que os neurônios periféricos e centrais atinjam o limiar de despolarização de forma precoce, gerando descargas ectópicas que se amplificam e ativam células vizinhas, caracterizando a dor crônica (KRAYCHETE; CALASANS; VALENTE, 2006).

Os sinais e sintomas da dor neuropática podem ser positivos e/ou negativos (QUADRO 1), sendo que os negativos consistem em redução ou perda da sensibilidade tátil, vibratória, térmica e dolorosa e os positivos podem ser espontâneos ou evocados (BARON; BINDER; WASNER, 2010).

Quadro 1 - Sinais e sintomas associados à dor neuropática.

Sintomas	Dor espontânea	Sensação dolorosa sem estímulo aparente	
Positivos	Evocados	Alodínia	Dor gerada por um estímulo não doloroso
		Hiperalgesia	Dor exagerada a um estímulo doloroso Moderado
	Espontâneos	Disestesia	Sensação dolorosa desagradável espontânea
		Parestesia	Sensação anormal não dolorosa
Negativos	Hipoestesia	Diminuição da sensibilidade a estímulos, excluindo os sentidos especiais	
	Anestesia	Perda total da sensibilidade	
	Analgesia	Ausência de dor em resposta a estímulos normalmente doloroso	
	Hipoalgesia	Resposta diminuída a um estímulo doloroso moderado	

Fonte: Adaptado de Baron, Binder e Wasner (2010).

O tratamento farmacológico da dor neuropática requer uma abordagem interdisciplinar. Neuropathic Pain Special Interest Group (NeuPSIG), International Association for the Study of Pain (IASP) e a European Federation of Neurological Societies, (EFNS) atualizaram as diretrizes do consenso de tratamento farmacológico da dor, onde propõe um tratamento gradativo (QUADRO 2).

Quadro 2 - Tratamento farmacológico da dor neuropática, adaptado das diretrizes para o tratamento da dor neuropática segundo Neuropathic Pain Special Interest Group

Fármacos de primeira linha			
Tratamento sistêmico	Antidepressivos	Antidepressivos tricíclico (ATC), aminoácidos secundários.	Nortriptilina Desipramina Amitriptilina
		Inibidores da recaptção da serotonina e norepinefrina	Duloxetina
	Anticonvulsivantes	Ligandos $\alpha 2$ - δ do canal de cálcio	Gabapentina
			Pregabalina
Tratamento tópico	Analgésico local	Amina do tipo amida	Lidocaína
Fármacos de segunda linha			
Tratamento sistêmico	Opióides fortes	Morfina	
		Oxicodona	
		Metadona	
		Fentanil	
	Opióides fracos	Tramadol	
Fármacos de terceira linha			
Tratamento sistêmico	Antidepressivos	Inibidores da recaptção de dopamina e noradrenalina (IRDN).	Bupropiona
		Inibidores da recaptção de serotonina e noradrenalina (ISRS).	Citalopram
			Paroxetina
	Anticonvulsivantes	Carbamazepina	
		Lamotrigina	
		Oxcarbazepina	
		Topiramato	
Ácido valproico			

Fonte: Adaptado de Attal et al. (2010) e Dworkin et al. (2010).

O primeiro passo consiste na avaliação e diagnóstico da dor. Nesta fase, são estabelecidas a causa provável e o tratamento, assim como os agravos relevantes que influenciam no tratamento. Na etapa seguinte, tem início o tratamento de comorbidades responsáveis pela dor neuropática onde são administradas medicações de primeira linha para o controle sintomático. Em paralelo, podem ser associados possíveis tratamentos não farmacológicos. Na terceira etapa, a dor é reavaliada. Se recorrente, toma-se a decisão de continuar o tratamento. Na quarta etapa é escolhida uma alternativa de uso de medicamento de segunda, terceira ou quarta linha. Em alguns casos específicos, deverá ser associado um medicamento de segunda linha ao de primeira linha (ATTAL et al., 2010; DWORKIN et al., 2010).

Entre os anticonvulsivantes a gabapentina apresenta eficácia e tolerabilidade, porém, produz efeitos adversos dependendo da dose. Está relacionada com o GABA, um neurotransmissor modulador da dor. Ela atravessa a barreira hematoencefálica, se liga à subunidade $\alpha 2\text{-}\delta$ de canais de cálcio de voltagem dependentes, diminuindo a liberação de glutamato, noradrenalina e substância P, por diminuição do influxo de cálcio para as células (DWORKIN et al., 2010; JENSEN; FINNERUP, 2007).

2.3 Mecanismos oxidativo e dor neuropática

O desequilíbrio entre a produção e as manifestações de substâncias reativas do oxigênio e/ou nitrogênio e a capacidade de defesa antioxidante do sistema biológico de detoxificar danos causados pelos radicais livres é denominado de estresse oxidativo (OLIVEIRA; SCHOFFN, 2010).

A toxicidade oxidativa é o principal fator da perda neuronal nas doenças neurodegenerativas. Nos nociceptores periféricos, as substâncias reativas ao oxigênio (ROS) modulam atividade dos canais de sódio, que aumentam a atividade nos nociceptores, como na dor neuropática aguda (KRISHNAN et al., 2005; LAI et al., 2005).

Antioxidantes são compostos que previnem substâncias químicas e biológicas dos danos oxidativos produzidos pelas substâncias reativas ao oxigênio (ROS), como hidroxil ($\text{HO}\cdot$), ânion superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), e óxido nítrico (NO). Nos processos inflamatórios e isquêmicos essas substâncias são produzidas em excesso como isso o organismo lança mão do sistema

antioxidante endógeno ou ainda do exógeno. O endógeno inclui defesas enzimáticas como superóxido dismutase (SOD) que catalisa a desmutação do $O_2^{\cdot-}$, convertendo-o em H_2O_2 , que é menos reativo e pode ser degradado por outras enzimas, catalase (CAT) que catalisa a água e oxigênio para formação de H_2O_2 e a glutathiona peroxidase (GPx) que catalisa a redução do H_2O_2 e peróxidos orgânicos para o seu álcool correspondente, sendo que a glutathiona opera em ciclos entre a sua forma oxidada e a sua forma reduzida. Existem ainda as defesas não enzimáticas como as proteínas (ferritina) que se ligam ao ferro, os uratos e os tióis proteicos do plasma, que muitos contribuem para apreensão dos radicais livres e as enzimas reparadoras do DNA (PIETTA, 2000).

O excesso de radicais livres no organismo é combatido pelos antioxidantes produzidos pelo corpo ou absorvidos na dieta (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006), e podem ser definidos como qualquer substância que, quando presente em baixa concentração comparada à do substrato oxidável, regenera o substrato ou previne significativamente a sua oxidação (HALLIWELL; CLEMENT; LONG, 2000).

Nesse sentido, é de grande interesse a busca por novas moléculas com potencial antioxidante. Entre as pesquisas nessa área os produtos naturais se destacam como potenciais agentes antioxidantes, devido principalmente à presença de compostos polifenólicos, fenólicos e terpênicos (BAKKALI et al., 2008).

A capacidade antioxidante dos compostos fenólicos é determinada por sua estrutura, em particular por hidroxilas que podem doar elétrons. Evidências comprovam que os polifenóis protegem as células nervosas da injúria oxidativa pela sua capacidade de varrer radicais livres, protegendo assim do estresse oxidativo que em última análise causa morte neuronal (ISHIGE; SCHUBERT; SAGARA, 2001).

Alguns flavonoides protegem da toxicidade do glutamato assim como de outras injúrias oxidativas, através de três mecanismos distintos que incluem aumento intracelular de glutathiona reduzida (GSH), redução direta dos níveis de ROS e prevenção do influxo de Ca_{2+} apesar dos altos níveis de ROS (ISHIGE; SCHUBERT; SAGARA, 2001). Os flavonoides interagem com as biomembranas e exercem a função de moduladores da fluidez, gerando um impedimento físico para a difusão das substâncias reativas ao oxigênio e substâncias reativas ao nitrogênio, de modo que há o decréscimo da cinética das reações responsáveis pelo estresse oxidativo (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Plantas com altas concentrações de flavonoides apresentam potenciais propriedades terapêuticas e são fontes promissoras na descoberta de novas moléculas com atividade analgésica, anti-inflamatória e antioxidante que possam garantir uma terapia eficaz e segura para tratamento da dor neuropática. Estudos comprovam que a *A. chica* Verlot apresenta na sua composição química flavonóides, especialmente flavonas e antocianinas (ZORN et al., 2001; JORGE et al., 2008; SIRAICH et al., 2013a; PAULA et al., 2013; 2014).

2.4 Citocinas e dor

As citocinas são pequenas proteínas liberadas pelas células que têm um efeito específico sobre as interações e as comunicações intercelular. Podem ter ação: autocrina quando atuam nas células que as secretam, parácrina quando são secretadas por células próximas e endócrinas quando são secretadas por células distantes (SOMMER; WHITE, 2010).

Evidências significativas mostram que certas citocinas / quimiocinas estão envolvidas não só na iniciação, mas também na persistência de dor patológica, ativando diretamente neurônios sensitivos nociceptivos (WHITEHEAD et al., 2010; NADEAU et al., 2011; AUSTIN; MOALEM-TAYLOR, 2013).

As citocinas durante processos fisiológicos e patológicos do tecido nervoso periférico são produzidas por macrófagos, mastócitos, células endoteliais e células de *Schwann*. Após a lesão nervosa os macrófagos e as células de *Schwann* migram para o local da lesão e secretam citocinas e fatores de crescimento específicos necessários para a regeneração nervosa. O processo inflamatório localizado no gânglio da raiz dorsal não só aumenta as citocinas pró-inflamatórias, mas também diminui as citocinas anti-inflamatórias (XIE et al., 2006; SOMMER; WHITE, 2010).

A IL-1 β é uma citocina pró-inflamatória liberada principalmente por monócitos, macrófagos e células não imunes, durante lesão celular, infecção e inflamação. Estudos comprovam quando a IL-1 β é expressa no gânglio da raiz dorsal e na medula espinhal, reduz o limiar de ativação de neurônios nociceptivos causando disparos espontâneos do potencial de ação, ocasionando dor e hipersensibilidade (COPRAY; MANTINGH; BROUWER, 2001; SCHOLZ; WOOLF, 2002). Evidências crescentes sugerem que as quimiocinas estão envolvidas na

neuroinflamação (WHITE et al., 2007; MILLER et al., 2009) e contribuem para o processamento da dor crônica (ABBADIE et al., 2009).

Na dor inflamatória, a IL-1 β é conhecida como um mediador chave que induz a expressão de COX-2 na medula espinhal (SAMAD et al., 2001) e nas células dos gânglios da raiz dorsal (IGWE; MURRAY; MOOLWANEY, 2001).

As citocinas IL-1 β e TNF- α são as primeiras a serem formadas após o dano tecidual ou infecção, afetando diretamente os receptores específicos dos neurônios sensoriais (OLIVEIRA et al., 2011). Após o início da cascata inflamatória, estas citocinas são secretadas pelos macrófagos e aparecem na circulação e apresentam efeitos locais e sistêmicos (ALWANI et al., 2006).

O TNF- α é produzida por células polimorfonucleares e mononucleares, desempenhando fortes efeitos inflamatórios, tais como, indução da expressão endotelial de moléculas de adesão ICAM-1 e VCAM-1 (ALWANI et al., 2006), ativação de neutrófilos e fagócitos mononucleares aumento permeabilidade vascular além de atuar como um fator de crescimento para fibroblastos e angiogênese (LAWRENCE; WILLOUGHBY; GILROY, 2002; SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

A liberação sistêmica de TNF- α pode acelerar uma cascata destrutiva de eventos que resultam em lesão tecidual, disfunção orgânica e, potencialmente, morte. Entre seus efeitos sistêmicos está a indução de febre, estimulação da secreção de proteínas de fase aguda pelo fígado, ativação da cascata de coagulação dentre outros (SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

A IL-1 β , e TNF- α , são capazes de induzir hiperalgesia mediada indiretamente através de diversos mecanismos incluindo liberação de prostaglandinas, elevação na expressão do fator de crescimento neural ou de receptores da bradicinina, ou ainda por afetar as fibras simpáticas (CARVALHO; LEMÔNICA, 1998). Além de possuir efeitos sistêmicos quando secretadas em quantidades suficientes, essas citocinas são responsáveis por induzir as enzimas ciclo-oxigenases e lipoxigenases na formação de seus produtos (GÓMEZ ESTRADA; GONZÁLEZ RUIZ; MEDINA, 2011).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar a eficácia do extrato etanólico e frações das folhas de *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) Verlot, em modelo experimental de dor neuropática.

3.2 Específicos

- a) avaliar os efeitos do extrato etanólico e das frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e butanólica de *A. chica* Verlot sobre a modulação da dor neuropática;
- b) analisar o efeito das frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e butanólica de *Arrabidaea chica* Verlot sobre a atividade das enzimas antioxidantes: superóxido dismutase, catalase e glutatona;
- c) analisar o efeito das frações hexânica, clorofórmica, acetato de etila e butanólica de *Arrabidaea chica* Verlot sobre citocina pró-inflamatória IL1 na indução da dor neuropática;
- d) identificar as substâncias bioativas nas frações obtidas do extrato etanólico das folhas de *Arrabidaea chica* Verlot.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Espécie vegetal

As folhas de *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) Verlot (350g) foram coletadas no Horto Medicinal “Prof^a Berta Lange de Morretes” do Herbário Ático Seabra, Cidade Universitária Dom Delgado na UFMA, município de São Luís (MA) (Latitude: 02° 31' 47" S Longitude: 44° 18' 10" W e Altitude: 24 m) em outubro de 2015. A espécie foi identificada no Herbário “Ático Seabra”/UFMA e exsicata do material (Nº 1067) está depositada neste Herbário.

4.2 Obtenção do extrato etanólico das folhas de *Arrabidaea chica*

As folhas de *A. chica* (350g) foram secas em estufa com circulação forçada de ar a 45°C até peso constante e pulverizadas em moinho de facas, obtendo-se um pó moderadamente grosso (156g). O pó obtido foi submetido ao processo de extração por maceração na proporção droga/solvente de 1:4 (p/v) com 900 mL de etanol durante 48 h. A solução extrativa foi filtrada e concentrada em evaporador rotativo sob vácuo (40 °C), obtendo-se o extrato etanólico das folhas de *A. chica* (EEAC).

4.3 Fracionamento do extrato etanólico das folhas de *Arrabidaea chica*

Parte do EEAC (9,08 g) foi dissolvido em 100 mL da mistura metanol/água (70:30, v/v) por meio de agitação e submetido à partição líquido-líquido usando hexano, clorofórmio, acetato de etila e n-butanol. As soluções extrativas foram filtradas (Na_2SO_4 anidro) e concentradas em evaporador rotativo sob vácuo obtendo-se as frações hexânica (FH), clorofórmica (FC), acetato de etila (FAE) e butanólica (FBU).

4.4 Caracterização química do extrato etanólico e frações de *Arrabidaea chica*

4.4.1 Abordagem fitoquímica do extrato e frações de *Arrabidaea chica*

Teste cloreto férrico: Alíquotas do EEAC e frações FH, FC, FAE e FBU foram separadamente, solubilizadas solução hidroalcoólica 7:3 (etanol/água), em seguida adicionou-se 03 gotas da solução hidroalcoólica de cloreto férrico, após agitação observa-se a coloração e/ou precipitação – variável azul e/ou vermelho, positivo para fenólicos; azul a verde positivo para taninos (MATOS,1997).

Teste Liebermann-Burchard: Alíquotas do EEAC e frações FH, FC, FAE e FBU secas, separadamente foram diluídas em clorofórmio, filtradas com sulfato de sódio anidro (PA) para um tubo de ensaio e adicionadas 1mL de anidrido acético, agitadas suavemente, e depois adicionado 03 gotas de ácido sulfúrico concentrado e agitados suavemente. Após agitação observa-se a coloração azul seguida de verde permanente, positivo para esteroides; parda até vermelha positivo para triterpenos (MATOS,1997).

Determinação do teor de fenólicos totais (TFT): O TFT do EEAC e frações foi determinado com o reagente de Folin-Ciocalteu e carbonato de sódio a 20%. A mistura da reação foi mantida no escuro durante 2 horas à temperatura ambiente, e a absorbância foi medida a 760 nm em espectrofotômetro UV-Vis (Lambda 35 Perkin Elmer, Inc. Waltham, USA). TFT foi calculado a partir da curva de calibração construída com soluções padrão de ácido gálico (Merck) (1,0-30,0 µg/mL) ($r^2 = 0,9985$) e expresso em miligramas de equivalente de ácido gálico/g do extrato ou fração (DUTRA et al., 2014). As análises foram realizadas usando três alíquotas de cada amostra, medida em triplicata e o valor médio foi calculado para cada amostra.

Determinação do teor de flavonoides totais (TFLT): O TFLT do EEAC e frações foi determinado utilizando o método colorimétrico com solução metanólica de cloreto de alumínio ($AlCl_3$) e a absorbância foi medida a 425 nm em espectrofotômetro Ultravioleta visível (Lambda 35 PerkinElmer, Inc.Waltham USA). A concentração foi calculada a partir da curva de calibração construída com soluções padrão de quercetina (Merck) (1,0-30,0 µg/mL) ($r^2 = 0,9929$) e expresso em miligramas de equivalentes de quercetina/g amostra (DUTRA et al., 2008). As análises foram realizadas em triplicata.

Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência com detector de Ultravioleta visível (CLAE/UV-vis): A análise por CLAE das frações FH e FAC foram realizadas num cromatógrafo líquido Thermo Finnigan Surveyor Autosampler (San Jose, CA, USA) equipado com um injetor com um loop de 25 μ L, e um detector de UV. A coluna Hypersil BDS C-18 column (250 \times 4.6 mm, 5 μ m; Thermo Electron Corp., Waltham, MA, USA), protegida por uma pré-coluna C-18 (4 \times 3 mm, 5 μ m, Gemini; Phenomenex) foi usada como fase fixa.

A separação das substâncias das amostras foi realizada à temperatura ambiente com um programa de gradiente de eluição a uma taxa de fluxo de 1,0mL/min. A fase móvel consistiu de água Milli-Q contendo 0,1% de ácido fórmico (A) e aceto nitrila (B). O gradiente linear aplicado foi 0-35 min, 5% -30 B; 35-50 min, 30-70% de B; 50-60 min, 70-100% B. A coluna foi reequilibrada durante 10 min antes da próxima corrida. O volume de injeção no sistema foi de 25 μ L, e detecção no UV-vis foi realizada a 254 nm. As amostras antes de serem injetadas no CLAE, foram diluídas em metanol (grau CLAE) para se obter uma concentração final de 3 mg/mL, filtradas em filtro de seringa de nylon (0,22 μ m, Allcrom, São Paulo). O volume da amostra injetado foi de 25 μ L a detecção foi realizada em 254nm. Todas as análises foram realizadas sob as mesmas condições.

Os compostos foram identificados com base na co-injecção de padrões de ácido gálico, β -sitosterol, ácido cafeico, ácido cumárico, rutina, miricetina e apigenina. Na ausência de padrões disponíveis, os compostos foram identificados com base em dados da literatura.

Análise da fração hexânica (FH) por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas (CLAE/DAD/EM/EM): A FH foi analisada em cromatógrafo líquido de alta eficiência acoplado a um espectrômetro de massas CLAE/LC-10AD (Shimadzu), equipado com detector de arranjo de fotodiodo, acoplado com espectrômetro de massas LC-MS/MS (Bruker Daltonics Esquire 3000 Plus), com analisador tipo íon trap quadrupolo em modo *tandem*, com ionização por elétron ebulização (*electrospray ionization*, ESI). A fase móvel utilizada foi água Milli-Q (Millipore) com 0,1% de ácido fórmico (eluyente A) e metanol (eluyente B). A eluição foi realizada em gradiente linear de 0 min - 5% B 2 min - 40% B 20 min - 50% B 30 min - 60% B 40 min - 70% B 50 min - 80% B utilizando coluna analítica Phenomenex Luna C18 de fase reversa (250mm x 4,60 mm, 5 μ m, Thermo). As amostras foram diluídas em metanol e água Milli-Q 0,1% de ácido fórmico na

concentração final de 5mg/mL e filtradas em filtro de seringa Nylon (0,22µm, Allcrom). O volume da amostra injetado no sistema foi de 25 µL, com fluxo de 0,6 mL/min e detecção UV-Vis em 254 nm. Os espectros de massas foram obtidos em modo negativo, utilizando nitrogênio ultrapuro como gás de nebulização com fluxo de 7.0 L/min, pressão de 27 psi, potencial de 4.0 kV, temperatura de 320°C e fluxo para massas de 100µL/min, em baixa resolução, na faixa de 100 a 1000*m/z*. A identificação dos constituintes foi obtida com base na massa do íon molecular, na fragmentação do íon molecular e fragmentação dos íons (*m/z*) comparados com os descritos na literatura.

4.5 Testes de atividade farmacológica

4.5.1 Animais

Neste estudo foram utilizados 64 ratos da linhagem Wistar, espécie *Rattus norvegicus*, adultos, machos e fêmeas com variação de peso entre 150 a 300g fornecidos pelo Biotério Central da UFMA. Os animais foram mantidos no Biotério Setorial do Prédio Pesquisa e Pós-Graduação do Centro de Ciências Biológicas e Saúde (CCBS/UFMA), sob condições controladas de luz (ciclo claro/escuro de 12 horas) a uma temperatura de $22 \pm 2^\circ \text{C}$ e umidade de ar 40 a 60%, com ração comercial da marca Labina® e água *ad libitum*. O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de animais (CEUA/UFMA sob o número 2311006040/2013-04).

4.5.2 Caracterização do tipo de estudo e seleção da amostra

Este estudo foi caracterizado como ensaio pré-clínico experimental, com distribuição aleatória dos grupos de animais. Para realização dos procedimentos experimentais foram obedecidas as normas éticas da *International Association for Study of Pain* (IASP), que regulam experimentos realizados em animais (COMMITTEE FOR RESEARCH AND ETHICAL ISSUES OF THE IASP, 1983).

4.5.3 Delineamentos experimentais

Os animais foram divididos em 2 grupos: o primeiro grupo (G1) com 24 animais, foi utilizado para o ensaio com o extrato etanólico de *A. chica* Verlot (EEAC). O segundo grupo (G2) com 40 animais foi utilizado para o ensaio com as frações hexânica (FH), clorofórmica (FC), acetato de etila (FAE) e butanólica (FBU) do extrato etanólico de *A. chica* Verlot.

O G1 foi subdividido em 4 subgrupos experimentais, cada um com seis animais sendo:

- a) controle (n=06): animais que não foram submetidos à intervenção cirúrgica;
- b) SHAM (n=06): animais nos quais foi realizada a incisão dos tecidos até a visualização do nervo ciático, porém o nervo não foi comprimido;
- c) salina (n=06): animais em que o nervo ciático foi isolado e comprimido em seu tronco comum, tratado com NaCl 0.9%;
- d) EEAC: animais em que o nervo ciático foi isolado e comprimido no tronco comum, os animais foram tratados por via oral do primeiro dia (D1) após indução até o décimo dia (D10) com extrato etanólico de *A. chica* (EEAC-500mg/Kg).

Os animais do G2 foram divididos em três grupos experimentais assim distribuídos:

- a) controle (n=05): animais que não foram submetidos a nenhum tipo de intervenção cirúrgica;
- b) SHAM (n=05): animais nos quais foi realizada a incisão dos tecidos até a visualização do nervo ciático, porém o nervo não foi comprimido;
- c) cirúrgico com compressão (n=30): animais em que o nervo ciático foi isolado e comprimido no tronco comum. Este grupo foi dividido em seis subgrupos cada um com cinco animais, denominados de: FH, FC, FAE, FBU, grupo salina e o controle positivo gabapentina. Os subgrupos FH, FC, FAE e FBU foram tratados por via oral com as diferentes frações do extrato na dose 1mg/Kg, o grupo controle positivo recebeu gabapentina (1mg/Kg v.o) e o grupo salina NaCl 0,9% (0,1ml/Kg). Os animais foram tratados no primeiro dia (D1) após

a indução até o décimo quinto dia (D15). Em seguida os animais foram eutanasiados para coleta do sangue, para o estudo bioquímico.

4.6 Modelo experimental de ciatalgia

Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de cloridrato de cetamina 2,5% - (90 mg/kg) e cloridrato de xilazina 1,75% - (10 mg/kg). Após a tricotomia, no local do procedimento, foi feita uma incisão paralela às fibras do bíceps femoral da coxa direita do animal, expondo assim o nervo ciático. Seguindo o modelo descrito por Bennet e Xie (1998) e modificado por nosso grupo de estudo, que efetuou a compressão no tronco comum do ciático da pata direita com uma força média de 0,44 Kgf, através de aparato desenvolvido no nosso laboratório, com finalidade de induzir dor neuropática no trajeto do nervo ciático (Patente – BR 10 2017 000325 6, depositada em: 06/01/2017), em seguida foi feita a sutura por planos.

A força de compressão foi determinada pela percepção do pesquisador do movimento reflexo da pata lesionada à medida que a compressão era efetuada. Finalizando este procedimento, o local da incisão foi suturado com fio de nylon não absorvível e desinfetado com solução de rifamicina.

Os animais pertencentes ao grupo SHAM foram submetidos ao procedimento anestésico e de isolamento do nervo ciático, porém não receberam nenhuma compressão neste nervo. O grupo controle não foi submetido a nenhuma intervenção cirúrgica.

4.7 Análise comportamental

4.7.1 Hiperalgisia térmica - Teste da Placa Quente

Este teste, proposto por Woolfe e Mc Donald (1944) consiste em quantificar o tempo de reação do animal ao estímulo térmico, ou seja, do momento em que o animal é colocado em uma placa quente ($55\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1,0\text{ }^{\circ}\text{C}$) até observar quanto tempo leva para manifestar uma resposta (lamber, morder, saltar ou levantar as patas). Essas alterações comportamentais indicam nocicepção, já que são

respostas integradas supraespinhalmente (YAMAMOTO; NOZAKI-TAGUCHI; CHIBA, 2002).

4.7.2 Deambulação forçada - Teste de Rotarod

Os animais foram colocados no rotarod (modelo IITC Life Science, Califórnia, Estados Unidos) na velocidade de 16 rpm por um período de tempo de 300 segundos. A utilização do membro afetado foi avaliada pela deambulação forçada. O uso da pata foi graduado em uma escala numérica que varia de 5 a 1, em que: 5= uso normal do membro; 4= claudicação leve; 3= claudicação grave; 2= intermitente desuso da pata afetada; 1= completo desuso da pata afetada (KALFF et al., 2010).

4.7.3 Alodínia mecânica - Teste de Von Frey

A alodinia mecânica foi realizada com um analgesímetro digital (modelo Insight, São Paulo, Brasil), que consiste em um transdutor de pressão conectado a um contador digital de força expressa em gramas (g). O contato do transdutor de pressão com a pata dos animais foi realizado por meio de uma ponteira descartável de polipropileno com 0,5 mm de diâmetro adaptada ao aparelho (KALFF et al., 2010; VIVANCOS et al., 2004).

Para adaptação ao ambiente, os animais foram colocados em caixas de acrílico medindo 12 x 20 x 17cm, cujo assoalho consiste de uma rede de malha de 5mm², constituída de arame não maleável de 1mm de espessura, durante 15 minutos antes do experimento. Espelhos foram posicionados 25 cm abaixo das caixas de experimentação para facilitar a visualização da região plantar das patas dos animais.

O experimentador aplicou, por entre as malhas da rede, uma pressão linearmente crescente no centro da região plantar de pata do rato até o animal produzir uma resposta caracterizada como sacudida (“*flinch*”) da pata estimulada. Os estímulos foram repetidos por até seis vezes, nas patas ipsilateral e contralateral, até o animal apresentar três medidas similares de resposta “*flinch*” após a retirada da pata (KALFF et al., 2010; VIVANCOS et al., 2004).

O limiar nociceptivo de retirada da pata (LNRP) foi definido como o percentual de força para provocar uma suspensão ativa na pata ipsilateral afetada e foi determinado da seguinte maneira:

$$\text{LNRP (\%)} = \frac{\text{LNRPA}}{\text{LNRPA} + \text{LNRPC}} \times 100$$

Onde:

LNRP é o limiar nociceptivo de retirada da pata;

LNRPA é limiar nociceptivo de retirada da pata afetada;

LNRPC limiar nociceptivo de retirada da pata contralateral.

4.7.4 Incapacidade funcional - Teste de Weight Bearing

Os animais são colocados em uma câmara de vidro angulada e posicionados, de modo que cada pata traseira repousasse sobre plataformas diferentes. O peso exercido sobre cada pata traseira (mensurado em gramas) foi avaliado em um período de cinco segundos. A aferição final da distribuição do peso foi dada por uma média de três aferições. As alterações na distribuição do peso nas patas traseiras foram calculadas da seguinte maneira:

$$\text{Distribuição do peso (\%)} = \frac{\text{PPA}}{\text{PPA} + \text{PPC}} \times 100$$

Onde:

PPA é o peso da pata afetada;

PPC o peso da pata contralateral.

4.8 Análises bioquímicas

4.8.1 Coleta de sangue

Ao término do experimento, os animais foram anestesiados e após laparotomia, a artéria abdominal foi visualizada e puncionada com scalp nº 21 para a coleta do sangue. Para a separação do soro, o sangue coletado foi imediatamente incubado em banho Maria 37°C por 30 minutos e, a seguir, centrifugado a 3000

rotação por minuto (rpm) durante 10 minutos. O plasma foi separado na presença de EDTA a 10% e sobre centrifugação nas mesmas condições citadas anteriormente.

4.8.2 Dosagem da citocina IL-1 β

A determinação do nível da citocina pró-inflamatória IL-1 β foi realizada a partir de soro sanguíneo, utilizando kit de ELISA de acordo com o protocolo especificado pelo fabricante (BIOSCIENCE, Inc. Science Center Drive, San Diego, CA-USA).

4.8.3 Quantificação de proteínas

As proteínas foram quantificadas pelo método descrito por Lowry e colaboradores, que utiliza como padrão uma solução de albumina bovina na concentração de 1 mg/mL (LOWRY et al., 1951). Para a realização das dosagens os reagentes usados foram o reativo de Folin Ciocalteu, diluído em água destilada na proporção de 1:3, o reativo C, que é composto por 50mL do reativo A, 0,5mL do reativo B1 e 0,5mL do reativo B2, onde os reativos A, B1 e B2 são respectivamente:

- a) NaHCO_3 (bicarbonato de sódio) 2% (P/V) em NaOH (hidróxido de sódio) 0,1N;
- b) $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ (sulfato de cobre) 1% (P/V);
- c) $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ (tartarato de sódio e potássio) 2% (P/V).

Em tubo de ensaio, foram adicionados 20 μ L de soro sanguíneo em 0,8mL de água destilada e 2mL de reativo C preparado a fresco, aguardando-se 10 minutos. Em seguida, adicionou-se 0,2mL do reativo de Folin Ciocalteu diluído, aguardando-se mais 30 minutos. Assim, a solução adquiriu uma coloração azulada que foi medida em espectrofotômetro, (Cary® 50UV-Vis, Varian) a 625 nm. O cálculo foi feito utilizando-se o fator de correção médio calculado a partir da solução padrão de albumina bovina.

Determinação da enzima superóxido dismutase (SOD)

A técnica utilizada para determinação da SOD baseou-se na inibição da reação do radical superóxido com o pirogalol. O superóxido é gerado pela auto

oxidação do pirogalol quando em meio básico. A SOD presente na amostra compete pelo radical superóxido com o sistema de detecção. Portanto, quanto maior for a concentração de SOD na amostra, menor seria a auto oxidação do pirogalol.

Neste ensaio, não se pode determinar a concentração da enzima nem sua atividade em termos de substrato consumido por unidade de tempo, por isso, se utiliza a quantificação em unidades relativas. Uma unidade de SOD é definida como a quantidade de enzima que inibe em 50% a velocidade de oxidação do detector. A oxidação do pirogalol leva à formação de um produto colorido, detectado espectrofotometricamente a 420 nm. A atividade da SOD é determinada medindo-se a velocidade de formação do pirogalol oxidado (MARKLUND, 1985).

Utilizaram-se os seguintes reagentes: Solução tampão (Tris-base na concentração de 50mM; EDTA na concentração de 1mM em pH 8,2); Pirogalol 24mM (em ácido clorídrico a 10mM) e a catalase a 30 μ M.

Para obter o resultado em unidade de SOD, necessita-se de um fator de calibração. Por isso, fez-se necessário a construção de uma curva padrão com uma solução de SOD de concentração conhecida. Desta forma, calculou-se o fator de calibração necessário para converter a percentagem de inibição da auto oxidação em unidades de enzima.

No ensaio, adicionou-se à cubeta 988 μ L de tampão Tris, 4 μ L de catalase. Zerou-se o espectrofotômetro e adicionou-se 8 μ L de pirogalol, observando a oxidação do mesmo. Desta forma, obtivemos o máximo (100%) de oxidação desta substância, para calcular a percentagem de inibição causada pela SOD da amostra. Os resultados foram expressos em U SOD/mg proteína.

Determinação da enzima catalase

A atividade da catalase é diretamente proporcional a taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio, e obedece a uma cinética de pseudo primeira ordem. Sendo assim, a atividade da enzima catalase pode ser medida através da avaliação do consumo do peróxido de hidrogênio.

Este teste consiste em avaliar a diminuição da absorbância no comprimento de onda de 240 nm, sendo este o comprimento de onda onde há a maior absorção pelo peróxido de hidrogênio, utilizando-se cubetas de quartzo devido à alta energia do comprimento de onda no qual foram realizadas as medidas.

Para realização deste ensaio foram utilizados os reagentes:

- a) Solução tampão de fosfato de sódio a 50mM e pH 7,4;
- b) Peróxido de hidrogênio 0,3 mol/l

Em cubeta de quartzo, foram adicionados 955 μ L do tampão fosfato e 10 μ L de amostra do tecido ou 30 μ L de amostra de soro, esta cubeta foi colocada em espectrofotômetro e descontada contra um branco de tampão fosfato. Após, foram adicionados 35 μ L do peróxido de hidrogênio para o tecido e 15 μ L para amostra de soro e foi feito o monitoramento da diminuição da absorbância no comprimento de onda selecionado. Os resultados foram expressos em pmoles por mg de proteína (BOVERIS; CHANCE, 1973).

Determinação da enzima glutathiona peroxidase (GPx)

A enzima glutathiona peroxidase (GPx) é uma proteína com 80Kda, com função de converter H_2O_2 em H_2O . Nesse processo, a enzima reduz 2 glutathionas reduzidas (GSH) gerando uma glutathiona oxidada (GSSG) tendo água como subproduto (TOWNSEND; TEW; TAPIERO, 2003).

Os segmentos da medula espinhal foram homogeneizados a 10% (100mg/ml) em tampão de fosfato de potássio dibásico (K_2HPO_4) 50mM pH 7,0 e o homogenado centrifugado a 1.500g (4000 rpm) por 10 minutos. O sobrenadante foi utilizado no ensaio.

A atividade da GPx foi determinada pelo método de Wendel (1981) que utiliza o peróxido de terbutila como substrato da reação, ocorrendo a oxidação da GSH pela GPx gerando GSSG, que é convertido em GSH pela glutathiona redutase, consumindo nessa reação uma molécula de NADPH, a qual pode ser acompanhada em espectrofotômetro a 340nm. O meio de reação foi composto por tampão (K_2HPO_4) 50mM pH 7.0, EDTA 1mM, glutathiona redutase 0,1U/mL, GSH 1mM e NADPH 0,2mM. A reação foi iniciada com a adição de peróxido de terbutila 0,5mM e acompanhada durante 5 minutos.

5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A comparação das médias de diferentes grupos experimentais foi realizada com teste t de Student ou análise de variância univariada (One-way ANOVA), seguida pelo teste de Newman Keuls.

Na avaliação de duas fontes de variabilidade, foi utilizado análise de variância bivariada (TWO-way – ANOVA). O valor de $p < 0,05$ foi considerado como indicativo de significância e os dados obtidos foram analisados através do software “graphpadInstal® (GraphPad software, San Diego, CA).

6 RESULTADOS

6.1 Fracionamento do extrato etanólico das folhas de *Arrabidaea chica*

A extração etanólica das folhas secas de *A. chica* resultou em 10,60% de rendimento extrativo, obtendo-se o extrato etanólico (EEAC), com coloração avermelhada e cheiro levemente adocicado. Após fracionamento por partição líquido-líquido, obtivemos as frações: FH (15,85%), FC (12,99%), FAE (3,96%) e FBU (67,18%).

6.2. Caracterização química do extrato etanólico e frações de *Arrabidaea chica*

Os resultados dos testes de abordagem fitoquímica demonstraram a presença de compostos fenólicos, taninos, triterpenos e esteroides no extrato e frações conforme apresentado na Tabela 1.

Tabela 1 - Teste de abordagem fitoquímica das classes de compostos no extrato etanólico (EEAC) e frações das folhas de *Arrabidaea chica* (MATOS, 1997).

Amostras	Testes abordagem fitoquímica			
	Compostos fenólicos	Taninos	Triterpenos	Esteroides
EEAC	+++	+	++	+
FH	++	-	++	+++
FC	+++	++	+	+++
FAE	++	-	+	+++
FBU	++	-	-	+

Nota: EEAC, extrato etanólico das folhas secas de *Arrabidaea chica*; FH, fração hexânica do EEAC; FC, fração clorofórmica do EEAC; FAE, fração acetato de etila do EEAC; FBU, fração butanólica do EEAC.

Os teores de polifenólicos e flavonoides totais do EEAC e das FH, FC, FAE e FBU estão mostrados na Tabela 2, sendo que a FAE apresentou os maiores teores de polifenólicos totais, enquanto a FH, a maior concentração de flavonoides totais.

Tabela 2 - Teores de polifenólicos (TPC) e flavonoides totais (TFLT) das frações do extrato etanólico das folhas de *Arrabidaea chica*.

Amostras	TPC (mg GAE/g)	TFLT (µg/mL)
FH	19,597 ± 2,904	1,708 ± 0,026
FC	35,462 ± 2,149	1,977 ± 0,186
FAE	51,221 ± 3,927	0,941 ± 0,177
FBU	7,170 ± 0,492	Nd

Nota: Valores representam a média ± desvio padrão (n=3); TPC, teor de polifenólicos totais; TFLT, teor de flavonoides totais; FH, fração hexânica do EEAC; FC, fração clorofórmica do EEAC; FAE, fração acetato de etila do EEAC; FBU, fração butanólica do EEAC; nd (Não detectado).

Fonte: Autor.

6.3 Análise da FH e FAE por cromatografia líquida de alta eficiência com detector de ultravioleta visível (CLAE/UV-vis).

Nas Figuras 02 e 03 estão apresentados os perfis cromatográficos por CLAE/UV-vis da FH e FAE.

Figura 02 - Perfil cromatográfico por CLAE/UV-Vis, a 254 nm da FH (fração hexânica do extrato etanólico das folhas de *Arrabidaea chica*).

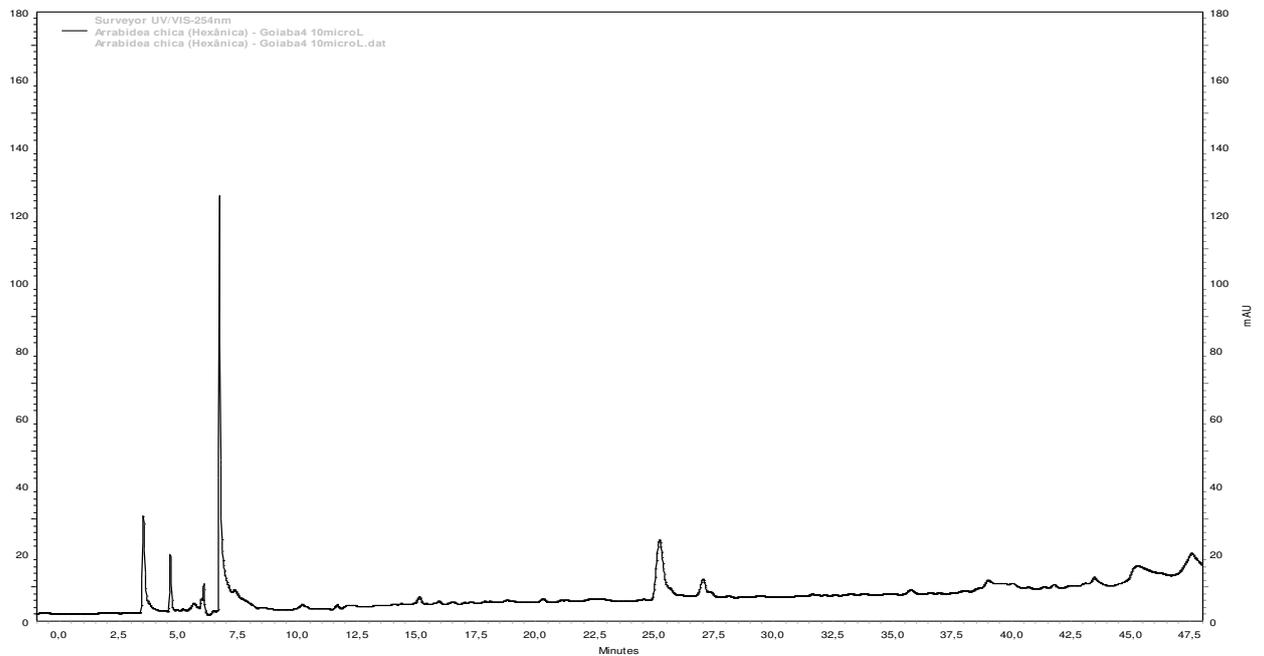
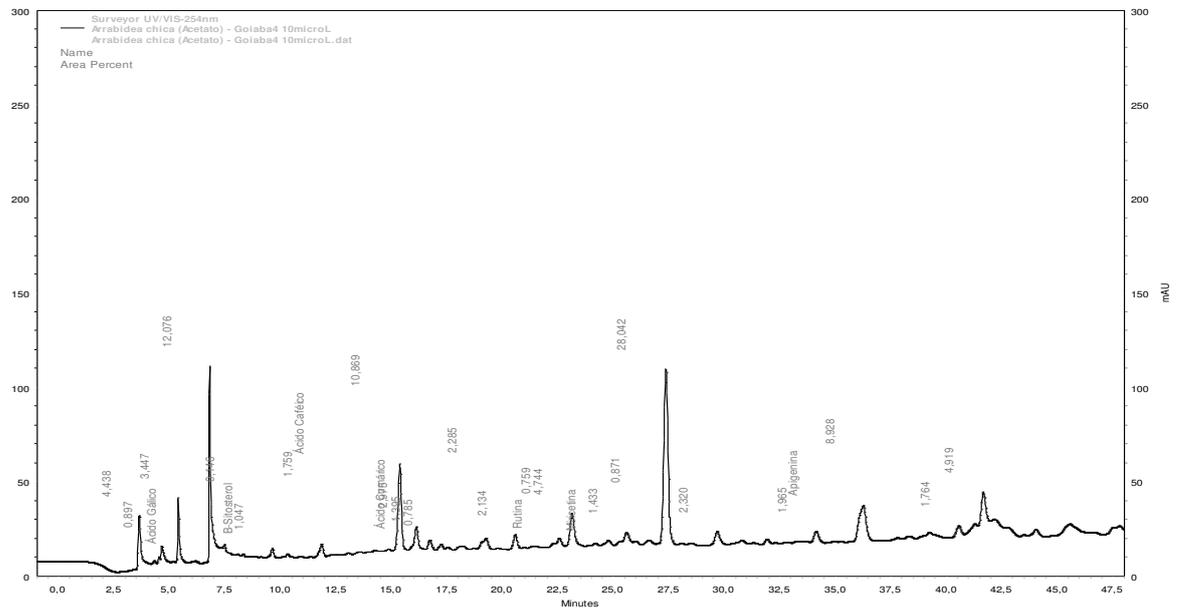


Figura 03 - Perfil cromatográfico por CLAE/UV-Vis, a 254 nm da FAE (fração acetato de etila do extrato etanólico das folhas de *Arrabidaea chica*).



A tabela 3 mostra a identificação das substâncias químicas da fração FEA.

Tabela 3 - Substâncias identificadas na FAE (fração acetato de etila do extrato etanólico das folhas de *Arrabidaea chica*) por CLAE/UV-Vis, a 254 nm.

Número pico	Substâncias
1	Ácido gálico
2	β -sitosterol
3	Ácido cafeico
4	Ácido cumarico
5	Rutina
6	Miricetina
7	Apigenina

6.4 Análise da fração hexânica (FH) por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a espectrômetro de massas (CLAE/DAD/EM/EM)

Na Tabela 4 sumariza-se a tentativa de identificação de substâncias presentes na fração hexânica por CLAE/DAD/EM/EM.

Tabela 4 - Tentativa de identificação de substâncias da FH (fração hexânica do extrato etanólico das folhas de *A. chica*) por CLAE/DAD/EM/EM.

Número Substâncias	tR (min)	PM	[M – H] ⁻ (m/z)	EM/EM (m/z)	Substâncias identificadas
1	7,3	317,27	316,67		Carajuflavona
2	43,6	602,87		298,79	Derivado diglicosilado de carajurina
3	43,7	651,57			Malvidin-3-O(6-O-acetyl-glucoside-4-vinylphenol
4	47,8	504,89	502,98	-	Peonidin-3-O-(6"-acetil-glucoside)
5	61,8	488,86	487,06	469,11	Ácido jacarandico
6	77,8	618,39	617,09		Ácido jacoumarico
7	78,3	618,39	617,10		Isômero do ácido jacoumarico
8	86,3	254,80	-	-	apigeninidina
9	87,5	284,01	281,88		dimetoxi apigeninidina

Nota: tR, tempo de retenção; min, minutos; PM, peso molecular; [M – H]⁻, molecular ion; EM/EM, espectro de massas/espectro de massas.

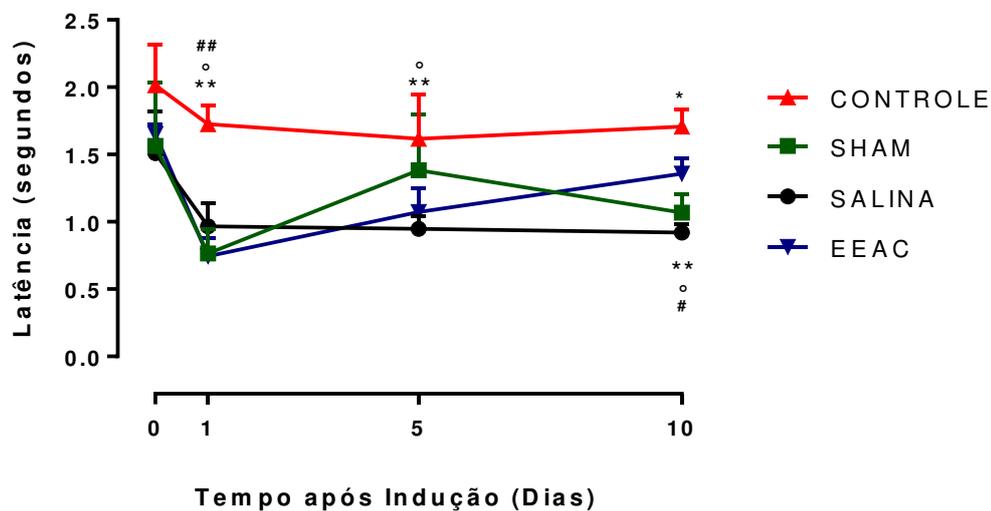
Na fração hexânica, foram identificadas as substâncias: carajuflavona, derivado diglicosilado de carajurina, malvidina-3-O(6-O-acetil-glucosideo-4-vinilfenol), peonidin-3-O-(6"- acetil-glucoside), ácido jacarandico, ácido jacoumarico, isômero do ácido jacoumarico, apigeninidina e dimetoxi apigeninidina (TABELA 04 e FIGURA 02). Na fração acetato de etila foram identificados: ácido gálico, β-sitosterol, ácido cafeico, ácido cumarico, rutina, miricetina e apigenina foram identificadas (TABELA 03 e FIGURA 03).

6.5 Avaliação do efeito do extrato etanólico de *Arrabidaea chica* (EEAC) na dor neuropática

6.5.1 Hiperálgia térmica - Teste da Placa Quente

A Figura 04 mostra que no primeiro dia após indução da dor neuropática DN, houve redução no tempo de latência nos grupos: SALINA (52,24%); SHAM (62,19%) e EEAC (63,19%), quando comparados ao grupo Controle. No quinto dia de avaliação clínica no grupo SHAM houve aumento de 31,89% no tempo de resposta ao teste em comparação com os grupos SALINA e de 22,47% em relação ao grupo EEAC. Porém, ao final do tratamento, no décimo dia, houve aumento significativo de 48,35% no tempo de latência à dor, no grupo tratado com o EEAC (500 mg/Kg), quando comparado com o grupo Salina, que não recebeu nenhum tratamento.

Figura 04 - Efeito da administração oral do Extrato Etanólico de *A. chica* (EEAC, 500 mg/Kg, v.o.) na hiperálgia térmica (Placa Quente) em modelo experimental de dor neuropática (DN) em ratos.

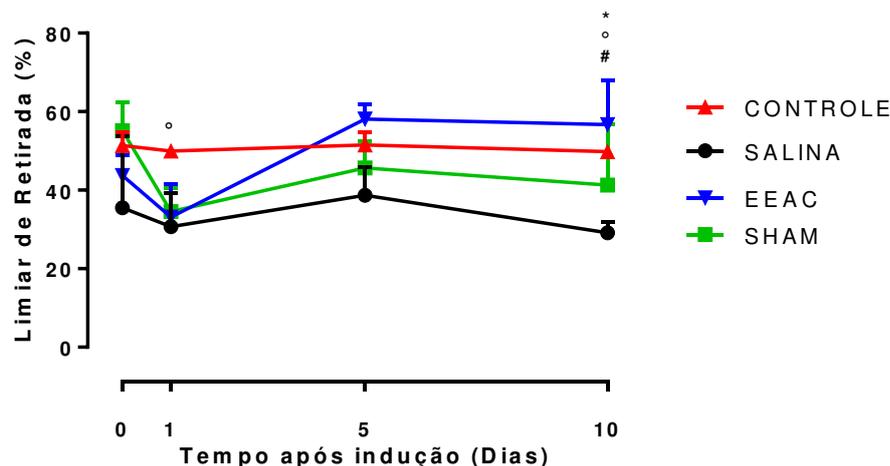


Nota: ANOVA – Newman Keuls ($p < 0,05$). * Indica diferença do grupo SALINA em relação ao grupo SHAM. ** Indica diferença do grupo EEAC em relação ao grupo ao controle. ^o Indica diferença do grupo SALINA em relação ao grupo CONTROLE. # Indica diferença do grupo EEAC em relação ao grupo SALINA. ## Indica diferença do grupo CONTROLE em relação ao grupo SHAM.

6.5.2 Avaliação da alodinia mecânica - Von Frey

A Figura 05 mostra que no primeiro dia após indução da DN, houve redução no limiar nociceptivo de retirada da pata entre os grupos estudados: SALINA (40,15%); SHAM (32,72%) e EEAC (35,45%), sendo que somente o grupo SALINA foi significativo ($p = 0,0191$), quando comparado ao grupo CONTROLE. O grupo tratado com EEAC (500 mg/Kg), durante os 10 dias de experimento, apresentou melhora significativa na alodinia mecânica, no quinto dia (D5 = 33,38%, $p = 0,0026$) e D10 (48,61%) com ($p < 0,001$) quando comparado ao grupo SALINA.

Figura 05 - Efeito da administração oral do EEAC (500 mg/Kg, v.o.) na alodinia mecânica (Von Frey) em modelo experimental de dor neuropática em ratos.



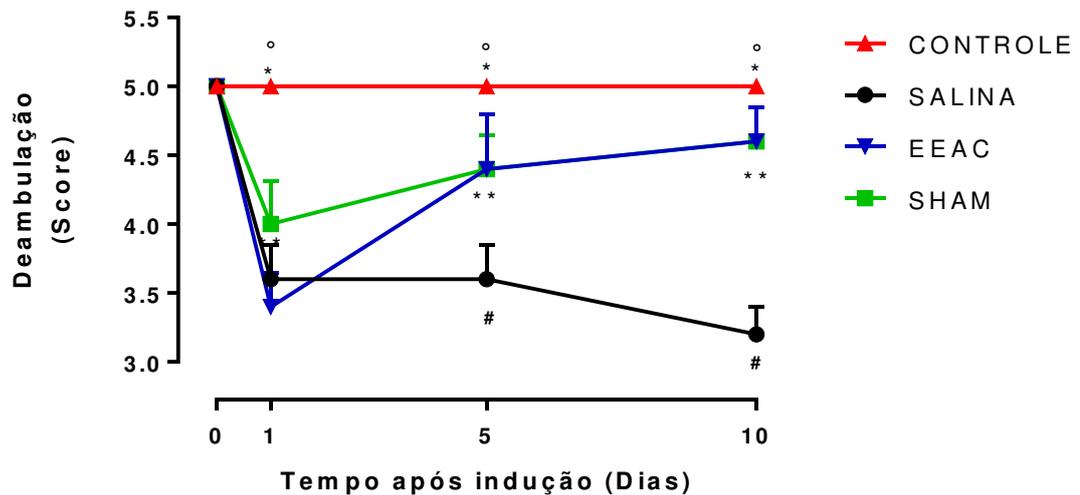
Nota: ANOVA – Newman Keuls ($p < 0.05$). * Indica diferença do grupo SALINA em relação ao grupo SHAM. ° Indica diferença do grupo SALINA em relação ao grupo CONTROLE. # Indica diferença do grupo EEAC em relação ao grupo SALINA.

6.5.3 Avaliação da deambulação forçada – Rotarod

A Figura 06 mostra o comprometimento da marcha no primeiro dia após a indução da DN, onde se percebe a redução do escore da marcha nos grupos: SALINA e EEAC apresentaram claudicação grave (escore 3) ($p < 0,0001$) e o grupo SHAM mostrou claudicação leve (escore 4) ($p = 0,0049$), quando comparados ao grupo CONTROLE (escore 5 = marcha normal). Os animais tratados com o EEAC apresentaram melhoras no escore da marcha no D5, com escore = 4,4 ($p = 0,0346$) e D10, com escore = 4,6 ($p < 0,0001$), classificados como marcha normal quando

comparados com o grupo SALINA nos mesmos tempos, D5 (escore = 3,6) e no D10 (escore = 3,2), que foram classificados com claudicação grave.

Figura 06 - Efeito da administração via oral do EEAC (500 mg/kg, v.o.) na deambulação (Rotarod) em modelo experimental de dor neuropática em ratos.



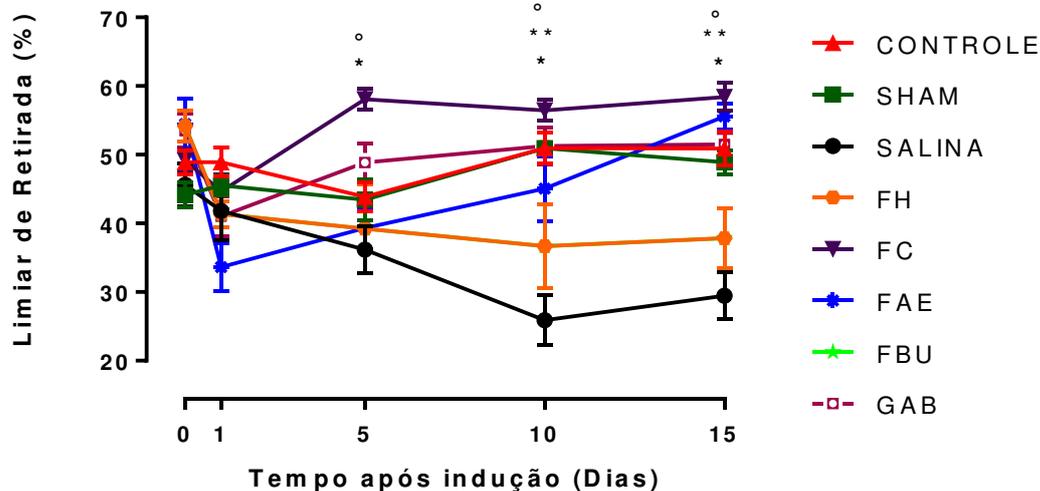
Nota: ANOVA – Newman Keuls ($p < 0.05$). * Indica diferença do grupo SALINA em relação ao grupo SHAM. ** Indica diferença do grupo EEAC em relação ao grupo CONTROLE. ° indica diferença do grupo SALINA em relação ao grupo CONTROLE. # Indica diferença do grupo EEAC em relação ao grupo SALINA.

6.6 Efeito das frações da *Arrabidaea chica* na dor neuropática

6.6.1 Análise da alodinia mecânica nos animais tratados com as frações do EEAC após a indução da DN - Teste de Von Frey

A Figura 07 mostra que no primeiro dia após indução da DN, houve aumento no limiar nociceptivo da pata ipsilateral dos animais, indicando alodinia mecânica entre os grupos estudados: SALINA (16,13%); SHAM (6,91%), GABAPENTINA (16,13%) e as frações: FH (15,42%), FC (7,91%), FAE (31,28%) e FBU (15,42%), quando comparado ao grupo CONTROLE.

Figura 07 - Efeito da administração oral da Fração Hexânica (FH), Fração Clorofórmica (FC), Fração Acetato de Etila (FAE) e Fração Butanólica (FBU) (1 mg / kg, v.o.), obtidas a partir do Extrato Etanólico de *A. chica*, e da gabapentina (GAB, 1 mg/kg) na alodinia mecânica (Von Frey) em modelo experimental de dor neuropática (DN) em ratos.



Nota: ANOVA – Newman Keuls ($p < 0.05$). * Indica diferença do grupo tratado com a FC em relação ao grupo SALINA (D5 ao D15). ** Indica diferença do grupo FAE em relação ao grupo SALINA (D10 ao D15). ° Indica diferença do grupo GAB (1 mg/Kg, v.o.), do D5 ao D15 em relação ao grupo SALINA.

Os animais tratados com as FC e FAE apresentaram melhora significativa na alodinia mecânica, do primeiro (D1) ao décimo quinto dia (D15) do tratamento. A FC no D5 reduziu em 37,71% o limiar nociceptivo ($p = 0,002$), no D10 reduziu em 45,88% ($p < 0,0001$) e no D15 em 49,53% ($p < 0,0001$). A FAE reduziu o limiar nociceptivo em 42,40% no D10 ($p = 0,0018$) e em 46,96% no D15 ($p < 0,0001$), quando comparada ao grupo SALINA.

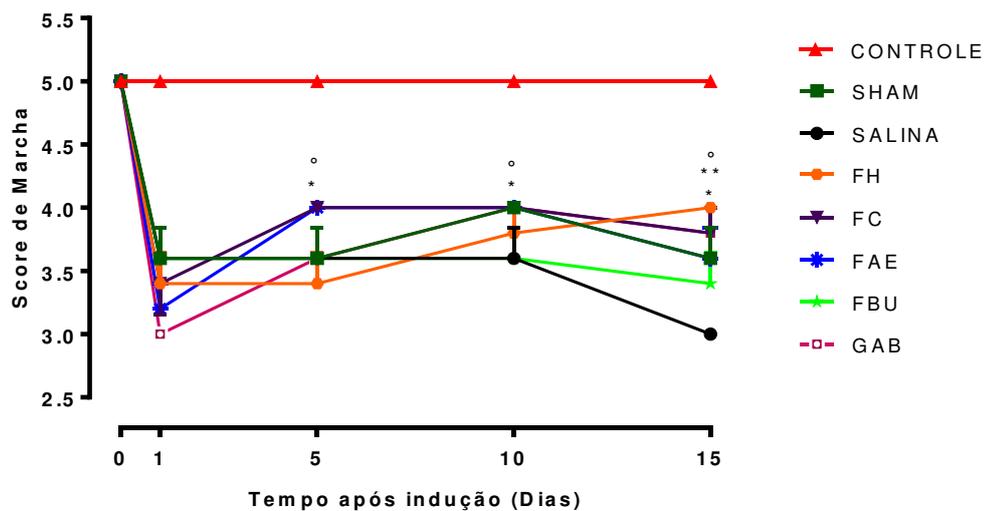
Ressaltando que a FC e a FAE apresentaram intensidade de efeito superior à gabapentina, que apresentou diminuição da alodinia no décimo e décimo quinto dia após a indução de 50,55% e 57,23%, respectivamente.

6.6.2 Análise da atividade locomotora dos animais tratados com as frações do EEAC após a indução da DN – Teste Rotarod

A Figura 08 mostra o comprometimento da marcha no primeiro dia após a indução da DN, onde se observa a redução do escore da marcha nos grupos tratados com as frações do EEAC (FH, FC, FAE e FBU), GABAPENTINA e SALINA que apresentaram escore 3, que indica claudicação grave ($p < 0,0001$) e o grupo

SHAM, escore 4, indicando claudicação leve ($p=0,0049$), quando comparados ao grupo CONTROLE (escore 5 = normal).

Figura 08 - Efeito da administração oral da Fração Hexânica (FH), Fração Clorofórmica (FC), Fração Acetato de Etila (FAE) e Fração Butanólica (FBU) (1 mg / kg, v.o.), obtidas a partir do Extrato Etanólico de *A. chica* e, da gabapentina (GAB, 1 mg/kg) na marcha (Rotarod), em modelo experimental de dor neuropática em ratos.



Nota: ANOVA – Newman Keuls ($p < 0.05$). * Indica diferença dos grupos tratados com FC e FAE em relação ao grupo SALINA (D5 ao D15). ** Indica diferença do grupo FH em relação ao grupo SALINA (no D15). ° Indica diferença do grupo GAB (1 mg/Kg, v.o.) (D5 ao D15) em relação ao grupo SALINA.

Os animais tratados com a FC e FAE apresentaram melhoras no escore da marcha do quinto ao décimo quinto de 26% e 20% respectivamente (escore = 4, $p = 0,0314$) quando comparado com o grupo SALINA (escore = 3). No D15 os animais tratados com a FH apresentaram melhora de 33,33% na marcha (escore = 4), assim como os tratados com a FAE que mostraram o mesmo comportamento dos animais controles positivo tratados com a gabapentina de 26,6% (escore = 3,8) quando comparado com o grupo SALINA (escore = 3).

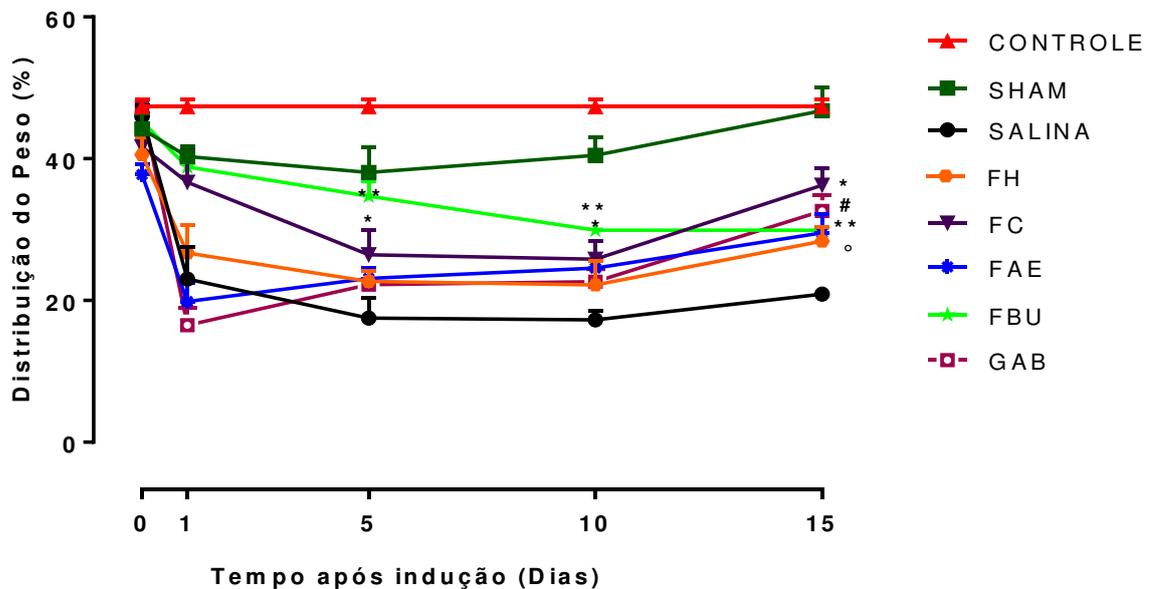
6.6.3 Avaliação da distribuição do peso nas patas traseiras após indução da dor neuropática – Teste Weigh-Bearing nos animais tratados com as frações do EEAC.

Para o teste comportamental de descarga de peso foi considerada a diferença dos valores da descarga de peso nas patas traseiras dos animais, isto é, a

diferença entre a pata ipsilateral e contralateral a lesão, conforme a equação 2 (item 4.7.4). Os valores são expressos em (%) e os valores maiores nas patas contralateral indica *deficit* de sustentação de peso na pata ipsilateral indicando hiperalgesia na pata lesada.

A Figura 09 mostra que no primeiro dia após indução da DN, houve redução no limiar nociceptivo na pata ipsilateral entre os grupos: SALINA (51,31%), SHAM (14,79%), FC (22,45%), FBU (17,87%), FAE (58,03), FH (43,57%) e o grupo controle GABAPENTINA (65,06%), quando comparados ao grupo CONTROLE. Os animais tratados com FC, FBU e FAE apresentaram melhora significativa do D5 ao D15, quando comparados ao grupo SALINA. No D15 a FC induziu um aumento do limiar nociceptivo de 73,66%, FBU aumentou em 43,15% e FAE de 41,39%. Os animais tratados com a gabapentina mostraram aumento de 32,64% quando comparada com o grupo SALINA.

Figura 09 - Efeito da administração oral da Fração Hexânica (FH), Fração Clorofórmica (FC), Fração Acetato de Etila (FAE) e Fração Butanólica (FBU) (1 mg / kg, v.o.), obtidas a partir do Extrato Etanólico de *A. chica*, e da gabapentina (GAB, 1 mg/kg) na da distribuição do peso nas patas traseiras em modelo experimental de dor neuropática em ratos.

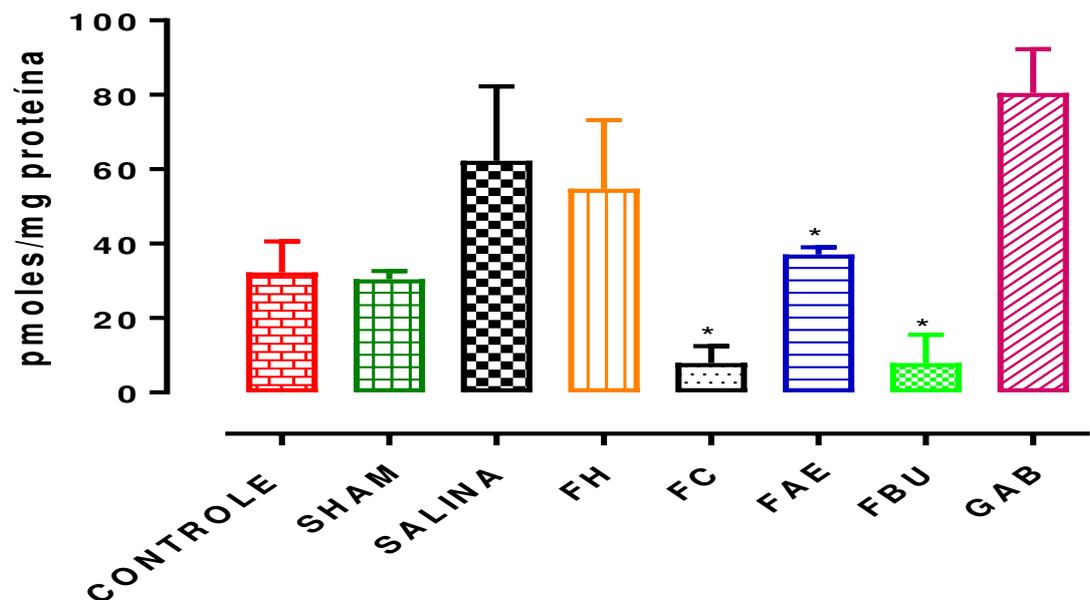


Nota: ANOVA – Newman Keuls ($p < 0.05$). * Indica diferença do grupo tratado com a FC em relação ao grupo SALINA (D5 ao D15). ** Indica diferença do grupo FBU em relação ao grupo SALINA (D5 ao D15). ° Indica diferença do grupo GAB (1mg/Kg, v.o.), no D15 em relação ao grupo SALINA. # Indica diferença do grupo FAE em relação ao grupo SALINA.

6.6.4 Determinação da atividade da catalase nos animais tratados com as frações do EEAC

Em relação a enzima catalase os animais tratados com as FC e FBU mostraram redução de 88,11% no nível da enzima catalase ($p < 0,0001$) quando comparado com o grupo salina. Quando comparado o grupo tratado com o fármaco padrão gabapentina (1mg/kg) com o grupo salina não houve diferença estatisticamente significativa entre eles (FIGURA 10).

Figura 10 - Variação da atividade da enzima catalase (pmoles/mg de proteína), durante 15 dias de tratamento com a Fração Hexânica (FH), Fração Clorofórmica (FC), Fração Acetato de Etila (FAE) e Fração Butanólica (FBU) (1 mg / kg), do EEAC, e Gabapentina (GAB, 1 mg/ Kg), em amostras de soro de ratos.



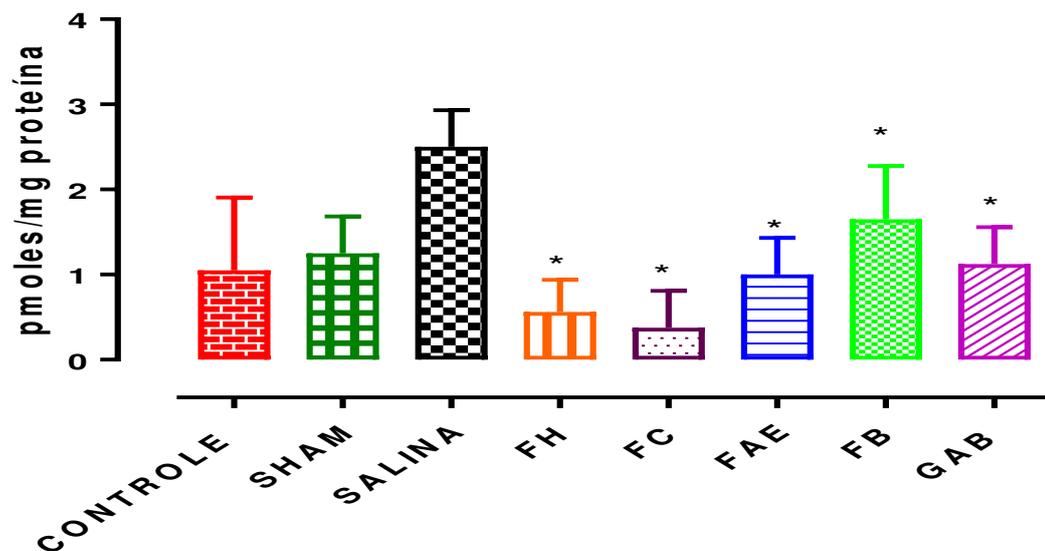
Nota: Os valores estão expressos como Média \pm Erro Padrão da Média. ANOVA – Newman Keuls. * indica diferença significativa dos grupos tratados com as frações clorofórmica (FC) e butanólica (FBU) (1mg/Kg), quando comparados ao grupo salina ($p < 0,001$).

6.6.5 Determinação da atividade da superóxido dismutase nos animais tratados com as frações do EEAC

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) mostrou-se reduzida nos animais tratados com a FC (85%), FH (70%), FAE (60%) e FB (34%) em comparação ao grupo salina. O grupo tratado com a droga padrão gabapentina (1

mg/kg) reduziu em 55,2%, em relação ao grupo salina, como pode ser observado na Figura 11.

Figura 11 - Variação da atividade da enzima superóxido dismutase (pmoles/mg de proteína), durante 15 dias de tratamento com a Fração Hexânica (FH), Fração Clorofórmica (FC), Fração Acetato de Etila (FAE) e Fração Butanólica (FBU) (1 mg / kg, v.o.), do EEAC, e Gabapentina (GAB, 1 mg/ Kg, v.o.) em amostras de soro de ratos.

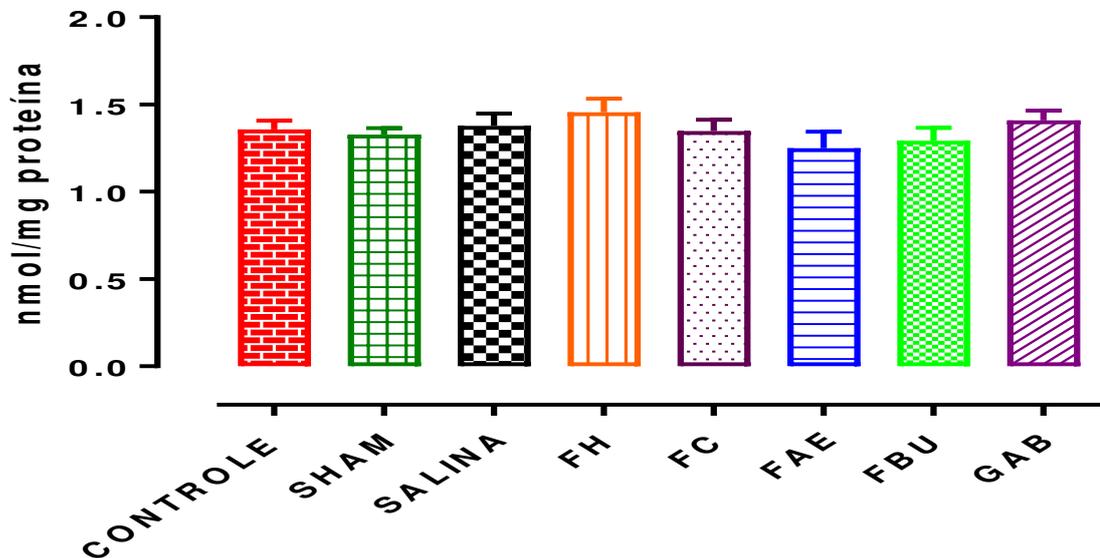


Nota: Os valores são expressos como Média \pm Erro Padrão da Média. ANOVA – Newman Keuls. * diferença significativa do grupo estudado quando comparado ao grupo salina ($p < 0,05$).

6.6.6 Determinação da atividade da glutathiona nos animais tratados com as frações do EEAC

A avaliação sistêmica da enzima glutathiona nos grupos tratados com a FH, FC, FAE e FBU obtidas a partir do EEAC não detectou diferença quando estes grupos foram comparados ao grupo salina e ao gabapentina, droga utilizada como padrão nos experimentos, mostrando que as frações não apresentaram ação na modulação desta enzima, como mostra a Figura 12.

Figura 12 - Atividade da enzima glutationa (pmoles/mg de proteína), durante 15 dias de tratamento com a Fração Hexânica (FH), Fração Clorofórmica (FC), Fração Acetato de Etila (FAE) e Fração Butanólica (FBU) (1 mg / kg, v.o.) do EEAC, e Gabapentina (GAB, 1 mg/ Kg, v.o.) em amostras de soro de ratos de cada grupo experimental.



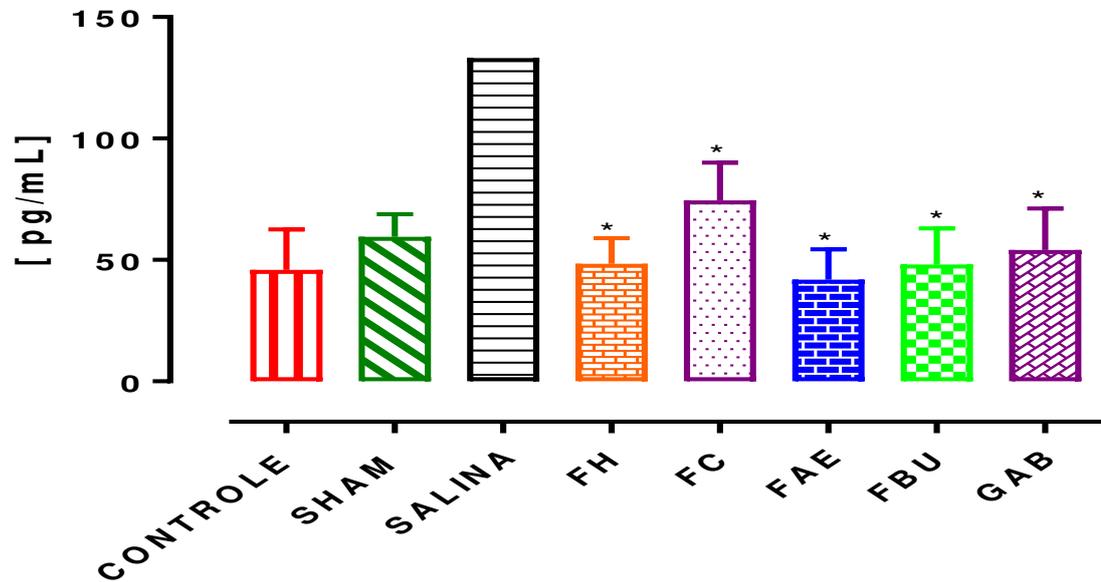
Nota: Não houve diferença estatisticamente significativa - ANOVA – Newman Keuls ($p < 0.05$).

6.6.7 Efeito das frações do EEAC sobre a Citocina IL1

A Figura 13 mostra o efeito da administração por via oral das frações FH, FC, FAE e FBU (1 mg / kg) sobre a concentração da citocina IL1 após indução da dor neuropática por compressão do ciático.

A administração das frações foi realizada do D1 ao D15 pós-indução, durante o qual observa-se que houve o aumento da concentração IL1 no grupo salina (54,04%) quando comparado com o grupo controle. A comparação do grupo salina com os grupos tratados com as frações do EEAC mostrou uma redução significativa da concentração de IL1 nos grupos tratados com as frações: FAE (41,82 pg/ml), FBU (48,18 pg/mL), FH (48,36 pg/mL) e FC (74,55 pg/mL), com inibição de 68,6%, 63,82%, 63,69% e 44,03% respectivamente ($p < 0,05$). No grupo controle positivo (GAB) a redução foi de 59,4%.

Figura 13 - Efeito da administração oral da Fração Hexânica (FH), Fração Clorofórmica (FC), Fração Acetato de Etila (FAE) e Fração Butanólica (FBU) (1 mg / kg, v.o.) do EEAC, e Gabapentina (GAB, 1 mg/ Kg, v.o.), na concentração sérica da citocina IL1, após indução da dor neuropática por compressão do nervo ciático.



Nota: Os valores são expressos como Média \pm Erro Padrão da Média. ANOVA – Newman Keuls. * diferença significativa quando comparado ao grupo salina ($p < 0,05$).

7 DISCUSSÃO

Neste estudo foi avaliado o potencial terapêutico do extrato etanólico de *Arrabidaea chica* Verlot (EEAC) e suas frações, em um modelo experimental de dor neuropática (DN).

O EEAC possui em sua composição compostos fenólicos, taninos, triterpenos e esteroides. Todas as frações do EEAC analisadas neste estudo: hexânica (FH), clorofórmica (FC), acetato de etila (FAE) e butanólica (FBU) apresentaram compostos fenólicos. Na FH predominaram compostos fenólicos, esteroides e taninos, enquanto na FC os predominantes foram os compostos fenólicos, taninos e triterpenos. Na FAE houve maior concentração de esteroides, seguida de compostos fenólicos. Nossos resultados corroboram com os encontrados por Barbosa et al. (2008), Alves et al. (2008) e Cortez de Sá et al. (2016) que também detectaram esses metabolitos secundários no extrato e frações das folhas de *A. chica*.

A FC e FAE apresentaram os maiores teores de polifenólicos totais, seguida da FH, enquanto a FC e FH apresentaram maiores concentrações de flavonoides. Silva et al. (2007) encontraram menores concentrações de polifenólicos e flavonoides totais em folhas de *A. chica*, porém a espécie vegetal foi coletada no estado do Pará, devendo, portanto, serem considerados fatores variantes como o clima e solo.

Com a finalidade de delinear a ação antinociceptiva do EEAC, o mesmo foi submetido à triagem farmacológica comportamental para investigar o perfil farmacológico de substâncias ativas contidas no EEAC, no controle da DN.

O EEAC apresentou ação antinociceptiva em modelo de dor neuropática induzida por compressão do nervo ciático, que foi observado pelo aumento do limiar nociceptivo, após a indução em testes de avaliação de hiperalgesia térmica, alodinia mecânica e deambulação forçada. Posteriormente o extrato foi fracionado obtendo-se as frações FH, FC, FAE e FBU, as quais foram biomonitoradas em modelos de DN.

Considerando que as FH e FAE apresentaram ação antinociceptiva e altas concentrações de polifenólicos e flavonoides totais, a composição química destas frações foi analisada por CLAE/UV-vis e CLAE-DAD-EM/EM. Esta investigação permitiu identificar flavonoides do tipo flavona (carajuflavona, rutina,

miricetina e apigenina), antocianidinas (derivado diglicosilado de carajurina, malvidina-3-O-(6-O-acetil-glucosideo-4-vinilfenol), peonidin-3-O-(6"-acetil-glucoside, apigeninidina e dimetoxi-apigeninidina), triterpenos pentacíclicos (ácido jacarandico, ácido jacoumarico e um isômero do ácido jacoumarico), ácidos fenólicos (ácido gálico, ácido cafeico e ácido cumarico) e esteroides (β -sitosterol).

De acordo com os resultados da análise química, a atividade farmacológica das frações de *A. chica* pode ser atribuída principalmente aos flavonoides, antocianidinas, e triterpenos, já que os constituintes destas classes de metabólitos foram identificados na FH e FAE. Estudos têm mostrado que esses compostos estão relacionados aos efeitos anti-inflamatório, antinociceptivo e analgésico (ROCHA et al., 2011; MICHEL et al., 2015).

A triagem farmacológica realizada com o EEAC foi iniciada com a avaliação da alodinia térmica pelo teste da placa quente. Este teste induz respostas comportamentais como lambar, morder as patas e movimentos de pular que são considerados com resposta nociceptoras integradas supraespinhalmente (ORLANDI et al., 2011; ARAÚJO et al., 2009). É um teste sensível e específico para avaliar drogas de ação central como os analgésicos opióides (ONG et al., 2011).

A sensibilização periférica faz parte da patogênese da DN devido a uma ação aumentada nos terminais de nociceptores, decorrentes da ação de neuromediadores inflamatórios, levando à alodinia e hiperalgesia, e conseqüentemente uma diminuição do limiar da dor, indução de descargas ectópicas e aumento na abertura de canais de sódio (MAKUCH et al., 2013).

A dor neuropática pode ser induzida experimentalmente. Um dos modelos utilizados para a indução da DN é a compressão do nervo ciático de ratos, onde animais lesados desenvolvem comportamentos de autoproteção e apresentam reações exageradas a estímulos mecânicos (alodínia) e térmicos (JAGGI et al., 2011).

Em nosso estudo, os resultados obtidos na avaliação do EEAC na hiperalgesia térmica, apresentados na Figura 4 mostram que no primeiro dia após a indução da DN, por compressão do nervo ciático, houve redução no tempo de latência nos grupos estudados quando comparados ao grupo controle, comprovando a eficácia deste método de indução. No grupo salina a hiperalgesia observada no 1º dia da indução foi mantida até o 10º dia do experimento. Porém, nos animais tratados com o EEAC houve aumento de 48,34% no tempo de latência ao estímulo

térmico, que foi observado no final do tratamento, indicando que o extrato apresenta efeito antinociceptivo na dose de 500 mg/kg. É importante relatar que o fato do grupo Sham apresentou redução do período de latência no primeiro dia, esta hiperalgesia observada deve ter sido devido ao procedimento cirúrgico que havia sido realizado naquele dia.

Além do efeito antinociceptivo, o EEAC também mostrou atividade na alodinia mecânica avaliada pelo teste de von Frey. O grupo tratado com EEAC reduziu significativamente a alodinia a partir do 5º dia de tratamento, atingindo 48,6% no final de dez dias de tratamento (FIGURA 03). Este resultado contribuiu para comprovar a ação analgésica do EEAC observada no experimento anterior.

As frações obtidas a partir do EEAC também foram avaliadas no teste de von Frey. Neste teste foi observado que as patas lesadas dos animais de todos os grupos apresentaram um aumento significativo da hiperalgesia, em comparação com as patas saudáveis. O tratamento dos animais com a FC e FAE (1 mg/Kg) reduziu, assim como ocorreu com o EEAC, a alodinia mecânica na pata ipsilateral dos animais. Além disso, as frações (FC e FAE) apresentaram a intensidade de efeito semelhante à gabapentina (1mg/kg), fármaco utilizado como controle positivo nos experimentos e que também apresentou ação analgésica, quando comparado ao grupo salina (FIGURA 07).

A gabapentina é um fármaco de referência utilizada no controle da dor neuropática. Seu efeito antinociceptivo parece estar relacionado à atuação em canais de cálcio neuronais e diminuição da transmissão glutamérgica. Além disso, a gabapentina diminui marcadores inflamatórios como a COX-2, PGE-2, NO, IL-1b e MMP2 (CHENG; CHIOU., 2006; KILIC, et al., 2016; SANT'ANNA et al., 2016).

Um dos fatores que desempenham um papel importante na indução de dor neuropática é a redução dos níveis ou função do ácido gama amino butírico (GABA), um dos principais neurotransmissores inibitórios do sistema nervoso central (AMIN; HOSSEINZADEH, 2012).

Alguns flavonóides extraídos de plantas são conhecidos como agonistas parciais de GABA e moduladores da ação de benzodiazepínicos (MARDER et al., 2001). Isto é relevante para o nosso trabalho visto que as frações do EEAC como a FH, FC e FAE apresentaram flavonóides em sua composição.

Além de prováveis mecanismos centrais que podem estar envolvidos na ação anti-nociceptiva do EEAC e frações, também é possível que este efeito possa

ocorrer por uma ação periférica, como foi evidenciado em outra espécie do mesmo gênero, *Arrabidaea brachypoda*, que apresenta semelhança a *A. chica*, em relação aos metabolitos secundários majoritários. *A. brachypoda* mostrou efeito antinociceptivo periférico, além de atividade anti-inflamatória, por inibir o recrutamento de leucócitos em um modelo de peritonite induzida por polissacarídeos (ROCHA et al., 2011).

A atividade locomotora de *A. chica* foi avaliada pelo teste do rotarod. Os animais tratados com o EEAC apresentaram melhora significativa do escore de marcha quando comparado com o grupo salina, reestabelecendo os valores normais, semelhante aos do grupo controle, no 10º dia de tratamento (FIGURA 06). Da mesma forma, foi observado que os animais tratados com a FH, FC e FAE apresentaram melhoras significantes na marcha quando comparados ao grupo salina (FIGURA 08). O grupo tratado com a gabapentina, na mesma dose utilizada para as frações apresentou efeito semelhante ao dos animais tratados com FH, FC e FAE. Vale ressaltar que estas frações foram as que apresentaram maior teor de polifenólicos totais e flavonoides, substâncias ativas que devem ser responsáveis pelos efeitos farmacológicos de *A. chica* na dor neuropática.

Outro teste realizado para a comprovação do efeito antinociceptivo das frações foi a avaliação da hiperalgesia pelo método de descarga de peso (Weight bearing). Os resultados mostraram que os animais tratados com a FC, FH, FAE e FBU apresentaram melhora no limiar nociceptivo, quando comparados com o grupo salina. O efeito observado para a gabapentina foi de intensidade semelhante ao obtidos nos grupos tratados com as frações (FIGURA 09).

Esses efeitos podem estar relacionados à atividade anti-inflamatória do EEAC, que já foi previamente mostrado por Zorn et al. (2001), quando observou que o extrato de *A. chica* inibiu o fator de transcrição nuclear kappa B, evitando com isso a formação de citocinas e enzimas inflamatórias como iNOS, COX-2, 5-LOX e fosfolipase A2 citosólica.

A dor está intimamente relacionada com o processo inflamatório já que os mediadores inflamatórios liberados com a lesão tecidual modificam a transmissão e a excitabilidade dos nociceptores de tal maneira que estímulos previamente leves ou ineficazes se tornam dolorosos (SCHOLZ; WOOLF, 2002; VERRY et al., 2006).

Recentemente, tem sido relatado que as citocinas pró-inflamatórias, como o interleucina-1b (IL-1b) e o óxido nítrico (NO) produzido pelas células imunes,

astroglia e microglia, na medula espinal desempenham um papel importante na patogênese da dor neuropática (OLD et al., 2015). Esses fatores iniciam uma cascata de neuroinflamação e eventos relacionados que podem manter-se e piorar a lesão original, causando dor e cronicidade (VALSECCHI et al., 2011). Além disso, a inflamação induz ciclooxigenase-2 (COX-2), que, por sua vez, resulta na produção de prostaglandinas (PGE) (LIU et al., 2012). A PGE2 é um fator indutor de dor, capaz de sensibilizar neurônios sensoriais primários, gerar sensibilização central e facilitar a liberação de neuropeptídeos relacionados à dor (VANEGAS; SCHAIBLE, 2001).

Estudos realizados por Michel e colaboradores em 2015, mostraram a ação do extrato etanólico de *A. chica* como agente anti-inflamatório e atribuíram esta atividade aos flavonoides, luteolina e canferol presentes no extrato. Oliveira et al (2008), estudaram os efeitos do extrato aquoso de *A. chica* sobre o edema induzido por venenos das serpentes *Bothrops atrox* e *Crotalus durissus ruruima*, em camundongos albinos pelas vias oral, intraperitoneal e subcutânea. Os resultados indicaram que o extrato contém substâncias químicas com atividade antiinflamatória.

Nosso estudo identificou compostos como flavonoides, antocianidinas, e triterpenos nas frações ativas do EECA e que provavelmente são as substâncias ativas envolvidas na ação antinociceptiva do extrato e frações de *A. chica*.

Além dos mecanismos de gênese da DN, citados anteriormente, há evidências que comprovam que os agentes antioxidantes têm um papel determinante na dor neuropática. O estresse oxidativo decorre de um desequilíbrio entre a geração de compostos oxidantes e a atuação dos sistemas de defesa antioxidante e estar envolvido na patogênese da dor neuropática (NAIK et al., 2006). Existem substâncias antioxidantes enzimáticas e não-enzimáticas, que atuam na proteção celular. Dentre os enzimáticos podem ser citadas a superóxido dismutase, a catalase e a glutathione peroxidase. Nas FH e FAE foram identificados flavonoides, do tipo flavona (carajulavona, rutina, apigenina e miricetina), antocianidinas, que são substâncias antioxidantes.

Neste estudo foi possível observar que o modelo de DN induziu um aumento significativo das concentrações das enzimas catalase e superóxido dismutase, conforme observado no grupo salina. Porém, quando se analisou essa atividade no soro dos animais tratados com as frações do extrato de *A. chica*, observou-se que a fração clorofórmica e butanólica induziram redução significativa

da concentração de catalase quando comparado aos animais que foram tratados com salina (FIGURA 10).

A SOD é uma enzima antioxidante que transforma o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) em uma espécie ativa de oxigênio (H_2O_2), que é menos lesivo por não ser radicalar (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006). A atividade da SOD apresentou-se diminuída no grupo tratado com as frações clorofórmica e hexânica, quando comparados ao grupo salina. O sistema de defesa antioxidante tem a função de inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria dos radicais livres ou das espécies reativas não-radicaís. Tais ações podem ser alcançadas por meio de diferentes mecanismos de ação: impedindo a formação dos radicais livres ou espécies não-radicaís (sistemas de prevenção), impedindo a ação desses (sistemas varredores) ou, ainda, favorecendo o reparo e a reconstituição das estruturas biológicas lesadas (BARBOSA et al., 2010).

Para medir a capacidade antioxidante total de uma amostra, utiliza-se uma técnica baseada na formação de radicais a partir da termólise do 2,2'Azo-bis (2-amidino-propano) diidrocloreto, produzindo emissão de luz (TRAP). Quando se tem presente no meio de reação um antioxidante, ele irá neutralizar estes radicais e, assim, diminuir a emissão de luz. Após todo o antioxidante reagir, o radical, aumentará a emissão de luz. Assim, deve-se observar por quanto tempo ele é capaz de inibir a formação de radicais. Este método permite medir a capacidade da amostra de agir como antioxidante frente a radicais livres formados. Dentre as substâncias, cuja ação é medida por esta técnica, que agem como antioxidantes temos a vitamina C, o ácido úrico e a glutathione, principais antioxidantes não-enzimáticos hidrossolúveis das células (EVELSON et al., 2001; LISSI; PASCUAL; DEL CASTILLO, 1992).

A glutathione S-transferase (GST) é uma enzima que catalisa a reação de conjugação da glutathione reduzida (GSH) com outras substâncias, que possam vir a prejudicar o funcionamento celular. Essa combinação forma os conjugados de glutathione que serão exportados para fora do meio interno da célula. Deste modo, esta enzima desempenha um papel importante na detoxificação celular (MANNERVIK; GLUTHENBERG, 1981). Entretanto, neste estudo não foi possível detectar um efeito antioxidante da glutathione das frações do EEAC (FIGURA 12).

O fato de não termos detectado alteração desta enzima, nos grupos experimentais em parte é satisfatória, pois indica que o estresse provocado pela

manipulação própria do delineamento experimental não causou danos e o tratamento não gerou um aumento na indução enzimática. O aumento da atividade enzimática pode representar uma resposta compensatória do sistema antioxidante quando se tem um aumento do estresse oxidativo. Isto pode ser explicado, como uma forma de os animais se defenderem contra o dano continuado (BARBOSA et al., 2010).

Com relação à avaliação dos níveis séricos da citocina IL1, os resultados mostraram a redução da citocina pró-inflamatória (IL1) nos grupos tratados com as frações: FAE, FH e FBU quando comparadas ao grupo salina. Estudos prévios evidenciam níveis aumentados das citocinas pró-inflamatórias em pacientes com dor crônica (DAVIES; HAYES; DEKABAN, 2007; KRAYCHETE et al., 2010; KOCH et al., 2007; ÜÇEYLER et al., 2007ab).

As citocinas inflamatórias estão envolvidas na sensibilização central induzida por lesão nervosa e/ou inflamação e estão relacionadas ao aparecimento de hiperalgesia e alodinia. Respostas inflamatórias no sistema nervoso somatossensorial desempenham papéis fundamentais na evolução e persistência na dor patológica. Estas citocinas estão presentes na medula espinhal, gânglios da raiz dorsal e lesões nervosas, são associadas a dor e com a geração de atividade espontânea anormal de fibras nervosas ou nos gânglios da raiz dorsal dos neurônios lesados ou inflamados (AUSTIN; MOALEM-TAYLOR, 2013; WATKINS; MILLIGAN; MAIER et al., 2003).

No decorrer do processo inflamatório ocorre vasodilatação aumentando o fluxo sanguíneo no local da lesão. A permeabilidade microvascular aumenta, causando a perda de proteínas plasmáticas e de fluido para o tecido. Simultaneamente, as citocinas pró-inflamatórias como Interleucina 1 β (IL-1 β), interleucina 6 (IL6) e o Fator de Necrose Tumoral (TNF- α) são liberadas pelos macrófagos, ativando a regulação das reações inflamatórias. Há evidências que as citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β , IL-6 e TNF- α) estão envolvidas no processo de sensibilização da dor neuropática (LAWRENCE; WILLOUGHBY; GILROY, 2002; SIMMONS, 2006; SOMMER; WHITE, 2010). Portanto, a redução de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-1, pelas frações do EEAC também podem estar relacionadas ao mecanismo de ação antinociceptivo induzido pela *A. chica*.

8 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nesse estudo mostram que o extrato etanólico de *Arrabidaea chica* (EEAC) (500mg/kg) e suas frações (1mg/Kg) apresentam atividade antinociceptiva na dor neuropática induzida pela compressão do nervo ciático em ratos, quando administrados por via oral, durante 15 dias de tratamento.

Os animais tratados com as frações do EEAC reduziram as concentrações das enzimas catalase e superóxido dismutase, revelando seu efeito antioxidante.

As frações do EEAC modularam os níveis de IL1, uma vez que os animais tratados apresentaram redução na concentração desta citocina.

Os testes de abordagem fitoquímica detectaram a presença de compostos fenólicos, taninos, triterpenos e esteroides no extrato e frações. A fração FAE apresentou os maiores teores de polifenólicos totais, enquanto a FC a maior concentração de flavonoides totais.

Diante do exposto os resultados comprovam a ação antinociceptiva e antioxidante do EEAC e suas frações na dor neuropática, porém, outras investigações farmacológicas são necessárias para se determinar o(s) mecanismo(s) da ação antinociceptiva e seu papel no estresse oxidativo, bem como, novas investigações moleculares e celulares são necessárias para demonstrar os efeitos centrais ou periféricos possíveis nesta condição crônica debilitante.

REFERÊNCIAS

- ABBADIE, C. et al. Chemokines and pain mechanisms. **Brain Research Reviews**, v. 60, n. 1, p. 125-134, 2009.
- AKIMOTO, N. et al. CCL-1 in the spinal cord contributes to neuropathic pain induced by nerve injury. **Cell Death Dis.**, v. 4, p. 679, 2013.
- ALVES, M. S. M. et al. Análise farmacognóstica das folhas de *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verlot, *Bignoniaceae*. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 20, n. 2, p. 215-221, 2010.
- ALWANI, M. et al. Bioactive sphingolipids in the modulation of the inflammatory response. **Pharmacology & therapeutics**, v. 112, n. 1, p. 171-183, 2006.
- AMARAL, R. R. et al. Biological activities of *Arrabidaea chica* (Bonpl.) B. Verl. Leaves. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 31, n. 3, p. 451-455, 2012.
- AMIN, B.; HOSSEINZADEH, H. Evaluation of aqueous and ethanolic extracts of saffron, *Crocus sativus* L., and its constituents, safranal and crocin in allodynia and hiperalgesia induced by chronic constriction injury model of neuropathic pain in rats. **Fitoterapia**, v. 83, p. 888-895, 2012.
- ANDRADE, J. S. C. S. et al. Atividade analgésica e antiedematogênica da *Arrabidaea chica* Verl. In: REUNIÃO ANUAL DA FEDERAÇÃO DAS SOCIEDADES DE BIOLOGIA EXPERIMENTAL, 12., 1997. Caxambu. **Resumos...** Caxambu: FESBE, 1997.
- ARAÚJO, F. L. O. et al. Antinociceptive effects of (O-methyl)-N benzoly tyramine (riparin I) from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Archives of pharmacology**, v. 380, p. 337-344, 2009.
- ARO, A. A. et al. *Arrabidaea chica* extract improves gait recovery and changes collagen content during healing of the *Achilles tendon*. **Injury, Int. J. Care Injured**, v. 44, p. 884-892, 2013.
- ATTAL, N. et al. EFNS guidelines on the pharmacological treatment on neuropathic pain: 2009 revision. **Eur. J. Neurol.**, v. 17, p. 1113-1123, 2010.
- AUSTIN, P. J.; MOALEM, T. G. The neuro-immune balance in neuropathic pain: involvement of inflammatory immune cells, immune-like glial cells and cytokines, **Journal of Neuroimmunology**, v. 229, p. 26-50, 2010.
- BAHAREH, A.; HOSSEIN, H. Evaluation of aqueous and ethanolic extracts of saffron, *Crocus sativus* L., and its constituents, safranal and crocin in allodynia and

hyperalgesia induced by chronic constriction injury model of neuropathic pain in rats. **Fitoterapia**, v. 83, p. 888-895, 2012.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils: a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.

BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Rev. Nutr.**, v. 23, n. 4, p. 629-643, 2010.

BARBOSA, W. L. R. et al. *Arrabidaea chica* (HBK) Verlot: phytochemical approach, antifungal and trypanocidal activities. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, p. 544-548, 2008.

BARON, R.; BINDER, A.; WASNER, G. Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. **Lancet Neurol.**, v. 9, p. 807-819, 2010.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre gerações de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123, 2006.

BASBAUM, A. I. et al. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v. 16, n. 139, p. 267-284, 2009.

BEHRENS, M. D.; TELLIS, C. J. M.; CHAGAS, M. S. *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verlot (Bignoniaceae). **Revista Fitos**, v. 7, n. 4, p. 236-244, 2012.

BENNETT, G. J.; XIE, Y. K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. **Pain**, v. 33, p. 87-107, 1998.

BORRÁS, M. R. L. **Plantas da Amazônia**: medicinais ou mágicas? Valer: Manaus, 2003.

BOUHASSIRA, D. et al. Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population. **Pain**, v. 136, n. 3, p. 380-387, 2008.

BOUHASSIRA, D.; ATTAL, N. Diagnosis and assessment of neuropathic pain: the saga of clinical tools. **Pain**, v. 152, n. 3, suppl, p. S74-S83, 2011.

BOVERIS, A.; CHANCE, B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. **Biochem. J.**, v. 134, n. 707-716, 1973.

BRASIL. Ministério da Saúde. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. RENISUS - Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília; DF, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2006a. 92 p. (Série B. Textos Básicos de Saúde).

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Decreto nº 5813 de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. **Diário Oficial [da República Federativa do Brasil]**, Brasília, DF, 22 jun. 2006b.

CAMPOS, S. C. et al. Toxicidade de espécies vegetais. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, SP, v. 18, n. 1, supl. I, p. 373-382, 2016.

CARNEIRO, F. M. et al. Trends of studies for medicinal plants in Brazil. **Revista Sapiência: Sociedade, saberes e práticas educacionais**, v. 3, n. 2, p. 44-75, jul./dez. 2014.

CARTÁGENES, M. S. et al. Avaliação da atividade anti-hipertensiva do extrato de *Arrabidaea chica* Verlot em ratos espontaneamente hipertensos. **Rev. Ciênc. Saúde**, São Luís, v. 16, n. 2, p. 98-105, jul./dez. 2014.

CARTÁGENES, M. S. S. et al. Efeito do extrato de *Arrabidaea chica* sobre a pressão arterial de ratos wistar normotensos. **Revista de Ciências da Saúde** (São Luis), v. 11, p. 113-117, 2009.

CARTÁGENES, M. S. S. **Investigação dos efeitos tóxicos e hipertensivo de *Arrabidaea chica* Verlot (Bignoniaceae)**. 2009. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2009.

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

CHAPMAN, E.; PERKIN, A. G.; ROBINSON, R. The colouring matters of carajura. **Journal of the Chemical Society.**, p. 3015-3041, 1927.

CHENG, J. K.; CHIOU, L. C., Mechanisms of the antinociceptive action of gabapentin, **A Pharm. Sci.**, v. 100, p. 471-486, 2006.

COHEN, S. P.; MAO, J. Neuropathic pain: mechanisms and their clinical implications. **BMJ**, p. 348, fev. 2014.

COPRAY, J. C.; MANTINGH I.; BROUWER, N. Expression of interleukin-1 beta in rat dorsal root ganglia. **J. Neuroimmunol.**, v. 118, p. 203-211, 2001.

- CORRÊA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das espécies cultivadas**. Rio de Janeiro: Ministério da Agricultura, 1931. v. 2.
- CORRÊA, P. M. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e das espécies exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: IBDF, 1984.
- CORTEZ DE SÁ, J. et al. Leishmanicidal, cytotoxicity and wound healing potential of *Arrabidaea chica* Verlot. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, p. 1-11, 2016.
- COSTA, P. R. C.; SILVA, E. A. Cosmetic technology of amazonic medicinal plants: an antiacneic toilet-soap of the crude extract of the crude extract of *Arrabidaea chica* Verlot. Bignoniaceae. In: SIMPÓSIO BRASIL- CHINA DE QUÍMICA E FARMACOLOGIA DE PRODUTOS NATURAIS, 1989, Rio de Janeiro. **Programa e Resumos**. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde: Fundação Oswaldo Cruz, 1989. p. 158.
- COSTIGAN, M.; SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J., Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. **Annu. Rev. Neurosci.**, v. 32, p. 1-32, 2009.
- DAVIES, A. L.; HAYES, K. C.; DEKABAN, G. A. Clinical correlates of elevated serum concentrations of cytokines and autoantibodies in patients with spinal cord injury. **Arch. Phys. Med. Rehabil.**, Philadelphia, v. 88, n. 11, p. 1384-1393, 2007.
- DEVIA, B. et al. New 3-desoxyanthocyanidins from leaves of *Arrabidaea chica*. **Phytochemical Analysis**, v. 13, p. 114-120, 2002.
- DUTRA, R. C. et al. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 4-29, 2016.
- DUTRA, R. P. et al. Avaliação farmacognóstica de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith (tiúba) em municípios da Baixada maranhense, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 557-562, 2008.
- DUTRA, R. P. et al. Phenolic acids, hydrolyzable tannins, and antioxidant activity of geopropolis from the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 2549-2557, 2014.
- DWORKIN, R. H. et al. Recommendations for the pharmacological management of neuropathic pain: an overview and literature update. **Mayo Clin. Proc.**, v. 85, p. S3-S14, 2010.
- EVELSON, P. et al. Evaluation of total reactive antioxidant potential (TRAP) of tissue homogenates and their cytosols. **Arch. Biochem. Biophys.** v. 388, n. 2, p. 261-266, 2001.

FREYNHAGEN, R.; BENNETT, M. I. Diagnosis and management of neuropathic pain. **BMJ**, n. 339, p. 3002, 2009.

GARRIDO, J. L. T. Toxicidade córneo-conjuntival e eficácia do extrato de *arrabidaea chica* (Crajiru) instilado em olhos de coelhos com quimadura química da córnea. 2006. 156 f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Programa Multinstitucional de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade federal do Amazonas, 2006.

GENTRY, A. H. Evolutionary patterns in neotropical Bignoniaceae. **Memoirs of the New York Botanical Garden**, v. 55, p. 118-129, 1990.

GILRON, I.; BARON, R.; JENSEN, T. Neuropathic Pain: Principles of Diagnosis and Treatment. **Mayo Clin. Proc.**, v. 90, n. 4, p. 532-545, apr. 2015.

GÓMEZ ESTRADA, H. A.; GONZÁLEZ RUIZ, K. N.; MEDINA, J. D. Actividad Anti-inflamatoria de Productos Naturales. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 10, n. 3, p. 182-217, 2011.

GONÇALVES, J. **Biodiversidade brasileira**. 2014. Disponível em: <<http://www.sibbr.gov.br/areas/area=biodiversidade/flora>>. Acesso em: 17 mar. 2016.

GRECARD, P. **Pharmacopees traditionelles em Guyana**. Paris: L'orstom, 1987.

HAANPÄÄ, M. et al. Neu PSIG Guidelines on neuropathic pain assessment. **PAIN**, v. 152, n. 1, p. 14-27, jan. 2011.

HALLIWELL, B.; CLEMENT, M. V.; LONG, L. H. Hydrogen peroxide in the human body. **Febs Letters**, v. 486, n. 1, p. 10-13, 2000.

HARBONE, J. B.; WILLIAMS, C. A. Anthocyanins and other flavonoids. **Natural Product Report**, v. 15, p. 631-652, 1998.

HARVEY, A. L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R.J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nat. Rev. Drug Discov.** v.14, p.111–129, 2015.

IGWE, O. J.; MURRAY, J. N.; MOOLWANEY, A. S. **Interleukin 1-induced cyclooxygenase and nitric oxide synthase gene expression in therat dorsal root ganglia is modulated by antioxidants**. **Neuroscience**, v. 105, n. 4, p. 971-985, ago. 2001.

INOUE, K.; TSUDA, M. Microglia and neuropathic pain. **Glia**, v. 57, p. 1469-79, 2009.

ISHIGE, K.; SCHUBERT, D.; SAGARA, Y. Flavonoids protect neuronal cells from oxidativ stress by three distinc mechanisms. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 30, n. 4, p.

433-446, 2001.

JAGGI, A.S.; JAIN, V.; SINGH, N. Animal models of neuropathic pain. **Fundam Clin Pharmacol.**, v. 25, p. 1-28, 2011.

JENSEN, T. S., FINNERUP, N. B. Management of neuropathic pain. **Curr. Opin. Support Palliat Care**, v. 1, p. 126-31, 2007.

JENSEN, T. S.; BARON, R.; HAANPÄÄM. A new definition of neuropathic pain. **Pain**, v. 152, n. 10, p. 2204-2205, 2011.

JOLY, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 1993.

JORGE, M. P. **Atividade cicatrizante de microencapsulados de extrato bruto etanólico obtido de *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) Verlot**. 2013. Tese (Doutorado em Clínica Médica) – Programa de Pós-Graduação de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, 2013.

JORGE, M. P. **Atividade cicatrizante do extrato bruto de *Arrabidaea chica* (HUMB. & BONPL.) Verlot**. 2008. Dissertação (Mestrado em Clínica Médica) – Programa de Pós-Graduação de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, 2008.

JORGE, M. P. et al. Evaluation of wound healing properties of *Arrabidaea chica* Verlot extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 118, p. 361-366, 2008.

JÚNIOR, S. **Plantas exóticas**. Rio de Janeiro: Codecri, 1981. (Coleção edições do Pasquim, v. 81).

KALFF, K. M. et al. Pre-treatment with capsaicin in a rat osteoarthritis model reduces the symptoms of pain and bone damage induced by monosodium iodoacetate. **Eur. J. Pharmacol.**, n. 641, p. 108-113, 2010.

KALIL FILHO, A. N.; KALIL, G. P. C.; LUZ, A. I. R. Conservação de germoplasma de plantas aromáticas e medicinais da Amazônia brasileira para uso humano. **Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (Embrapa)**. Comunicado Técnico. Paraná, n. 50, p.1-4, dez. 2000.

KOCH, A. et al. Nitric oxide and pro-inflammatory cytokines correlate with pain intensity in chronic pain patients. **Inflam. Res. Basel**, v. 56, n. 1, p. 32-37, 2007.

KRAYCHETE, D. C.; CALASANS, M. T. A.; VALENTE, C. M. L. Pro-inflammatory Cytokines and Pain. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 46, n. 3, p. 199-206, maio/jun. 2006.

KRISHNAN, A. V. et al. Oxaliplatin: induced neurotoxicity and the development of

neuropathy. **Muscle Nerve**, v. 32, p. 51-60, 2005.

LAI, B. et al. Inhibition of Qi site of mitochondrial complex III with antimycin A decreases persistent and transient sodium currents via reactive oxygen species and protein kinase C in rat hippocampal CA1 cells. **Exp. Neurol.**, v. 194, p. 484-494, 2005.

LAWRENCE, T.; WILLOUGHBY, D. A.; GILROY, D. W. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 2, n. 10, p. 787-95, 2002.

LEONARD, G. et al. Evidence of descending inhibition deficits in atypical but not classical trigeminal neuralgia. **Pain.**, v. 147, n. 1-3, p. 217-23, 2009.

LIMA, J. Atividade anticâncer in vitro em células tumorais humanas do composto 6,7-dihidroxi-5,4-dimetoxiflavilium (carajurina) isolado a partir da espécie *Arrabidaea chica* Verlot. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA (SBQ), 33., 2010, Águas de Lindóia. **Anais...** Águas de Lindóia, 2010. p. 1-2.

LISSI, E.; PASCUAL, C.; DEL CASTILLO, M. Luminol luminescence induced by 2,2%-azo-bis(2-amidinopropane) thermolysis. **Free Radical Research Communications**, v. 17, p. 299-311, 1992.

LIU, T.; GAO, Y. J.; JI, R. R. Emerging role of Toll-like receptors in the control of pain and itch. **Neurosci. Bull.**, v. 28, p. 131-144, 2012.

LONGHI-BALBINOT, D. T. et al. The nitroxyl donor, Angeli's salt, reduces chronic constriction injury-induced neuropathic pain. **Chemico-Biological Interactions**, 2016.

LONGO, T. B. **Avaliação da atividade genotóxica/antigenotóxica do extrato vegetal de *Arrabidaeachica***. 2007. 89 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Toxicologia Aplicada) – Programa de Pós-Graduação em Genética e Toxicologia Aplicada, ULBRA, Canoas, 2007.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum; 2002.

LOWRY O. H. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. Biol. Chem.** v. 193, n. 1, p. 265, 1951.

MACHELSKA, H. Dual peripheral actions of immune cells in neuropathic pain. **Arch. Immunol. Ther Exp.**, v. 59, n. 1, p. 11-24, 2011.

MAFIOLETI, L. et al. Evaluation of the toxicity and antimicrobial activity of hydroethanolic extract of *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verl. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, p. 576-582, 2013.

MAKUCH, W. et al. Effects of selective and non-selective inhibitors of nitric oxide synthase on morphine - and endomorphin-1-induced analgesia in acute and neuropathic pain in rats. **Neuropharmacology**, v. 75, p. 445-457, 2013.

MALEK, N. et al. The importance of TRPV1-sensitisation factors for the development of neuropathic pain. **Mol. Cell. Neurosci.**, v. 65, p. 1-10, 2015.

MANNERVIK, B.; GLUTHENBERG, C. Glutathione transferase. **Methods in Enzymology**, v. 77, p. 231-235, 1981.

MARDER, M. et al. Molecular modeling and QSAR analysis of the interaction of flavone derivatives with the benzodiazepine binding site of the GABA_A receptor complex. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 9, p. 323-335, 2001.

MARKLUND, S. Handbook of methods for oxygen radical reseach. **Boca Raton. CRC Press**, p. 243-247, 1985.

MATOS, F. J. A. **Introdução a fitoquímica experimental**. 2. ed. Fortaleza: Edições UFC, 1997. 141 p.

MICHEL, A. F. R. M. et al. Evaluation of anti-inflammatory, antiangiogenic and antiproliferative activities of *Arrabidaea chica* crude extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, n. 165, p. 2938, 2015.

MILLER, R. J. et al. Cytokine and chemokine regulation of sensory neuron function. **Handb. Exp. Pharmacol.**, n. 194, p. 417-449, 2009.

MILLIGAN, E. D.; WATKINS, L. R. Pathological and protective roles of glia in chronic pain. **Nat. Rev. Neurosci.**, v. 10, p. 23-36, 2009.

MISHRA, B. B.; TIWARI, V. K. Natural products: an evolving role in future drug discovery. **Eur. J. Med. Chem.**, v. 46, p. 4769-4807, 2011.

MORAIS VIEIRA, E. B. et al. Prevalence, characteristics, and factors associated with chronic pain with and with out neuropathic characteristics in SaoLuis, Brazil. **J. Pain Symptom Manage**, v. 44, p. 239-51, 2012.

NAIK, A. K. et al. Role of oxidative stress in pathophysiology of peripheral neuropathy and modulation by N-acetyl-L-cysteine in rats. **Eur. J. Pain**, v. 10, p. 573-579, 2006.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **J. Nat. Prod.**, v. 79, p. 629-661, 2016.

OLD, E. A.; CLARK, A. K.; MALCANGIO, M. The role of glia in the spinal cord in neuropathic and inflammatory pain. **Pain Control**, v. 227, p. 145-170, 2015.

OLIVEIRA, C. M. B. et al. Citocinas e dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 61, n. 2, p. 260-265, 2011.

OLIVEIRA, D. P. C. et al. Atividade anti-inflamatória do extrato aquoso de *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verlot. sobre o edema induzidos por venenos de serpentes amazônicas. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, p. 643-649, 2009.

OLIVEIRA, M. C.; SCHOFFEN, J. P. F. Oxidative stress action in cellular aging. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 6, p. 1333-1342, 2010.

ONG, H. M. et al. Antinociceptive activity of methanolic extract of *Acmella uliginosa* (Sw) Cass. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, p.227-233, 2011.

ORLANDI, L. et al. Anti-inflammatory and nociceptive effects of the stem bark of *Byrsonima intermedia* A. Juss. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, p. 1469-1476, 2011.

PAES, E. R. C. **Formulação de um gel de *Arrabidaea chica* (Humb & Bonpl) B. Verlot e sua ação em feridas provocadas na pele de ratos Wistar**. 2004. 82 f. Dissertação (Mestrado Multidisciplinar em Patologia Tropical) – Departamento de Farmácia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2004.

PAULA, J. T. et al. Extraction of anthocyanins and luteolin from *Arrabidaea chica* by sequential extraction in fixed bed using supercritical CO₂, ethanol and water as solvents. **The Journal of Supercritical Fluids**, n. 86, p. 100-107, 2014.

PAULA, J. T. et al. Extraction of anthocyanins from *Arrabidaea chica* in fixed bed using CO₂/ethanol/water mixture as solvents, **Journal of Supercritical fluids** 81: 33-41, 2013.

PIETTA, P. G. Flavonoids as Antioxidants. **J. Nat. Prod.**, v. 63, p. 1035-1042, 2000.

RÊGO, T. J. A. **Fitogeografia das plantas medicinais do Maranhão**. 2. ed. São Luís: EDUFMA, 1995.

REVILLA, J. **Apontamentos para a cosmética amazônica**. Manaus: SEBRAE-AM/INPA, 2002.

RIBEIRO, A. F. C. **Avaliação das atividades anti-inflamatória, antiangiogênica e antitumoral de extratos da *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verlot**. [S. l: s.n.], 2008. 92f.

RIBEIRO, A. F. C. et al. Effect of *Arrabidaea chica* extracts on the Ehrlich solid tumor development. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 2, p. 364-373, mar./apr. 2012.

ROCHA, C. Q. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Arrabidaea brachypoda* (DC.) Bureau roots. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, p. 396-401, 2011.

RODRIGUES, I. A. et al. *Arrabidaea chica* hexanicextract induces mitochondrion damage and peptidase inhibition on *Leishmania* spp. **BioMed. Research International**, v. 2014, p. 1-7, 2014.

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. Plantas medicinais no domínio dos Cerrados (métodos de avaliação laboratorial da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória de produtos naturais). **Boletim Técnico**, Lavras, n. 97, p. 1-35, 2014.

ROWLAND, L. P.; PEDLEY, T. A. Merritt: Tratado de Neurologia. 12. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2011. 1196 p.

SAMAD, T. A. Interleukin-1beta-mediated induction of Cox-2 in the CNS contributes to inflammatory pain hypersensitivity. **Nature**, v. 410, n. 6827, p. 471-475, 2001.

SANT'ANNA, M. B. et al. Medial plantar nerve ligation as a novel model of neuropathic pain in mice: pharmacological and molecular characterization. **Sci. Rep.**, v. 6, p. 26955, 2016.

SANTOS, V. C. et al. Evaluation of the mutagenicity and genotoxicity of *Arrabidaea chica* Verlot (Bignoniaceae), an Amazon plant with medicinal properties. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 76, n. 6, p. 381-390, 2013.

SCHIOZER, A. L. et al. Electrospray Ionization Mass Spectrometry Fingerprinting of Extracts of the Leaves of *Arrabidaea chica*. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 23, n. 3, p. 409-414, 2012.

SCHMADER, K. E. Epidemiology and impact on quality of life of post herpetic neuralgia and painful diabetic neuropathy. **Clin. J. Pain**, v. 18, n. 6, p. 350-354, 2002.

SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. Can we conquer pain? **Nature Neuroscience**, v. 5, p.1062-1066, 2002.

SHERWOOD, E. R.; TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. Best Practice and Research. **Clinical Anaesthesiology**, v. 18, n. 3, 385-405, 2004.

SILVA, E. M. et al. Antioxidant activities and polyphenol contents of fifteen selected plants species from the Amazonian region. **Food Chemistry**, v. 101, p. 1012-1018, 2007.

SIMMONS, D. L. What makes a good anti-inflammatory drug target? **Drug Discovery today**, v. 11, p. 210-219, 2006.

SIRAICH, I. J. T. et al. Antioxidant capacity of the leaf extract obtained from *Arrabidaea chica* cultivated in Southern Brazil. **PLoS ONE**, v. 8, n. 8, p. 727-733, 2013a.

SIRAICH, I. J. T. et al. Ultraviolet (UVB and UVA) photoprotector activity and percutaneous penetration of extracts obtained from *Arrabidaea chica*. **Appl. Spectrosc.**, v. 67, n. 10, p. 1179-1184, 2013b.

SOMMER, C.; WHITE, F. Cytokines, chemokines and pain. In: BEAULIEU, P. et al. **Pharmacology of Pain**. Seattle: IASP Press, 2010. p. 279-302.

SOUSA, I. M. O. **Avaliação da estabilidade do extrato seco e formulações de bases semissólidas, contendo *Arrabidaea chica* Verlot, para uso em cicatrização**. 2013. 123 f. Dissertação (Mestrado em Biologia) - Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, 2013.

TAKEMURA, O. S. et al. A flavone from leaves of *Arrabidaea chica* f. *cuprea*. **Phytochemistry**, v. 38, p. 1299-1300, 1995.

TOWNSEND, D. M.; TEW, K. D.; TAPIERO, H. The importance of glutathione in human disease. **Biomed Pharmacother**, v. 57, n. 3-4, p. 145-55, 2003.

ÜÇEYLER, N. et al. Differential expression patterns of cytokines in complex regional pain syndrome. **Pain**, Amsterdam, v. 132, n. 1, p. 195-205, 2007b.

ÜÇEYLER, N. et al. Differential expression of cytokines in painful and painless neuropathies. **Neurology**, Hagerstown, v. 69, n. 1, p. 42-49, 2007a.

VALLEJO, R. et al. The role of glia and the immune system in the development and maintenance of neuropathic pain. **Pain Pract**, Malden, v. 10, n. 3, p. 167-84, 2010.

VALLI, M. et al. Development of a natural products database from the biodiversity of Brazil. **J. Nat. Prod.**, v. 76, p. 439-444, 2013.

VALSECCHI, A. E. et al. The soy isoflavone genistein reverses oxidative and inflammatory state neuropathic pain, neurotrophic and vasculature deficits in diabetes mouse model. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 650, p. 694-702, 2011.

VAN DEN BERG, M. E. **Plantas medicinais na Amazônia**: contribuição ao seu conhecimento sistemático. [S.l.]: CNPq/Programa Trópico Úmido: MPEG: Falangola Editora Ltda, 2003.

VANEGAS, H.; SCHAIBLE, H.-G., Prostaglandins and cyclooxygenases in the spinal cord, **Prog. Neurobiol.**, v. 64, p. 327-363, 2001.

VERRY JUNIOR, W. A. et al. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development? **Pharmacology & Therapeutics**, v. 112, n. 1, p. 116-138, 2006.

VIVANCOS, G.G., VERRI, W.A. JR., CUNHA, T.M., SCHIVO, I.R., PARADA, C.A., CUNHA, F.Q., FERREIRA, S.H. An electronic pressure-meter nociception paw test for rats. **Braz J Med Biol Res** 2004; 37:391-399.

WATKINS, L.R.; MILLIGAN, E.D.; MAIER, S.F. Glial proinflammatory cytokines mediate exaggerated pain states: implications for clinical pain. **Adv. Exp. Med. Biol.**, v. 521, p. 1-21, 2003.

WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods Enzymol.**, v. 77, p. 325-333, 1981.

WHITE, F. A. et al. Chemokines and the pathophysiology of neuropathic pain. **Proc Natl. Acad. Sci.**, v. 104, p. 20151-20158, 2007.

WOOLF, C. J. Central sensitization: Implications for the diagnosis and treatment of pain. **Pain**, v. 152, n. 3, Suppl, p. S2-15, 2011.

XIE, W. R. et al. Robust increase of cutaneous sensitivity, cytokine production and sympathetic sprouting in rats with localized inflammatory irritation of the spinal ganglia. **Neuroscience**, v. 142, p. 809-822, 2006.

YAMAMOTO, T.; NOZAKI-TAGUCHI, L.; CHIBA, T. Analgesic effect of intrathecally administered Teredorexin-A in the rat formalina test and in the rat hot plate test. **Brist Journal Pharmacology**, v. 137, p. 170-176, 2002.

ZARPELON, A. C. et al. Spinal cord oligodendrocyte-derived alarmin IL-33 mediates neuropathic pain, **FASEB J.**, v. 30, p. 54- 65, 2016.

ZORN, B. et al. 3-desoxyanthocyanidins from *Arrabidaea chica*. **Phytochemistry**, v. 56, p. 831-835, 2001.

APÊNDICE A

 UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS	
PARECER CONSUBSTANCIADO INICIAL	Nº do parecer: 05
PROJETO DE PESQUISA	Registro da CEUA: 05/13
	Nº do Protocolo: 23115.006040/2013-04
	Data de entrada no CEUA: 03/05/13
	Parecer: Aprovado

I – Identificação

Título do projeto: ATIVIDADE DE PLANTAS DA FLORA MARANHENSE E SINTÉTICOS BIATIVOS EM MODELO EXPERIMENTAL DE DOR NEUROPÁTICA: PARÂMETROS CLÍNICOS E OXIDATIVOS.		
Identificação da equipe executora: Maria do Socorro de Sousa Cartágenes, Ana Paula Santos Azevedo, Antonio Marcus Andrade Paes, Antônio Carlos Romão Borges, João Batista dos Santos Garcia, Marilene Oliveira da R. Borges, Samira Abdalla Silva Paes, Sônia Maria de Farias Freire, Elizabeth Teixeira N. Servin, Lyvia Maria Rodrigues de Sousa Gomes, Rayanne Luiza Tajra Muallem Araújo, Pedro Paulo de Alcântara Pedro, Rennam Abud dos Santos		
Instituição onde será realizado: UFMA		
Area temática: Não se aplica	Multicêntrico: Não	Data de recebimento: 12/06
Cooperação estrangeira:		Data de devolução: 01/07

II – Objetivos:

- Avaliar os efeitos extrato extratos plantas medicinais da flora maranhense e/ou sintéticos bioativos, sobre a modulação da dor em ratos, após a lesão do nervo ciático através de parâmetros clínicos
- Analisar o efeito do extrato extratos plantas medicinais da flora maranhense e/ou sintéticos bioativos, após a manipulação e a constrição unilateral do nervo isquiático sobre a atividade das enzimas antioxidantes SOD e CAT em

homogeneizado de medula espinal lombossacral, tronco cefálico e neocortex de ratos. .
- Determinar a concentração de ácido ascórbico em homogeneizado de medula espinal lombossacral, tronco cefálico e neocortex de ratos controle e tratados com extrato extratos plantas medicinais da flora maranhense e/ou sintéticos bioativos

III – Sumário do projeto:

O projeto em análise trata-se de projeto de pesquisa coordenado pela Profa Dra Maria do Socorro Cartágenes (UFMA) e possui como objetivo geral avaliar os a eficácia dos extratos plantas medicinais da flora maranhense e/ou sintéticos bioativos, em modelo experimental de cialgia em ratos. O projeto usará 30 ratos, distribuídos em 5 grupos experimentais. O modelo de cialgia utilizado será baseado em artigos publicados na literatura científica. A execução deste projeto envolve a estrutura do Laboratório de Pesquisa e Pós-graduação em Farmacologia e do Laboratório de fisiopatologia da dor. Estão envolvidos nesta pesquisa pesquisadores de diversos departamentos e alunos de pós-graduação e graduação da Universidade Federal do Maranhão. Os profissionais envolvidos possuem especialização nas mais diversas áreas como anestesia, dor, ortopedia, farmacologia, produtos naturais, imunologia formando assim um grupo abrangente e experiente. Os alunos de graduação envolvidos fazem parte da Liga Acadêmica de Dor do Maranhão (LAD-MA), uma entidade acadêmica que atua no âmbito do ensino, pesquisa e extensão. O projeto é financiado pela FAPEMA. Sua vigência será de 24 meses a iniciar em julho de 2013 e os experimentos iniciarão tão logo seja aprovado no comitê de ética.

IV – Comentário do relator frente à resolução 779 de 26 de agosto de 2010 e complementares em particular sobre:

O projeto está claro quanto aos seus objetivos. O delineamento experimental está coerente ao que se propõe. O número de animais está adequado para contemplar os grupos experimentais e a cinética proposta.

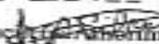
V – Pendências

VI – Recomendações:

- Relatar o destino das carcaças dos animais.

VII – Parecer consubstanciado da CEUA

São Luis, 26 / 08 / 2013.

Profa Dra  Maranhão Silva

Presidente da CEUA / UFMA



Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2017 000325 6

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: Universidade Federal do Maranhão

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 06279103000119

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Av. dos Portugueses, 1966 - Cidade Universitária Dom Delgado, Vila Bacanga.

Cidade: São Luis

Estado: MA

CEP: 65080-805

País: Brasil

Telefone: (98) 32728710

Fax:

Email: nit-dapi@ufma.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): MESA CIRÚRGICA PARA ROEDORES

Resumo:

A presente invenção diz respeito a uma mesa cirúrgica para roedores constituída de uma base fixa (1), um braço fixo a direita (2), um braço fixo a esquerda (3), um braço móvel (4) onde é acoplado o dinamômetro, uma base oscilante (5) regulável na altura onde o animal é posicionado facilitando o procedimento e um suporte para pinça (6). A presente invenção refere-se, portanto, a uma mesa cirúrgica a ser usada em estudo experimental para indução da dor neuropática em roedores. Este mecanismo permite quantificar a força de compressão aplicada no nervo tornando o procedimento mais eficaz.

Figura a publicar: 1



Pedido nacional de Invenção, Modelo de Utilidade, Certificado de Adição de Invenção e entrada na fase nacional do PCT

Número do Processo: BR 10 2017 024658 2

Dados do Depositante (71)

Depositante 1 de 1

Nome ou Razão Social: UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO

Tipo de Pessoa: Pessoa Jurídica

CPF/CNPJ: 06279103000119

Nacionalidade: Brasileira

Qualificação Jurídica: Instituição de Ensino e Pesquisa

Endereço: Av. dos Portugueses, 1966 - Cidade Universitária Dom Delgado, Vila Bacanga.

Cidade: São Luis

Estado: MA

CEP: 65080-805

País: Brasil

Telefone: (98) 32728710

Fax:

Email: nit-dapi@ufma.br

Dados do Pedido

Natureza Patente: 10 - Patente de Invenção (PI)

Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54): Formulações de uso oral e tópico das folhas de Arrabidaea chica Verlot.

Resumo: Esta invenção trata-se das formulações farmacêuticas de uso oral e tópico contendo o extrato etanólico e suas frações (Acetato de etila, clorofórmica, butanólica e hexânica) das folhas de Arrabidaea chica Verlot. Planta medicinal popularmente conhecida como pariri e carajuru, usada para obtenção de fitoterápicos de uso oral e tópico com ação antinociceptiva no tratamento da dor neuropática.