



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO MULTIDISCIPLINAR DE SAÚDE
PROGRAMA MULTICÊNTRICO DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS - SBFIS**



LORENA LÔBO BRITO MORBECK

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA,
ANTINOCICEPTIVA, ANTIOXIDANTE E TOXICOLÓGICA DO
EXTRATO ETANÓLICO E DAS FRAÇÕES DO CAULE E
CASCA DA *Aeschynomene martii* BENTH.**

Vitória da Conquista, BA
2018

LORENA LÔBO BRITO MORBECK

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA,
ANTINOCICEPTIVA, ANTIOXIDANTE E TOXICOLÓGICA DO
EXTRATO ETANÓLICO E DAS FRAÇÕES DO CAULE E
CASCA DA *Aeschynomene martii* BENTH.**

Dissertação apresentada ao Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas/Sociedade Brasileira de Fisiologia, Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Regiane Yatsuda
Universidade Federal da Bahia – UFBA

Co-orientador: Prof.^a Dr.^a Mariluze Peixoto Cruz
Universidade Federal da Bahia - UFBA

Vitória da Conquista, BA

2018

Biblioteca Universitária Campus Anísio Teixeira - UFBA

Morbeck, Lorena Lôbo Brito

Avaliação da atividade anti-inflamatória, antinociceptiva, antioxidante e toxicológica do extrato etanólico e das frações do caule e casca da *Aeschynomene martii* BENTH / Lorena Lôbo Brito Morbeck. - 2018.

93 f.: il.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Regiane Yatsuda.

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Mariluze Peixoto Cruz.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar em Saúde, Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas/Sociedade Brasileira de Fisiologia, 2018.

1. Antinociceptiva. 2. Anti-inflamatória. 3. Antioxidante. I. Universidade Federal da Bahia. II. Instituto Multidisciplinar em Saúde. III. Yatsuda, Regiane. IV. Cruz, Mariluze Peixoto IV. Título.

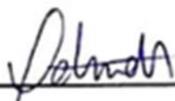
CDU: 615.012

LORENA LOBO BRITO MORBECK

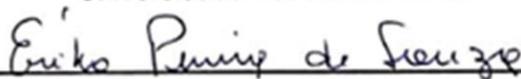
**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA, ANTINOCICEPTIVA,
ANTIOXIDANTE E TOXICOLÓGICA DO EXTRATO ETANÓLICO E DAS FRAÇÕES
DO CAULE E CASCA DA *AESCHYNOMENE MARTII* BENTH.**

Esta dissertação foi julgada adequada à obtenção do grau de mestre em
Ciências Fisiológicas e aprovada em sua forma final pelo Programa
Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade
Federal da Bahia.

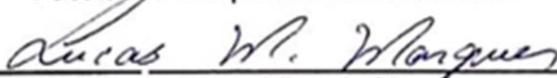
Vitória da Conquista – BA, 18 de dezembro de 2018.



Prof^ª Dr^ª. Regiane Yatsuda
Universidade Federal da Bahia



Prof^ª Dr^ª. Érika Pereira de Souza
Faculdade Independente do Nordeste



Prof. Dr. Lucas Miranda Marques
Universidade Federal da Bahia

Dedico este trabalho à **Deus**, por se fazer presente em minha vida do início ao fim.

Ao meu amado esposo, **Hegberto Gibran Santos Morbeck**, que dividiu comigo momentos de crescimento, conquistas e alegrias de uma maneira única, a você também dedico todo meu amor.

A minha mãe, **Nancy Gleide Lôbo Brito** e ao meu pai, **Djalma Oliveira Brito**, por imenso amor dedicado e pelos princípios de integridade.

À minha irmã **Larissa** pela amizade eterna e aos meus sobrinhos **Isabela** e **Rodrigo** por oxigenar, alegrar meus dias e encher meu coração de ternura.

À minha orientadora **Dra. Regiane Yatsuda** por todos os ensinamentos e conhecimentos compartilhados, além de sua amizade.

E aos meus amigos do grupo **Anti-inflamatório**, a quem tenho orgulho em fazer parte, eterna gratidão e carinho!

AGRADECIMENTOS

À **DEUS**, palavras são incapazes de expressar e descrever tamanha gratidão ao único que é digno de receber. A Ele, eu dedico toda a minha gratidão, que começa com o reconhecimento de quem Ele é, e daquilo que tem feito e fará em minha vida.

À toda minha **Família** que de maneiras direta e indireta contribuíram para essa conquista. Obrigada pela torcida, palavras de força e principalmente pelas orações.

Agradeço às Instituições públicas financiadoras, **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico** (CNPq-UNIVERSAL 014/2008; 014/2010), **Fundação de Amparo à Pesquisa e à Inovação Tecnológica do Estado da Bahia** (FAPESB/PPSUS 0008/2009) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo incentivo financeiro.

Agradeço também as Instituições que colaboraram para o desenvolvimento desta pesquisa além da aprendizagem vivenciada na **Universidade Federal da Bahia Campus (IMS/CAT)**, e na **Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG)**.

Ao **Programa Multicêntrico de Pós-Graduação** pelo privilégio concedido em realizar esse mestrado e à **Sociedade Brasileira de Fisiologia**, por proporcionar e incentivar o conhecimento à vida de muitos de nós.

A oportunidade de ingressar no mestrado me abriu um grande horizonte de conhecimentos, de oportunidades e, sem dúvida alguma, um imenso prazer. Hoje tenho a certeza que ninguém caminha sozinho, sempre existe alguém em quem se apoiar nos momentos de fraqueza, ou compartilhar os momentos de alegria. É para elas que apresento meus mais sinceros agradecimentos e carinho.

A minha professora orientadora, **Dra. Regiane Yatsuda**. Agradeço em especial por acreditar em mim desde a graduação, pela paciência, amizade, bem como os valiosos ensinamentos e por ser meu exemplo de pesquisadora. Rê eu serei sempre GRATA a você!

A minha co-orientadora, **Dra. Mariluze Peixoto Cruz**, pela tamanha paciência e disponibilidade, compartilhando grandes ensinamentos que enriqueceram meu trabalho. Mari obrigada pelas palavras de incentivo e força além de sua amizade.

As professoras **Dra. Érika Pereira de Souza** e **Kelle Oliveira Silva** por me acolherem desde o início, proporcionando o privilégio de sua amizade, conversas, convivência, conselhos e exemplos de comprometimento com a pesquisa.

Aos meus amigos da pós-graduação **Talita Costa dos Santos, Rafael Santos Dantas Miranda Dórea, Thiago Macedo Lopes Correia, Manoela Rios Trindade e**

Danielba Almeida da Silva, agradeço a oportunidade de convivência no mestrado, a partilha de conhecimentos e o apoio sempre que preciso.

A minha amiga confidente **Pâmala Évelin Pires Cedro** pela grande parceria e amizade. Como sempre dizemos “da UFBA para vida”.

Aos pesquisadores e professores **Dr. Lucas Miranda Marques, Dr. Bruno Oliveira Moreira, Dra. Telma de Jesus Soares, Dra. Amélia Cristina M. de Magalhães Gusmão e Dr. Avaldo de Oliveira S. Filho** pelo amparo, auxílio, suporte técnico e disponibilidade para a pesquisa.

Ao nosso querido Tonho, **Antônio Correia Freire**, pela indispensável ajuda durante as coletas e identificação.

Aos amigos e companheiros do grupo anti-inflamatório, **Talita Costa dos Santos, Rafael Santos Dantas Miranda Dórea, Verônica Alves Campos, Sarah Rocha Lima Braga, Alana Pereira Prado, Ananda Brito Soares, Ketleen Lucas do Carmo, Leonardo Oliveira Silva Bastos Andrade, Lucas Limeira Moreira, Mateus da Silva Pereira, Luiza Amorim Rocha, Kaic Santos Pereira e Vinicius Calebe Soares Souza**, pela ajuda em todos os testes. Sou grata pelo carinho, confiança e respeito recebido ao longo dessa jornada, onde tive o privilégio não só de ensinar, mas principalmente em aprender muito com vocês. Sou extremamente orgulhosa em fazer parte dessa equipe, onde fui apenas à porta-voz de um trabalho desenvolvido com muito empenho e garra de todos.

Aos técnicos e servidores **Antônio Carlos, Perivaldo Santos, Gideon Oliveira, Janeide Muritiba, Sérgio do Prado, José Cláudio Amorim e Robson da França**, pela ajuda com materiais, manutenção e mobilidade, essenciais para o desenvolvimento desta pesquisa.

Aos servidores da **Limpeza e Segurança**, que se eu escrever todos os nomes haja espaço, agradeço especialmente pelo carinho, ajuda e atenção, tornando meus dias de trabalho mais tranquilos. Obrigada pelos cafezinhos divididos na copa e por me permitir um lugar cativo nela.

A todos aqueles que estiveram ao meu lado com intuito de ajudar e neste momento. Muito obrigada por possibilitar essa experiência enriquecedora e gratificante, da maior importância para meu crescimento como ser humano e profissional. **Logo, não cheguei ao fim e, sim, ao início de uma longa caminhada.**

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

(Arthur Schopenhauer)

MORBECK, Lorena Lôbo Brito. Avaliação da atividade anti-inflamatória, antinociceptiva, antioxidante e toxicológica do extrato etanólico e das frações do caule e casca da *Aeschynomene martii* Benth. 2018. Dissertação (Mestrado) - Instituto Multidisciplinar de Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2018.

RESUMO

A espécie vegetal a ser estudada, *Aeschynomene martii* Benth, do gênero *Aeschynomene*, família das Leguminosae, possuem compostos bioativos com grande potencial farmacológico a serem usados. O estudo teve como objetivo avaliar as atividades antinociceptiva, anti-inflamatória, antioxidante e toxicológica do caule e casca da *A. martii* Benth, coletada na região da Floresta Nacional Contendas do Sincorá (FLONA). O extrato etanólico foi preparado por maceração e submetido à extração por partição. Após a evaporação, foram obtidas as quatro frações do extrato bruto com os seguintes rendimentos: 13,21% (hexano), 40,92% (diclorometano), 30,68% (acetato de etila) e 8,10% (butanol) em relação ao peso do extrato bruto 17,03 g. A prospecção fitoquímica das frações foi realizada por CCD com reveladores específicos. As frações de hexano e diclorometano tiveram seus perfis cromatográficos avaliados por CG-EM com destaque para a identificação de: estigmasterol, β -sitosterol, lupenona, 3,3',4',5,5',7-hexametoxiflavona, além dos ácidos graxos. A atividade antioxidante foi avaliada por teste do sequestro do radical livre DPPH, o extrato etanólico e as frações não apresentaram atividade antioxidante significativa ($p < 0,05$), além de serem classificadas quanto à concentração inibitória (boa, média e baixa, respectivamente). Para os ensaios antinociceptivo e anti-inflamatório foram utilizados camundongos machos adultos *Balb/c*. O efeito antinociceptivo foi avaliado pelos testes: Contorção abdominal induzido por ácido acético 0,6%, onde todas as frações (25 mg/kg) promoveram redução significativa das respostas nociceptivas ($p < 0,05$). Injeção intraplantar de formalina 1,5%, na fase 1 e 2, as frações (25 mg/kg) reduziram o número de "flinches", em comparação ao controle negativo ($p < 0,05$), quando comparadas ao grupo controle positivo morfina, as frações de diclorometano e butanol não apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$), o edema de pata formado reduziu significativamente nas frações (25 mg/kg) de hexano, diclorometano e acetato de etila ($p < 0,05$). No *Von Frey* eletrônico por injeção intraplantar de carragenina (Cg), todas as frações (25 mg/kg) foram capazes de reduzir significativamente a hipernocicepção ($p < 0,05$). Para a determinação da atividade anti-inflamatória foram realizados testes de Migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal, onde todas as frações (25 mg/kg) apresentaram redução significativamente a migração de neutrófilos em ($p < 0,05$); Determinação dos níveis de nitrito, todas as frações (25 mg/kg) apresentaram redução significativa ($p < 0,05$). Avaliação da permeabilidade vascular por azul de Evans, que mostrou uma significativa redução do extravasamento do corante no líquido peritoneal ($p < 0,05$). Para determinação da toxicidade frente à *Artemia salina* Leach, as classificações de toxicidade das frações foram ativa no extrato etanólico e hexano, moderada em diclorometano e inativa em acetato de etila e butanol. Os resultados permitem considerar que a *A. martii* Benth é uma promissora fonte natural para a identificação de novos compostos bioativos e agentes terapêuticos, bem como uma espécie promissora para uso quanto fitoterápico.

Palavras-chave: *Aeschynomene martii* Benth, Antinociceptiva. Anti-inflamatória. Antioxidante. Tripa de Galinha.

MORBECK, Lorena Lôbo Brito. Evaluation of anti-inflammatory, antinociceptive, antioxidant and toxicological activity of the ethanolic extract and of the stem and bark fractions of *Aeschynomene martii* Benth. 2018. Thesis (Master) - Multidisciplinary Health Institute, Federal University of Bahia, Vitoria da Conquista, 2018.

ABSTRACT

The plant species to be studied, *Aeschynomene martii* Benth, of the genus *Aeschynomene*, family of Leguminosae, possess bioactive compounds with great pharmacological potential to be used. The objective of this study was to evaluate the antinociceptive, anti-inflammatory, antioxidant and toxicological activities of *A. martii* Benth stem and bark, collected in the Contendas do Sincorá National Forest region (FLONA). The ethanolic extract was prepared by maceration and subjected to partition extraction. After evaporation, the four fractions of the crude extract were obtained in the following yields: 13.21% (hexane), 40.92% (dichloromethane), 30.68% (ethyl acetate) and 8.10% (butanol) relative to the weight of the crude extract 17.03 g. The phytochemical exploration of the fractions was performed by CCD with specific developers. Fractions of hexane and dichloromethane had their chromatographic profiles evaluated by GC-MS, with the emphasis on the identification: stigmaterol, β -sitosterol, lupenone, 3,3',4',5,5',7-hexamethoxyflavone, besides the acids fatty acids. The antioxidant activity was evaluated by the DPPH free radical sequestration test, the ethanolic extract and the fractions showed no significant antioxidant activity ($p < 0.05$), besides being classified as inhibitory concentration (good, medium and low, respectively). For the antinociceptive and anti-inflammatory assays adult male *Balb/c* mice were used. The antinociceptive effect was evaluated by the following tests: 0.6% acetic acid-induced abdominal contortion, where all fractions (25 mg/kg) promoted a significant reduction in nociceptive responses ($p < 0.05$). Intraplantar injection of formalin 1.5%, in phases 1 and 2, the fractions (25 mg/kg) reduced the number of flinches in comparison to the negative control ($p < 0.05$), when compared to the positive control group morphine, dichloromethane and butanol fractions did not present statistical difference ($p < 0.05$), the paw edema formed significantly reduced in the fractions (25 mg/kg) of hexane, dichloromethane and ethyl acetate ($p < 0.05$). In the electronic *Von Frey* by intraplantar injection of carrageenan (Cg), all fractions (25 mg/kg) were able to significantly reduce hypernociception ($p < 0.05$). For the determination of anti-inflammatory activity, tests were performed: Neutrophil migration to the peritoneal cavity, where all fractions (25 mg/kg) showed a significant reduction in neutrophil migration in ($p < 0.05$); Determination of nitrite levels, all fractions (25 mg/kg) presented a significant reduction ($p < 0.05$). Evaluation of vascular permeability by Evans blue, which showed a significant reduction of dye extravasation in the peritoneal fluid ($p < 0.05$). To determine the toxicity to *Artemia salina* Leach, the toxicity classifications of the fractions were active in ethanolic extract and hexane, moderate in dichloromethane and inactivated in ethyl acetate and butanol. The results allow us to consider that *A. martii* Benth is a promising natural source for the identification of novel bioactive compounds and therapeutic agents, as well as a promising species for use as a herbal remedy.

Keywords: *Aeschynomene martii* Benth. Antinociceptive. Anti-inflammatory. Antioxidant. Chicken bowel.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Planta <i>A. martii</i> Benth. em seu habitat, na Floresta Nacional Contendas do Sincorá (FLONA), Contendas do Sincorá- BA.....	23
Figura 2 - Cromatograma obtido por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa da fração de Hexano do caule e casca da <i>A. martii</i> Benth.....	51
Figura 3 - Cromatograma obtido por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa da fração de Diclorometano do caule e casca da <i>A. martii</i> Benth	51
Quadro 1 - Substâncias das frações do caule e casca da <i>A. martii</i> Benth identificadas por Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massa.....	52
Figura 4 - Efeito das frações do caule e casca da <i>A. martii</i> Benth no teste de contorção abdominal induzida por ácido acético (0,6%) em camundongos .	54
Figura 5 - Efeito das frações do caule e casca da <i>A. martii</i> Benth na resposta à nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina 1,5 % em camundongos.....	56
Figura 6 - Efeito das frações do caule e casca da <i>A. martii</i> Benth no edema de pata induzido por formalina 1,5%	57
Figura 7 - Efeito das frações do caule e casca da <i>A. martii</i> Benth na inibição da nocicepção mecânica pelo teste de Von Frey	58
Figura 8 - Efeito das frações do caule e casca da <i>A. martii</i> Benth na permeabilidade vascular, teste de azul de Evans.	59
Figura 9 - Efeito das frações do caule e casca da <i>A. martii</i> Benth sobre a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida por carragenina (Cg).....	60
Figura 10 - Fotomicrografia das frações do caule e casca da <i>A. martii</i> Benth sobre a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida por carragenina (Cg).....	61
Figura 11 - Efeito das frações do caule e casca da <i>A. martii</i> Benth sobre a produção do NO, avaliada indiretamente pela quantificação da concentração de nitrito.....	62

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** – Rendimentos do extrato etanólico e de suas respectivas frações de hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol obtidos do caule e casca da *Aeschynomene martii* Benth.....48
- Tabela 2** – Cromatografia de Camada Delgada com os perfis fitoquímicos, do extrato etanólico e das frações do caule e casca da *Aeschynomene martii* Benth. .49
- Tabela 3** – Substâncias identificadas por, Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa, das frações de hexano e diclorometano do caule e casca da *A. martii* Benth.....50
- Tabela 4** – Atividade antioxidante utilizando o radical livre DPPH, do caule e casca da *Aeschynomene martii* Benth.....53
- Tabela 5** – Resultados do teste de letalidade frente *A. salina* para o extrato etanólico e as frações do caule e casca da *A. martii* Benth.....63

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AE	Acetato de Etila
ANOVA	Análise de Variância
APCs	Células apresentadoras de antígenos
ATP	Adenosina trifosfato
BSTFA	<i>N,O</i> -Bis(trimetilsilil)trifluoroacetamida
c-NOS	Síntese do óxido nítrico constitutivo
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CG-EM	Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massa
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
COX	Cicloxygenase
COX-2	Cicloxygenase do tipo 2
D	Diclorometano
DCs	Células dendríticas
DAMPs	Padrões moleculares associados a danos
DL50	Dose letal mediana
DMSO	Dimetilsulfoxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
D.P.	Desvio padrão
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
DRG	Glânglios da Raiz Dorsal
eNOS	Síntese do óxido nítrico endotelial
EDTA	Ácido etileno diamino tetra acético
EPM	Erro padrão da média
ET-1	Endotelina-1
FDA	Food and Drug Administration
FLONA	Floresta Nacional Contendas do Sincorá
H	Hexano
HTM	Nociceptores mecânicos de alto limiar
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
i-NOS	Síntese do óxido nítrico induzível

i.p.	Intraperitoneal
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1
IL-1	Interleucina-1
IL1 α / β	Interleucina-1 alfa e beta
IL-1 β	Interleucina-1 β
IL-18	Interleucina-18
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NF- $\kappa\beta$	Fator nuclear kappa beta
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAF	Fator ativador de plaquetas
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos
PBS	Tampão fosfato-salino
PGe2	Prostaglandina e2
ROS	Espécie reativa de oxigênio
s.c.	Subcutânea
SNC	Sistema Nervoso Central
TNF- α	Fatores de Necrose Tumoral Alfa
TLRs	Receptores Toll-like
TLR9	Toll-like receptor 9
TRPV1	Potencial do receptor transitório vanilóide 1
UESB	Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	18
2.1 ATIVIDADE BIOLÓGICA E O USO DE PLANTAS MEDICINAIS	18
2.1.1 Plantas Medicinais	19
2.1.2 Toxicidade de plantas medicinais	20
2.2 <i>Aeschynomene martii</i> Benth	22
2.3 INFLAMAÇÃO	24
2.3.1 O Estresse Oxidativo e a Inflamação.....	28
2.4 DOR E NOCICEPÇÃO	30
2.4.1 Mecanismos Neurais da Nocicepção.....	32
2.4.2 Interações Entre Dor e Inflamação.....	34
3 OBJETIVOS.....	37
3.1 OBJETIVO GERAL.....	37
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	37
4 MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE VEGETAL.....	38
4.2 PREPARO DO EXTRATO, FRAÇÕES E ANÁLISE FITOQUÍMICA	39
4.2.1 Preparo do Extrato Etanólico e das Frações Orgânicas.....	39
4.2.2 Análise Fitoquímica Preliminar do Extrato com Reações de Caracterização dos Metabólitos.....	39
4.2.3 Identificação de Substâncias Presente em <i>A. martii</i> Benth por CG-EM....	40
4.3 BIOENSAIO	41
4.3.1 Atividade Antioxidante - Teste do Sequestro do Radical Livre DPPH.....	41
4.3.2 Animais	42
4.3.3 Teste de Contorções Abdominais Induzidas por Ácido Acético	43
4.3.4 Nocicepção Induzida Pela Injeção Intraplantar de Formalina	43
4.3.5 Teste de Von Frey.....	44
4.3.6 Avaliação da Permeabilidade Vascular	44
4.3.7 Recrutamento de Neutrófilos para a Cavidade Peritoneal.....	45
4.3.8 Avaliação da Produção do Óxido Nítrico (NO) por Determinação dos Níveis de Nitrito	45

4.3.9 Determinação da Toxicidade.....	46
4.3.9.1 Teste de Letalidade Frente à <i>Artemia Salina</i> Leach	46
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA	47
5 RESULTADOS.....	48
5.1 ANÁLISE QUÍMICA DA <i>Aeschynomene martii</i> Benth.....	48
5.1.1 Rendimento do Extrato e das Frações da <i>A. Martii</i> Benth.....	48
5.1.2 Análise Fitoquímica do Extrato Etanólico e das Frações em CCD	49
5.1.3 Análises de CG-EM das Frações do Caule e Casca da <i>A. Martii</i> Benth.....	49
5.2 ENSAIOS USADOS PARA AVALIAR A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	52
5.2.1 Avaliação da Atividade Antioxidante por DPPH	52
5.3 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DAS FRAÇÕES DO EXTRATO ETANÓLICO DO CAULE E CASCA DA <i>A. martii</i> Benth.	54
5.3.1 Contorção Abdominal Induzida por Ácido Acético	54
5.3.2 Nocicepção Induzida Pela Injeção Intraplantar de Formalina	55
5.3.2.1 Edema de pata induzido por formalina	56
5.3.3 Teste de <i>Von Frey</i>	57
5.3.4 Avaliação da Permeabilidade Vascular	58
5.3.5 Recrutamento de Neutrófilos para a Cavidade Peritoneal	59
5.3.6 Avaliação da Produção do Óxido Nítrico (NO)	61
5.4 DETERMINAÇÃO DA TOXICIDADE	62
5.4.1 Teste de letalidade frente à <i>Artemia Salina</i> Leach	62
6 DISCUSSÃO	64
7 CONCLUSÃO	79
REFERÊNCIAS	80
ANEXO A.....	92
ANEXO B.....	93

1 INTRODUÇÃO

A inflamação é um conjunto complexo de interações entre fatores e células que podem surgir em qualquer tecido em resposta a lesões traumáticas, infecciosas, pós-isquêmicas, tóxicas ou autoimunes (FRANKLIN; XU; DUMAN, 2017). Estes estímulos resultam na liberação de mediadores químicos exógenos e endógenos que, por sua vez, dão origem aos sinais cardinais iniciais de inflamação como, rubor, calor, tumor, dor e perda de função, descrito por Celsus no primeiro século (GANDHI et al., 2015).

Os mediadores exógenos atuam de forma quimiotática para recrutar primeiramente neutrófilos no local da lesão que fagocitam os invasores e detritos celulares gerados (PAN et al., 2017). Dentro dos neutrófilos, os fagossomas recém-formados, amadurecem formando fagolisossomos por fusão com grânulos lisossômicos, que contêm enzimas degradativas e produzem espécies reativas de oxigênio (ROS) para eliminar os invasores ou degradar restos celulares (MANGGE, 2014).

Dentre os sinais cardinais da inflamação descritos, a dor faz parte de um deles (BASBAUM et al., 2010). De tal modo que a liberação de mediadores químicos no processo inflamatório leva à sensibilização dos nociceptores que são, um subconjunto especializado de neurônios sensoriais que medeiam à dor e inervam densamente os tecidos periféricos. Os vários subconjuntos de nociceptores existente podem responder a estímulos nocivos mecânicos, químicos ou térmicos (PINHO-RIBEIRO; VERRI; CHIU, 2017).

Neste contexto, existe uma grande necessidade em desenvolver novos medicamentos que busquem modular a função celular específica de determinadas patologias (PATRIDGE et al., 2016). Logo, estima-se que aproximadamente 40% dos medicamentos disponíveis foram desenvolvidos direta ou indiretamente a partir de fontes naturais, assim subdivididos: 25% de plantas, 12% de microrganismos e 3% de animais (CALIXTO, 2001). Além disso, nas últimas décadas, o interesse populacional pelas terapias naturais tem aumentado significativamente nos países industrializados estando em expansão o uso de plantas medicinal e fitoterápico (CORRÊA; RODRIGUES; BARBANO, 2016).

O Brasil é o país de maior biodiversidade do planeta que, associada a uma rica diversidade étnica e cultural detém um valioso conhecimento tradicional associado ao uso de plantas medicinais, tendo potencial necessário para desenvolvimento de pesquisas com resultados em tecnologias e terapêuticas apropriadas (MARREIROS et al., 2015).

As plantas medicinais são importantes para a pesquisa farmacológica e no desenvolvimento de drogas, não somente quando seus constituintes são usados diretamente como agentes terapêuticos, mas também como matéria prima para a síntese, ou modelos de compostos farmacologicamente ativos (LI; WENG, 2017).

As potencialidades no uso das plantas medicinais encontram-se longe de estar esgotadas. Portanto novos estudos visando o conhecimento de novas moléculas com atividade terapêutica ou aplicações tecnológicas no desenvolvimento de fitoterápicos com maior eficiência de ação, precisam ser elucidados (PATRIDGE et al., 2016). Buscando garantir a necessária segurança, eficácia e qualidade dos medicamentos, a promoção do uso racional e o acesso da população àqueles considerados essenciais (CORRÊA; RODRIGUES; BARBANO, 2016).

As mais importantes fontes de princípio ativo encontram-se na diversidade de plantas com propriedades medicinais, por isso, levantamentos etnofarmacológicos são importantes para o conhecimento e estudo de espécies com finalidades medicinais (WENG; PHILIPPE; NOEL, 2012). As práticas médicas populares utilizam elementos naturais com fins farmacológicos, para tratamento de doenças, devido muitas vezes ao baixo custo em comparação alguns medicamentos sintéticos o que leva a redução de gastos, assim a constante busca por novos medicamentos com base nestas práticas tradicionais, tem-se mostrado promissoras. A relação entre as pessoas e as plantas usadas na terapêutica local é um dos principais focos de interesse da etnobotânica (MARREIROS et al., 2015).

A etnobotânica é a ciência que utiliza de diversas abordagens para ampliar o conhecimento sobre o uso da biodiversidade através dos saberes locais, empregando diferentes estratégias, principalmente para a seleção de espécies propícias a bioprospecção (CARTAXO; SOUZA; ALBUQUERQUE, 2010). Nesse sentido, a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, aprovada por meio do Decreto Nº 5.813, de 22 de junho de 2006, estabelece diretrizes e linhas prioritárias, para o desenvolvimento de ações e acesso seguro além do uso racional

de plantas medicinais e fitoterápicos no Brasil (CORRÊA; RODRIGUES; BARBANO, 2016).

É importante o desenvolvimento de novas tecnologias e inovações que visam fortalecer as cadeias e arranjos produtivos, ao uso sustentável da biodiversidade brasileira (HANSEN; HARAGUCHI; ALONSO, 2010). Desta forma o presente estudo baseia-se no fato de haver poucos trabalhos na literatura relacionados a espécies do gênero *Aeschynomene*, em especial *A. martii* Benth. Muitos dos artigos estão relacionados mais com a identificação e classificação botânica, sendo que existem poucos estudos relacionados sua atividade biológica.

Estudos realizados anteriormente pelo grupo de pesquisa ao qual estou inserida, mostraram que o extrato etanólico do caule de *A. martii* apresentou atividade antinociceptiva significativa reduzindo as contorções abdominais em camundongos (12,5 e 50 mg/kg), bem como diminuiu os episódios de flinches no teste de formalina, na fase 1 caracterizada pela dor de origem neurogênica (0,39 e 6,25 mg/kg) e na fase 2 caracterizada pela dor de origem inflamatória (0,78 e 6,25 mg/kg), também conseguiu diminuir a hiperalgesia observada no teste de hipernocicepção mecânica (1,56 mg/kg). Em relação a atividade anti-inflamatória do extrato, o mesmo foi capaz de inibir o recrutamento de neutrófilos (1,56 e 3,13 mg/kg) e diminuir o extravasamento peritoneal (12,5 mg/kg) (OLIVEIRA; YATSUDA; CRUZ, 2016).

Neste contexto, os resultados revelaram que *A. martii* Benth é uma espécie rica em atividade biológica, sendo promissor o fracionamento, isolamento e identificação de seus compostos bioativos. Dando continuidade às pesquisas o presente trabalho teve objetivo avaliar a atividade anti-inflamatória, antinociceptiva, antioxidante e toxicológica do extrato etanólico e frações do caule e casca da *A. martii* Benth, popularmente conhecida como tripa de galinha, coletada na região de semiárido (caatinga) de Contendas do Sincorá (BA), devido a sua ampla distribuição na região.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ATIVIDADE BIOLÓGICA E O USO DE PLANTAS MEDICINAIS

As plantas medicinais são empregadas no tratamento de várias doenças humanas desde tempos imemoriais, sendo reconhecidas por suas propriedades terapêuticas. Durante séculos, em todo o mundo usavam-se a fitoterapia tradicional para tratar variados tipos de doenças. Nesta vertente, muitos estudos validaram o uso de produtos fitoterápicos no tratamento de diversas enfermidades (LI; WENG, 2017).

O reino vegetal continua a servir como uma fonte importante para entidades químicas que apoiam a descoberta de drogas. As ricas tradições da fitoterapia, desenvolvidas por tentativa e erro em seres humanos ao longo de milhares de anos, contêm inestimáveis informações biomédicas que aguardam para serem descobertas, utilizando-se abordagens científicas modernas (SILVA et al., 2015).

Quando utilizados por seres humanos, esses compostos muitas das vezes interagem com alvos proteicos ou alteram o crescimento de organismos comensais, patogênicos ou parasíticos que vivem dentro do corpo humano, o que, por sua vez, afeta a saúde levando ao estado de doença (WENG; PHILIPPE; NOEL, 2012).

As plantas produzem um repositório de substâncias químicas estruturalmente diversas, tradicionalmente conhecidas como metabólitos secundários, pois muitas delas não estão diretamente envolvidas no metabolismo central. A expansão da diversidade associada a metabólitos secundários reproduz a principalmente a adaptabilidade das plantas terrestres (CARTAXO; DE ALMEIDA SOUZA; DE ALBUQUERQUE, 2010).

Novos ramos metabólicos surgiram continuamente ao longo da evolução das plantas terrestres, resultando em um repertório contemporâneo de metabólitos especializados, alguns dos quais são compartilhados entre vários grupos taxonômicos, enquanto outros existem apenas em uma única espécie (CARTAXO; DE ALMEIDA SOUZA; DE ALBUQUERQUE, 2010). Como exemplo, a morfina um analgésico alcaloide benzilisoquinolina, provém da extração da planta *Papaver somniferum*, sendo aprovada para uso em 1827, foi a primeira molécula isolada

derivada de plantas. Desde então, muitas drogas foram descobertas a partir de plantas (PATRIDGE et al., 2016).

A moderna indústria farmacêutica surgiu no início do século XIX, e foi parcialmente impulsionada pela pesquisa em busca de novos agentes terapêuticos a partir de plantas medicinais. Assim, a Food and Drug Administration (FDA) aprovou novas entidades moleculares de fontes naturais, 25% são derivados de produtos naturais de plantas (PATRIDGE et al., 2016).

Certamente, os produtos naturais aprovados pelo FDA são melhores caracterizados, como parte de um programa para isolar e estudar novos produtos naturais, embora alguns permaneçam descritos como misturas complexas (PATRIDGE et al., 2016). Em muitos sistemas fitoterápicos tradicionais, uma prescrição frequentemente compreende várias substâncias misturadas em uma determinada proporção compondo uma única fórmula, em que cada substância em isolamento às vezes não possui atividades terapêuticas, destacando o fenômeno conhecido como o efeito combinatório (LUCIANO; FERRAZ; SECA, 2015). Postula-se que a eficácia farmacológica pode aumentar a partir da ação simultânea de vários produtos químicos, e/ou ação sinérgica em um único composto. (WENG; PHILIPPE; NOEL, 2012).

2.1.1 Plantas Medicinais

No Brasil, as informações acerca das plantas medicinais surgem de uma miscigenação de conhecimentos, oriundos de povos indígenas, europeus e africanos. A principal razão pela qual a população é adepta a utilização de espécies vegetais para tratamento de doenças, é devido ao baixo custo em comparação aos medicamentos sintéticos o que leva a redução de gastos com estes produtos (CARTAXO; SOUZA; ALBUQUERQUE, 2010).

As mais importantes fontes de princípio ativo do planeta encontram-se na diversidade de plantas com propriedades medicinais, por isso, levantamentos etnofarmacológicos são importantes para o conhecimento e estudo de espécies com finalidades medicinais, vez que são fontes potenciais de compostos terapêuticos (SILVA et al., 2014).

O uso das plantas medicinais no combate às doenças ou na manutenção da saúde foi reconhecido pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 1978, quando o órgão, através de comunicados e resoluções, expressou sua posição frente à necessidade de valorizar o uso das plantas medicinais no âmbito sanitário (BRASIL, 2006). A OMS recomenda então, aos órgãos de saúde pública de cada país, que procedam ao levantamento das plantas utilizadas na medicina tradicional no âmbito regional, identifique-as botanicamente e estimulem seu uso (SAÚDE, 2016).

A Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, aprovada através do decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006, considera a utilização das plantas medicinais como uma estratégia para o fortalecimento da agricultura familiar, geração de emprego e renda, uso sustentável da biodiversidade brasileira, avanço tecnológico e melhoria da atenção à saúde da população brasileira (BRASIL, 2006).

Com o aumento da capacitação nas Instituições Universitárias, cresce a possibilidade de pesquisa e desenvolvimento de medicamentos fitoterápicos nacionais (CORRÊA; RODRIGUES; BARBANO, 2016). Muitos estudos buscam estratégias que consistem em submeter às preparações de espécies vegetais, tais quais usadas pela população em geral, a uma completa bateria de testes farmacológicos, toxicológicos, pré-clínicos e clínicos, através dos quais procuram a confirmação ou não da propriedade terapêutica atribuída (OCHWANG'I et al., 2014).

2.1.2 Toxicidade de plantas medicinais

As plantas produzem uma grande variedade de metabólitos secundários que frequentemente são relacionados a mecanismos de proteção da planta contra predadores e patógenos (SILVA; TUROLLA, 2004). As espécies tóxicas são aquelas capazes de produzirem compostos que podem causar alterações metabólicas prejudiciais ao homem e aos animais. A toxicidade apresentada por uma espécie vegetal pode estar relacionada a fatores associados ao indivíduo, à planta, ao modo de exposição e a questões ambientais (PEREIRA et al., 2016).

O surgimento do conceito de “natural” em muito contribuiu para o aumento do uso das plantas medicinais nas últimas décadas. Para muitas pessoas esse conceito significa a “ausência de produtos químicos”, que são aqueles que podem causar algum dano ou, de outra forma, representa perigo (CAMPANA, 2016).

Espécies consideradas tóxicas produzem metabólitos secundários que pela inalação, ingestão ou contato podem causar alterações patológicas em homens e animais e, em alguns casos, pode levar a sérios distúrbios no organismo e até mesmo o óbito (CAMPANA, 2016). Desde antigamente as plantas tóxicas são utilizadas pelo homem, seja para uso em casos de envenenamentos intencionais, tais como, homicídio e suicídio, uso indiscriminado, utilização indígena para caça ou ainda, como recurso terapêutico e desenvolvimento de novos fármacos (PEREIRA et al., 2016).

O estudo das plantas tóxicas vem ganhando importância, pois, além de esclarecer diferentes aspectos dos casos de intoxicações pode ainda fornecer compostos líderes para o desenvolvimento de fármacos (SILVA; TUROLLA, 2004). Um exemplo da utilização de plantas tóxicas na descoberta de novos medicamentos foi o desenvolvimento dos bloqueadores neuromusculares a partir do curare. Os trabalhos com o curare da espécie *Strychnos* e *Chondodendron* deram início aos estudos sobre a relação entre estrutura química e atividade biológica (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006).

Existe um número cada vez maior de estudos científicos que comprovam a toxicidade de plantas antes usadas sem restrições e de forma indiscriminada (VEIGA; PINTO; MACIEL, 2005). No Brasil, na década de 80, o confrei (*Symphytum officinale* L. Boraginaceae) foi disseminado como planta para a cura de diversas doenças, inclusive o câncer. Estudos posteriores demonstraram o risco do uso interno desta planta, altamente hepatotóxica devido a alcaloides pirrolizidínicos (CAMPANA, 2016).

O desconhecimento por parte da população sobre efeitos secundários e toxicidade de espécies utilizadas habitualmente pode levar a consequências sérias (OLIVEIRA, 2006). A intoxicação, aguda ou crônica, causada por plantas é difícil de ser diagnosticada assim como a associação entre os sintomas e o consumo e/ou contato com algumas espécies é difícil de ser estabelecida (MARIA, 2011).

Desta forma, o diagnóstico deve ser baseado na maior quantidade possível de dados, sobretudo naqueles obtidos nos exames clínicos. As análises toxicológicas e os dados epidemiológicos também podem ajudar o diagnóstico de intoxicação ou na identificação de casos de abuso de espécies vegetais. O tratamento nos casos de intoxicação, geralmente é sintomático e de suporte, e o

conhecimento das plantas tóxicas da região, em particular as ornamentais, pode ser de grande auxílio (MARIA, 2011).

Apesar da crescente importância dos medicamentos fitoterápicos, relativamente poucos estudos são realizados a fim de comprovar sua eficácia e segurança, sendo que muitas plantas ainda são utilizadas com base somente no seu uso popular bem estabelecido. Portanto as plantas medicinais vêm desempenhando um grande papel na medicina moderna, sendo fontes naturais que fornecem compostos que podem ser levemente modificados, tornando-os mais eficazes ou menos tóxicos (PEREIRA et al., 2016).

Diante da grande importância dos medicamentos fitoterápicos, testes toxicológicos devem ser executados segundo protocolos da regulamentação federal vigente, sendo extremamente necessários para consolidar essa lacuna frente ao uso das plantas medicinais (CAMPANA, 2016).

2.2 *Aeschynomene martii* Benth

A espécie a ser estudada pertence ao gênero *Aeschynomene*, família das Leguminosae, subfamília Faboideae. De acordo com Fan e Lin (2013) as Fabaceae são consideradas a maior família no Brasil, com 2.100 espécies e 188 gêneros, dos quais 31 são endêmicos, estando representada em todos os biomas brasileiros. As análises filogenéticas têm demonstrado que Fabaceae é uma família monofilética, com subfamília Faboideae, estando representada por 28 tribos, 478 gêneros e 13.800 espécies (FAN; LIN, 2013).

Em 1859, na Flora Brasiliensis de Martius, foram descritas 24 espécies, oito das quais novas para a Ciência. Em 1938, foi proposta uma divisão do gênero em duas secções: *Eu-aeschynomene* L. e *Ochopodium*. Logo em 1955, foi realizada uma revisão do gênero, renomeando a secção *Eu-aeschynomene* como *Aeschynomene*, estimando cerca de 350 espécies distribuídas nos trópicos e em locais relativamente mais quentes das zonas temperadas sendo que, para o continente americano, foram listadas 160 espécies (SOUZA et al., 2012).

Figura 1 – Planta *A. martii* Benth. em seu *habitat*, na Floresta Nacional Contendas do Sincorá (FLONA), Contendas do Sincorá- BA.



Fonte: Fotografia da espécie vegetal no FLONA feita pela autora.

Estudos fitoquímicos da família Leguminosae demonstraram a presença de compostos alcaloides na casca; isoflavona, triterpenos e alguns diterpenos (COELHO et al., 2005). O diterpeno 14,15-epoxigeranilgeraniol e alguns derivados isolados têm sido associados à atividade protetora contra a penetração de cercárias

de *Schistosoma mansoni*. O furano-diterpeno 6 α , 7 β -di-hidroxiouacapan-17 sódio-oato, apresentou atividade anti-inflamatória no edema de pata produzido pela carragenina (DUTRA; LEITE; BARBOSA, 2008).

Embora sua flora seja amplamente utilizada em medicina doméstica, na literatura há poucos trabalhos que buscam comprovar o potencial medicinal da utilização da *A. martii* Benth, assim alguns estudos sobre a sua família já foram descritos. Estudos com as frações do extrato de *Pterodon pubescens* Benth, apresentaram efeitos antinociceptivos periféricos e/ou centrais através de doses muito baixas, justificando seu uso popular em distúrbios da dor (COELHO et al., 2005). Já com os extratos alcoólicos de *Pterodon pubescens* Benth. (Leguminosae) apresentaram potente ação antiedematogênica aguda e tópica, destacando a fração de hexano (SILVA et al., 2004).

Estudo com extrato etanólico das sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel. (Leguminosae), demonstraram atividade bactericida para *Staphylococcus aureus*, e suas frações hexânica e butanólica apresentarem uma potente atividade leishmanicida (DUTRA et al., 2009). Os efeitos anti-inflamatórios e antinociceptivo foram inibidos pelo extrato alcoólico da casca e caule de *Pterodon emarginatus* Vogel. destacando as propriedades de ação analgésica e anti-inflamatória (DE MORAES et al., 2009). O gênero *Pterodon* spp., (Leguminosae), apresentaram em estudos propriedades antirreumáticas, analgésicas e anti-inflamatórias (HANSEN; HARAGUCHI; ALONSO, 2010). Estudos com *Aeschynomene indica* L. promoveram efetivamente a cicatrização de feridas reduzindo a formação da cicatriz, por diminuir a produção de colágeno I / III, e inibir a expressão de TGF- β 1, além de acelerar a transição de fenótipos de macrófagos M1 para M2 (LEI et al., 2018).

2.3 INFLAMAÇÃO

A inflamação e morte celular resultam de respostas teciduais contra infecções, injúrias químicas e lesões físicas. Em organismos multicelulares, uma ampla gama de vias de sinalização atuam em conjunto para controlar o processo que normalmente leva à recuperação do tecido lesado e à cicatrização (CRESPO YANGUAS et al., 2017).

Apresentando ação altamente regulada, inicia após uma lesão tecidual ou infecção, e tem como principal função a eliminação dos insultos patogênicos e dos tecidos danificados, no entanto se ocorrer de forma inadequada e persistente, gera mais danos teciduais (NATHAN, 2002). Conta ainda com a ação de células específicas como os neutrófilos, monócitos e macrófagos, que são cruciais para a efetiva eliminação de patógenos e detritos celulares (SERHAN; CHIANG; VAN DYKE, 2008).

O influxo de células no local da atividade inflamatória e a presença da multiplicidade de mediadores inflamatórios resultam nos sinais cardinais de inflamação: vermelhidão, inchaço, calor, dor e perda de função (KVIETYS; GRANGER, 2014). Embora projetado para serem prejudicial aos patógenos, às atividades celulares envolvidas na resposta inflamatória e os mediadores químicos produzidos podem causar danos aos tecidos do hospedeiro (PAPAYANNOPOULOS, 2017).

No entanto, a inflamação é normalmente autolimitada e se resolve, muitas vezes rapidamente. Isso ocorre porque vários mecanismos de feedback negativo são ativados à medida que a inflamação segue seu curso (PAPAYANNOPOULOS, 2017). Estes incluem a secreção de citocinas anti-inflamatórias e mediadores lipídicos que atuam para inibir a sinalização pró-inflamatória; assim como a perda de receptores para mediadores inflamatórios; e a ativação de células reguladoras que amortecem a atividade dos tipos de células pró-inflamatórias (INNES; CALDER, 2018).

A redução de processos regulatórios pode resultar em inflamação excessiva, inadequada ou contínua, que pode causar danos irreparáveis aos tecidos do hospedeiro (INNES; CALDER, 2018). No entanto seus pontos de checagem, e sinais de ativação, atuam em conjunto com sinalizações de moléculas responsáveis por suprimir ou ativar as resposta inflamatórias (GANDHI et al., 2015).

Como uma visão geral, o processo inflamatório ocorre mediante processos coordenados começando pelo reconhecimento do dano tecidual e subsequente indução de recrutamento de neutrófilos (fase I), os mecanismos subjacentes ao recrutamento de monócitos mediados por neutrófilos (fase II), os sinais derivados de fagócitos que anulam o recrutamento de neutrófilos (fase III) e, finalmente, término

da resposta inflamatória por macrófagos que adotam um perfil anti-inflamatório após a ingestão de neutrófilos apoptóticos (fase IV) (MÓCSAI, 2013; NATHAN, 2002).

O início das respostas inflamatórias deve ser rigidamente regulado para evitar danos consideráveis. Sinais moleculares gerados em resposta a dano tecidual e/ou invasão microbiana são reconhecidos por células apresentadoras de antígenos (APCs), tais como macrófagos residentes ou células dendríticas (DCs), devido à sua localização estratégica nas proximidades do local da lesão (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013).

A morte celular necrótica resultante de infecção ou lesão leva ao rompimento das membranas celulares seguida da liberação de componentes citoplasmáticos e nucleares, que contêm padrões moleculares associados a danos (DAMPs). Os DAMPs são reconhecidos pelos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) como Toll-like receptor-9 (TLR9) expressos pelos leucócitos e promovem a produção de citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-1 (IL-1) (NATHAN, 2002; TAYLOR; COLGAN, 2017).

Outro evento chave na inflamação inclui a liberação extracelular de ATP do tecido lesado, promovendo finalmente a maturação e subsequente secreção das citocinas pró-inflamatórias, incluindo interleucinas 1 alfa e 1 beta ($IL1\alpha / 1\beta$) bem como IL18. O primeiro sinal depende da ativação do fator nuclear kappa B (NF- κ B), que é desencadeado pela ligação de padrões moleculares associados a danos (DAMPs) ou padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) a receptores Toll-like (TLRs) (TAYLOR; COLGAN, 2017).

O NF- κ B também pode ser ativado por citocinas da família TNF, ligante CD40, fator de ativação de células B e ativador de receptor do ligante NF- κ B. A ativação do NF- κ B induz a expressão de TNF- α e as formas prematuras de $IL1\beta$ e IL18 (SERHAN; CHIANG; VAN DYKE, 2008). Diante de todo esse conjunto de ações, o primeiro passo na resposta inflamatória resulta no suprimento aumentado de sangue para o local da inflamação e um aumento na permeabilidade da parede vascular, permitindo que o plasma e moléculas grandes atravessem o endotélio, havendo a liberação desses mediadores no local da inflamação (KVIETYS; GRANGER, 2014).

Os leucócitos (glóbulos brancos) migram da corrente sanguínea para o local da lesão. Processo promovido pela liberação de substâncias químicas que atuam como quimiotáticos de leucócitos para o local da inflamação e pela regulação

positiva de moléculas de adesão no endotélio que permitem a fixação transitória de leucócitos no endotélio (SOEHNLEIN; LINDBOM, 2010).

A adesão e extravasamento de neutrófilos depende em grande parte da expressão de P-selectina (também conhecida como CD62P), molécula de adesão intercelular 1 (ICAM1, também conhecida como CD54) e ICAM2 (também conhecida como CD102) pelo endotélio; ICAM1 e ICAM2 são reconhecidos pelas integrinas β 2 CD11b – CD18, que são expressas pelos neutrófilos (SOEHNLEIN et al., 2017). O recrutamento de neutrófilos é promovido por agentes quimiotáticos, como o componente C5a do complemento, o leucotrieno B4, o fator ativador de plaquetas (PAF) e o CXCL8, muitos dos quais são derivados de células residentes em tecidos ou subgrupos de leucócitos infiltrantes (CRESPO YANGUAS et al., 2017).

Os neutrófilos ativados liberam mediadores químicos no local da inflamação. Esses mediadores podem incluir lipídios como as prostaglandinas, leucotrienos, endocanabinóides, fator ativador de plaquetas, peptídeos, citocinas, quimiocinas, espécies reativas de oxigênio como o ânion superóxido e peróxido de hidrogênio, os derivados de aminoácidos como as histaminas, óxido nítrico e as enzimas proteases de matriz (INNES; CALDER, 2018).

Os neutrófilos são células de vida curta que são recrutadas no início da resposta inflamatória. Eles usam uma grande variedade de mecanismos inflamatórios, alguns dos quais são potencialmente prejudiciais para o hospedeiro, e assim a ativação de neutrófilos tem que ser rigidamente controlada para evitar danos excessivos aos tecidos (PAPAYANNOPOULOS, 2017). Os neutrófilos, monócitos e macrófagos são células fagocíticas totalmente relacionadas, que cooperam durante o início, progressão e resolução da inflamação, desta forma é notório que os neutrófilos e macrófagos formam uma parceria intrincada em locais de danos (SOEHNLEIN et al., 2017).

Durante a fase de inflamação, os neutrófilos aprimoram as atividades macrofágicas que visam eliminar o estímulo inicial. Durante a fase de resolução, os neutrófilos que morrem transmitem um sinal importante que reprograma macrófagos para promover a cicatrização (SOEHNLEIN; LINDBOM, 2010). Durante a resolução da inflamação, um conjunto de ações impede a infiltração adicional de neutrófilos e promove a remoção de detritos do local inflamado, assim restaurando a homeostase

do tecido e, ao mesmo tempo, promovendo a captação e eliminação de células apoptóticas (JURÁŇOVÁ; FRANKOVÁ; ULRICHOVÁ, 2017).

Os mediadores lipídicos parecem ter um papel fundamental nesse processo, e a resolução da inflamação é acompanhada por uma mudança ativa nos tipos de mediadores lipídicos encontrados no local inflamado. Durante a resposta inflamatória inicial, as prostaglandinas e os leucotrienos que amplificam a inflamação são gerados por vários tipos de células, incluindo células endoteliais, neutrófilos, monócitos e macrófagos (KVIETYS; GRANGER, 2014). Em seguida, a prostaglandina E2 (PGE2) e a PGD2 promovem gradualmente a síntese de mediadores com atividade anti-inflamatória e de pró-resolução, como as lipoxinas. Este processo é conhecido como interruptor de classe do mediador lipídico (INNES; CALDER, 2018).

Dentro de todo esse contexto apresentado, observamos que a inflamação é uma resposta imune essencial que permite ao hospedeiro eliminar uma grande variedade de substâncias nocivas. Em condições agudas, o estímulo é percebido por receptores de reconhecimento de padrões, levando a cascatas de sinalização que induzem a liberação de mediadores inflamatórios, como eicosanoides e citocinas. Esses mediadores recrutam neutrófilos, monócitos e macrófagos para o local da inflamação para eliminar o estímulo (KVIETYS; GRANGER, 2014; MOWAT; SCOTT; BAIN, 2017)

Neste processo ocorre a depuração de neutrófilos, sendo um sinal importante para a mudança do perfil de macrófagos inflamatórios, fornecendo uma fonte contínua de citocinas importantes para os estímulos de fibroblastos e proliferação de queratinócitos, neutralizando os sinais inflamatórios e promovem o reparo tecidual (SOEHNLEIN et al., 2017).

2.3.1 O Estresse Oxidativo e a Inflamação

Os radicais livres possuem diferentes papéis no organismo e encontram-se envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. Entretanto, seu excesso apresenta efeitos deletérios, tais como danos ao DNA, proteínas e organelas celulares e membranas, provocando alterações na estrutura e funções

celulares (ALVES et al., 2010). Para combater os radicais livres os organismos vivos produzem substâncias que são capazes de regenerar ou prevenir os danos oxidativos, exercendo seu papel como antioxidante (PAN et al., 2017).

O estresse oxidativo e a inflamação estão intimamente inter-relacionados, uma vez que o estresse oxidativo pode causar inflamação, que por sua vez pode induzir o mesmo. Tanto o estresse oxidativo quanto a inflamação causam danos às células incluindo o endotélio (SERHAN; CHIANG; VAN DYKE, 2008). A disfunção endotelial, por sua vez, promove um ambiente pró-inflamatório, como evidenciado pelo aumento da expressão endotelial de moléculas de adesão e pelo desequilíbrio de metabólitos do ácido araquidônico e moléculas quimiotáticas (SITI; KAMISAH; KAMSIAH, 2015).

Os mediadores inflamatórios são os principais fatores não enzimáticos envolvidos em muitas doenças inflamatórias, juntamente com a imunomodulação associada e o estresse oxidativo. O Óxido Nítrico (NO) é um gás liberado a partir da reação de oxigenação do aminoácido L-arginina, mediada pela enzima NO-sintase constitutiva (c-NOS) e induzível (i-NOS), em pequenas quantidades em condições fisiológicas e, em maiores quantidades, em condições patológicas, como no processo inflamatório e choque séptico (DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003) (LUNDBERG; WEITZBERG; GLADWIN, 2008).

Apresenta um papel dúbio, às vezes benéfico, outras vezes prejudicial ao organismo. Está envolvido no relaxamento vascular e tem um papel de grande importância na proteção do vaso sanguíneo. O óxido nítrico (NO) constitui um dos mais importantes mediadores de processos intra e extracelulares (DIETRICH et al., 2015).

Em concentrações fisiológicas é um importante mediador citotóxico de células imunes efetoras ativadas, capaz de destruir patógenos e células tumorais. Possui, ainda, um papel como mensageiro/modulador em diversos processos biológicos essenciais. No entanto em altas concentrações o NO é potencialmente tóxico. A toxicidade se faz presente particularmente em situações de estresse oxidativo, geração de intermediários do oxigênio e deficiência do sistema antioxidante (DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003).

Desta forma, o NO é o principal mediador citotóxico de células imunes efetoras ativadas e constitui a mais importante molécula reguladora do sistema

imune. Tem um papel como mensageiro/modulador em diversos processos biológicos essenciais (DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003). O alto nível de NO produzido por macrófagos ou por neutrófilos ou outras células ativadas, podem também lesar células saudáveis vizinhas, sendo este mecanismo um dos responsáveis pelos processos inflamatórios e autoimunes (WORDS, 2000).

Todas as células que participam da resposta inflamatória podem produzir espécies reativas de oxigênio (ROS) após a ativação podem levar a ações que resultam em falhas de barreira endotelial associada à inflamação (DE GONZALO-CALVO et al., 2010). Contudo em células endoteliais há expressão e produção de endotelina-1 (ET-1), são aumentadas pelo dano tecidual e patogênicas, ativando a formação de ROS, aumentando a atividade da NADPH oxidase, causando estresse oxidativo, formando uma retroalimentação positiva da lesão e disfunção oxidativa endotelial, sendo um potente peptídeo vasoconstritor com propriedades pró-oxidante e pró-inflamatórias (SITI; KAMISAH; KAMSIAH, 2015).

A ET-1 reduz as propriedades vasodilatadoras endoteliais por induzir a redistribuição da síntese do óxido nítrico endotelial (eNOS) da membrana plasmática para a mitocôndria através da fosforilação da eNOS, reduzindo assim a biodisponibilidade do NO (MANGGE, 2014).

Indiretamente, as ROS podem alterar a função de barreira promovendo a adesão e a migração transendotelial de leucócitos, via aumento da transcrição de moléculas de adesão nas células endoteliais (EC) sensíveis ao oxidante, induzindo vias de sinalização que regulam a biossíntese de mediadores inflamatórios e ativando proteases latentes tais como metaloproteinase de matriz (KVIETYS; GRANGER, 2014).

2.4 DOR E NOCICEPÇÃO

O comitê de taxionomia da Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) conceitua a dor como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a dano tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de tal dano.”; conceitua também nocicepção como “o processo neural de codificação de estímulos nocivos” (IASP, 1994).

Classicamente, a dor foi conceituada do ponto de vista restrito do processamento nociceptivo. O campo gerou amplo conhecimento sobre a transdução, transmissão e processamento da medula espinhal dos sinais nociceptivos relacionados à dor aguda e crônica; da mesma forma, estudos em animais revelaram propriedades dos aferentes primários, seus circuitos da medula espinhal e vias especializadas relacionadas no cérebro que mediam o comportamento semelhante à dor (BALIKI; APKARIAN, 2015).

A ativação de nociceptores e vias nociceptivas podem causar dor, por outro lado, amplas evidências indicam que os nociceptores podem estar ativos na ausência de percepção da dor (BASBAUM et al., 2010). A nocicepção ocorre continuamente na ausência da percepção da dor e é um processo fisiológico fundamental que subconscientemente fornece informações mais verídicas e instantâneas que protege o organismo de danos nos tecidos (HERNÁNDEZ-PORRAS et al., 2017).

Do ponto de vista mecanicista, presumimos que os comportamentos modulados pela nocicepção, na ausência de dor, dependem de repertórios habituais já estabelecidos (BASBAUM et al., 2010). Em contraste, quando a dor é evocada, ela dá origem à nova aprendizagem, sensibilização nociceptiva periférica e medular além da aprendizagem emocional que é potencializada pela saliência e estímulo percebido do evento aversivo. No entanto, em geral, o funcionamento nociceptivo e seus mecanismos subjacentes, na ausência de dor, ultrapassam o entendimento atual e exigem mais investigação (HERNÁNDEZ-PORRAS et al., 2017).

A capacidade de detectar estímulos nocivos é essencial para a sobrevivência e o bem-estar de um organismo. O sistema nervoso detecta e interpreta uma ampla gama de estímulos térmicos e mecânicos, bem como irritantes químicos ambientais e endógenos (TEIXEIRA, 2001).

Quando esses estímulos são intensos geram dor aguda e, no quadro de lesão persistente, os componentes do sistema nervoso periférico e central da via de transmissão da dor exibem plasticidade, aumentando os sinais de dor e produzindo hipersensibilidade. Quando a plasticidade facilita os reflexos de proteção, pode ser benéfica, mas quando as mudanças persistem, pode ocorrer uma condição de dor crônica (MITSU; ZACHARIOU, 2016).

No entanto a definição padrão de dor enfatiza sua subjetividade que por sua vez, implica uma experiência consciente. A dor é uma sensação complexa que se manifesta de muitas maneiras diferentes. Os estímulos nociceptivos são geralmente categorizados nos seguintes tipos: inflamatórios, neuropáticos e nociceptivos.

2.4.1 Mecanismos Neurais da Nocicepção

A nocicepção é o processo pelo qual estímulos térmicos, mecânicos ou químicos intensos são detectados por uma subpopulação de fibras nervosas periféricas, chamadas nociceptores (BASBAUM et al., 2010). Os corpos celulares dos nociceptores estão localizados nos gânglios da raiz dorsal (DRG) do corpo e do gânglio trigeminal da face, e possuem um ramo axonal periférico e central que inerva seu órgão-alvo e a medula espinhal, respectivamente (MCENTIRE et al., 2016).

Existem duas classes principais de nociceptores. A primeira inclui aferentes mielinizados de diâmetro médio (A δ) que medeiam a dor “primeira” aguda, bem localizada ou rápida. Estes aferentes mielinizados diferem consideravelmente do diâmetro maior e conduzem rapidamente fibras A β que respondem à estimulação mecânica inócua (isto é, toque leve). A segunda classe de nociceptor inclui fibras “C” não mielínicas de pequeno diâmetro que transmitem dor mal localizada, “segunda” ou lenta (RAZAVI; HOSSEINZADEH, 2017).

Os nociceptores são excitados apenas quando as intensidades dos estímulos atingem a faixa nociva, sugerindo que eles possuem propriedades biofísicas e moleculares que lhes permitem detectar seletivamente e responder a estímulos potencialmente lesivos (BASBAUM et al., 2010).

Estudos eletrofisiológicos subdividiram ainda mais os nociceptores A δ em duas classes principais. Tipo I (HTM: nociceptores mecânicos de alto limiar) respondem a estímulos mecânicos e químicos, mas possuem limiares de calor relativamente altos (> 50 ° C). Os nociceptores A δ do tipo II têm um limiar de calor muito mais baixo, mas um limiar mecânico muito alto (RAZAVI; HOSSEINZADEH, 2017). A atividade deste aferente quase certamente medeia a “primeira” resposta da dor aguda ao calor nocivo. De fato, o bloqueio de compressão das fibras nervosas periféricas mielinizadas elimina a percepção da dor de primeira ordem, mas não a dor de segunda ordem (BORSOOK et al., 2013).

A caracterização da neuroanatomia e molecular dos nociceptores demonstrou ainda mais sua heterogeneidade, particularmente para as fibras C. Por exemplo, a chamada população “peptidérgica” dos nociceptores C libera os neuropeptídeos, a substância P e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP); eles também expressam o receptor de neurotrofina TrkA , que responde ao fator de crescimento nervoso (NGF) (BASBAUM et al., 2010). Os nociceptores também podem ser distinguidos de acordo com a sua expressão diferencial de canais que conferem sensibilidade ao calor (TRPV1), frio (TRPM8), meio ácido (ASIC), e uma série de irritantes químicos, associados à função específica na detecção de modalidades de dor distintas (MCENTIRE et al., 2016).

A transdução nociceptiva existe como um componente essencial da via nociceptiva, que consiste em transdução, transmissão, modulação e percepção nociceptiva. Refere-se ao processo pelo qual os estímulos externos são convertidos em sinais elétricos que podem ser percebidos como dor. A transdução é uma parte indispensável do processo de detecção de estímulos externos: sem transdução, o corpo humano perderia a capacidade de provar, tocar, ouvir, ver ou sentir dor (HERNÁNDEZ-PORRAS et al., 2017).

Ocorre quando, em resposta a um estímulo físico, os processos somatossensoriais facilitam a abertura de canais bloqueados por íons. Isso transforma um estímulo físico em um sinal eletroquímico que pode ser transmitido e percebido por centros nervosos de ordem superior (BASBAUM et al., 2010). No início do processo de transdução, o estímulo sensorial gera uma mudança conformacional no receptor molecular, levando a uma modificação do potencial de membrana na célula receptora. No neurônio sensorial típico, a parte da célula onde ocorre a transdução sensorial, fica muitas vezes, distante do terminal sináptico (MAZZA; FROT; REY, 2018).

O potencial de receptor precisa ser convertido em uma série de propagação dos potenciais de ação, o qual por sua vez carrega o sinal ao longo do axônio à sinapse. A transdução nociceptiva envolve principalmente terminações nervosas livres (fibras C e A δ) que se espalham entre as células epidérmicas, órgãos somatossensoriais e envolvem o sistema nervoso periférico e central (HERNÁNDEZ-PORRAS et al., 2017). Alguns nociceptores que não são estimulados, normalmente, disparam poucos ou nenhum potencial de ação e a sua resposta a lesão tecidual é

um aumento da taxa de disparo da propagação dos potenciais de ação junto ao axônio das células (MITSU; ZACHARIOU, 2016).

2.4.2 Interações Entre Dor e Inflamação

A dor inflamatória corresponde à liberação de mediadores inflamatórios, como interleucinas, prostaglandinas e citocinas entre outros, que sensibilizam os neurônios nociceptivos. Os mediadores envolvidos na gênese da dor inflamatória também desempenham um papel essencial no desencadeamento de outros eventos inflamatórios, incluindo edema e migração de leucócitos (JI; XU; GAO, 2014).

Há consenso na literatura que a hipernocicepção inflamatória ocorre, pelo menos em parte, como consequência da sensibilização dos nociceptores aferentes primários. Este fenômeno tem sido atribuído à ação direta de mediadores inflamatórios sobre os seus receptores presentes na membrana dos nociceptores (SERHAN; CHIANG; VAN DYKE, 2008). Isso diminui o limiar do nociceptor, com um aumento na excitabilidade da membrana neuronal. No entanto, parece que os estímulos inflamatórios não induzem diretamente a liberação de mediadores de ação direta. Em vez disso, uma cascata coordenada de citocinas precede sua liberação (CUNHA et al., 2008).

Os mediadores uma vez liberados pelas células imunes modulam a atividade dos neurônios nociceptores à sensibilidade da dor. Os nociceptores, por sua vez, liberam neuropeptídeos e neurotransmissores que são capazes de modular as células imunológicas. Assim, a sinalização neural pode definir o padrão de respostas imunológicas e, conseqüentemente, contribuir para o desenvolvimento de doenças inflamatórias locais e sistêmicas (PINHO-RIBEIRO; VERRI; CHIU, 2017).

A sensibilização periférica mais comumente resulta de alterações associadas à inflamação no ambiente químico da fibra nervosa. Assim, o dano tecidual é frequentemente acompanhado pelo acúmulo de fatores endógenos liberados de nociceptores ativados ou células não neurais que residem dentro ou se infiltram na área lesada incluindo mastócitos, basófilos, plaquetas, macrófagos, neutrófilos, células endoteliais, queratinócitos e fibroblastos (MACHELSKA; CELIK, 2016).

As células imunes liberam lipídios, citocinas e fatores de crescimento que têm um papel fundamental na sensibilização dos neurônios sensoriais do nociceptor,

agindo nos tecidos periféricos e na medula espinhal, produzindo plasticidade neuronal e dor (PINHO-RIBEIRO; VERRI; CHIU, 2017). Essa sensibilização é responsável pela hiperalgesia termomecânica primária e pela vasodilatação observada em lesões traumáticas, inflamatórias e isquêmicas (JI; XU; GAO, 2014).

Fatores como substâncias algio gênicas, incluindo bradicinina, acetilcolina, prostaglandinas, histamina, serotonina, leucotrieno, tromboxanos, fator de ativação plaquetária, radicais ácidos e os íons potássio, liberados no ambiente tecidual, representam uma ampla gama de moléculas de sinalização (MCDONALD et al., 2014). Assim dentre essas interações (dor e inflamação) o sistema imunológico tem um papel crítico na dor ao liberar mediadores moleculares que podem sensibilizar neurônios nociceptivos (MACHELSKA; CELIK, 2016).

Na inflamação neurogênica já se tem a liberação de substância P, neuroquinina A e B e dos peptídeos relacionados geneticamente à calcitonina (CPGR), entre outros (MACHELSKA; CELIK, 2016). Esses são liberados nos tecidos pelas terminações nervosas dos aferentes nociceptivos e interagem com elementos celulares envolvidos na inflamação (neutrófilos, linfócitos, plasmócitos, macrófagos, fibroblastos, células de Schwann, etc.), atraindo ou ativando e instalado processo inflamatório de origem neurogênica (DONVITO et al., 2017; MACHELSKA; CELIK, 2016). Os neurônios nociceptores também modulam as defesas do hospedeiro contra as lesões geradas bacterianas e fúngicas, em alguns casos, a atividade neural beneficia o hospedeiro, enquanto em outros, beneficia o patógeno (BALIKI; APKARIAN, 2015).

Notavelmente, os nociceptores expressam um ou mais receptores da superfície celular capazes de reconhecer e responder a cada um desses agentes pró-inflamatórios (BASBAUM et al., 2010). As interações entre os neurônios nociceptores e as células imunes contribuem para a patologia em doenças inflamatórias crônicas, incluindo artrite reumatoide, psoríase, doença pulmonar asmática e colite (BUCKLE, 2015).

Visto que dada a capacidade do sistema nervoso de propagar sinais dentro de milissegundos quando estimulados, os nociceptores estão idealmente posicionados para serem os primeiros a responder a patógenos e lesões teciduais. Embora a dor seja crítica para induzir mudanças comportamentais que evitem os estímulos nocivos, também está claro que a sensação de dor está intimamente

ligada às interações moleculares e celulares entre os sistemas nervoso e imunológico (MITSU; ZACHARIOU, 2016).

Desta forma os neurônios sensitivos nociceptivos protegem os organismos do perigo, provocando dor e evitando a condução. A dor também acompanha muitos tipos de inflamação e lesão (BUCKLE, 2015). Portanto, as sinalizações entre os neurônios nociceptores e o sistema imunológico é um aspecto fundamental da inflamação, tanto aguda quanto crônica. Uma melhor compreensão dessas interações poderia produzir abordagens para o tratamento da dor crônica e das doenças inflamatórias (PINHO-RIBEIRO; VERRI; CHIU, 2017).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as atividades, anti-inflamatória, antinociceptiva, antioxidante e toxicológica do extrato etanólico e frações da casca e caule, da *Aeschynomene martii* Benth do semiárido da Bahia.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Analisar os compostos fitoquímicos do extrato da *Aeschynomene martii* Benth através de reações de caracterização dos metabólitos;
- b) Identificar as substâncias presentes no extrato da *Aeschynomene martii* Benth por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa;
- c) Avaliar a atividade anti-inflamatória e antinociceptiva *in vivo* das frações da casca e caule da *Aeschynomene martii* Benth;
- d) Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* do extrato etanólico e frações da casca e caule da *Aeschynomene martii* Benth através do método do sequestro do radical livre DPPH;
- e) Avaliar a toxicidade do extrato etanólico e frações da casca e caule da *Aeschynomene martii* Benth, frente ao teste de letalidade *Artemia salina* Leach.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE VEGETAL

Para o curso desta pesquisa, a espécie vegetal estudada foi *Aeschynomene martii* Benth; conhecida popularmente como “Tripa de Galinha”. Estudos etnofarmacológico realizado no povoado de Palmeiras, na cidade de Contendas do Sincorá, região do semiárido da Bahia, demonstraram a utilização de várias plantas nativas pela população (DUARTE et al., 2008). Porém a planta em estudo escolhida para o trabalho *A. martii*, não apresentou indicação de uso medicinal pela população, sendo escolhida devido a sua grande distribuição no FLONA e pela falta de estudos biológicos dessa espécie vegetal.

A espécie vegetal foi coletada na Floresta Nacional Contendas do Sincorá (FLONA), sendo uma área de reserva ambiental com cobertura florestal de espécies predominantemente nativas com bioma caatinga, e tem como objetivo básico o uso múltiplo sustentável dos recursos florestais e a pesquisa científica, com ênfase em métodos para exploração sustentável de florestas nativas. Essa área de preservação ambiental já foi estudada quanto à composição da cobertura vegetal de 11034,34 hectares e seus limites que, indo para o leste, faz divisa através do riacho da Goiabeira, que também divide o município de Contendas do Sincorá e de Tanhaçu, parte do oeste é dividida pela Ferrovia Centro Atlântica (FCA) e os limites do oeste estão próximos a serra da Cabeça Inchada (MATTEI, et al., 2006).

Para a coleta da planta, foram concedidos pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), o Registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico (N 12292-1) e a Autorização para atividade com finalidade científica (N 13258-1). A espécie foi fotografada, devidamente localizada (S 13° 55' 03 e W 041° 06' 87.1) e catalogada, tendo sido depositado a exsicata no Herbário da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), campus de Vitória da Conquista, sob coordenação do Prof. Avaldo de Oliveira S. Filho. As exsicatas foram preparadas seguindo as orientações de Mori (1989) e a identificação taxonômica foi feita por comparação no herbário e através de literatura (MORI, 1989). O registro das exsicatas depositadas são os números de vouchers 4921- 4926.

4.2 PREPARO DO EXTRATO, FRAÇÕES E ANÁLISE FITOQUÍMICA

4.2.1 Preparo do Extrato Etanólico e das Frações Orgânicas

O extrato etanólico da *Aeschynomene martii* Benth foi preparado a partir da casca e caule da planta seca moída e colocada em maceração juntos com etanol PA, sob agitação esporádica. Após filtração, o extrato foi concentrado em evaporador rotativo até eliminação do etanol, fornecendo o extrato bruto seco, que foi colocado em uma estufa a 40°C para secagem. O extrato seco solubilizado em etanol e água (1:1) foi particionado com solvente de polaridade crescente, dando origem às frações de hexano, diclorometano, acetato de etila, e butanol, que foram concentradas em evaporador rotativo para eliminação dos solventes, e após concentradas as frações calculou-se seu rendimento. Posteriormente foram diluídas e testadas farmacologicamente nas doses previamente determinadas (CELEGHINI; VILEGAS; LANCAS, 2001; DUARTE et al., 2008; YATSUDA et al., 2005). A princípio as doses testadas foram determinadas de acordo com os resultados obtidos com o extrato bruto após uma triagem (OLIVEIRA; YATSUDA; CRUZ, 2016).

4.2.2 Análise Fitoquímica Preliminar do Extrato com Reações de Caracterização dos Metabólitos

As análises fitoquímicas possibilitam a revelação qualitativa das diferentes classes de metabólitos secundários presentes nas várias frações da *Aeschynomene martii* Benth, como polifenóis, taninos, saponinas, flavonoides, esteroides e alcaloides (BROSSI, 1988; COSTA, 2001; REGO, 2012; WAGNER; BLADT, 2001) como descrito pelos autores. Para a realização desses foi utilizada a Cromatografia em Camada Delgada (CCD) para melhor identificação.

Para a detecção de polifenóis foi utilizado à fase móvel de acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético: água (100:11:11:27). A placa cromatográfica foi revelada pulverizando uma mistura de 1:1 das soluções aquosas de ferrocianeto de potássio 1% (m/v) e cloreto de ferro 2% (m/v) nas placas (Anexo A), que foram analisadas. O aparecimento de manchas azuladas indica a presença de polifenóis.

Para a detecção de saponinas foi utilizada como fase móvel clorofórmio: metanol (9:1) eluindo duas vezes. As saponinas foram visualizadas pela pulverização de ácido sulfúrico concentrado em etanol a 5% (v/v) após aquecimento das placas a 110 °C, durante 5 minutos. O aparecimento de manchas de coloração roxo berinjela, no visível, indicará a presença de saponinas.

Para a detecção de taninos foi utilizada como fase móvel acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético: água (10:11:11:27). O revelador utilizado foi solução metanólica de cloreto férrico a 2% (Anexo A).

Para a análise de flavonoides e ácidos fenólicos foi utilizado à fase móvel acetato de etilo: hexano (7:1). Na placa de sílica, foi pulverizado o reagente cloreto de alumínio em etanol a 1% (m/v). A visualização das manchas foram sob luz Ultravioleta (BIOTEC®), a 366 nm. Os flavonoides apareciam como manchas verdes fluorescentes enquanto que os ácidos fenólicos surgiam como manchas azuis fluorescentes.

Para a análise de esteróides foi utilizado como fase móvel hexano: acetato de etilo (8:2). O reagente de Liebermann-Burchard (Anexo A) foram pulverizado na placa que foi levada ao aquecimento a 110°C durante 5 minutos. O aparecimento de manchas roxas no visível indicará a presença de esteróides.

Para a detecção de alcaloides foi utilizada como fase móvel acetato de etila: metanol: água (4:1:2). O reagente de Wagner (Anexo A) foi pulverizado na placa e o aparecimento de manchas castanho-avermelhadas, no visível, indicará a presença de alcaloides.

4.2.3 Identificação de Substâncias Presente em *A. martii* Benth por CG-EM

As fases de hexano e diclorometano do caule e casca da *Aeschynomene martii* Benth foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM).

Antes de serem analisadas por CG-EM, as amostras foram submetidas à derivatização por sililação. Para esta reação foi pesado 3 mg da amostra em frasco reativo, onde foram adicionados 100 µL da mistura reacional de *N,O*-Bis(trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) contendo 1% de trimetilclorosilano (TMCS) (Sigma-

Aldrich®) e 60 µL de piridina. Essa mistura foi aquecida a 70 °C por 30 minutos e 1 µL da mistura foi injetado no CG-EM (CRUZ, 2013).

A temperatura do injetor foi 290 °C com temperatura inicial de 80 °C por 5 min, aumentando de 80 °C a 285 °C na razão de 4 °C/min. A temperatura final permaneceu em 285 °C por 40 minutos. A temperatura do detector foi de 290 °C e a temperatura na interface do sistema CG-EM foi de 290 °C. O detector de massas operou com ionização por impacto de elétrons (70 eV) e varredura de massas entre o intervalo de 30 a 600 Da. A identificação dos compostos foi realizada por meio da comparação dos espectros de massas das amostras, com aqueles existentes no banco de dados do aparelho (NIST 08, FFNSC1.3 e WILEY8).

4.3 BIOENSAIOS

4.3.1 Atividade Antioxidante - Teste do Sequestro do Radical Livre DPPH

Esse teste avalia a habilidade da substância testada de sequestrar o radical livre estável DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazil), baseado na mudança de cor de uma solução composta pelo radical estável, de cor violeta, quanto à adição de substâncias que podem ceder um átomo de hidrogênio (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995). Seguindo a metodologia de Sousa e colaboradores (2007) com pequenas adaptações, o ensaio do DPPH• foi realizado com as fases orgânicas, sendo preparada uma solução metanólica de DPPH• (40 µg/mL) e soluções com as fases (50, 100, 150, 200, 250 µg/mL) em MeOH. As medidas das absorvâncias das misturas reacionais, constituídas de 200 µL de metanol para o controle e 200 µL de cada solução metanólica dos extratos + 1800 µL da solução DPPH• adicionados em cada cubeta, foram realizadas após 30 minutos de incubação da reação à temperatura ambiente e protegida da luz. As misturas foram colocadas em cubetas e suas medidas foram feitas a 515 nm em espectrofotômetro. Neste ensaio, utilizou-se ácido gálico e o ácido ascórbico como padrões, nas mesmas concentrações das fases. Todas as análises foram realizadas em triplicatas (SOUSA et al., 2007).

O percentual de sequestro do radical livre DPPH• (%SRL), foi calculado como:

$$\%SRL = [(AC - AA) / AC] \times 100$$

Onde:

AC = Absorvância final do controle

AA = Absorvância da amostra no tempo final.

A concentração eficiente, quantidade de antioxidante necessária para reduzir a concentração inicial de DPPH em 50% (CE₅₀), foi calculada por regressão linear a partir dos resultados encontrados do percentual de sequestro do radical livre (%SRL), em que o eixo da abscissa representou as concentrações da amostra (µg/mL) ou dos controles positivo e na ordenada.

4.3.2 Animais

Para todos os experimentos seguintes, foram utilizados camundongos machos *Balb-c* (20-30 g), mantidos no biotério do Instituto Multidisciplinar de Saúde da Universidade Federal UFBA-IMS, aclimatados a 23 ± 2 °C com umidade relativa de 30 a 70%. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno contendo maravalha na base da caixa, foi permitido livre acesso à comida (NeoVia, Socil) e água. Todos os animais utilizados foram climatizados no laboratório pelo menos uma hora antes dos testes, realizados na fase clara do ciclo. A intensidade dos estímulos utilizados foram os mínimos necessários para demonstrar de forma consistente o efeito dos tratamentos. Ao final de cada experimento, os animais foram eutanasiados por profundidade anestésica com 60 mg/kg de Ketamina e 7,5 mg/kg de xilazina.

Para realização dos experimentos em modelo animal, o projeto foi aprovado no Comitê de Ética de Experimentação Animal da Universidade Federal da Bahia, Campus Anísio Teixeira (processo nº 055/2018) (Anexo B).

4.3.3 Teste de Contorções Abdominais Induzidas por Ácido Acético

O efeito antinociceptivo foi avaliado pelo teste de contorção abdominal induzida por ácido acético. Foram utilizados grupos experimentais de até 06 camundongos, tratados por via subcutânea (s.c.) com veículo (etanol 10%, v/v) e as frações (25 mg/kg, s.c) de hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol advindas do extrato etanólico da casca e caule. Após 30 minutos, os animais foram colocados em caixas separadas e receberam uma injeção de ácido acético 0,6% (Sigma-Aldrich®), pela via intraperitoneal (i.p.) (0,1 mL/10g). As contorções da parede abdominal, seguidas de contorções do tronco e extensão dos membros posteriores produzidas foram contadas durante 20 minutos como indicativo de nocicepção (KOSTER et al., 1959; VACHER et al., 1964).

4.3.4 Nocicepção Induzida Pela Injeção Intraplantar de Formalina

O modelo de nocicepção induzida pela formalina permite avaliar dois tipos distintos de nocicepção: a de origem neurogênica (estimulação direta das fibras nociceptivas) e a de origem inflamatória (caracterizada pela liberação de mediadores inflamatórios). O comportamento de nocicepção induzido por formalina foi avaliado como descrito anteriormente (TJØLSEN et al., 1992). Um volume de 20 µL de solução de formalina 1,5% foi injetado intraplantar (i.pl.) na superfície ventral da pata direita dos animais pré-tratados 30 min antes com as frações da planta (25 mg/kg, s.c.), veículo (10% etanol, v/v, s.c.) e morfina (5 mg/kg, s.c.). Os camundongos foram observados individualmente durante 30 min após a injeção de formalina e o comportamento da nocicepção foi determinado pelo número de *flinches*, sacudidas, mordidas e lambidas, na pata injetada durante o período de tempo de observação. A fase 1 (neurogênica) foi definida como 0-5 min após a injeção, e a fase 2 (inflamatória) foi definida dos 05-30 min após a injeção.

Para avaliação do edema de pata induzido por formalina, após o final do experimento, os animais foram eutanasiados e as patas posteriores foram removidas e pesadas em uma balança analítica. O peso da pata que recebeu formalina foi diminuído do peso da pata que não recebeu injeção, a fim de determinar a formação de edema. Os resultados foram expressos em gramas.

4.3.5 Teste de Von Frey

Os filamentos Von Frey (FREY, 1896) é um método para determinar o limiar de nocicepção mecânica. Essa técnica foi modificada em um método eletrônico usado primeiramente em humanos e posteriormente em ratos (MÖLLER; JOHANSSON; BERGE, 1998). O limiar de nocicepção mecânica foi medido pelo método de Von Frey eletrônico (NAPIMOGA et al., 2007). Os camundongos foram colocados em gaiolas de acrílico (12 x 20 x 17 cm) com piso de grade de arame, 30 min antes do experimento para adaptação. O teste consistiu em produzir uma pressão na pata do animal com um transdutor de força de mão adaptado com uma ponta (0,8 mm² diâmetro da ponta, eletrônica de Von Frey, Insight Equipamentos©, Brasil). Um espelho inclinado sob a grade proporcionou uma visão clara da pata dos camundongos. O estímulo foi automaticamente interrompido com a retirada da pata pelo animal, e a sua intensidade foi registrada pelo aparelho. O intervalo entre dois ensaios consecutivos na mesma pata foi de pelo menos 1 min, totalizando seis ensaios em cada animal. A força máxima aplicada foi de 50 g. Os camundongos foram pré-tratados com as frações da planta (25 mg/kg, s.c.) e veículo (etanol 10%, v/v) e depois de 30 min, foi injetado carragenina (100 µg/pata, i.pl.) na superfície ventral da pata dos animais. Após três horas o teste Von Frey foi realizado. A intensidade de hipernocicepção foi quantificada como a variação na pressão (Δ de reação em gramas) obtida subtraindo-se o valor basal observado antes do procedimento experimental (dia 0) do valor de pressão obtido após a administração do estímulo que variaram de acordo com o tratamento (dia 1).

4.3.6 Avaliação da Permeabilidade Vascular

A permeabilidade vascular foi analisada pelo teste de azul de Evans (THURSTON et al., 2000). Quinze minutos antes da administração das frações da planta e do veículo, o corante azul de Evans (50 mg/kg) foi diluído em 50 µL de solução salina sendo injetado por via venosa no plexo ocular. As frações da planta (25 mg/kg, s.c.) e o veículo (etanol a 10% v/v) foram administradas por via subcutânea 30 minutos antes do estímulo inflamatório (injeção i.p de Cg, 500 µg/cavidade). Os camundongos foram sacrificados 3 h após a administração de Cg e

a cavidade peritoneal foi lavada com 3 mL de PBS. O conteúdo do azul de Evans (o extravasamento de proteína plasmática) foi calculado usando uma curva padrão do corante e a absorvância de cada amostra foi mensurada a 620 nm por meio de um espectrofotômetro (Genesys©, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA).

4.3.7 Recrutamento de Neutrófilos para a Cavidade Peritoneal

Para a determinação da migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal, as frações de hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol da planta na dose (25 mg/kg, s.c.) e o veículo (etanol 10% v/v), foram administrados por via subcutânea 30 minutos antes da administração do estímulo inflamatório, uma injeção intraperitoneal (i.p.) de carragenina (Cg), 500 µg/cavidade. Os camundongos foram eutanasiados 4 h após a administração de Cg e as células da cavidade peritoneal foram coletadas por lavagem da cavidade com 3 mL de tampão fosfato (PBS) contendo EDTA 1 mM (NUNES et al., 2009). O volume recuperado foi semelhante em todos os grupos experimentais e correspondeu a aproximadamente 95% do volume injetado. A contagem total foi realizada em câmara de Neubauer e a contagem diferencial de células (100 células no total) foi realizada em lâminas preparadas em citocentrífuga e coradas com panótico (Laborclin, Brasil). Os resultados são apresentados como o número de neutrófilos por cavidade.

4.3.8 Avaliação da Produção do Óxido Nítrico (NO) por Determinação dos Níveis de Nitrito

Os níveis indiretos de óxido nítrico (NO) foram mensurados pelos níveis de nitrito (NO_2^-), sendo subproduto do metabolismo de NO. O procedimento foi realizado através da reação de Griess (GREEN et al., 1982). Cada uma das amostras do lavado peritoneal (50µL), provenientes dos mesmos grupos do teste de recrutamento de neutrófilos (4.4.4), reagiu com 50 µL de solução de 0,1% de naftiletlenodiamina e com 50 µL de solução de 1% de sulfanilamida. No procedimento, ocorre a formação de um composto azo estável de coloração púrpura em que a sua absorvância foi mensurada espectrofotometricamente em 540 nm. Uma curva padrão de nitrito de sódio (1,65 a 100 µMol) foi construída para

quantificação dos níveis de nitrito nas amostras, os quais foram expressos em μMol . A análise de regressão linear foi usada para calcular as concentrações de nitrito nas amostras em relação à curva padrão de nitrito de sódio. Os níveis de nitrito das amostras foram expressos em, $\text{NO}_2^- \mu\text{Mol}$ e foram analisados estatisticamente.

4.3.9 Determinação da Toxicidade

4.3.9.1 Teste de Letalidade Frente à *Artemia Salina* Leach

O teste de letalidade empregado foi adaptado do método descrito por Lhullier e colaboradores (2006). Os ovos de *Artemia salina* (Miramar®) foram eclodidos em um aquário, utilizando-se água do mar artificial preparada com sal marinho (Ocean Water - Alcon) de acordo com as especificações do fabricante nas concentrações de 3,82 mg/mL. O sistema foi aerado com bomba específica e os ovos foram adicionados e iluminado com lâmpada 60W, de modo a atrair os crustáceos para este local, após a eclosão. Os ovos foram incubados por 48 horas em temperatura ambiente. As amostras foram estabelecidas a partir de uma solução estoque de 200 $\mu\text{g/mL}$, preparada pela dissolução de 10 mg dos extratos, 50 mL de água do mar artificial e 500 μL de dimetilsulfoxido (DMSO). A partir da solução estoque foram obtidas, por diluições, soluções das fases nas concentrações de 200, 100, 50, 25 e 12,5 $\mu\text{g/mL}$. O preparo do controle positivo seguiu a mesma metodologia do preparo da solução mais concentrada (200 $\mu\text{g/mL}$), sem a presença de qualquer uma das fases orgânicas. O controle negativo foi a água do mar artificial (LHULLIER, CINTIA; HORTA, PAULO ANTUNES; FALKENBERG, 2006; MEYER et al., 1982).

Após 48 horas de incubação, 10 crustáceos foram transferidos, com um auxílio de uma pipeta Pasteur, para pequenos frascos de vidros contendo 10 mL das soluções das fases nas concentrações previamente determinadas ou da solução controle. Essas amostras foram mantidas sob iluminação à temperatura ambiente por 24 horas e, após esse período, o número de *nauplios* sobreviventes foram determinados com auxílio de uma lupa. A larva foi considerada morta caso não exibisse movimentos durante 10 segundos de observação. Todos os experimentos, inclusive os de controle foram realizados em triplicata.

Aos dados de porcentagem de larvas de *Artemia salina* mortas, em relação ao aumento da concentração do extrato da planta e suas frações, ajustou-se uma equação linear simples, a qual foi utilizada para estimar a concentração de extrato responsável por matar 50% de *nauplios*, valor representativo da DL₅₀. Utilizou-se método gráfico de análise para obtenção da DL₅₀ (dose letal do extrato para 50% da população).

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para todas as análises foram utilizado o programa *GraphPad Prism*® versão 5.00 (*GraphPad*®, *La Jolla, CA92037, USA*). Os valores foram considerados significantes quando apresentaram $p < 0,05$.

Todas as variáveis foram testadas quanto à distribuição normal e variância homogênea. Quando a distribuição foi considerada normal e com variância homogênea utilizou o teste ANOVA One-Way, seguido do teste de Bonferroni ou seguido do teste de Dunnet. Nos casos de distribuição não normal, foi utilizado Kruskal-Wallis seguido por comparações múltiplas pelo teste de Dunn's.

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE QUÍMICA DA *Aeschynomene martii* Benth.

5.1.1 Rendimento do Extrato Etanólico e das Frações da *A. martii* Benth.

O extrato etanólico do caule e casca da *A. martii* Benth, após filtração, foi concentrado, obtendo-se um rendimento de 5,73% em relação ao seu peso seco de 1000 g que foi macerado. Logo em seguida, aproximadamente 17,03 g desse extrato etanólico foi submetido à extração por partição, seguindo gradiente crescente de polaridade, onde foram obtidas quatro frações com os seguintes rendimentos: 13,21% (hexano), 40,92% (diclorometano), 30,68% (acetato de etila) e 8,10% (butanol). Observa-se que a fração de diclorometano possui o maior rendimento (Tabela 1).

Tabela 1 – Rendimentos do extrato etanólico e de suas respectivas frações de hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol obtidos do caule e casca da *Aeschynomene martii* Benth.

Rendimento do extrato/fração da <i>Aeschynomene martii</i> Benth.		
Parte da planta	Extratos/Fração	Rendimento (%)
Casca e Caule	Extrato etanólico	5,73
	Fração de hexano	13,21
	Fração de diclorometano	40,92
	Fração de acetato de etila	30,68
	Fração de butanol	8,10

Rendimentos das amostras com base na metodologia de partição.

Fonte: Dados da pesquisa.

5.1.2 Análise Fitoquímica do Extrato Etanólico e das Frações em CCD

A análise fitoquímica possibilita a identificação dos principais grupos de metabólitos secundários que possam estar relacionados com as atividades biológicas. A utilização de reveladores específicos permite avaliar a presença destes grupos através do estudo dos perfis fitoquímicos nas placas de CCD. Os dados na (Tabela 2) mostram uma composição química complexa, evidenciado pela reação

positiva para a presença de todas as classes de metabólitos secundários avaliados, como os polifenóis, taninos, saponinas, flavonoides, esteroides e alcaloides.

Tabela 2 – Cromatografia de Camada Delgada com os perfis fitoquímicos, do extrato etanólico e das frações do caule e casca da *Aeschynomene martii* Benth.

<i>Aeschynomene martii</i> Benth. Extrato/fração	Perfis fitoquímicos					
	Polifenóis	Taninos	Saponinas	Flavonoides	Alcaloides	Esteroides
Extrato etanólico	+	+	+	+	+	+
Hexano	+	-	+	+	-	+
Diclorometano	+	+	+	+	+	+
Acetato de etila	+	+	-	+	+	-
Butanol	+	-	+	+	+	+

As amostras foram preparadas na concentração de 10 mg/mL em solvente apropriado e aplicadas com volume de 10 µL em bandas de 7 mm em lâmina de alumínio sílica gel. A placa foi eluída com sistema de solvente apropriado em cuba de vidro. Depois de eluída e seca observou-se em câmara de ultravioleta e/ou revelador de interesse. (+) reação positiva, indicando a presença do grupo de metabólitos secundários; (-) reação negativa, indicando a ausência do grupo de metabólitos secundários.

Fonte: Dados da pesquisa.

5.1.3 Análises de CG-EM das Frações do Caule e Casca da *A. martii* Benth.

A análise química das frações de hexano e diclorometano do caule e casca da *A. martii* por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa, possibilitou a identificação de 53 substâncias no total.

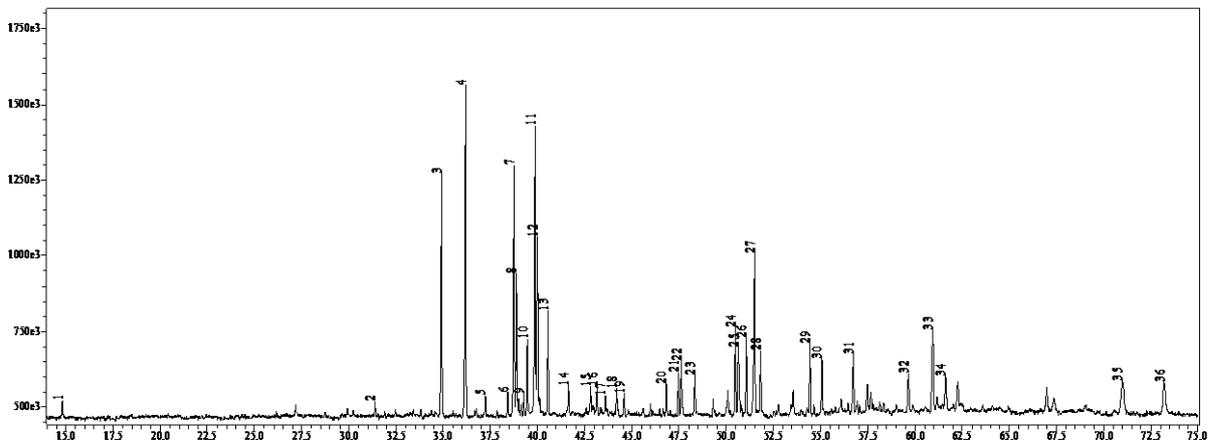
Os padrões de fragmentação de acordo com os resultados obtidos pela técnica de CG-EM, foram identificados por comparação com dados obtidos (tempo de retenção e fragmentação iônica) de padrões autênticos. Alguns desses fragmentos não foram identificados, indicando baixa similaridade da substância analisada frente ao registro da biblioteca. Ao analisar a fração de hexano, foi observado o total de 36 substâncias, sendo 31 identificadas, totalizando um percentual de 94,22% da amostra. Na fração de diclorometano, foi observado um total de 17 substâncias, sendo 08 identificadas, totalizando um percentual de 74,98% da amostra (Tabela 3).

Tabela 3 – Substâncias identificadas por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa, das frações de hexano e diclorometano do caule e casca da *A. martii* Benth.

Tempo de Retenção	Substâncias	Percentual de área presente nas frações de Hexano e Diclorometano da <i>A. martii</i> Benth.	
		%PF-Hex	%PF-Dic
14.795	Glicerol	0,48	-
31.400	Ácido tetradecanoico	0,39	-
33.205	D-galactose	-	0,55
34.400	Glucopirranose	-	1,53
34.925	Hexadecanoato de etila	7,36	-
36.150	Ácido hexadecanoico	11,86	0,40
37.210	Heptadecanoato de etila	0,46	-
38.400	Ácido heptadecanoico	0,69	-
38.765	Linoleate de etila	7,48	-
38.880	(Z)Octadec-9-enoato de etila	4,45	-
39.250	Hexadecanoato de butila	0,51	-
39.445	Octadecanoato de etila	1,7	-
39.890	Ácido (9,12-Z,Z)Octadeca-9,12-dienoico	9,08	-
39.995	Ácido linolenico	6,46	-
40.540	Ácido esteárico	2,92	-
42.805	9,12-Octadecadienoato de 2,3-didroxipropila	0,78	-
43.600	Eicosanoato de etila	0,43	-
44.565	Ácido Eicosanoico	0,7	-
47.470	Docosanoato de etila	1,22	-
47.620	Éster de ácido graxo	1,74	-
48.315	Ácido docosanoico	1,28	-
49.385	Alfa-D-glucopiranosideo	-	0,66
50.250	Ácido diidroxifenilpropanóico	-	5,73
50.475	Diterpenoide	2,67	8,15
50.625	Éster de ácido graxo	2,81	-
51.630	Diterpenoide	-	47,38
51.075	Tetracosanoato de etila	2,4	-
51.505	3,3',4',5,5',7-hexametoxiflavona	6,35	10,60
51.805	Ácido tetracosanoico	1,73	-
54.425	Hexacosanoato de etila	2,22	-
55.075	Ácido hexacosanoico	1,84	-
59.665	Estigmasterol	1,82	-
60.955	β -Sitosterol	4,55	-
61.620	Lupenona	1,53	-
71.010	Acetato de oleanolato de metila	3,29	-
73.220	Acetato de 28-oxours-12-en-3-yl	3,02	-
Identificados		94,22	74,98
Não identificados		5,78	25,02

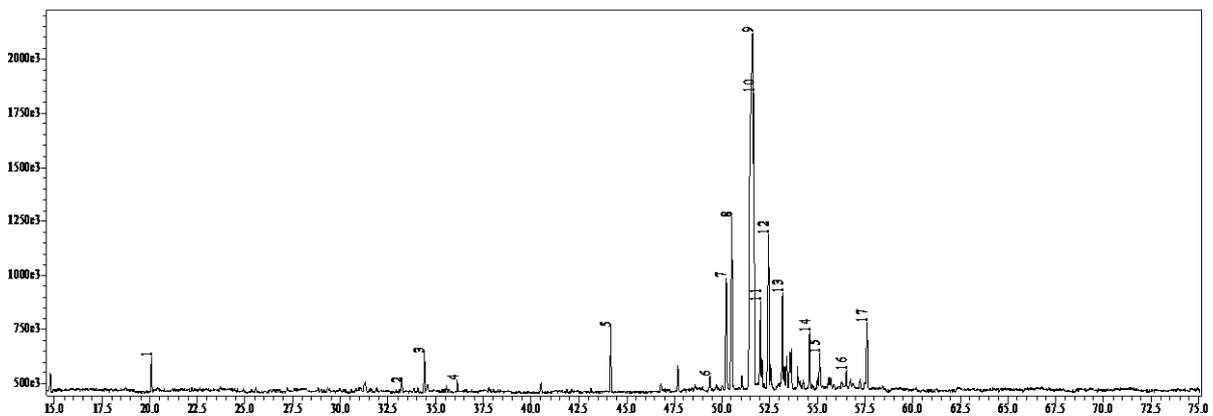
Legenda: PF-Hex (Percentual de área da fração de Hexano) e PF-Dic (Percentual de área da fração de diclorometano). Fonte: Dados da pesquisa.

Figura 2 – Cromatograma obtido por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa da fração de Hexano do caule e casca da *A.martii* Benth.



Fonte: Dados da pesquisa

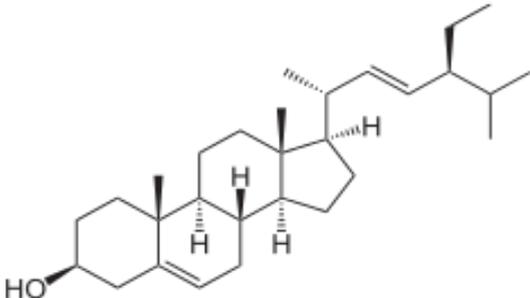
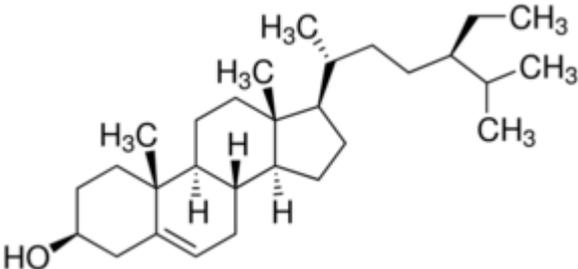
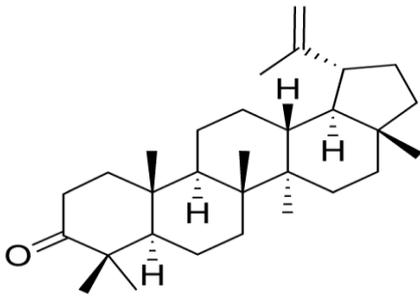
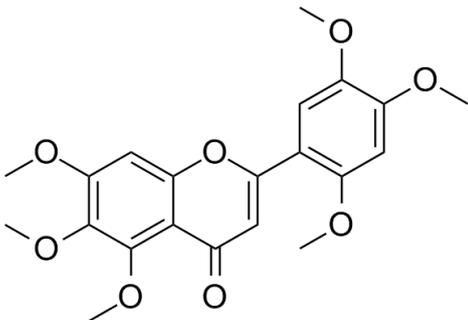
Figura 3 – Cromatograma obtido por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa da fração de Diclorometano do caule e casca da *A.martii* Benth.



Fonte: Dados da pesquisa

A partir da avaliação dos resultados obtidos e identificados pelo CG-EM das frações de hexano e diclorometano a partir da planta *A. martii*, foi possível a identificação de alguns compostos, sendo os mais promissores representados no Quadro abaixo.

Quadro 1 – Substâncias das frações do caule e casca da *A. martii* Benth identificadas por Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massa.

 <p>Stigmasterol Encontrada em: PF-Hex</p>	 <p>β-Sitosterol Encontradas em: PF-Hex</p>
 <p>Lupenona Encontrada em: PF-Hex</p>	 <p>3,3',4',5,5',7-Hexametoxiflavona Encontrada em: PF-Dic</p>

5.2 ENSAIOS USADOS PARA AVALIAR A ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

5.2.1 Avaliação da Atividade Antioxidante por DPPH

A atividade de sequestro de radicais livres DPPH foi realizada nas concentrações variando de 50 a 250 µg/mL. A Tabela 4 apresenta os valores de CE₅₀ da Atividade Antioxidante (AA) obtidos pelo método do sequestro de radicais livres (DPPH), fazendo uma comparação entre os valores de CE₅₀ encontrados, considerando o ácido gálico (AG) e o ácido ascórbico (AAS) como padrão de

referência. Onde, o extrato etanólico e as frações (hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol) do caule e casca da *A. martii* Benth não promoveram atividade antioxidante significativa ($p < 0,05$), comparado aos padrões testados.

Segundo Alves e colaboradores 2010, a atividade antioxidante pelo método do DPPH pode ser classificada como: Boa se a CE_{50} da fase for até três vezes maiores a CE_{50} dos padrões ($AAS-CE_{50} < 99,63 \mu\text{g/mL}$) e ($AA-CE_{50} < 51,39 \mu\text{g/mL}$); Média se o valor da CE_{50} encontrada for entre 3 a 7 vezes maior que a CE_{50} do padrão ($99,63 < AAS-CE_{50} < 232,47 \mu\text{g/mL}$) e ($51,39 < AA-CE_{50} < 119,91 \mu\text{g/mL}$) e baixa se a CE_{50} da fase for 7 vezes maior que a CE_{50} do padrão ($AAS-CE_{50} > 232,47 \mu\text{g/mL}$) e ($AAS-CE_{50} > 119,91 \mu\text{g/mL}$). Seguindo esse critério e considerando o ácido gálico, como substância padrão, as frações de diclorometano e acetato de etila apresentaram média AA e o extrato etanólico e as frações de hexano e butanol apresentaram baixa AA. No entanto, considerando o ácido ascórbico, como substância padrão, a fração de acetato de etila apresentou boa AA; o extrato etanólico e as frações de diclorometano e butanol apresentaram média AA; por fim a fração de hexano apresentou baixa AA (Tabela 4).

Tabela 4 – Atividade antioxidante utilizando o radical livre DPPH, do caule e casca da *Aeschynomene martii* Benth.

Atividade antioxidante extrato/fração da <i>Aeschynomene martii</i> Benth				
Parte da planta	Extratos/Fração	CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$) \pm DP*	Classificação CE_{50}	
			AG	AAS
Casca e Caule	Extrato etanólico	$207,75 \pm 1,13^a$	Baixa	Média
	Fração de hexano	$1008,19 \pm 19,28^b$	Baixa	Baixa
	Fração de diclorometano	$118,76 \pm 2,71^c$	Média	Média
	Fração de acetato de etila	$66,31 \pm 0,64^d$	Média	Boa
	Fração de butanol	$231,79 \pm 1,04^a$	Baixa	Média
Padrão antioxidante	Ácido Gálico (AG)	$17,13 \pm 0,14^e$		
	Ácido ascórbico (AAS)	$33,21 \pm 0,21^e$		

*Os resultados são expressos como média \pm Desvio padrão (DP) ($n = 3$); A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni. Valores seguidos da mesma letra não demonstraram diferença significativa quando comparando os padrões, o extrato etanólico e as suas devidas frações ($p < 0,05$).

FONTE: Dados da pesquisa.

5.3 AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DAS FRAÇÕES DO EXTRATO ETANÓLICO DO CAULE E CASCA DA *A. martii* Benth.

5.3.1 Contorção Abdominal Induzida por Ácido Acético

Para avaliar o efeito antinociceptivo das frações da *A. martii* Benth, foi realizado o ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético que induz nocicepção visceral. Todas as frações do extrato etanólico (25 mg/Kg) do caule e casca da *A. martii* Benth promoveram uma redução significativa ($p < 0,05$) no número de episódios de contorção abdominal em comparação ao grupo tratado com o veículo (etanol 10%, v/v) de acordo com a Figura 4.

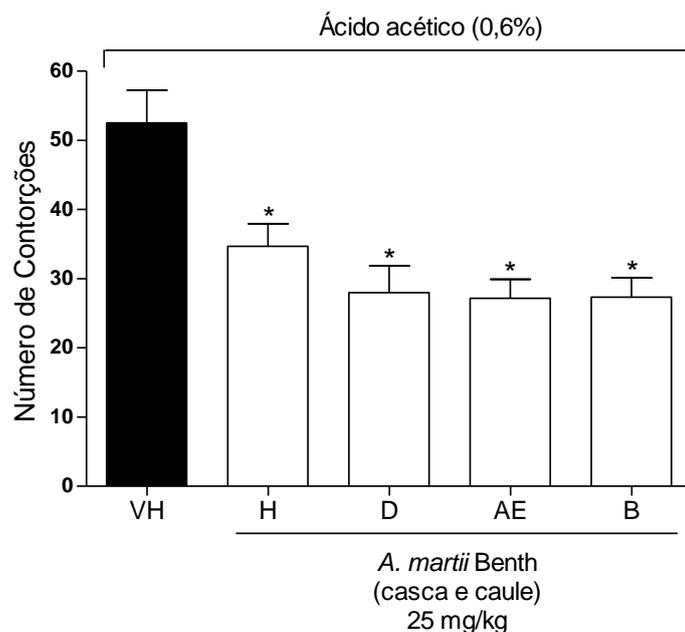


Figura 4 – Efeito das frações de hexano (H), diclorometano (D), acetato de etila (AE) e butanol (B) do caule e casca da *A. martii* Benth no teste de contorção abdominal induzida por ácido acético (0,6%) em camundongos. Os animais foram pré-tratados, de acordo com os grupos, com as frações do extrato (25 mg/Kg, s.c.) e o veículo (VH, etanol 10%, v/v). Os resultados são apresentados como médias \pm E.P.M. da contorção em camundongos ($n = 6$). A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni. As variações diferem respectivamente de forma significativa onde: (*) $p < 0,05$, quando comparado o grupo dos camundongos tratados com a fração ao grupo veículo.

5.3.2 Nociceção Induzida Pela Injeção Intraplantar de Formalina

Para avaliar a nociceção neurogênica e inflamatória foi realizado o teste da formalina, com as frações da *A. martii* Benth. No teste da formalina (Figura 5), os resultados podem ser avaliados em duas fases diferentes de nociceção, a primeira fase consiste na nociceção neurogênica nos primeiros 05 minutos do teste, na segunda fase consistem na nociceção inflamatória apresentada entre os 05 e 30 minutos do início do teste.

Na primeira fase, as quatro frações (hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol) do caule e casca da *A. martii* Benth (25 mg/kg) promoveram uma redução significativa no número de “flinches” induzidas pela formalina quando comparadas ao grupo tratado com veículo, controle negativo ($p < 0,05$), quando comparadas ao grupo morfina controle positivo, as frações (hexano, acetato de etila e butanol) promoveram redução significativa ($p < 0,05$), e apenas a fração de diclorometano não apresentou diferença estatística ($p < 0,05$), supondo que essa fração possui ação igual ou semelhante à morfina um potente analgésico opioide na redução da dor de origem neurogênica (Figura 5).

Já na segunda fase, as quatro frações (hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol) do caule e casca da *A. martii* Benth (25 mg/kg) promoveram uma redução significativa no número de “flinches” induzidas pela formalina quando comparadas ao grupo tratado com veículo, controle negativo ($p < 0,05$), quando comparadas ao grupo morfina controle positivo, as frações (hexano, diclorometano e acetato de etila) promoveram redução significativa ($p < 0,05$), e apenas a fração de butanol não apresentou diferença estatística ($p < 0,05$), supondo que essa fração possui ação igual ou semelhante à morfina um potente analgésico opioide na redução da dor de origem inflamatória.

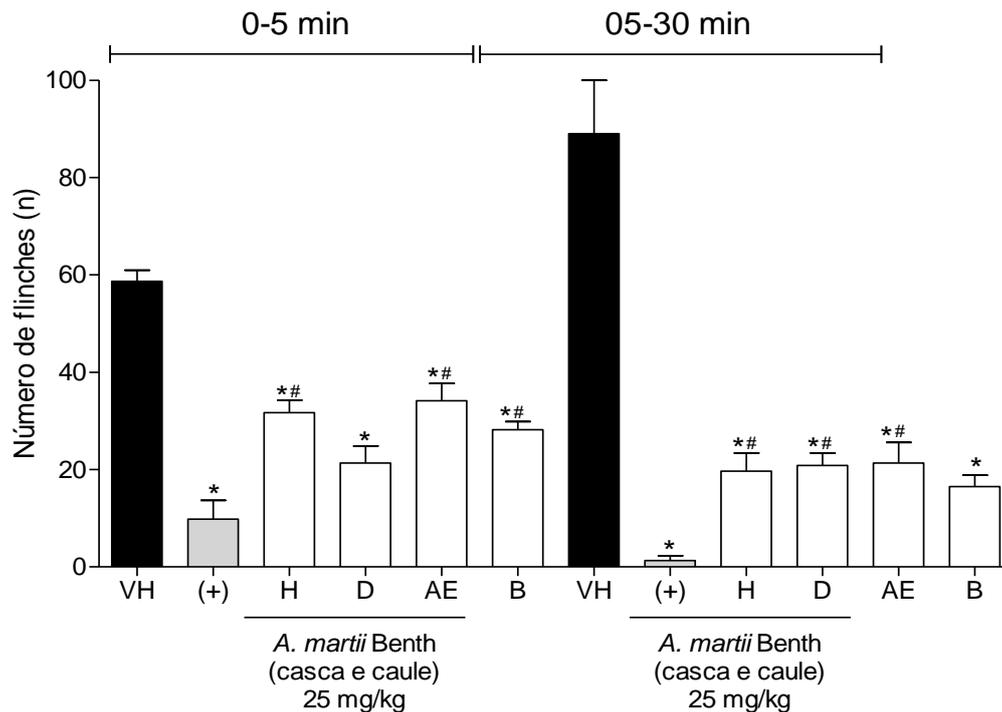


Figura 5 – Efeito das frações de hexano (H), diclorometano (D), acetato de etila (AE) e butanol (B) do caule e casca da *A. martii* Benth na resposta à nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina 1,5 % em camundongos. Os animais foram pré-tratados por administração subcutânea das frações da planta (25 mg/kg), (VH) veículo (etanol 10%, v/v) ou (+) morfina (5 mg/kg). Os resultados são apresentados como média \pm E.P.M. (n = 6) do número de *flinches*, sacudidas e lambidas da pata injetada por um período de 30 min. A análise estatística foi realizada por meio do ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. * p < 0,05 quando comparado ao grupo de camundongos tratado com as frações ao veículo. # p < 0,05, quando comparado a morfina com o grupo dos camundongos tratados com as frações.

Considerando o fato de que a primeira fase do teste de formalina resulta essencialmente, da estimulação direta dos nociceptores e a segunda fase do teste envolve um período de sensibilização durante o qual ocorrem os fenômenos inflamatórios, os resultados sugerem que o efeito antinociceptivo das frações de hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol do caule e casca são mediados, em parte, por compostos com propriedades anti-inflamatórias e antinociceptivas presente nestas frações.

5.3.2.1 Edema de pata induzido por formalina

Ao final do experimento de Formalina (5.3.2), as patas posteriores foram removidas e pesadas em uma balança analítica. O peso da pata que recebeu formalina foi diminuído do peso da pata que não recebeu injeção, a fim de

determinar a formação de edema. Os resultados foram expressos em gramas (Figura 6). As frações (hexano, diclorometano e acetato de etila) do caule e casca da *A. martii* Benth (25 mg/kg), demonstraram uma redução na formação do edema quando comparado ao grupo que recebeu o tratamento com o veículo ($p < 0,05$). Das quatro frações ativas na segunda fase, apenas a fração de butanol não conseguiram diminuir a formação de edema na pata quando comparado com o grupo veículo ($p < 0,05$).

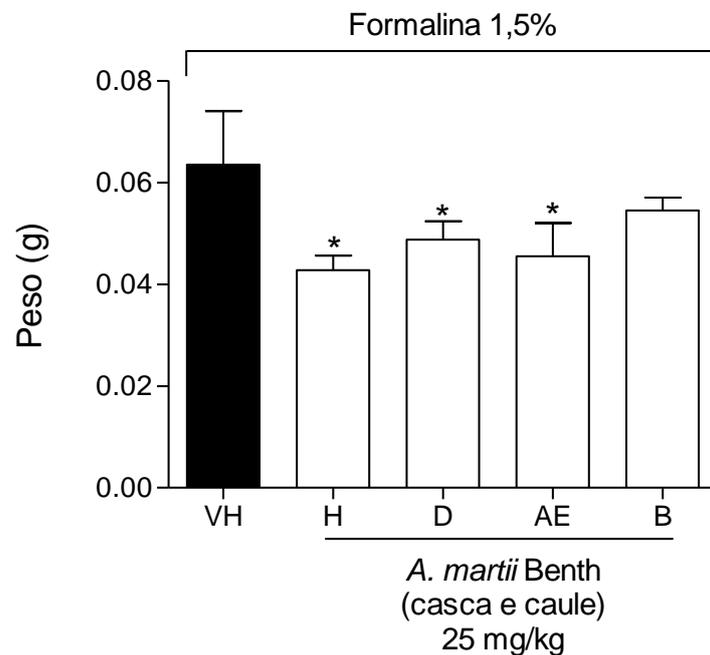


Figura 6 – Efeito das frações de hexano (H), diclorometano (D), acetato de etila (AE) e butanol (B) do caule e casca da *A. martii* Benth no edema de pata induzido por formalina 1,5%. Os animais foram pré-tratados por administração das frações (25 mg/kg, s.c.), ou (VH) veículo (etanol 10%, v/v, s.c.). Após a contagem dos *flinches*, os animais ($n = 6$) foram sacrificados e as patas retiradas e pesadas, e o edema da pata calculado pela diferença entre as duas patas em gramas. Os resultados são apresentados como média \pm E.P.M. A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ quando comparado o grupo de camundongos tratados com as frações ao veículo.

5.3.3 Teste de Von Frey

Também foi avaliado o efeito antinociceptivo sobre o mecanismo de nocicepção mecânica. A nocicepção mecânica induzida por Cg foi realizada por meio do teste de Von Frey. As frações (hexano, diclorometano, acetato de etila e

butanol), do caule e casca da *A. martii* Benth (25 mg/Kg), administrada 30 min antes da injeção intraplantar de Cg, reduziu significativamente a intensidade de hipernociceção dos animais quando comparada com o grupo veículo ($p < 0,05$), conforme apresenta a Figura 7.

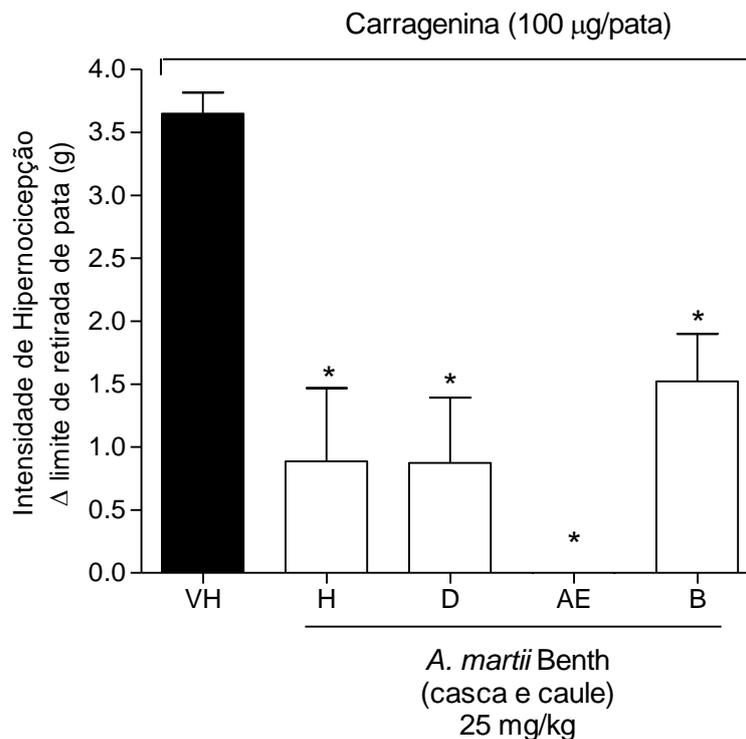


Figura 7 – Efeito das frações de hexano (H), diclorometano (D), acetato de etila (AE) e butanol (B) do caule e casca da *A. martii* Benth na inibição da nociceção mecânica pelo teste de Von Frey. Os camundongos foram tratados com as frações (25 mg/kg, s.c.) ou veículo (VH, etanol 10%, v/v, s.c.), 30 minutos antes da injeção i.pl. de Cg (Cg, 100 μg/pata). As respostas hipernociceptivas foram avaliadas 3 h após estímulo. Os resultados são apresentados como média ± E.P.M. (n = 6). A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ quando comparado o grupo de camundongos tratados com as frações ao veículo.

5.3.4 Avaliação da Permeabilidade Vascular

Além da migração de neutrófilos, outro importante parâmetro a ser avaliado no processo inflamatório é o extravasamento vascular. Desta forma, foi avaliada a hipótese de que as frações de hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol, obtidos do caule e casca da *A. martii* Benth, poderiam reduzir a permeabilidade microvascular induzida por Cg. A Figura 8 apresenta que o pré-tratamento com 25

mg/Kg das frações (hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol) demonstraram uma significativa redução do extravasamento do corante azul de Evans no líquido peritoneal em comparação ao grupo veículo ($p < 0,05$).

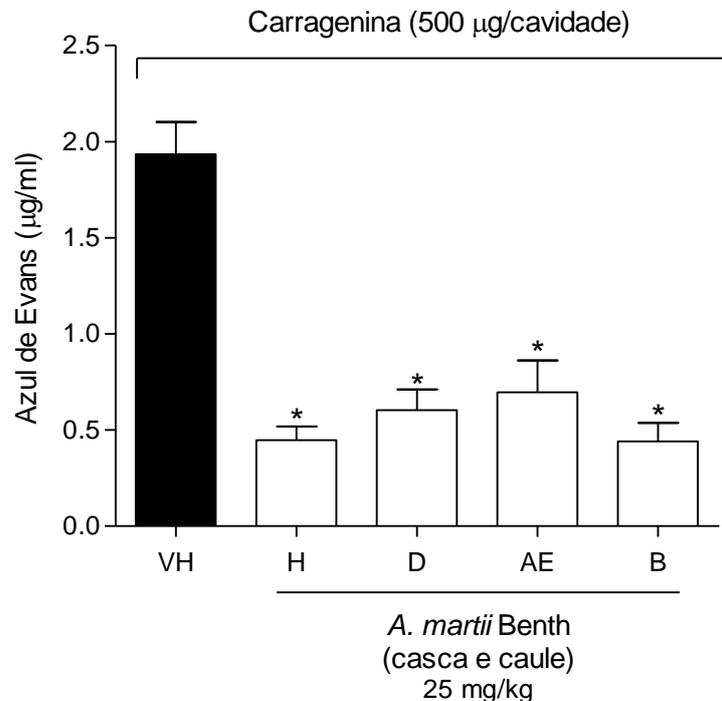


Figura 8 – Efeito das frações de hexano (H), diclorometano (D), acetato de etila (AE) e butanol (B) do caule e casca da *A. martii* Benth na permeabilidade vascular, teste de azul de Evans. Os animais foram pré-tratados por administração das frações (25 mg/kg, s.c.) ou veículo (VH, etanol 10%, v/v, s.c.), 30 min antes da injeção de Cg (500 mg/cavidade, i.p.). O aumento da permeabilidade vascular foi avaliado após 4 h. Os resultados são apresentados como média \pm E.P.M. da concentração de corante azul de Evans ($n = 6$). A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ quando comparado o grupo de camundongos tratados com as frações ao veículo.

5.3.5 Recrutamento de Neutrófilos para a Cavidade Peritoneal

Para avaliar o efeito anti-inflamatório das frações de hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol obtidos do caule e casca da *A. martii* Benth, primeiro foi avaliado o efeito na migração de neutrófilos induzida pela carragenina na cavidade peritoneal do camundongo (Figura 9). Todos os grupo tratado com as frações na dose de 25 mg/kg apresentaram redução significativa na migração de neutrófilos comparado ao grupo tratado com o veículo ($p < 0,05$).

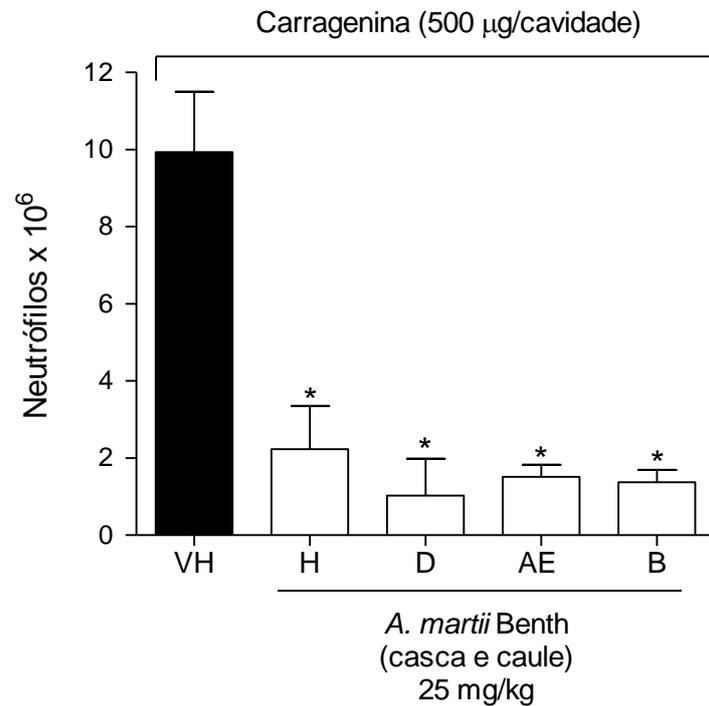


Figura 9 – Efeito das frações de hexano (H), diclorometano (D), acetato de etila (AE) e butanol (B) do caule e casca da *A. martii* Benth sobre a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida por carragenina (Cg). Grupos de camundongos ($n = 6$) foram pré-tratados por via subcutânea com administração das frações (25 mg/kg) ou (VH) veículo (etanol 10%, v/v, s.c.), 30 min antes da Cg (500 µg/cavidade) induzir a peritonite. Cada valor representa a média \pm E.P.M. A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ quando comparado o grupo tratado com fração ao grupo veículo.

Tem sido demonstrado que os neutrófilos desempenham um papel relevante na gênese da nocicepção inflamatória induzida por Cg uma vez que estas células são fonte de citocinas hipernociceptivas ou mediadores hipernociceptivos de ação direta (CUNHA et al., 2008). Mediante este fato e aos resultados encontrados, foram feitas fotomicrografia dos grupos testados apresentados na (Figura 10).

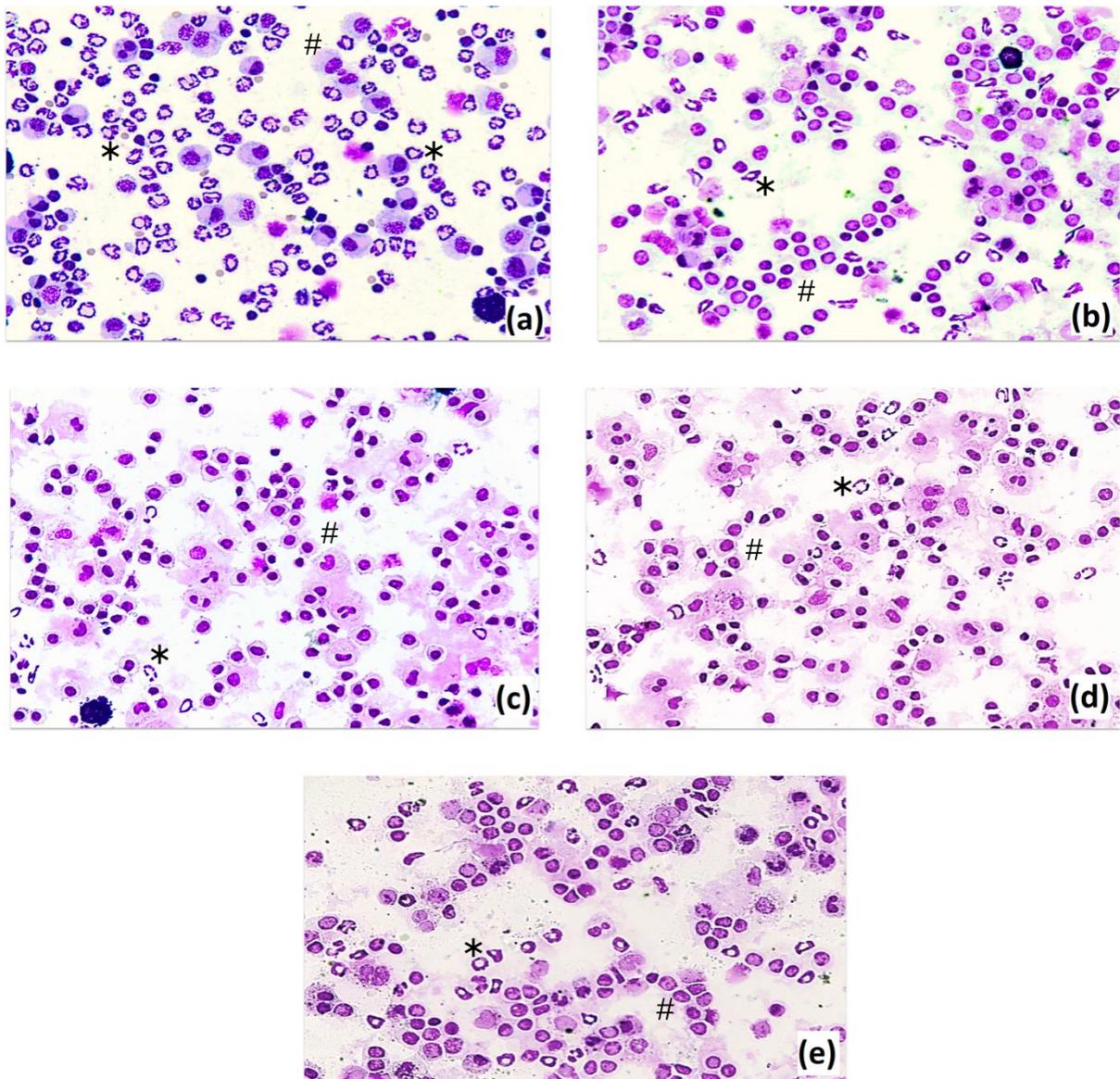


Figura 10 – Fotomicrografia das frações (25 mg/kg) do caule e casca da *A. martii* Benth sobre a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida por carragenina (Cg). A área total dos campos microscópicos foi observada em microscópio óptico, cuja imagem foi capturada por câmera de alta resolução e digitalizada através do Software Ifinity Analyzy® (aumento de 20x). Legenda: (a) Veículo (etanol 10%, v/v), (b) Fração de Hexano; (c) Fração de Diclorometano; (d) Fração de Acetato de Etila; (e) Fração de Butanol; (*) Neutrófilos; (#) Outros tipos celulares.

5.3.6 Avaliação da Produção do Óxido Nítrico (NO)

A produção do NO foi avaliada indiretamente pela quantificação da concentração de nitrito, utilizando o lavado peritoneal, dos grupos determinados pelo teste de recrutamento de neutrófilos. O alto nível de NO produzido por macrófagos, neutrófilos e células ativadas, pode também lesar células saudáveis vizinhas, sendo

este mecanismo responsável pela maioria de processos inflamatórios e autoimunes. Todos os grupo tratado com as frações (hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol) obtidos do caule e casca da *A. martii* Benth na dose de (25 mg/kg), apresentaram redução significativa em comparação ao grupo tratado com o veículo ($p < 0,05$). Desta forma as frações ativas do extrato, podem levar a inibição da síntese de nitrito mediada por células imunes entre elas os neutrófilos e macrófagos, reduzindo assim os estímulos inflamatórios presentes (Figura 11).

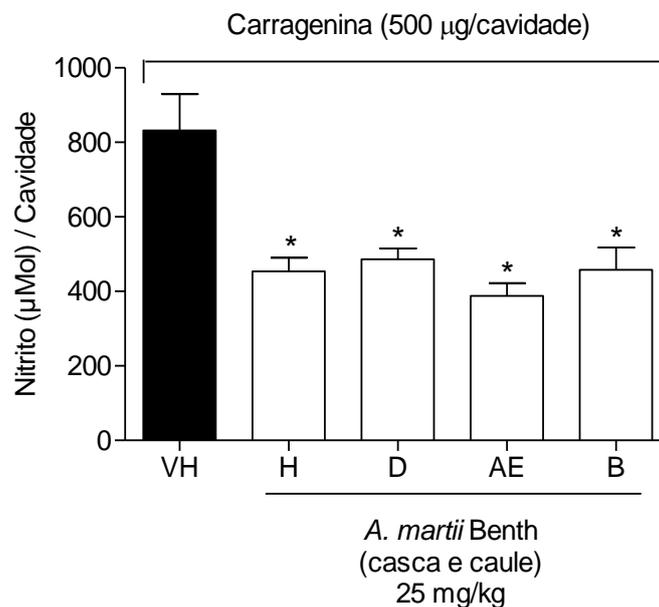


Figura 11 – Efeito das frações de hexano (H), diclorometano (D), acetato de etila (AE) e butanol (B) do caule e casca da *A. martii* Benth sobre a produção do NO, avaliada indiretamente pela quantificação da concentração de nitrito por espectrofotometria usando a reação de Griess. Grupos de camundongos ($n = 6$) foram pré-tratados por via subcutânea com administração das frações (25 mg/kg) ou (VH) veículo (etanol 10%, v/v, s.c.), 30 min antes da Cg (500 µg/cavidade) induzir a peritonite, sendo coletado o lavado peritoneal para a quantificação. Cada valor representa a média \pm E.P.M. A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. * $p < 0,05$ quando comparado o grupo tratado com fração ao grupo veículo.

5.4 DETERMINAÇÃO DA TOXICIDADE

5.4.1 Teste de letalidade frente à *Artemia salina* Leach

O teste de letalidade da *Artemia salina* L. (BST) tem sido usado como bioensaio a fim de determinar a toxicidade pela estimativa da dose letal média

(DL₅₀), ou seja, a concentração em que há morte de 50% da população de *A. salina*. As substâncias que apresentam DL₅₀>1000 µg/ml são consideradas inativas frente a *A. salina* e aquelas que apresentam DL₅₀<100 µg/ml são consideradas muito ativas. Substâncias que apresentam o DL₅₀ entre 100 e 1000 µg/ml são consideradas moderadamente ativas (ANDERSON et al., 1991; DAVID et al., 2001; MEYER et al., 1982). Os controles positivo (DMSO + água salina artificial) e negativo (água salina artificial), não apresentaram nenhuma letalidade a *A. salina* L., frente o ensaio.

Os resultados mostraram que o extrato etanólico e a fração de hexano indicam uma elevada toxicidade, a fração de diclorometano indica moderada toxicidade e as frações de acetato de etila e butanol não apresentam toxicidade de acordo com a tabela 5 (ANDERSON et al., 1991; DAVID et al., 2001; MEYER et al., 1982).

Tabela 5 – Resultados do teste de letalidade frente *A. salina* para o extrato etanólico e as frações do caule e casca da *A. martii* Benth.

Atividade antioxidante extrato/fração da <i>Aeschynomene martii</i> Benth		
Extratos/Fração	DL ₅₀ (µg/mL)	Classificação da Toxicidade
Extrato etanólico	33,63	Muito ativa
Fração de hexano	83,63	Muito ativa
Fração de diclorometano	106,45	Moderadamente ativa
Fração de acetato de etila	1615,92	Inativa
Fração de butanol	1438,94	Inativa

Tabela 5 - Aos dados de porcentagem de larvas de *Artemia salina* mortas, em relação ao aumento da concentração do extrato da planta e suas frações, ajustou-se uma equação linear simples, a qual foi utilizada para estimar a concentração de extrato responsável por matar 50% das artemias valor representativo da DL₅₀ (dose letal do extrato para 50% da população), sendo os resultados compilados nesta tabela.

Fonte: Dados da pesquisa.

6 DISCUSSÃO

O Brasil é considerado um dos países de maior biodiversidade do planeta por possuir cerca de 20% do número total de espécies do mundo (SILVA et al., 2014). Porém, parte desta diversidade de espécies ainda não foi investigada em relação as suas potencialidades terapêuticas, embora este seja um processo que vem evoluindo significativamente (ALBUQUERQUE, 2010). As plantas medicinais são importantes para a pesquisa farmacológica e o desenvolvimento de novas drogas, não somente quando seus constituintes são usados diretamente como agentes terapêuticos, mas também como matérias-primas para a síntese, ou modelos para compostos farmacologicamente ativos (CORRÊA; RODRIGUES; BARBANO, 2016). Através de métodos de triagem farmacológicos a pesquisa de produtos naturais tem proporcionado à descoberta de substâncias farmacologicamente ativas, com importantes aplicações tanto na área experimental como na identificação de princípios ativos de interesse terapêutico (SILVA et al., 2014).

Neste contexto, a avaliação do potencial da atividade biológica do extrato e frações de *A. martii* Benth do semiárido da Bahia, é de grande interesse científico, ambiental, tecnológico e econômico. Para tanto, foram realizados estudos com o extrato etanólico e com as frações do caule e casca preparados a partir da espécie coletada na Floresta Nacional Contendas do Sincorá, para a detecção de substâncias químicas presentes e a avaliação das atividades antinociceptiva, anti-inflamatória, antioxidante e toxicológica.

Neste estudo, todas as classes de metabólitos secundários foram investigados a partir das análises fitoquímicas com a aplicação de testes analíticos padrões que detectaram as presenças de polifenóis, flavonoides, saponinas, taninos, esteroides e alcaloides no extrato etanólico obtido do caule e casca da *A. martii* Benth. As prospecções fitoquímicas e análises por CG-EM das frações de hexano e diclorometano, identificaram substâncias químicas importantes, pertencentes aos grupos dos ácidos graxos, esteroides e flavonas, o que permite apontar esse material vegetal estudado como um futuro fitofármaco.

Os ácidos graxos têm sido abordados em estudos como uma causa provável para incidência de patologias inflamatórias, uma vez que os eicosanoides sintetizados a partir deles são agentes pró-inflamatórios. Por outro lado, estudos mostraram que os precursores de eicosanoides têm atividades anti-inflamatórias e

antinociceptivas (CERQUEIRA, 2017; MESQUITA et al., 2011), assim como usado no tratamento de artrite reumatoide (ASIF, 2014), na asma caracterizada pela inflamação crônica das vias aéreas (SEWELL; MARKS; SEGAL, 2015), no câncer com efeitos anti-proliferativos (STEPHENSON et al., 2013; XIA et al., 2006), nos processos inflamatórios da obesidade (SIMOPOULOS, 2010), na síndrome de resposta inflamatória sistêmica por sepse (SEKI et al., 2010), entre outros achados.

Dentre os esteroides, temos o β -sitosterol que existe amplamente em plantas e é classificado como fitoesterol, tem demonstrado uma potente atividade antioxidante (SEKI et al., 2010), antibacterianas (COPETTI, 2016; PAN et al., 2009), atua na lesão hepática inibindo a oxidação e a inflamação (YIN et al., 2018), possui atividades antimetastática avaliada *in vitro* (DEBELE; MEKURIA; TSAI, 2017), atuam na atividade anti-inflamatória de doença pulmonar crônica (YUK et al., 2007) e atua inibindo a inflamação das vias aéreas induzida pela ovalbumina (MAHAJAN; MEHTA, 2011), além de sua interação com ácidos graxos que inibe os efeitos oxidativos celulares (XU et al., 2011).

Já o estigmasterol atua em conjunto com o β -sitosterol na terapia de reposição hormonal de estrogênio (SRIRAMAN et al., 2015), possui potente atividade antioxidante (AGATONOVIC-KUSTRIN et al., 2018; AGATONOVIC-KUSTRIN; MORTON, 2018), tem efeitos protetores contra sintomas psicóticos induzidos por cetamina e nas alterações comportamentais, bioquímicas e histopatológicas (YADAV et al., 2018), além inibir respostas imunes inatas induzidas por lipopolissacarídeos em modelos *in vivo* (ANTWI et al., 2017).

A lupenona tem apresentado atividades como agente terapêutico e quimiopreventivo para o tratamento da inflamação e do cancro (SALEEM, 2009), possui efeito estimulador da captação de glicose em células do músculo esquelético (KHAN et al., 2014), atua na resposta inflamatória mudando o perfil dos macrófagos para M2 em doença intestinal (ZHU et al., 2016), assim como possui atuação direta na atividade anti-ciclooxigenase levando à inibição da COX-2 (SÁNCHEZ-BURGOS et al., 2015), além de auxiliar no processo cicatricial de feridas apresentando atividades antioxidante e antibacteriano em conjunto (PATEL et al., 2018).

Muitos flavonoides apresentam inúmeras propriedades farmacológicas, entre elas atividade anti-inflamatória devido a inibição das enzimas envolvidas no metabolismo final do ácido araquidônico (NAGEM, 2002). Dentre essa classe de

flavonoides destaca-se a, 3,3',4',5,5',7-hexametoxiflavona que demonstrou em estudos um potencial em induzir a inibição do crescimento de células cancerosas humanas e ainda levam à apoptose através da modulação de funções mitocondriais reguladas por espécies reativas de oxigênio (PAN et al., 2007), além disso, inibe a produção de NO induzida por LPS modulando a expressão de iNOS através da supressão da atividade de NF- κ B (KANG et al., 2013), e pode também suprimir múltiplos eventos moleculares oncogênicos em células de câncer de cólon (QIU et al., 2011), como até mesmo reduzir a incidência tumoral por ser um agente funcional capaz de prevenir a tumorigênese associada à inflamação, ao regular negativamente à expressão inflamatória da iNOS e COX-2 (LAI et al., 2007).

Nos resultados das prospecções fitoquímicas muitas substâncias que não foram identificadas das frações (hexano e diclorometano), apresentavam características similares aos diterpenos. Sendo assim, buscando uma melhor elucidação dos constituintes da planta *A. martii* Benth, novas metodologias como: Espectroscopia no Infravermelho (IV), Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), entre outras técnicas futuramente serão empregadas, visando à identificação desses grupos funcionais.

Buscando o conhecimento sobre os possíveis potenciais de ação da planta *A. martii* Benth, o presente trabalho realizou um ensaio para avaliar a atividade antioxidante do extrato etanólico e suas frações do caule e casca. A capacidade de sequestrar o radical DPPH, baseia-se na transferência de elétrons de um composto antioxidante para um oxidante. Os radicais livres e outros oxidantes, vem sendo considerados nos últimos anos grandes causadores de várias doenças, quando em excesso, podendo gerar estresse oxidativo, nas quais os radicais livres causam danos teciduais. O excesso desses radicais pode ser combatido por antioxidantes produzidos pelo corpo ou adquiridos de forma exógena (HARA et al., 2018; NICKLISCH; WAITE, 2014).

Os radicais livres são moléculas altamente reativas produzidas como resultado do metabolismo celular normal do oxigênio em mamíferos (NICKLISCH; WAITE, 2014). Em níveis baixos ou moderados, os radicais livres exercem efeitos benéficos nas respostas celulares e na função imunológica, enquanto em altas concentrações geram estresse oxidativo, um processo deletério que pode danificar todas as estruturas celulares e causar o surgimento e/ou progressão de um número

crescente de doenças. O papel fundamental do estresse oxidativo na fisiopatologia, que é desencadeado por um desequilíbrio redox entre os radicais livres e antioxidantes, constitui a base lógica para abordagens terapêuticas antioxidantes (PLANTIER et al., 2016).

Resultados apresentados quantitativamente na avaliação da capacidade dos constituintes do extrato etanólico e frações (hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol) da *A. martii* em capturar radicais livres (DPPH), mostraram que nenhum dos extratos da planta, foi capaz de inibir a oxidação, ou seja, de promover atividade antioxidante em comparação aos padrões testados. Já qualitativamente de acordo a classificação de Alves (2010), apenas a fração de acetato de etila em comparação ao ácido ascórbico conseguiu apresentar uma boa atividade antioxidante. Assim, só é possível denominar antioxidantes, as substâncias que apresentam em concentrações baixas, comparadas ao substrato oxidável, a capacidade de retardar significativamente ou inibir a oxidação do substrato.

O presente estudo também buscou avaliar as propriedades antinociceptiva e/ou anti-inflamatória das frações do caule e casca da *A. martii* por meio de vários modelos de indução da nocicepção e inflamação *in vivo*, na busca de novas opções terapêuticas para o tratamento da dor e inflamação a partir da utilização de espécies em evidência no FLONA.

O primeiro modelo experimental de nocicepção realizado no presente trabalho foi o de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos. A administração intraperitoneal de agentes que irritam as membranas serosas provoca um comportamento estereotipado que é caracterizado por contrações abdominais e redução na atividade motora. Esses comportamentos são considerados como reflexos devido à dor visceral provocada (LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001). Apresenta-se como método simples e rápido para o rastreamento de novas drogas, com resposta altamente sensível, atuando como *screening* (HOSSEIN; TAMADDONFARD; NASRIN, 2008).

Esse método envolve mecanismos complexos, incluindo a produção de citocinas pró-inflamatórias e abertura de canais iônicos. O ácido acético produz uma resposta que depende da interação de vários neurotransmissores e neuromoduladores que determinam a nocicepção, o que faz esse modelo sensível às substâncias analgésicas de ação central e/ou periférica com os mais variados

mecanismos de ação (PERAZA et al., 2007). Os macrófagos peritoneais liberam as citocinas TNF α , IL-1 β e IL-8/CXCL8, que além de sensibilizar e estimular os neurônios aferentes primários resulta no aumento da liberação dos neurotransmissores excitatórios tais como o aspartato e o glutamato no fluido cérebro espinhal (ARAGÃO et al., 2017; MCENTIRE et al., 2016). Os mastócitos também liberam as mesmas citocinas que os macrófagos, além de outras interleucinas como, IL-4, IL-13, IL-9 e diversos mediadores (GATIS-CARRAZZONI et al., 2018).

A excitabilidade neuronal é alterada pela interação direta dos prótons resultantes à resposta do ácido acético que despolarizam neurônios sensoriais diretamente pela ativação de um canal não seletivo catiônico cutâneo, visceral ou outros tipos de fibras C aferentes periféricas (ALVES, 2016). Além também de ser resultante na liberação de diversos mediadores inflamatórios como a PGE2 e PGF2 α (GATIS-CARRAZZONI et al., 2018). Sendo assim, o modelo de contorção induzido por ácido acético é sensível às substâncias analgésicas de ação periférica, bem como as de ação central. Os efeitos algícos do ácido acético podem ser evitados por drogas como os anti-inflamatórios esteroidais e não esteroidais, além de analgésicos centrais como a morfina (DOS SANTOS et al., 2010).

Contudo os resultados demonstraram que as frações (hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol) do caule e casca da *A. martii* (25 mg/kg), foram capazes de reduzir a resposta nociceptiva comportamental induzida pelo ácido acético. Portanto é provável que a ação antinociceptiva do extrato da *A. martii* esteja relacionada com a presença de diterpenos (OLIVEIRA et al., 2014) onde seus mecanismos de efeitos analgésicos podem-se induzido pela diminuição da produção de prostaglandinas responsáveis pela dor. Assim acredita-se que a resposta antinociceptiva envolva inibição direta ou indireta da liberação de mediadores pró-inflamatórios, que estimulam terminações nociceptivas ou até mesmo promovam uma modulação central na transmissão.

A injeção intraplantar de formalina é um ensaio experimental que permite em resposta determinar o comportamento nocivo em camundongos. Tem sido amplamente utilizada por avaliar dois tipos diferentes de tipologias da dor, sendo elas relacionadas às respostas à nocicepção e a inflamação. Como principal vantagem consiste na quantificação muito objetiva do comportamento associado à

dor em resposta aos estímulos nocivos (LÓPEZ-CANO et al., 2017). No geral, o teste da formalina pode ser considerado uma abordagem experimental fácil para determinar a atividade analgésica sendo considerada uma ferramenta muito poderosa na pesquisa pré-clínica para desenvolver novas drogas que reduza a percepção da dor (nocicepção) (BORSOOK et al., 2013).

O modelo de formalina é amplamente utilizado para avaliar os efeitos de compostos analgésicos, sua injeção induz uma resposta de dor bifásica (GATIS-CARRAZZONI et al., 2018). A primeira fase (0-5 min após formalina) é a fase neurogênica e é geralmente atribuída a um efeito direto do estímulo sobre os neurônios nociceptivos primários que refletem dor periférica aguda, provavelmente devido à ativação direta de nociceptores. A segunda fase (15-30 min após a formalina) é devida ao estímulo inflamatório contínuo e à sensibilização nociceptiva central, envolve o desenvolvimento subsequente de inflamação, que é mediada por liberação de várias citocinas e prostaglandinas (GATIS-CARRAZZONI et al., 2018; MCNAMARA et al., 2007).

Na fase neurogênica, a nocicepção ocorre devido à sensibilização direta de nociceptores aferentes primários de fibra C (BORSOOK et al., 2013). Isto sugere que a atividade neural gerada durante a fase inicial da resposta à formalina é capaz de produzir alterações na função do SNC (isto é, sensibilização central), que por sua vez, influencia o processamento durante a fase tardia (LÓPEZ-CANO et al., 2017). Ao excitar os neurônios sensoriais a formalina ativa diretamente o receptor de potencial transitório (TRPA1), um canal de cátion que desempenha um papel importante também na dor inflamatória (MCNAMARA et al., 2007).

A segunda fase resulta na resposta inflamatória causada pela ação de mediadores inflamatórios, ou até certo ponto, pela sensibilização central dos neurônios do corno dorsal. Substância P e bradicinina foram relatadas durante a fase neurogênica, enquanto histamina, serotonina, prostaglandinas e também bradicinina estavam envolvidos na fase inflamatória (PING et al., 2018).

Neste teste é possível entender a atuação de drogas de primeira fase com ação central, como a morfina, que inibe a nocicepção em ambas as fases igualmente. De fato, a existência dessas duas fases leva à possibilidade do estudo de diferentes fármacos analgésicos, incluindo AINEs, para decifrar o mecanismo de

ação da droga ao longo do neuroeixo doloroso (BASBAUM et al., 2010; LÓPEZ-CANO et al., 2017)

O presente estudo indica que todas as frações (hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol) do caule e casca da *A. martii* (25 mg/kg), assim como o controle positivo testado (morfina), reduziram o número de *flinches* induzidas pela formalina em ambas as fases. Assim, sugerimos que *A. martii* Benth atua de maneira central e periférica, resultante por alguns de suas substâncias atuarem na redução de mediadores inflamatórios originando a dor, como os ácidos graxos sendo precursores de eicosanoides com atividade anti-inflamatória e antinociceptiva (CERQUEIRA, 2017; MESQUITA et al., 2011).

Visto também que a frações de diclorometano na primeira fase em relação ao controle positivo morfina não apresentou diferença estatística, assim podemos sugerir que o extrato pode está atuando na inibição da estimulação química direta dos nociceptores, principalmente das fibras C, sendo associada à liberação de neuropeptídeos e outras substâncias que produzem respostas locais, denominada de inflamação neurogênica (BATISTA et al., 2016). Já na segunda fase a fração de butanol não apresentou diferença estatística em relação ao controle positivo morfina, supondo que o extrato esteja reduzindo a liberação de mediadores inflamatórios, como histamina, serotonina, bradicinina e prostaglandinas que produzem sensibilização das vias periféricas e centrais de condução da dor de origem inflamatória (BATISTA et al., 2016).

Podemos inferir que essas frações (diclorometano e butanol) possuem ação semelhante ou igual à morfina um potente analgésico opioide de ação central, que em sua cascata de eventos levam ao fechamento de canais de cálcio voltagem dependente, redução na produção de monofosfato de adenosina cíclico (AMPs) e estímulo ao efluxo de potássio resultando em hiperpolarização celular. Assim, o efeito final é a redução da excitabilidade neuronal, e redução da neurotransmissão de impulsos nociceptivos (LEMONICA, 2008).

Ainda no teste da formalina, avaliou-se a formação do edema de pata. Este teste experimental fundamenta-se no fato de que a administração de agentes flogísticos local, como a formalina na pata de um animal, produzirá uma reação inflamatória local caracterizada pela formação de edema, reprodutível e facilmente

mensurável, o qual se constitui como um sinal cardinal inflamatório (AGNEL ARUL JOHN; SHOBANA, 2012).

O edema de pata é caracterizado em dois momentos, onde no primeiro temos a liberação de mediadores que causam vasodilatação, seguido do aumento da permeabilidade microvascular e no segundo momento a migração de células do processo inflamatório (LEE et al., 2012). No modelo de edema de pata os efeitos edematogênicos ocasionados pelos mediadores tais como carragenina, histamina, PGE2 ou bradicinina, ocorrem por vias de sinalizações intracelulares. Por exemplo, os receptores de histamina e PGE2 presentes nas membranas citoplasmáticas de diversos tecidos são do tipo GPCR ligados à proteína Gαq/11 e Gas, respectivamente, os quais ativam a enzima fosfolipase C e adenililciclase (LEE et al., 2012).

A redução do edema de pata promovido pelas três (hexano, diclorometano e acetato de etila) frações (25 mg/kg) induzido por formalina sugere efeitos antiedematosos no sítio inflamatório. Vários mecanismos poderiam explicar os efeitos antiedematosos da inflamação induzida por formalina (SINGH et al., 2010). Podendo ocorrer, por inibição da ativação e o recrutamento de células imunes periféricas para o local da inflamação, atenuando a liberação de citocinas inflamatórias (TNF-α, IL-1β) e a translocação do fator nuclear κB (NF-κB). Destacando, a diminuição da infiltração de neutrófilos em lesões da pele; e reduzindo a liberação de neurotransmissores como SP, CGRP e glutamato dos terminais nervosos sensoriais periféricos, onde os neurotransmissores liberados contribuem para o edema induzido pela formalina (KVIETYS; GRANGER, 2014; LEE et al., 2012)

Esses resultados apoiam a hipótese da participação dessas três frações (25 mg/kg) do caule e casca em inibir a síntese de prostaglandinas ou agir em mecanismos periféricos que promovem a síntese e a liberação de mediadores que alteram a permeabilidade vascular, pois a formação de edema na pata é o resultado de um sinergismo entre vários mediadores inflamatórios que aumenta a permeabilidade vascular e o fluxo sanguíneo (KVIETYS; GRANGER, 2014).

Outro possível mecanismo de ação das frações do extrato de *A. martii* pode ser a inibição da sensibilização ou da ativação dos nociceptores. A hipernocicepção inflamatória resulta principalmente da sensibilização dos neurônios aferentes induzida pela liberação de mediadores como PGs e aminas simpatomiméticas que sensibilizam os neurônios nociceptivos periféricos (BUCKLE, 2015). A aplicação de um estímulo mecânico nocivo pode ser progressiva onde as respostas produzidas são em relação à intensidade e/ou duração do estímulo, desde reflexos. Desta forma o estímulo é interrompido assim que uma resposta é obtida (LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001).

O tipo de estímulo mecânico usado na investigação de hipernocicepção foi o *von Frey*, método utilizado para avaliar a sensibilidade tecidual ao estímulo mecânico (SILVA et al., 2013). As alterações nos limiares nociceptivos são avaliadas exercendo-se uma pressão linearmente crescente no centro da planta da pata do animal até a produção de uma resposta caracterizada como retirada e sacudida (*flinches*). Os modelos experimentais baseados em testes mecânicos permitem a avaliação do aumento da sensibilidade do nociceptor a estímulos inócuos (alodinia) ou nocivos (hiperalgesia) (BALIKI; APKARIAN, 2015). Porém, além de estímulo de nociceptores de fibras A δ e nociceptores de fibras C, também podem ser ativados os mecanorreceptores, resultando em estímulos inespecíficos que nem sempre refletem a neurofisiologia da nocicepção. Particularmente, o teste de *von Frey*, é usado para avaliar através do estímulo mecânico inócuo e crescente (alodinia mecânica) a sensibilidade tecidual (SILVA et al., 2013).

As frações de (hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol) da *A. martii* (25 mg/kg) caule e casca apresentaram um elevado efeito antinociceptivo em modelos de nocicepção mecânica, no teste de Von Frey, podendo este dado estar associado com a sua ação anti-inflamatória, atribuídas a células imunes a exemplo dos neutrófilos, que são fonte relevante de citocinas hipernociceptivas ou de mediadores hipernociceptivos de ação direta, como as PGs (BASBAUM et al., 2010), uma vez que os flavonoides agem na inibição das enzimas envolvidas no metabolismo do ácido araquidônico (NAGEM, 2002). Portanto os estímulos inflamatórios induzem a liberação de mediadores pró-inflamatórios por células residentes resultando na sensibilização dos nociceptores ou sua ativação direta dependendo da intensidade de resposta ao estímulo (JI; XU; GAO, 2014).

Um dos mecanismos da inflamação responsáveis pelo dano tecidual no processo inflamatório, além de implicados na própria nocicepção inflamatória, é a migração de neutrófilos (CUNHA et al., 2008). Os neutrófilos são o tipo leucocitário mais abundante em circulação, constituem a primeira linha de reconhecimento e defesa contra agentes infecciosos no tecido, tradicionalmente iniciam uma inflamação aguda e são responsáveis por uma resposta imune pró-inflamatória eficaz (SILVA, 2015). O modelo experimental de inflamação aguda *in vivo* é bem caracterizado, permitindo avaliar quantitativamente a correlação de migração celular após um processo inflamatório agudo, induzido por agente irritante (carragenina) aplicado no interior da cavidade abdominal (SILVA, 2015; WARD, 2010)

A carragenina (Cg), um polissacarídeo extraído de algas, é utilizada para avaliar a contribuição dos mediadores envolvidos nas alterações vasculares associadas com a inflamação aguda (WARD, 2010). A resposta inflamatória à carragenina consistiu de três fases: A fase primária mediada por histamina, serotonina e 5-hidroxitriptamina, sendo seguida por uma fase secundária mediada por cininas, notavelmente a bradicinina endógena não peptídica produzida pela caliceína. A fase final é atribuída à produção local de prostaglandinas e tromboxanos, derivado do ácido araquidônico pela ação das enzimas cicloxigenase (COX) (MORRIS, 2003). Assim a injeção de carragenina no espaço pleural, induz um processo inflamatório agudo envolvendo a migração celular, exsudação de plasma e produção de mediadores, como o óxido nítrico, PGE₂, IL-1 β , IL-6 e fator de necrose tumoral TNF- α . Esses mediadores são capazes de recrutar leucócitos, como neutrófilos, em vários modelos experimentais (SILVA, 2015).

Na maioria dos tecidos, a cascata de recrutamento de leucócitos envolve as seguintes etapas comumente reconhecidas: fixação, rolagem, adesão, rastreamento e, finalmente, transmigração (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013). É iniciado por alterações na superfície do endotélio que resultam da estimulação por mediadores inflamatórios (incluindo histamina, leucotrienos e citocinas) que são liberados de tecidos residentes por leucócitos sentinela quando entram em contato com patógenos (KVIETYS; GRANGER, 2014). As células endoteliais também podem ser ativadas diretamente pela detecção mediada por receptores de reconhecimento de padrões (PRR) de patógenos que aumentam a expressão de moléculas de adesão e em poucos minutos, regulam a P-selectina dos corpos de Weibel-Palade, e a E-

selectina é sintetizada. Uma vez presentes na superfície endotelial, a P-selectina e a E-selectina ligam-se aos seus ligantes glicosilados como a molécula de adesão intercelular endotelial-1 (ICAM-1), conduzindo à ancoragem de neutrófilos de fluxo livre à superfície endotélio e sua posterior rolagem ao longo do vaso (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013).

De fato, a interação de neutrófilos recrutados no local da inflamação com células residentes, mediadores inflamatórios locais e/ou matriz extracelular pode levar à produção de vários outros mediadores, incluindo citocinas/quimiocinas, enzimas degradantes, espécies de oxigênio (ROS), nitrogênio e metaloproteases que pode amplificar ainda mais a resposta inflamatória e lesar o tecido circundante (SOEHNLEIN et al., 2017).

O presente estudo demonstrou que as frações (hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol) da *A. martii* (25 mg/kg) do caule e casca, reduziram de maneira efetiva a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal após 4 h da indução com a carragenina. Conseqüentemente pode ser atribuído principalmente à supressão da liberação das citocinas pró-inflamatória TNF- α , IL-1 β e IL-6 que estão envolvidas no recrutamento (SOEHNLEIN et al., 2017). Essa supressão pode ser devido a presença de substâncias como as flavonas que inibe a enzima final do ácido araquidônico (NAGEM, 2002), modulando a expressão da iNOS através da supressão de NF- κ B (KANG et al., 2013) e através da lupenona mudando o perfil de macrófagos M1 para M2 e consecutivamente as citocinas liberadas, agindo também diretamente na via da COX-2 (ZHU et al., 2016).

A inibição da migração dos leucócitos para a cavidade peritoneal pode ser elucidada não somente pela inibição da produção de substâncias químiatraente, mas também pela inibição da expressão de moléculas de adesão, uma vez que os leucócitos requerem substâncias quimiotáticas que facilitem sua migração para o local onde está ocorrendo à injúria, para então, desencadear seus efeitos na tentativa de neutralizar o agente agressor (KVIETYS; GRANGER, 2014; PAPAYANNOPOULOS, 2017).

O recrutamento de neutrófilos tem como função induzir processos, que levam o aumento na permeabilidade dos vasos sanguíneos locais e a liberação de quimiocinas. Para o estudo da permeabilidade vascular, foi escolhido o método de injeção de azul de Evans, que baseia na sua ligação a proteína albumina (GEHLEN

et al., 2004; WICK et al., 2018). Em condições fisiológicas, o endotélio é impermeável à albumina, de modo que o azul de Evans se liga à albumina e não extravasa dos vasos. Em condições patológicas que promovem o aumento da permeabilidade vascular, células endoteliais parcialmente perdem seus contatos próximos, tornando-se permeável a pequenas proteínas como a albumina (WICK et al., 2018).

As inflamações agudas caracterizam-se por fenômenos exsudativos, em decorrência das alterações da permeabilidade vascular (SANTOS; MARTA; CÁRNIO, 2013). Um aumento na permeabilidade endotelial é frequentemente associado à desregulação da adesão juncional, pela liberação de substância P, fatores físico-químicos, aumento da adesão, migração transendotelial e a liberação de uma variedade de mediadores solúveis por células inflamatórias residentes e/ou circulantes, que ligam aos receptores específicos (KVIETYS; GRANGER, 2014).

Durante o processo da peritonite causado pela Cg ocorrem alterações que levam a vasodilatação dos capilares na membrana (KVIETYS; GRANGER, 2014). Esta condição permite o extravasamento de azul de Evans aos tecidos, onde em estudo com as frações (hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol) da *A. martii* (25 mg/kg) caule e casca demonstraram uma potente capacidade em diminuir a permeabilidade vascular evocada pela Cg. Assim é possível supor que a hexametoxiflavona que inibe a produção de NO (PAN et al., 2007) e regula negativamente a expressão inflamatória da iNOS e COX-2 (LAI et al., 2007), inibindo a vasodilatação dos capilares na membrana peritoneal e da abertura dos poros dos microvasos, por meio da redução na liberação de mediadores celulares e inflamatórios, como neutrófilos e PGE2 (PAPAYANNOPOULOS, 2017).

Vimos que a inflamação induzida por Cg envolve a migração celular, exsudação de plasma por meio do aumento da permeabilidade e produção de mediadores, entre eles o óxido nítrico, sendo mediador capaz de recrutar leucócitos, como neutrófilos, em vários modelos experimentais (DIETRICH et al., 2015). Este evento local induzido por Cg está relacionado com a produção de radicais livres derivados de neutrófilos, tais como peróxido de hidrogênio, radicais superóxido e hidroxila. Assim, o recrutamento dos neutrófilos resulta em danos e disfunções nos tecidos, subsequentes levar à morte celular por dano oxidativo ao DNA, proteínas e peroxidação lipídica das membranas celulares (JÄDERT et al., 2012).

O nitrito é um metabólito final da oxidação do NO, e por ser um produto estável, tem sido frequentemente usado como marcador da inflamação (WORDS, 2000). O NO constitui um dos mais importantes mediadores de processos intra e extracelulares e a sua síntese resulta da oxidação de um dos dois nitrogênios guanidino da L-arginina, que é convertida em L-citrulina. Esta reação é catalisada pela enzima NO-sintase (NOS) (DUSSE; VIEIRA; CARVALHO, 2003). Assim, as isoformas da NOS são agrupadas em duas categorias, constitutiva (c-NOS), dependente de íons cálcio (Ca^{++}) e de calmodulina, que está envolvida na sinalização celular, e induzível (i-NOS), produzida por macrófagos e outras células ativadas por citocinas (DIETRICH et al., 2015).

O NO apresenta um papel dúbio, às vezes benéfico, outras vezes prejudicial ao organismo. Está envolvido no relaxamento vascular e tem um papel de grande importância na proteção do vaso sanguíneo. Constitui um importante mediador citotóxico de células imunes efectoras ativadas (JÄDERT et al., 2012). Possui, ainda, um papel como mensageiro/modulador em diversos processos biológicos essenciais. No entanto o NO é potencialmente tóxico, a sua toxicidade se faz presente particularmente em situações de estresse oxidativo, geração de intermediários do oxigênio e deficiência do sistema antioxidante (MIYAMOTO et al., 2011).

Os macrófagos são células fundamentais para o início e desenvolvimento das respostas imune e inflamatória, não somente por sua capacidade de apresentar antígenos e produzir citocinas, como também por produzir grandes quantidades de NO e espécies reativas de oxigênio (ROS) em adição a outros mediadores inflamatórios. Macrófagos e outras células ativadas por citocinas sintetizam NO e O_2^- resultando na formação de NO_2^- (nitrito) e NO_3^- (nitrato) (ZHONG et al., 2018). A reação de Griess, empregada no presente trabalho buscou avaliar indiretamente os níveis de NO, através de uma reação colorimétrica simples e confiável, sendo que sua única desvantagem reside no fato de que detecta somente nitrito (SZABÓ; ISCHIROPOULOS; RADI, 2007). Como resultado, foi observado que as frações de (hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol) da *A. martii* (25 mg/kg) caule e casca apresentaram uma redução significativa dos níveis de nitrito no lavado peritoneal induzido pela Cg.

Levando-se em conta a redução dos níveis de nitrito observado, supõem que as frações do extrato da *A. martii* foram capazes de inibir a atividade da enzima (iNOS) que sintetiza óxido nítrico nos macrófagos ativadas, como também reduz a liberação de mediadores citotóxicos de células imunes efetoras ativadas, onde sua toxicidade se faz presente, particularmente, em situações de estresse oxidativo, geração de intermediários do oxigênio e deficiência do sistema antioxidante (ZHONG et al., 2018).

Mediante os resultados das atividades anti-inflamatórias, demonstrados nos ensaios anteriores, é possível sugerir que um dos mecanismos envolvidos na redução da liberação de NO por células imunes ativadas por citocinas, estejam ligados à presença da substância hexametoxiflavona, que também suprime a atividade de NF- κ B. Em fases iniciais do processo inflamatório, quando ainda se encontra em baixas concentrações, o NO ativa o NF- κ B, levando à expressão de uma variedade de moléculas inflamatórias, amplificando o processo (KVIETYS; GRANGER, 2014). Assim, a redução do NO impede que ele exerça suas funções pró-inflamatórias inibindo a ativação de células residentes, o que leva à diminuição da cascata de produção e liberação de diferentes proteínas inflamatórias, dentre elas fatores quimiotáticos, o que em última instância reduz a migração de células inflamatórias para o sítio inflamado (JIANG; AMES, 2018).

Mediante todos os testes apresentados para avaliar a atividade anti-inflamatória, antinociceptiva e antioxidante, podemos inferir que a presença de muitas das substâncias identificadas pertencentes aos grupos dos ácidos graxos, terpenos, esteroides e flavonoides com ações farmacológicas descritas em alguns estudos, podem esta promovendo a redução, inibição ou controle dos diversos fatores e mecanismos que levam ao processo, inflamatório, nociceptivo e oxidante.

Diante de todos os resultados de ensaios *in vivo* anteriormente descritos, viu-se a necessidade de elucidar e avaliar a possível toxicidade da planta *A. martii* Benth sobre *A. salina* Leach. A letalidade de um organismo simples foi escolhida para um rápido monitoramento da resposta biológica, onde existe apenas um parâmetro envolvido: morte ou vida (SHAALA et al., 2015). O ensaio de letalidade permite a avaliação da toxicidade geral e, portanto é considerado essencial como bioensaio preliminar no estudo de compostos com potencial atividade biológica (SILVA et al., 2016). Assim, utilizou neste bioensaio uma espécie de crustáceo

marinho, *Artemia salina* Leach, um microcrustáceo de água salgada que é utilizado como alimento vivo para peixes, sendo seus ovos facilmente encontrados em lojas de aquaristas. O bioensaio possui um baixo custo e é rápido, favorecendo a sua utilização rotineira (SIQUEIRA; PEREIRA, 1998).

O uso indiscriminado de plantas sem qualquer conhecimento fitoquímico, farmacológico e principalmente toxicológico é de grande preocupação para a saúde. Assim, encontrar uma concentração segura e não letal para o uso terapêutico constitui-se uma etapa de grande importância (HOCAYEN et al., 2012). Os resultados obtidos no ensaio com *A. salina*, demonstraram que o extrato etanólico e a fração de hexano indicam uma elevada toxicidade, a fração de diclorometano indica moderada toxicidade e as frações de acetato de etila e butanol não apresentam toxicidade. Desta forma destaca a importância da comprovação científica das propriedades farmacológicas de plantas empregadas para fins medicinais, visto que a toxicidade é um problema sério de saúde pública. Contudo é indispensável à realização de outros ensaios toxicológicos, afim de melhor avaliar a relação risco/benefício para validar a utilização desta planta como medicamento eficaz e seguro.

7 CONCLUSÃO

A espécie vegetal *Aeschynomene martii* Benth, com grande distribuição geográfica e coletada na reserva do FLONA, região de semiárido baiano, é uma planta rica em atividade biológica que pode ser atribuída à presença de diversos compostos químicos como os ácidos graxos, as flavonas, terpenos identificados ou não, que possuem ações farmacológicas promissoras. O extrato bruto e as frações apresentaram importante atividade anti-inflamatória e antinociceptiva, com toxicidade moderada ou ausente. Portanto, mais estudos devem ser realizados para que se proporcione isolamento e identificação dos demais compostos bioativos, além de elucidar os mecanismos de ação dessa planta. Deste modo, *A. martii* Benth é uma espécie promissora no desenvolvimento de fitoterápicos ou no isolamento de novos compostos bioativos, possibilitando a continuidade e o aprofundamento dos estudos farmacológicos.

REFERÊNCIAS

- AGATONOVIC-KUSTRIN, S. et al. The relationship between major polyphenolic acids and stigmasterol to antioxidant activity in different extracts of *Myrmecodia platytyrea*. **South African Journal of Botany**, v. 115, p. 94–99, mar. 2018.
- AGATONOVIC-KUSTRIN, S.; KUSTRIN, E.; MORTON, D. W. Phenolic acids contribution to antioxidant activities and comparative assessment of phenolic content in mango pulp and peel. **South African Journal of Botany**, v. 116, p. 158–163, maio 2018.
- AGNEL ARUL JOHN, N.; SHOBANA, G. Anti-inflammatory activity of *Talinum fruticosum* L. on formalin induced paw edema in albino rats. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 2, n. 1, p. 123–127, 2012.
- ALBUQUERQUE, U. P. DE. Implications of Ethnobotanical Studies on Bioprospecting Strategies of New Drugs in Semi-Arid Regions. **The Open Complementary Medicine Journal**, v. 2, n. 2, p. 21–23, 2010.
- ALVES, A. F. Milonina, alcaloide de *cissampelos sympodialis* EICHL.(Menispermaceae) inibe inflamação aguda mediada por mastócito. **CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE, PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS**, p. 107f., 2016.
- ALVES, C. Q. et al. Methods for determination of in vitro antioxidant activity for extracts and organic compounds. **Quimica Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202–2210, 2010.
- ANDERSON, J. E. et al. A blind comparison of simple bench-top bioassays and human tumour cell cytotoxicities as antitumor prescreens. **Phytochemical Analysis**, v. 2, n. 3, p. 107–111, jul. 1991.
- ÄNGEBY MÖLLER, K.; JOHANSSON, B.; BERGE, O.-G. Assessing mechanical allodynia in the rat paw with a new electronic algometer. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 84, n. 1–2, p. 41–47, out. 1998.
- ANTWI, A. O. et al. Stigmasterol inhibits lipopolysaccharide-induced innate immune responses in murine models. **International Immunopharmacology**, v. 53, p. 105–113, dez. 2017.
- ARAGÃO, D. P. et al. The anti-inflammatory and antinociceptive activity of albumins from *Crotalaria retusa* seeds. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 93, p. 536–542, set. 2017.
- ASIF, M. Role of Omega-3 Polyunsaturated fatty acids in Inflammation and rheumatoid arthritis disorders. **International Journal of Applied Sciences and Biotechnology**, v. 2, n. 1, 25 mar. 2014.
- BALIKI, M. N.; APKARIAN, A. V. Nociception, Pain, Negative Moods, and Behavior Selection. **Neuron**, v. 87, n. 3, p. 474–491, 2015.
- BASBAUM, A. I. et al. Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. **Cell.**, v. 139, n. 2, p. 267–284, 2010.

- BATISTA, E. K. F. et al. Atividades antinociceptiva e antiinflamatória do extrato etanólico de *Luehea divaricata*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 2, p. 433–441, 2016.
- BORSOOK, D. et al. Pain and analgesia: The value of salience circuits. **Progress in Neurobiology**, v. 104, p. 93–105, 2013.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft Und-Technologie**, v. 28, n. 5, p. 25–30, 1995.
- BROSSI, A. The Alkaloids: Chemistry and Physiology. **Academic Press Inc**, v. 32, p. 454, 1988.
- BUCKLE, J. Pain and Inflammation Clinical Aromatherapy. **Third Edition**, v. 117, p. 195–222, 2015.
- CALIXTO, J. B. Biological activity of plant extracts: novem analgesic drugs. **Expert Opinion Emerging Drugs**, v. 2, n. 1, p. 261–279, 2001.
- CAMPANA, P. Toxicidade de espécies vegetais. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 18, n.1, s, n. June, p. 373–382, 2016.
- CARTAXO, S. L.; DE ALMEIDA SOUZA, M. M.; DE ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, n. 2, p. 326–342, 2010.
- CELEGHINI, R. M. S.; VILEGAS, J. H. Y.; LANCAS, F. M. Extraction and quantitative HPLC analysis of coumarin in hydroalcoholic extracts of *Mikania glomerata* Spreng (“guaco”) leaves. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v. 12, p. 706–709, 2001.
- CERQUEIRA, S. R. P. OS ÁCIDOS GORDOS ÔMEGA-3 E OS SEUS EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIOS. **Tese de Doutorado**, n. 83, 2017.
- COELHO, L. P. et al. Antinociceptive properties of ethanolic extract and fractions of *Pterodon pubescens* Benth. seeds. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 98, n. 1–2, p. 109–116, 2005.
- COPETTI, D. ESTUDO DA CASCA DA RAIZ DA ESPÉCIE *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek, MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS DO COMPOSTO β -SITOSTEROL E ANÁLISES DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANAS. **Dissertação (Mestrado) - PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**, p. 95, 2016.
- CORRÊA, A. P. R.; RODRIGUES, Â. G.; BARBANO, D. B. A. POLÍTICA NACIONAL DE PLANTAS MEDICINAIS E FITOTERÁPICOS. **Ministério da Saúde**, p. 60, 2006.
- CORRÊA, A. P. R.; RODRIGUES, Â. G.; BARBANO, D. B. A. Política e Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos. **Ministério da Saúde**, p. 190, 2016.
- COSTA, A. F. Farmacognosia: farmacognosia experimental. **Fundação Calouste Gulbenkian**, p. 992, 2001.
- CRESPO YANGUAS, S. et al. Pannexin1 as mediator of inflammation and cell death. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1864, n. 1, p. 51–61,

2017.

CRUZ, M. P. Isolamento e identificação de compostos bioativos de *Mimosa hostilis* Benth. **Tese (Doutorado) – Instituto de Química. Universidade Federal da Bahia**, p. 207f, 2013.

CUNHA, T. M. et al. Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 83, n. 4, p. 824–832, 2008.

DAVID, J. P. et al. Lignanas e triterpenos do extrato citotóxico de *Eriope blanchetii*. **Química Nova**, v. 24, n. 6, p. 730–733, 2001.

DE GONZALO-CALVO, D. et al. Differential inflammatory responses in aging and disease: TNF- α and IL-6 as possible biomarkers. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, n. 5, p. 733–737, 2010.

DE MORAES, W. F. et al. Anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of *Pterodon emarginatus* stem bark alcohol extract. **Pharmaceutical Biology**, v. 47, n. 2, p. 146–150, 2009.

DEBELE, T. A.; MEKURIA, S. L.; TSAI, H.-C. Synthesis and characterization of redox-sensitive heparin- β -sitosterol micelles: Their application as carriers for the pharmaceutical agent, doxorubicin, and investigation of their antimetastatic activities in vitro. **Materials Science and Engineering: C**, v. 75, p. 1326–1338, jun. 2017.

DIETRICH, S. J. et al. Inhibition of NOS-NO system prevents autoimmune orchitis development in rats: Relevance of NO released by testicular macrophages in germ cell apoptosis and testosterone secretion. **PLoS ONE**, v. 10, n. 6, p. 1–21, 2015.

DONVITO, G. et al. The Endogenous Cannabinoid System: A Budding Source of Targets for Treating Inflammatory and Neuropathic Pain. **Neuropsychopharmacology**, n. August, p. 1–87, 2017.

DOS SANTOS, D. A. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae) in different experimental models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, n. 2, p. 543–550, fev. 2010.

DUARTE, J. C. et al. Estudo etnofarmacológico e etnobotânico das plantas medicinais na região do semi-árido da Bahia. In: **XX Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil e X International Congress o Ethnopharmacology, São Paulo.**, p. 248, 2008.

DUSSE, L. M. S.; VIEIRA, L. M.; CARVALHO, M. DAS G. Revisão sobre óxido nítrico. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 39, n. 4, p. 343–350, 2003.

DUTRA, R. C. et al. Atividades antimicrobiana e leishmanicida das sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 2 A, p. 429–435, 2009.

DUTRA, R. C.; LEITE, M. N.; BARBOSA, N. R. Quantification of phenolic constituents and antioxidant activity of *Pterodon emarginatus* vogel seeds.

International Journal of Molecular Sciences, v. 9, n. 4, p. 606–614, 2008.

FAN, C.; LIN, Z. Collaborative ranking with ranking-based neighborhood. **Lecture Notes in Computer Science (including subseries Lecture Notes in Artificial Intelligence and Lecture Notes in Bioinformatics)**, v. 7808 LNCS, n. 4, p. 770–781, 2013.

FRANKLIN, T.; XU, C.; DUMAN, R. S. Depression and sterile inflammation: essential role of danger associated molecular patterns. **Brain, Behavior, and Immunity**, 2017.

FREY, V. Abhandlungen der Königl. Sächsische. **Gesellschaft der Wissenschaften**, v. 23, p. 188, 1896.

GANDHI, N. A. et al. Targeting key proximal drivers of type 2 inflammation in disease. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 15, n. 1, p. 35–50, 2015.

GATIS-CARRAZZONI, A. S. S. G. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of the leaf methanol extract of *Miconia minutiflora* (Bonpl.) DC. and characterization of compounds by UPLC-DAD-QTOF-MS/MS. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, 2018.

GEHLEN, M. L. et al. Avaliação espectrofotométrica do azul de Evans na reação inflamatória da córnea: Estudo experimental em coelhos. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 67, n. 2, p. 219–225, 2004.

GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131–138, out. 1982.

HANSEN, D.; HARAGUCHI, M.; ALONSO, A. Pharmaceutical properties of “sucupira” (*Pterodon* spp). **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 46, n. 4, p. 607–616, 2010.

HARA, K. et al. Antioxidant activities of traditional plants in Sri Lanka by DPPH free radical-scavenging assay. **Data in Brief**, v. 17, p. 870–875, abr. 2018.

HERNÁNDEZ-PORRAS, B. C. et al. Complex regional pain syndrome: A review. **Cirurgía y Cirujanos (English Edition)**, v. 85, n. 4, p. 366–374, 2017.

HOCAYEN, P. DE A. S. et al. Avaliação da Toxicidade do extrato bruto metanólico de *Baccharis dracunculifolia* por meio do bioensaio com *Artemia salina*. **INSULA Revista de Botânica**, n. 41, p. 23–31, 2012.

HOSSEIN, TAJIK; TAMADDONFARD, ESMAEAL; NASRIN, H.-G. The Effect of Curcumin (Active Substance of Turmeric) on the Acetic Acid-Induced Visceral Nociception in Rats. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 11, p. 312–314, 2008.

IASP. Classification of chronic pain: descriptors of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. **Seattle: IASP Press**, v. 3, n. 2th ed, p. 1, 1994.

INNES, J. K.; CALDER, P. C. Omega-6 fatty acids and inflammation. **Prostaglandins Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v. 132, n. March, p. 41–48, 2018.

- JÄDERT, C. et al. Decreased leukocyte recruitment by inorganic nitrate and nitrite in microvascular inflammation and NSAID-induced intestinal injury. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 52, n. 3, p. 683–692, 2012.
- JI, R.-R.; XU, Z.-Z.; GAO, Y.-J. Emerging targets in neuroinflammation-driven chronic pain. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 13, n. 7, p. 533–548, 2014.
- JIANG, Q.; AMES, B. N. Proinflammatory Eicosanoids and Inflammation. **Control**, v. 05, 2018.
- JURÁŇOVÁ, J.; FRANKOVÁ, J.; ULRICHOVÁ, J. The role of keratinocytes in inflammation. **Journal of Applied Biomedicine**, 2017.
- KANG, C.-H. et al. 5-Hydroxy-3,6,7,8,3',4'-hexamethoxyflavone inhibits nitric oxide production in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia via NF- κ B suppression and Nrf-2-dependent heme oxygenase-1 induction. **Food and Chemical Toxicology**, v. 57, p. 119–125, jul. 2013.
- KHAN, M. F. et al. Design and synthesis of lupeol analogues and their glucose uptake stimulatory effect in L6 skeletal muscle cells. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 24, n. 12, p. 2674–2679, jun. 2014.
- KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 3, p. 159–175, 2013.
- KOSTER, R.; ANDERSON, M.; BEER, E. J. Acetic acid for analgesic screening. **Federation proceedings**, v. 18, p. 412–416, 1959.
- KVIETYS, P.; GRANGER, D. N. **Mediators and Mechanisms of the Increased Blood Flow, Vascular Permeability, and Blood Vessel Proliferation in Inflamed Tissue**. [s.l.] Elsevier Inc., 2014.
- LAI, C.-S. et al. Inhibitory effect of citrus 5-hydroxy-3,6,7,8,3',4'-hexamethoxyflavone on 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate-induced skin inflammation and tumor promotion in mice. **Carcinogenesis**, v. 28, n. 12, p. 2581–2588, 4 set. 2007.
- LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. Animal models of nociception. **Pharmacological Reviews**, v. 53, n. 4, p. 597–652, 2001.
- LEE, M. J. et al. Ethyl Pyruvate Attenuates Formalin-Induced Inflammatory Nociception by Inhibiting Neuronal ERK Phosphorylation. **Molecular Pain**, v. 8, p. 1744-8069-8–40, 10 set. 2012.
- LEI, Z.-Y. et al. Efficacy of *Aeschynomene indica* Linn leaves for wound healing and isolation of active constituent. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 228, n. April 2018, p. 156–163, 2018.
- LEMONICA, L. Farmacologia dos Opioides. **Prática Hospitalar**, v. 56, n. Mar-Abr, p. 129–135, 2008.
- LHULLIER, CINTIA; HORTA, PAULO ANTUNES; FALKENBERG, M. Avaliação de extratos de macroalgas bêmicas do litoral catarinense utilizando o teste de letalidade para *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p. 158–163, 2006.

- LI, F. S.; WENG, J. K. Demystifying traditional herbal medicine with modern approaches. **Nature Plants**, v. 3, n. July, p. 1–7, 2017.
- LÓPEZ-CANO, M. et al. Formalin Murine Model of Pain. **BIO-PROTOCOL**, v. 7, n. 23, 2017.
- LUCIANO, R.; FERRAZ, D. S.; SECA, L. POTENCIAL MEDICINAL EM ESPONTÂNEAS ENCONTRADAS EM AGROECOSSISTEMA DE PINHÃO MANSO SOB CONDIÇÃO SALINA. **TERRA: Qualidade de Vida, Mobilidade e Segurança**, v. 2, n. July, p. 13, 2015.
- LUNDBERG, J. O.; WEITZBERG, E.; GLADWIN, M. T. The nitrate-nitrite-nitric oxide pathway in physiology and therapeutics. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 7, n. 2, p. 156–167, 2008.
- MACHELSKA, H.; CELIK, M. Ö. Recent advances in understanding neuropathic pain: glia, sex differences, and epigenetics. **F1000Research**, v. 5, p. 2743, 2016.
- MAHAJAN, S. G.; MEHTA, A. A. Suppression of ovalbumin-induced Th2-driven airway inflammation by β -sitosterol in a guinea pig model of asthma. **European Journal of Pharmacology**, v. 650, n. 1, p. 458–464, jan. 2011.
- MANGGE, H. Antioxidants, inflammation and cardiovascular disease. **World Journal of Cardiology**, v. 6, n. 6, p. 462, 2014.
- MARIA, D. S. PLANTAS MEDICINAIS COM CARACTERÍSTICAS TÓXICAS USADAS PELA POPULAÇÃO DO MUNICÍPIO DE MORRETES, PR. **Revista Visão Acadêmica**, v. 2, n. 2, p. 77–80, 2011.
- MARREIROS, N. D. A. et al. CONHECIMENTO BOTÂNICO TRADICIONAL SOBRE PLANTAS MEDICINAIS NO SEMIÁRIDO DA PARAÍBA (NORDESTE , BRASIL) TRADITIONAL BOTANICAL KNOWLEDGE ON MEDICINAL PLANTS IN THE SEMIARID OF PARAÍBA STATE (BRAZILIAN NORTHEASTERN) No Nordeste brasileiro está localizada. **Revista Ouricuri**, v. 5, p. 110–144, 2015.
- MATTEI, VINÍCIUS GARCIA; SILVA, MARINA; BARROS, MARCUS LUIZ BARROSO; HUMMEL, ANTÔNIO CARLOS; FRANÇA, J. T. PLANO DE MANEJO FLORESTA NACIONAL CONTENDAS DO SINCORÁ: Informações Gerais Sobre a Floresta Nacional. **ICM-BIO**, v. I, n. Maio, p. 02-132, 2006.
- MAZZA, S.; FROT, M.; REY, A. E. A comprehensive literature review of chronic pain and memory. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 87, p. 183–192, dez. 2018.
- MCDONALD, M. K. et al. Functional significance of macrophage-derived exosomes in inflammation and pain. **Pain**, v. 155, n. 8, p. 1527–1539, 2014.
- MCENTIRE, D. M. et al. Pain transduction: a pharmacologic perspective. **Expert Review of Clinical Pharmacology**, v. 9, n. 8, p. 1069–1080, 2016.
- MCNAMARA, C. R. et al. TRPA1 mediates formalin-induced pain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 33, p. 13525–13530, 2007.
- MESQUITA, T. R. et al. Efeito anti-inflamatório da suplementação dietética com

- ácidos graxos ômega-3, em ratos. **Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor**, v. 12, n. 4, p. 337–341, 2011.
- MEYER, B. et al. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. **Planta Medica**, v. 45, n. 05, p. 31–34, 29 maio 1982.
- MITSI, V.; ZACHARIOU, V. Modulation of pain, nociception, and analgesia by the brain reward center. **Neuroscience**, v. 338, n. May, p. 81–92, 2016.
- MIYAMOTO, T. et al. TRPV3 regulates nitric oxide synthase-independent nitric oxide synthesis in the skin. **Nature Communications**, v. 2, n. 1, p. 312–369, 2011.
- MÓCSAI, A. Diverse novel functions of neutrophils in immunity, inflammation, and beyond. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 210, n. 7, p. 1283–1299, 2013.
- MORI, S. A. Manual de manejo do herbário fanerogâmico. **CEPLAC**, n. Ilhéus, BA, p. 103 p, 1989.
- MORRIS, C. J. Carrageenan-Induced Paw Edema in the Rat and Mouse. **Inflammation Protocols**, v. 225, p. 115–122, 2003.
- MOWAT, A. M.; SCOTT, C. L.; BAIN, C. C. Barrier-tissue macrophages: functional adaptation to environmental challenges. **Nature Medicine**, v. 23, n. 11, p. 1258–1270, 2017.
- NAGEM, T. J. EFEITO DE FLAVONÓIDES NO METABOLISMO. **Medicina, Riberão Preto**, v. 35, n. abr./jun., p. 127–133, 2002.
- NAPIMOGA, M. H. et al. Lonchocarpus sericeus lectin decreases leukocyte migration and mechanical hypernociception by inhibiting cytokine and chemokines production. **International Immunopharmacology**, v. 7, n. 6, p. 824–835, jun. 2007.
- NATHAN, C. Points of control in inflammation. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 846–852, 2002.
- NICKLISCH, S. C. T.; WAITE, J. H. Optimized DPPH assay in a detergent-based buffer system for measuring antioxidant activity of proteins. **MethodsX**, v. 1, p. 233–238, 2014.
- NUNES, B. S.; RENSONNET, N. S.; DAL-SECCO, D.; VIEIRA, S. M.; CAVADA, B. S.; TEIXEIRA, E. H.; MOURA, T. R.; TEIXEIRA, C. S.; CLEMENTE-NAPIMOGA, J. T.; CUNHA, F. Q.; NAPIMOGA, M. H. Lectin extracted from *Canavalia grandiflora* seeds presents potential anti-inflammatory and analgesic effects. **Naunyn-Schmied Arch Pharmacol**, v. 379, p. 609–616, 2009.
- OCHWANG'I, D. O. et al. Medicinal plants used in treatment and management of cancer in Kakamega County, Kenya. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 151, n. 3, p. 1040–1055, 2014.
- OLIVEIRA, A. A.; YATSUDA, R.; CRUZ, M. P. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA DO EXTRATO ETANÓLICO DO CAULE DE *Aeschynomene martii* BENTH (TRIPA DE GALINHA). **Dissertação de Mestrado - Universidade Federal da Bahia**, p. 98, 2016.

- OLIVEIRA, F. Q. Conhecimento sobre plantas medicinais e fitoterápicos e potencial de toxicidade por usuários de Belo Horizonte, Minas Gerais. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 36–41, 2006.
- OLIVEIRA, M. et al. Aplicação de Terpenos como Agentes Analgésicos: uma Prospecção Tecnológica. **Revista GEINTEC - Gestão, Inovação e Tecnologias**, v. 4, n. 4, p. 1292–1298, 2014.
- PAN, F. et al. Fungal endophyte-derived *Fritillaria unibracteata* var. *wabuensis*: Diversity, antioxidant capacities in vitro and relations to phenolic, flavonoid or saponin compounds. **Scientific Reports**, v. 7, n. 211, p. 1–14, 2017.
- PAN, M.-H. et al. 5-Hydroxy-3,6,7,8,3',4'-hexamethoxyflavone Induces Apoptosis through Reactive Oxygen Species Production, Growth Arrest and DNA Damage-Inducible Gene 153 Expression, and Caspase Activation in Human Leukemia Cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 13, p. 5081–5091, jun. 2007.
- PAN, Y. et al. Estudo preliminar da atividade antibacteriana das cascas de *Erythrina velutina* Willd., Fabaceae (Leguminosae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 22, n. 6, p. 776–780, 2009.
- PAPAYANNOPOULOS, V. Neutrophil extracellular traps in immunity and disease. **Nature Reviews Immunology**, p. 1–14, 2017.
- PATEL, S. et al. Preparation and optimization of chitosan-gelatin films for sustained delivery of lupeol for wound healing. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107, p. 1888–1897, fev. 2018.
- PATRIDGE, E. et al. An analysis of FDA-approved drugs: Natural products and their derivatives. **Drug Discovery Today**, v. 21, n. 2, p. 204–207, 2016.
- PERAZA, G. G. et al. O Potencial Antinociceptivo dos Produtos de Origem Natural. **Vittale - Revista de Ciências da Saúde**, v. 19, n. 1, p. 35–44, 2007.
- PEREIRA, C. et al. Toxicity of herbal medicines with interest to SUS : a review. **Ciências Biológicas e da Saúde, Londrina**, v. 37, n. 1, p. 83–96, 2016.
- PING, C. P. et al. Antinociceptive effects of cardamonin in mice: Possible involvement of TRPV1, glutamate, and opioid receptors. **Molecules**, v. 23, n. 9, p. 1–14, 2018.
- PINHO-RIBEIRO, F. A.; VERRI, W. A.; CHIU, I. M. Nociceptor Sensory Neuron–Immune Interactions in Pain and Inflammation. **Trends in Immunology**, v. 38, n. 1, p. 5–19, 2017.
- PLANTIER, J.-L. et al. Comparison of antioxidant properties of different therapeutic albumin preparations. **Biologicals**, v. 44, n. 4, p. 226–233, jul. 2016.
- QIU, P. et al. The inhibitory effects of 5-hydroxy-3,6,7,8,3',4'-hexamethoxyflavone on human colon cancer cells. **Molecular Nutrition & Food Research**, v. 55, n. 10, p. 1523–1532, out. 2011.
- RAZAVI, B. M.; HOSSEINZADEH, H. A review of the role of orexin system in pain modulation. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 90, p. 187–193, 2017.

REGO, E. A. Avaliação da Actividade Anti-inflamatória de Plantas dos Açores. **UNIVERSIDADE DOS AÇORES DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS TECNOLÓGICAS E DESENVOLVIMENTO**, p. 101, 2012.

SALEEM, M. Lupeol, a novel anti-inflammatory and anti-cancer dietary triterpene. **Cancer Letters**, v. 285, n. 2, p. 109–115, nov. 2009.

SÁNCHEZ-BURGOS, J. A. et al. Isolation of lupeol from white oak leaves and its anti-inflammatory activity. **Industrial Crops and Products**, v. 77, p. 827–832, dez. 2015.

SANTOS, D. DOS; MARTA, I.; CÁRNIO, E. Utilização de um modelo experimental para estudo sobre o toque terapêutico. **Latino-Americana de ...**, v. 21, n. 1, p. 1–8, 2013.

SEKI, H. et al. Resolvins as Regulators of the Immune System. **The Scientific World JOURNAL**, v. 10, p. 818–831, 2010.

SERHAN, C. N.; CHIANG, N.; VAN DYKE, T. E. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 5, p. 349–361, 2008.

SEWELL, G. W.; MARKS, D. J. B.; SEGAL, A. W. The immunopathogenesis of Crohn's disease : a three-stage model. **Europe PMC Funders Group**, v. 21, n. 5, p. 506–513, 2015.

SHAALA, N. M. A. et al. Lethal Concentration 50 (LC50) and Effects of Diuron on Morphology of Brine Shrimp *Artemia Salina* (Branchiopoda: Anostraca) Nauplii. **Procedia Environmental Sciences**, v. 30, p. 279–284, 2015.

SILVA, C. G. et al. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais em área de Caatinga na comunidade do Sítio Nazaré, município de Milagres, Ceará, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 1, p. 133–142, 2015.

SILVA, S. L. DA et al. Avaliação da toxicidade aguda pré-clínica do extrato metanólico das cascas do caule de *Parahancornia amapa* (Apocynaceae). **Acta Amazonica**, v. 46, n. 1, p. 73–80, 2016.

SILVA, Í. C. Neutrófilos : Aspectos Clássicos , Plasticidade E Novas Funções Imunorregulatórias. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais**, p. 35–46, 2015.

SILVA, J. C. et al. Modelos experimentais para avaliação da atividade antinociceptiva de produtos naturais : uma revisão Experimental models for evaluation of antinociceptive activity of natural products : a review. **Rev. Bras. Farm.**, v. 94, n. 1, p. 18–23, 2013.

SILVA, M. C. C. et al. Acute and topic anti-edematogenic fractions isolated from the seeds of *Pterodon pubescens*. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 56, n. 1, p. 135–141, jan. 2004.

SILVA, M.; TUROLLA, R. Avaliação dos aspectos toxicológicos dos fitoterápicos: um estudo comparativo. **Toxicologia e Análises Toxicológicas**, p. 145, 2004.

- SILVA, S. et al. Conhecimento e uso de plantas medicinais em uma comunidade rural no município de Cuitegi , Paraíba , Nordeste do Brasil. **Gaia Scientia**, v. 8, n. 1, p. 248–265, 2014.
- SIMOPOULOS, A. P. Genetic variants in the metabolism of omega-6 and omega-3 fatty acids: their role in the determination of nutritional requirements and chronic disease risk. **Experimental Biology and Medicine**, v. 235, n. 7, p. 785–795, jul. 2010.
- SINGH, M. et al. Anti-inflammatory activity of aqueous extract of *Mirabilis jalapa* Linn. leaves. **Pharmacognosy Research**, v. 2, n. 6, p. 364, 2010.
- SIQUEIRA, J. M. DE; PEREIRA, M. D. B. E N. F. G. ESTUDO FITOQUÍMICO DE UNONOPSIS LINDMANII - ANNONACEAE, BIOMONITORADO PELO ENSAIO DE TOXICIDADE SOBRE A ARTEMIA SALINA LEACH. **Symposium A Quarterly Journal In Modern Foreign Literatures**, v. 21, n. 5, p. 557–559, 1998.
- SITI, H. N.; KAMISAH, Y.; KAMSIAH, J. The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review). **Vascular Pharmacology**, v. 71, p. 40–56, 2015.
- SOEHNLEIN, O. et al. Neutrophils as protagonists and targets in chronic inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 4, p. 248–261, 2017.
- SOEHNLEIN, O.; LINDBOM, L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, n. 6, p. 427–439, 2010.
- SOUSA, C. M. D. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quimica Nova**, v. 30, n. 2, p. 351–355, 2007.
- SOUZA, M. C. DE et al. O gênero *Aeschynomene* L . (Leguminosae , Faboideae , Dalbergieae). p. 198–210, 2012.
- SRIRAMAN, S. et al. Identification of beta-sitosterol and stigmasterol in *Bambusa bambos* (L.) Voss leaf extract using HPLC and its estrogenic effect in vitro. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 115, p. 55–61, nov. 2015.
- STEPHENSON, J. A. et al. The Multifaceted Effects of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids on the Hallmarks of Cancer. **Journal of Lipids**, v. 2013, p. 1–13, 2013.
- SZABÓ, C.; ISCHIROPOULOS, H.; RADI, R. Peroxynitrite: Biochemistry, pathophysiology and development of therapeutics. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 6, n. 8, p. 662–680, 2007.
- TAYLOR, C. T.; COLGAN, S. P. Regulation of immunity and inflammation by hypoxia in immunological niches. **Nature Reviews Immunology**, 2017.
- TEIXEIRA, M. J. Fisiopatologia da nocicepção e da supressão da dor. **Dor: Princípios e prática**, p. 205, 2001.
- THURSTON, G. et al. Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage. **Nature Medicine**, v. 6, n. 4, p. 460–463, 1 abr. 2000.

- TJØLSEN, A. et al. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, v. 51, n. 1, p. 5–17, out. 1992.
- TUROLLA, M. S. DOS R.; NASCIMENTO, E. DE S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 2, p. 289–306, 2006.
- VACHER, J.; DUCHÊNE-MARULLAZ, P.; BARRAT, P. A propos de quelques produits usuels. Comparaison de deux méthodes d'étude des analgésiques. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 11, p. 51–58, 1964.
- VEIGA, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: Cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519–528, 2005.
- WAGNER, HILDEBERT; BLADT, S. Plant Drug Analysis - A Thin Layer Chromatography Atlas. **Springer Science & Business Media**, p. 385, 2001.
- WARD, P. A. Oxidative stress: acute and progressive lung injury. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1203, n. 1, p. 53–59, ago. 2010.
- WENG, J. K.; PHILIPPE, R. N.; NOEL, J. P. The rise of chemodiversity in plants. **Science**, v. 336, n. 6089, p. 1667–1670, 2012.
- WICK, M. J. et al. An Optimized Evans Blue Protocol to Assess Vascular Leak in the Mouse. **Journal of Visualized Experiments**, n. 139, 12 set. 2018.
- WORDS, E. Y. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Rev Ass Med Brasil**, v. 46, n. 3, p. 265–271, 2000.
- XIA, S. et al. Melanoma growth is reduced in fat-1 transgenic mice: Impact of omega-6/omega-3 essential fatty acids. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 33, p. 12499–12504, 15 ago. 2006.
- XU, G. et al. Interaction of fatty acids with oxidation of cholesterol and β -sitosterol. **Food Chemistry**, v. 124, n. 1, p. 162–170, jan. 2011.
- YADAV, M. et al. Protective effects of stigmasterol against ketamine-induced psychotic symptoms: Possible behavioral, biochemical and histopathological changes in mice. **Pharmacological Reports**, v. 70, n. 3, p. 591–599, jun. 2018.
- YATSUDA, R. et al. Effects of Mikania genus plants on growth and cell adherence of mutans streptococci. **Journal Ethnopharmacology**, v. 97, p. 83–189, 2005.
- YIN, Y. et al. Beta-sitosterol and its derivatives repress lipopolysaccharide/ d - galactosamine-induced acute hepatic injury by inhibiting the oxidation and inflammation in mice. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 28, n. 9, p. 1525–1533, maio 2018.
- YUK, J. E. et al. Effects of lactose- β -sitosterol and β -sitosterol on ovalbumin-induced lung inflammation in actively sensitized mice. **International Immunopharmacology**, v. 7, n. 12, p. 1517–1527, dez. 2007.
- ZHONG, J. et al. Mannan-induced Nos2 in macrophages enhances IL-17-driven psoriatic arthritis by innate lymphocytes. **Science Advances**, v. 4, n. 5, 2018.

ZHU, Y. et al. The pentacyclic triterpene Lupeol switches M1 macrophages to M2 and ameliorates experimental inflammatory bowel disease. **International Immunopharmacology**, v. 30, p. 74–84, jan. 2016.

ANEXO A – Reveladores para CCD

Ferrocianeto de potássio 1% (m/v) (WAGNER; BLADT, 2001)

A solução foi preparada pela dissolução de 0,10 g de ferrocianeto de potássio em 10 mL de água destilada e foi armazenada a -4°C.

Cloreto de Ferro III 2% (m/v) (WAGNER; BLADT, 2001)

O reagente foi preparado pela adição de 0,20 g de cloreto de ferro a 10 mL de água destilada e guardou-se a -4°C.

Reagente de Liebermann-Burchard (WAGNER; BLADT, 2001)

O reagente foi preparado pela adição cuidadosa de 5 mL de anidrido acético e 5 mL de ácido sulfúrico a 50 mL de etanol, enquanto se arrefece em gelo. O reagente foi preparado na altura do ensaio, devido à sua instabilidade.

Reagente de Wagner (BROSSI, 1988)

O reagente foi preparado pela dissolução de 1 g de iodo e 10 g de iodeto de potássio em 50 mL de água destilada e pela adição de 2 mL de ácido acético glacial. O volume foi completo até 100 mL com água destilada.

ANEXO B – TERMO DE APROVAÇÃO CEUA

Página 1 de 1



Universidade Federal da Bahia
 Instituto Multidisciplinar em Saúde - Campus Anísio Teixeira
 COMISSÃO DE ÉTICA EM USO DE ANIMAIS
 (CEUA - IMS/CAT - UFBA)


PROJETO DE PESQUISA - Protocolo 055/2018 - Apreciação em 14/06/2018 – Aprovado sem restrições

Título: Avaliação da atividade anti-inflamatória, ansiolítica e ou sedativa das frações do extrato do caule de *Aeschynomene martii* Benth (Tripa de Galinha).

Protocolo: 055/2018

Pesquisador: Regiane Yatsuda

Instituição: Instituto Multidisciplinar em Saúde - Campus Anísio Teixeira – UFBA

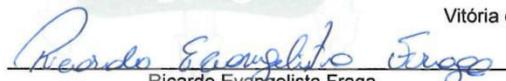
CERTIFICADO

A Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA - IMS/CAT - UFBA) certifica que o projeto de pesquisa "Avaliação da atividade anti-inflamatória, ansiolítica e ou sedativa das frações do extrato do caule de *Aeschynomene martii* Benth (Tripa de Galinha)", Protocolo nº 055/2018, da pesquisadora Regiane Yatsuda, que foi submetido à avaliação desta Comissão, está de acordo com os princípios éticos da experimentação animal e foi aprovado na 20ª reunião ordinária no dia 14/06/2018.

CERTIFICATE

The Committee on Ethics in Animal Use (CEUA - IMS / CAT - UFBA) certifies that the research project "Evaluation of the anti-inflammatory, anxiolytic and or sedative activity of the fractions of the stem extract of *Aeschynomene martii* Benth (Chicken Gut) ", Protocol No. 055/2018, by researcher Regiane Yatsuda, which was submitted to the evaluation of this Commission, is in accordance with the ethical principles of animal experimentation and was approved at the 20th ordinary meeting on 06/14/2018.

Vitória da Conquista, 14 de junho de 2018.


 Ricardo Evangelista Fraga
 Coordenador CEUA - IMS/CAT – UFBA