

UFRRJ

**INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

DISSERTAÇÃO

**Avaliação da atividade anti-inflamatória e antinociceptiva dos extratos
brutos metanólicos da *Eugenia uvalha* Cambess (uvaia)**

Mírian Eliza Alves de Souza

2017



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E
ANTINOCICEPTIVA DOS EXTRATOS BRUTOS METANÓLICOS DA
EUGENIA UVALHA CAMBESS (UVAIA)**

MÍRIAN ELIZA ALVES DE SOUZA

Sob orientação do professor
Wellington da Silva Côrtes

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre em Ciências Fisiológicas**, no curso de pós-graduação de ciências fisiológicas, área de concentração Farmacologia

Seropédica, RJ
Fevereiro, 2017

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S725a Souza, Mirian Eliza Alves de, 1983-
Avaliação da atividade anti-inflamatória e
antinociceptiva dos extratos brutos metanólicos da
Eugenia uvalha Cambess (uvaia) / Mirian Eliza Alves de
Souza. - 2017.
89 f.

Orientador: Wellington da Silva Côrtes.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro, Programa de Pós-graduação em
Ciências Fisiológicas, 2017.

1. Eugenia Uvalha Cambess. 2. extrato metanólico
das folhas. 3. antinociceptivo. 4. anti-inflamatório.
5. antiedematogênico. I. Côrtes, Wellington da Silva,
1964-, orient. II Universidade Federal Rural do Rio
de Janeiro. Programa de Pós-graduação em Ciências
Fisiológicas III. Título.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS

MÍRIAN ELIZA ALVES DE SOUZA

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, área de concentração farmacologia.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 22/02/2017:

Wellington da Silva Côrtes, Dr. (UFRRJ)
(Orientador)

Maria Eline Matheus, Dr. (UFRJ)

Bruno Guimarães Marinho, Dr. (UFRRJ)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a meu avô Pedro Alves de Souza (*in memoriam*) que além de exemplo pessoal foi um farmacêutico, que mesmo com toda dificuldade de seu tempo não deixou de assistir os que o procuravam.

AGRADECIMENTO

Agradeço primeiramente a Deus, pelo dom da vida e pela força que me deu para vencer os obstáculos ao longo desta caminhada.

A Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas que proporcionaram a realização deste sonho bem como conhecer amigos que compartilharam a trilha árida da pesquisa brasileira.

A todos os mestres que passaram por minha vida e contribuíram com minha formação e aprendizado tanto acadêmico quanto pessoal, em especial ao meu orientador Dr. Wellington da Silva Côrtes que se dispôs nesta empreitada iluminar o estreito caminho do saber.

Aos doutores Bruno Guimarães Marinho e Maria Eline Matheus que se dispuseram a formação desta banca, a revisão deste trabalho cuja as contribuições certamente serão fundamentais para avanço desta pesquisa.

Aos colegas de laboratório que me auxiliaram no aprendizado e realização dos diversos experimentos, compartilhando tanto o saber quanto as dúvidas inquietantes que nos conduziram a construção desta dissertação.

Ao meu marido, Reinaldo Ramos Silva, que se abdicou da minha presença em prol do tempo necessário para este passo na carreira acadêmica, e foi à grande inspiração para a mudança no prumo de minha caminhada profissional, além de ser meu companheiro de todas as horas com grande amor.

Aos meus pais José Alves de Souza e Balbina Amancio de Souza, pelo exemplo, formação ética e pelos princípios a mim ensinados. As minhas irmãs Leonor Eliza e Sandra Eliza (*in memoriam*) pelo compartilhar do aprendizado em família.

A todos que contribuíram para a construção deste sonho e não foram mencionados nominalmente, meu profundo agradecimento por cada passo.

EPÍGRAFE

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”

Madre Teresa de Calcutá (1910 – 1997)

VII

RESUMO

SOUZA, Mírian Eliza Alves de. **Avaliação da atividade anti-inflamatória e antinociceptiva dos extratos brutos metanólicos da *Eugenia uvalha* Cambess (uvaia)**. 89p Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas, Farmacologia e Fisiologia) Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

Desde tempos remotos a humanidade procura nos vegetais a cura para diversos males, este conhecimento hoje está inserido no uso popular de diversas plantas, dentre as quais no Brasil, destaca-se a *Eugenia uvalha* Cambess que é empregada no combate a processos inflamatórios dentre outras doenças, servindo este processo empírico de rastilho para esta investigação científica, objetivou-se estabelecer a segurança do uso, o efeito anti-inflamatório e antinociceptivo dos extratos metanólicos das folhas (EMF) e do caule (EMC). Para os experimentos foram utilizados camundongos *Swiss Webster*, machos e adultos, mantidos sob respeito a todas as normas vigentes para experimento com animais. Com finalidade de determinar a segurança do uso empregou-se o ensaio de toxicidade aguda (dose simples) que não apresentou nenhum efeito tóxico para os dois extratos na dose de 1000 mg/kg. Para determinar a atividade antinociceptiva executou-se o método das contorções induzidas por ácido acético para avaliar nocicepção onde foram utilizadas as doses de 10, 30, 100, 300 e 1000 mg/kg, o EMF inibiu as contorções acumuladas respectivamente 29,37±3,32; 40,18±10,44; 33,38±4,22; 55,12±2,69 e 68,94±3,42% sendo possível determinar a DI₅₀ em 308 mg/kg. O EMC nas mesmas doses não produziu resultado de inibição das contorções abdominais. Utilizou-se o método da formalina para investigar o mecanismo de inibição das contorções do EMF e confirmar a ausência deste tipo de atividade para o EMC. Na primeira fase, avaliativa da nocicepção neurogênica, do método da formalina os extratos não produziram alterações no tempo de reação, enquanto na segunda fase (nocicepção inflamatória) do método, o EMC confirmou a ausência dos efeitos antinociceptivos, o EMF nas doses de 100, 300 e 1000 mg/kg diminuiu o tempo de reação em 96,20±1,96; 97,93±1,94 e 98,34±1,44%, respectivamente, apresentando desempenho semelhante à indometacina. Para avaliar as propriedades anti-inflamatórias do EMF foi conduzido o método da pleurisia induzida por carragenina para as doses 30, 100 e 300 mg/kg afim de se obter o exsudato, a partir deste avaliou-se a migração leucocitária por contagem na câmara de Neubauer (EMF e EMC), e quantificação do mediador TNF α por ELISA (EMF), o EMF inibiu a migração leucocitária em 83,16±7,56% e reduziu a quantidade de TNF α em 70,27±8,00% para a dose de 300 mg/kg, sendo que a inibição de TNF α se mostrou constante para todas as doses utilizadas, os resultados para as doses de EMC neste método não produziram inibição da migração leucocitária. Na avaliação da atividade antiedematogênica para o EMF utilizou-se o método do edema de pata induzido por carragenina, histamina e serotonina, e este na dose de 300 mg/kg inibiu o edema em 58,44±5,08; 46,74±10,00 e 50,96±3,52%, respectivamente. Utilizou-se de roda giratória e campo aberto para avaliar-se algum efeito motor ou sobre o sistema nervoso central para o EMF na dose de 300 mg/kg e o mesmo não causou ou demonstrou nenhuma alteração motora ou da atividade exploratória enquanto o controle positivo diazepam promoveu redução de tempo de permanência na roda giratória em 50,0% e no campo aberto promoveu alterações que sugerem um efeito ansiolítico deste fármaco. Com base nos resultados descritos acima pode-se concluir que o EMF da *Eugenia uvalha* possui efeito antinociceptivo e este está diretamente relacionado ao efeito anti-inflamatório semelhante ao da indometacina e antiedematogênico observado para este extrato, com baixa toxicidade e sem efeitos sobre o sistema nervoso central. Os resultados obtidos no presente estudo contribuem para explicar que, pelo menos em parte, o uso medicinal de partes da planta em processos inflamatórios possuem embasamento científico devido às atividades anti-nociceptiva, antiedematogênicas e anti-inflamatórias aqui demonstradas.

Palavras-chaves: *Eugenia Uvalha* Cambess; extrato metanólico das folhas; antinociceptivo; anti-inflamatório; antiedematogênico

ABSTRACT

SOUZA, Mirian Eliza Alves de. **Evaluation of the anti-inflammatory and antinociceptive activity of the crude methanolic extracts of *Eugenia uvalha* Cambess (uvaia)**. 89p Dissertation (Master in Physiological Sciences, Pharmacology and Physiology) Institute of Biological Sciences and Health, Department of Physiological Sciences, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

*Since remote times, mankind has sought in plants the cure for various evils, this knowledge today is inserted in the popular use of various plants, among which, in Brazil, stands *Eugenia uvalha* Cambess out, that is used in the combat of inflammatory processes among other diseases, serving this empirical process of fuse for this scientific investigation, it aimed establish the safety of use, anti-inflammatory and antinociceptive effects of methanolic leaf extracts (MLE) and the stem (MSE). For the experiments were used Swiss Webster mice, male and adult, maintained in compliance with all current standards for animal experiments. In order to determine the safety of the use, it was used the acute toxicity test (single dose) which showed no toxic effect for the two extracts at the dose of 1000 mg/kg. To determine the antinociceptive activity, was performed the induced contortion method by acetic acid to evaluate nociception which doses of 10, 30, 100, 300 and 1000 mg/kg were used, the MLE inhibited the cumulative contortions, respectively 29.37±3.32; 40.18±10.44; 33.38±4.22; 55.12±2.69 and 68.94±3.42% it being possible to determine the DI_{50} at 308 mg/kg. The MSE at the same doses did not produce result of inhibition of the abdominal contortions. It was used the formalin method to investigate the mechanism of inhibition of MLE contortions and to confirm the absence of this type of activity for the EMC. In the first phase, evaluating of neurogenic nociception, of formalin method, the extracts did not produce changes in the reaction time, while in the second phase (inflammatory nociception) of the method, the MSE confirmed the absence of antinociceptive effects, the EMF at doses of 100, 300 and 1000 mg/kg decreases the reaction time by 96.20±1.96; 97.93±1.94 and 98.34±1.44% %, respectively, presenting performance like the indomethacin. To evaluate the anti-inflammatory properties of EMF, the induced pleurisy method by carrageenan was conducted for the doses 30, 100 and 300 mg/kg in order to obtain the exudates, from which, the leukocyte migration by counting in the Neubauer camera (MSE and MLE) was evaluated, and quantification of the TNF α mediator by ELISA (MLE), the MLE inhibited leukocyte migration in 83.16±7.56% and reduced the amount of TNF α from 70.27±8.00% to the dose of 300 mg/kg, the inhibition of TNF α show itself constant for all the doses used, the results for EMC doses in this method did not produce inhibition of leukocyte migration. In the evaluation of the anti-fungence activity for the MLE, it was used the paw edema method induced by carrageenan, histamine and serotonin, and this at the dose of 300 mg/kg inhibited the edema in 58,44±5,08; 46,74±10,00 and 50,96±3,52%. It was used a rotating wheel and open field to evaluate some motor effect or central nervous system for the MLE at the dose of 300 mg/kg and it did not cause or demonstrate any motor or exploratory activity alteration while the diazepam positive control promoted reduction of the permanency time in the rotating wheel in 50.5% and in the open field promoted alterations that suggest an anxiolytic effect of this drug. Based on the results described above, it can be concluded that the MLE of *Eugenia uvalha* has antinociceptive effect and it is directly related to the anti-inflammatory effect similar to the indomethacin and antiedematogenic observed for this extract, with low toxicity and no effects on the central nervous system. Therefore, the results obtained in the present study contribute to explain that, at least in part, the medicinal use of plant parts in inflammatory processes has a scientific basis due to the anti-nociceptive, anti-nematode and anti-inflammatory activities demonstrated here.*

*Keywords: *Eugenia Uvalha* Cambess; Methanolic extract from leaves; Antinociceptive; Anti-inflammatory; Antiedematogenic*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Características morfoanatômicas da <i>Eugenia uvalha</i> Cambess;.....	6
Figura 2 – Respostas desencadeadas pelo processo inflamatório;	10
Figura 3 - Processo com múltiplas etapas da migração de neutrófilos ao logo dos vasos sanguíneos	12
Figura 4 – Geração de metabolitos do Ácido Araquidônico;.....	15
Figura 5 – Principais classes de dor em relação ao estímulo;	25
Figura 6 - Estímulos nocivos, caminhos de reconhecimento microbiano e inflamatório desencadeiam a ativação do sistema nervoso periférico	27
Figura 7 – Transmissão e processamento da dor;.....	28
Figura 8 – Esquema do ensaio de toxicidade aguda;.....	33
Figura 9 – Esquema do método de contorções abdominais induzidas por ácido acético;	34
Figura 10 – Esquema do método de formalina.....	36
Figura 11 – Esquema do método de pleurisia induzida por carragenina	37
Figura 12 – Esquema do método de edema de pata induzido por carragenina	38
Figura 13 – Resultados das contorções abdominais induzidas por ácido acético para o EMF44	
Figura 14 - Resultados das contorções abdominais induzidas por ácido acético para o EMC	45
Figura 15 – Resultados do método da formalina do EMC.....	47
Figura 16 – Resultado do método da formalina para EMF	48
Figura 17 – Contagem de Leucócitos no exsudato sob ação do EMC	50
Figura 18 - Contagem de Leucócitos no exsudato sob ação do EMC	50
Figura 19 – Concentração de TNF α no exsudato da pleurisia induzida por carragenina;	52
Figura 20 – Evolução do edema de pata induzido por carragenina.....	53
Figura 21 – Edema de pata induzido por carragenina (Área sob a curva).....	54
Figura 22 - Evolução do edema de pata induzido por histamina	55
Figura 23 – Edema de pata induzido por histamina em 1 hora	55
Figura 24 – Evolução do edema de pata induzido por Serotonina	56
Figura 25 – Edema de pata induzido por serotonina em 1 hora	56
Figura 26 – Tempo de permanência na roda giratória (<i>rota-rod</i>)	58
Figura 27 – Número de quedas no método da roda giratória (<i>rota-road</i>).....	59

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Levantamento de pesquisas científicas com o gênero <i>Eugenia</i>	2
Tabela 2 – Estudos anteriores sobre atividade biológica da <i>Eugenia uvalha</i> Cambess	7
Tabela 3 – Prostaglandina e seus efeitos biológicos na inflamação	16
Tabela 4 – Via da lipoxigenase e as principais ações na inflamação.....	17
Tabela 5 – Outros mediadores inflamatórios.....	23
Tabela 6 – Classificação da nocicepção quanto ao mecanismo de origem.....	24
Tabela 7 – Outros Ensaio de toxicidade	41
Tabela 8 – Contorções abdominais induzidas por ácido acético	43
Tabela 9 - Resultados das contorções abdominais induzidas por ácido acético para o EMF e EMC.....	45
Tabela 10 - Resultados do método da formalina para o EMC	47
Tabela 11 - Resultados do método da formalina para o EMF	48
Tabela 12 - Resultados do método de pleurisia - contagem leucocitária do exsudato	51
Tabela 13 - Resultados do método de edema de pata induzido por carragenina.....	53
Tabela 14 - Área sob a curva para o edema de pata induzido por carragenina	54
Tabela 15 - Área sob a curva para o edema de pata induzido por histamina e serotonina	57
Tabela 16 - Resultados do método roda giratória.....	59
Tabela 17 – Resultados do método de campo aberto.....	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

µg – micrograma

5 –HETE – Hidroxieicosatetraenoico

5- HT – 5 hidroxitriptamina

5-HPETE – 5 hidroperoxieicosatetraenoico

5-HTR1 – Receptor 1 para 5-HT

5-HTR2 – Receptor 2 para 5-HT

5-HTR3 – Receptor 3 para 5-HT

5-HTR4 – Receptor 4 para 5-HT

5-HTR5 – Receptor 5 para 5-HT

5-HTR6 – Receptor 6 para 5-HT

5-HTR7 – Receptor 7 para 5-HT

a.C – Antes de Cristo

AA – ácido araquidônico (AA)

AGEPC – acetil-gliceril-éter-fosforilcolina

AINE – Anti-inflamatório não esteroide

ANOVA – análise de variância

ASP – *American Pain Society* (Sociedade Americana da Dor)

ATCC – *American Type Culture Collection* (Coleção de cultura padrão Americano)

C – Concentração

C5a – fragmento do componente complemento C5

Ca²⁺ - Cálcio

Cambess – Jacques Cambessèdes

Cox -1 – Cicloxigenase 1

Cox-2 – Cicloxigenase 2

DC – Depois de Candolle

DDPH – 1,2-difenil-2-picrilhidrazina

DI₅₀ – Dose inibitória de 50%

DO – Densidade óptica registrada

ELISA – *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (Ensaio de imunoabsorção enzimática)

EMC – Extrato metanólico do caule

EMF - Extrato metanólico da folha
EPM – Erro padrão da média
ERO – espécies reativas a oxigênio
E-selectinas – Selectina produzida no endotélio
GABA – ácido gama aminobutírico
H1 – Receptor de histamina 1
H4– Receptor de histamina 4
H2 – Receptor de histamina 2
H₂O₂ – peróxido de hidrogênio
H3 – Receptor de histamina 3
HIV – *Human Immunodeficiency Virus* (vírus da imunodeficiência humana)
IASP – *International Association for the Study of Pain* (Associação internacional para o estudo da dor).
ICAM-1 – Moléculas de adesão intercelular 1
IL-1 – interleucina-1
IL-10 – Interleucina 10
IL-6 – Interleucina-6
IL-8 – Interleucina -8
K⁺ - Potássio
kg – quilograma
L. – Carl von Linné
Lam. – Jean-Baptiste de Lamarck
L-selectinas – Selectina dos leucócitos
LTA₄ – leucotrieno A₄
LTB₄--leucotrieno B₄
LTC₄ – Leucotrieno C₄
LTD₄ – Leucotrieno D₄
LTE₄ – leucotrieno E₄
LXA₄ – Lipoxina A₄
LXB₄ – Lipoxina B₄
m/s – metros por segundo
mL – microlitro
Na⁺ - Sódio

NO – Óxido Nítrico
NOS – Óxido Nítrico Sintase
O.Berg. – Otto Karl Berg
OCI⁻ – hipoclorito
OH⁻ - hidroxila
ONOO⁻ – peroxinitrito.
P – Prostaciclina
p. – página
p.ex. – por exemplo
p/v – por volume
PA - pró-análise
PAF – Fator ativador de plaquetas
PBS – *phosphate buffered saline* (Tampão fosfato salino)
PECAM-1 – Molécula de adesão de célula endotelial e plaqueta
pg – Picograma
PGD – Prostaglandina D₂
PGE₂ – Prostaglandina E₂
PGF_{2 α} – Prostaglandina F_{2 α}
PGI₂ – Prostaglandina I₂
pH – Potencial de hidrogênio
P-Selectina – Selectina produzida pela plaqueta no endotélio
R²- coeficiente de determinação
SERT – *Sodium-dependent serotonin transporter*(transportador de serotonina dependente de sódio)
Spp – *species*(espécies)
SW55 – Swiss Webster
TNF – Fator de necrose tumoral
TXA₂ – Tromboxano A₂
UFRPE – universidade federal rural de Pernambuco
VCAM-1 – Moléculas de adesão vascular 1

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	4
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	5
3.1 <i>Eugenia Uvalha Cambess</i>	5
3.2 Inflamação.....	9
3.2.2 Mediadores químicos.....	14
3.2.3 Metábolitos do Ácido Araquidônico (AA).....	15
3.2.4 Histamina e Serotonina.....	18
3.2.5 Outros mediadores inflamatórios.....	20
3.2.6 Dor Inflamatória.....	24
4 MATERIAIS E METÓDOS.....	31
4.1 Animais.....	31
4.2 Drogas, Reagentes e Solventes.....	31
4.3 Extratos.....	32
4.4 Modelos experimentais.....	33
4.4.1 Ensaio de toxicidade aguda (dose simples).....	33
4.4.2 Contorções abdominais.....	34
4.4.3 Formalina.....	35
4.4.4 Pleurisia induzida por carragenina.....	36
4.4.5 Edema de pata.....	37
4.4.6 <i>Rota-rod</i>	39
4.4.7 Campo aberto.....	39
4.4.8 Análise Estatística.....	40
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	41
5.1 Ensaio de toxicidade aguda (dose simples).....	41
5.2 Contorções abdominais induzidas por ácido acético.....	43
5.3 Formalina.....	46
5.4 Pleurisia induzida por carragenina.....	49
5.5 Avaliação anti-edematogênica.....	52
5.6 <i>Rota-rod</i>	58
5.7 Campo Aberto.....	60
6 CONCLUSÕES.....	61
REFERÊNCIAS.....	63

1 INTRODUÇÃO

O homem registra a procura e processamento de medicamentos obtidos da natureza para amenizar seus males desde tempos remotos, como comprovam achados arqueológicos em diversas culturas antigas como as nozes de bétele no Timor e folhas de coca no Equador (DIAS, 2005). E os registros escritos da bíblia cristã como a mirra e alóes (Tomazzoni, 2004) e o papiro de Ebers que segundo Pinto et al. (2002) contém uma coleção de mais de 100 doença com seus respectivos preparos medicamentosos a partir de elementos vegetais e animais.

Viegas, Bolzani e Barreiro (2006) e Pinto et al. (2002) discutem a evolução da química medicinal moderna reconhecendo a grande contribuição dos fármacos sintéticos e o advento da química combinatória que gerou milhões de novas potencias moléculas, contudo este processo revelou-se altamente dispendioso e de baixíssimo aproveitamento terapêutico final, o que a partir da década de 2000 motivou a grande indústria farmacêutica à redescoberta principalmente dos vegetais como base para novos fármacos. Barreiro e Bolzani (2009) e Newman e Gragg (2012) afirmam que as plantas de forma geral desenvolveram ao longo da evolução diversos metabólitos secundários que lhe garantiram a sobrevivência, e este imenso “laboratório natural” já selecionou milhares de moléculas farmacologicamente ativas.

Neste contexto o Brasil destaca-se com sua enorme biodiversidade e potencialidade para novas descobertas. Tomazzoni (2004) lembra que em terras brasileiras há disseminado uso popular medicinal de uma infinidade de vegetais e que há interesse de aplicação por parte governamental destes na rede básica de saúde, carecendo, contudo de pesquisa que corroborem, desaprovem ou acrescentem a indicação popular dando-lhe segurança. Este vazio é também corroborado por Viegas, Bolzani e Barreiro (2006) que o justifica por diversos empecilhos financeiros e estruturais do país, mas reconhecem a crescente a partir da década de 1990 dos esforços de diversos pesquisadores ligados a linhas de pesquisa que envolve a química de produtos naturais.

O reconhecimento que o Brasil detém grande diversidade de flora com potencial inexplorado é apresentado numericamente e debatido em Tomazzoni (2004) e Viegas, Bolzani e Barreiro (2006), dentro desta exuberância destaca-se a família da *Myrtaceaes* que conta com mais de 3.500 representantes e 100 gêneros, dentro destes é proeminente a participação do

gênero *Eugenia*, quer seja pelo número de indivíduos, uso dos frutos como alimento, da madeira e na medicina popular (ARANTES e MONTEIRO, 2002).

Lamarca et al. (2013) faz um levantamento de trabalhos que relatam o uso do gênero *Eugênia* no Brasil, encontrando emprego em todas as regiões do país. Para a extração de madeira tem-se como exemplo o araçá da mata (*Eugenia paraensis* O. Berg.) e o catiguá (*Eugenia neomytifolia* Sobral), alimentar como o araçá boi (*Eugenia stipitata* McVauch) e o cambuí (*Eugenia arenaria* Cambess), ainda há espécimes utilizados para diversos fins na medicina popular como a aperta guela (*Eugenia lívida* O. Berg) e a cereja do Rio Grande do Norte (*Eugenia involucrata* DC). Podem-se destacar ainda representantes que se prestam aos três fatores como a Pitanga (*Eugenia uniflora* L.) e a Uvaia (*Eugenia uvalha* Cambess).

Além do uso popular como medicamento diversas *Eugenia spp.* já foram alvos de investigações científicas, como resumido na tabela 1:

Tabela 1 – Levantamento de pesquisas científicas com o gênero *Eugenia*

Nome popular	Nome científico	Atividade			
		Antibacteriana	Anti-inflamatória	Antioxidante	Antifúngica
Uvaia do visconde	<i>beaurepaireana</i> (<i>Kiaesrkou</i>) Legrand	X ¹	X ²	X ³	—
Grumixama	<i>brasiliensis</i> Lam.	X ¹	X ¹⁰	X ³	X ⁴
Baguaçu	<i>umbelliflora</i> Berg.	X ¹		X ³	X ⁴
Pitanga	<i>uniflora</i> Lam.	X ^{5,6}	X ⁹	X ⁹	X ⁵
Cagaiteira	<i>Dysenterica</i> DC	X ¹⁰	—	X ⁸	X ⁷
Uvaia	<i>Uvalha</i> Cambess	X ¹¹	—	X ¹²	X ¹³

Fonte: Elaborado a partir de: 1 – Benfatti et al. (2010); 2 – Magina et al. (2010); 3 – Magina et al. (2009 A) ; 4 – Magina et al. (2009 B); 5 – Pessinet al. (2003); 6 – Voss-Rechet al. (2011); 7 - Costa et al. (2000); 8 – Rocha et al. (2013); 9 - Consolini, Baldini e Amat (1999); 10 - Junqueira et al. (2007); 11 – Ferreira, Ferreira e Corrêa (2015); 12 – Silva et al. (2015); 13 – Souza et al. (2013); X – Pesquisa encontrada; -- ausência de pesquisa registrada no portal periódico capes até a execução da pesquisa em 15 de dezembro de 2016.

A tabela 1, embora não tenha finalidade de ser uma revisão fechada sobre o estado da arte científica em relação à *Eugenia spp.*, dado a grande quantidade de entes e outras atividades biológicas não exploradas nesta pesquisa, mas sim apresentar que ainda há lacunas a serem preenchidas em concordância com Lamarca (2013), menos de 20% das espécies deste gênero foram alvos de algum estudo farmacológico. Nota-se ainda que a maioria das *Eugénias* apresenta efeito anti-inflamatório o que corrobora os aspectos populares de uso levantados por Queiroz et al. (2015) e Lamarca et al. (2013).

A *Eugenia uvalha* Cambess, conhecida popularmente como uvaia, pode ser destacada neste cenário conforme o estudo etnofarmacológico de Lamarca et al. (2013) é empregada em todas as regiões do Brasil, seja como fonte de alimento, madeira e na medicinal popular. Albuquerque, Figuéredo e Cerqueira (2012) realizaram uma ampla pesquisa sobre o uso empírico da espécie, em resumo, aplicada por populares: “como adstringente e digestivo, seu chá ou infusão das folhas e cascas tem ação no controle da hipertensão, diminuição do colesterol e ácido úrico, emagrecimento, tratamento de HIV, tumores (câncer), malária e processos inflamatórios”, os próprios autores ressoam que o uso tradicional, mesmo que consagrado em certa região pela dimensão temporal, carece de pesquisa científica que confirme sua atividade biológica, determine sua segurança e doses de uso.

Neste contexto, conforme a necessidade alentada por Silva et al. (2015), esta pesquisa investigou as propriedades da *Eugenia uvalha* Cambess em relação aos processos inflamatórios agudos, em detrimento das demais indicações populares. Katzung et al. (2014) afirma que a inflamação é preocupação do homem desde tempos idos, relacionando-a com as guerras, contusões e quadros dolorosos, e embora seja uma reação de defesa natural do organismo pode ser em si um problema grave se não controlada, e o entendimento dos mecanismos não se encontram plenamente desvendados, estando intimamente relacionada a outras etiologias de traumas a infecções, que constituem um amplo campo de pesquisa. Há de destacar-se o esforço diletante que se empregaria para explorar todos os usos tradicionais no tempo de duração desta investida.

2 OBJETIVOS

O objetivo geral foi investigar as atividades anti-inflamatórias e antinociceptiva dos extratos metanólicos do caule e das folhas da *Eugenia uvalha* Cambess.

Para alcançá-lo alguns passos foram necessários e configuraram-se como objetivos específicos:

- Avaliar a toxicidade dos extratos empregando o protocolo de toxicidade aguda (dose única);
- Avaliar a atividade antinociceptiva empregando os métodos das contorções acumuladas abdominais acumuladas e formalina;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória através dos métodos da formalina, pleurisia e edema de pata;
- Avaliar a atividade antiedematogênica através do método de edema de pata;
- Avaliar a influência sobre a atividade locomotora induzida empregando o método da roda giratória;
- Avaliar a influência sobre a atividade locomotora espontânea, medo e ansiedade, por interferência do sistema nervoso central com o método de campo aberto;
- Quantificar o mediador químico TNF- α , com objetivo de determinar um dos possíveis mecanismos de ação anti-inflamatória.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 *Eugenia uvalha* Cambess

A *eugenia uvalha* Cambess pertence à família *myrtaceae* sendo conhecida popularmente pelo nome de uvaia ou ubaia, que conforme Ferreira, Ferreira e Corrêa (2015) derivam do tupi *iwa'ya* que significa fruto azedo, de acordo com *The Plant List* (2013) tendo como principal sinônima *Eugenia pyriformis* Cambess, sendo o último táxon em homenagem ao naturalista e botânico Jacques Cambessèdes (1799 – 1863).

Caracteriza-se botanicamente de acordo com Scalon, Scalon Filho e Rigoni (2004) como uma árvore que tem altura máxima entre seis a trezes metros de altura, possui copa arredondada, tronco geralmente ereto, entre 30 a 50 centímetros de diâmetro. Possui flores solitárias, de cor branca e floresce do mês de agosto a setembro. Os frutos, são formados por drupas globosas de cor amarela, carnosos e justapostos, ainda Justo et al. (2006) acrescenta que ocorre naturalmente de Minas Gerais ao Rio Grande do Sul, e também é encontrada no Paraguai e Argentina, sendo utilizada para reflorestamento devido ao seu rápido crescimento e frutificação, sendo possível seu plantio em outras regiões do país, a figura 1 apresenta registro fotográfico de Emmerich et al. (2014) que ilustram o espécime.

O seu fruto é utilizado para consumo *in natura*, e de preparos como sucos, geléias e doces em pastas, a composição físico-química oferece aos produtos boa impressão gustativa, olfativa e nutricional, sendo o teor de vitamina C na faixa de 33 a 39,5 mg 100⁻¹g (GIAROLA, 2011). Sua madeira é dura e densa sendo empregada localmente para carvão, mourões e postes (LAMARCA et al. 2013; SCALON, SCALON FILHO e RIGONI, 2004).

Na medicina popular é empregada empiricamente conforme Albuquerque, Figüêredo e Cerqueira (2012) na forma de chá ou infusão de suas folhas e cascas para controle da hipertensão, diminuição do colesterol e ácido úrico, emagrecimento, potencial de uso no tratamento da Síndrome da Imunodeficiência adquirida, tumores, malária e processos inflamatórios, Oliveira et al. (2007) também registra em acréscimo no uso nordestino o tratamento da gripe, febre e disenteria. O uso tradicional conforme Viegas, Bolzani e Barreiro (2006) servem como sinal para iniciar as pesquisas com critério científico, a fim de

estabelecer, a segurança e as condições de uso, bem como identificar o metabólito secundário responsável, a fim de replicá-lo tornando-o acessível.



Figura 1 – Características morfoanatômicas da *Eugenia uvalha* Cambess; (A) Uvaieiras em mata nativa do Município de São José do Cerrito, SC (setas). (B) Detalhe da inflorescência e característica das folhas. (C) Tronco avermelhado, liso e caule semi descamante, característico das mirtáceas. (D) Frutos maduros e amarelados. Fonte: Emmerich *et al.* (2014).

Seguindo esta trilha e aumentado o foco sobre o possível uso medicinal da *Eugenia uvalha* Cambess, outros pesquisadores registraram pesquisa anteriores que estão resumidas na tabela 2.

A fim de garantir a segurança no uso, um dos métodos mais importantes é a toxicidade, já que visam aferir qual o grau de segurança da substância teste bem como a letalidade. Silva et al. (2015) empregando o extrato etanólico das folhas empregou bioensaio de letalidade frente ao microcrustáceo *Artemia salina* Leach apresentando como atóxico até a concentração de $1000\mu\text{g mL}^{-1}$, contudo Emmerich et al. (2014) ofertou para consumo *in natura* frutos frescos a ovinos registrando letalidade após o quinto dia de consumo a uma taxa

de 45,85 kg/dia entretanto o exame histopatológico e dos níveis enzimáticos não revelaram alterações, sendo o quadro clínico indicativo de alteração neurológica.

A avaliação antimicrobiana empregada por Silva et al. (2015) frente às bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 e *Escherichia coli* ATCC 8739 após incubação de 24 horas a 37°C mesmo na dose máxima do experimento de 1000 µg mL⁻¹ não houve indução da propagação.

Tabela 2 – Estudos anteriores sobre atividade biológica da *Eugenia uvalha* Cambess

Objetivo	Extrato/Parte utilizada	Resultado
Avaliar toxicidade	Extrato etanólico das folhas ¹	Não apresentou toxicidade até a concentração de 1000 µg mL ⁻¹
	Frutos <i>in natura</i> ²	Letal após 5 dias com consumo de 45,85 kg/dia
Avaliação antimicrobiana	Extrato etanólico das folhas ¹	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538 – não houve inibição <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739 – não houve inibição
	Extrato etanólico de folhas, frutos e galhos ³	<i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> penicillinase + (7+) – não houve inibição <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 14458), <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Staphylococcus 8-</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228) e <i>Enterococcus aerogenes</i> (ATCC 27853) – inibida pelo extrato folha <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 14458), <i>Proteus vulgaris</i> , <i>Staphylococcus 8-</i> , <i>Staphylococcus epidermidis</i> (ATCC 12228), <i>Enterococcus aerogenes</i> (ATCC 27853) – inibida pelo extrato do galho
	Extrato hidroetanólico, das folhas, fruto, sementes e galhos ⁷	<i>Bacillus cereus</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Enterococcus faecalis</i> , <i>Micrococcus luteus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Enterobacter cloaca</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Proteus mirabilis</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Serratia marcescens</i> – foram inibidos pelo extrato da folha e não do caule
Avaliação antioxidante	Extrato metanólico da casca do tronco ⁴	Houve inibição de 70,68±0,95% dos radicais livres
	Suco do fruto ⁵	<i>In vitro</i> – inibição de 92% <i>In vivo</i> - redução significativa (p<0,05) nos marcadores sulfidrilas totais, de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico e proteína carbonilada
	Suco do fruto	<i>In vitro</i> – redução de 83%

Fonte: elaborado a partir de: 1 – Silva et al. (2015); 2 – Emmerich et al. (2014); 3 – Ferreira, Ferreira e Corrêa (2015); 4 - Lima (2011); 5 - Lopes (2014); 6 – Pereira et al. (2012); 7 – Chavasco et al. (2014)

Ferreira, Ferreira e Corrêa (2015) também analisaram a atividade do crescimento antimicrobiana utilizando três extratos etanólico do fruto, folha e galhos, utilizaram método de microdiluição e cultura na dose de 1mg/mL, confirmando e ampliando o resultado de Chavasco et al. (2014) não ocorrendo inibição da *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* penicillinase + (7+), contudo o extrato do fruto conseguiu inibir o crescimento da colônia dos microorganismos *Bacillus subtilis*, *Proteus vulgaris* e a *Enterococcus aerogenes* (ATCC 27853), para a folha *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* (ATCC 14458), *Proteus*

vulgaris, *Staphylococcus* 8-, *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) e *Enterococcus aerogenes* (ATCC 27853) e os galhos *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* (ATCC 14458), *Proteus vulgaris*, *Staphylococcus* 8-, *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Enterococcus aerogenes* (ATCC 27853).

Chavasco et al. (2014) realizou experimento com extrato hidroetanólico das folhas, caule, semente e fruto. Houve inibição do crescimento dos *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Enterobacter cloaca*, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia Marcescens* com o emprego da folha não registrando nenhum efeito do caule para esta seleção de microorganismos.

Embora com princípios de extratos diferentes verifica-se que o microrganismo *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus* foram inibidos tanto na pesquisa de Chavasco et al. (2014) quanto em Ferreira, Ferreira e Corrêa (2015). A *Escherichia coli* foi inibida em Chavasco et al. (2014) e, mas não nos estudos de Ferreira, Ferreira e Corrêa (2015) e Silva et al. (2015), sendo este autor também discordante para o *Staphylococcus aureus*, tais divergências podem ter origem na forma de extração.

Ferreira, Ferreira e Corrêa (2015) especulam que o resultado pode ser devido à presença do limoneno que conforme Maróstica Júnior e Pastore (2006) são um óleo essencial (terpeno) comum a mais de 300 espécies vegetais que os protegem contra-ataques microbianos. Já Chavasco et al. (2014) atribuem tal efeito a presença de taninos, saponinas, flavonoides e alcalóides, estes dois últimos segundo Haminiuk *et al.* (2012) possuem uma concentração cerca 80% maior em extratos de base hidroetanólica (na razão 1:1) do que as que utilizam base de etanol absoluto, o que concorda com resultados para outras plantas tropicais conforme levantamento realizado pelo autor. Em complemento Lima et al. (2010) isolou germacreno D e α -muroleno que são potentes agentes antimicrobianos para bactérias gram-positivas, presentes nos extratos.

A atividade antioxidante foi avaliada por Lima (2011), empregando o método de atividade sequestrante de radicais livres que simula as espécies reativas ao oxigênio (ERO) sendo o radical livre o DDPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazina), utilizando extrato metanólico da casca do tronco em concentrações variando de 25 a 250 $\mu\text{g/mL}$, obtendo uma inibição para a dose máxima de $70,68 \pm 0,95\%$.

Lopes (2014) avaliou o efeito do suco da *Eugenia Uvalha* Cambess sobre o estresse oxidativo em ratas com dieta hipercolesterêmica, no teste *in vitro* primeiro aplicou o método

DDPH aplicado também por Lima (2011), obtendo resultado de 92% de inibição para a dose de 10 mL/mL, também Pereira et al. (2012) realizou o mesmo teste comparando a uvaia com outras duas espécies de mirtáceas a goiaba amarela e a guabiroba atribuindo estes efeitos aos seus altos teores de carotenóides (precursores da vitamina A; 909,33 µg/g) e vitamina A (37,83 µg/g), *in vivo* foram avaliadas concentrações séricas de sulfidrilas totais (capacidade antioxidante) e proteína carbonilada (dano oxidativo) que são considerados marcadores do estresse oxidativo onde foram observadas reduções significativas com $p < 0,05$.

Lima et al. (2010) já alertava para o possível uso terapêutico da *Eugenia Uvalha*, pois a partir do óleo essencial extraído das folhas, isolou o E-cariofileno substância com efeito anti-inflamatório já comprovado registrado também na *Cordia verbenacea* que já possui uso comercial. Haminiuk et al. (2012) destacam a presença pronunciada do ácido gálico e a quercetina, ambos ácidos fenólicos com concentrações respectivas de 255,91 e 58,31 mg/kg no extrato metanólico. O ácido gálico e a quercetina tiveram seu efeito anti-inflamatório comprovado por Kroes et al. (1992)

3.2 Inflamação

A inflamação e a busca por seu tratamento são registradas desde as pinturas rupestres, placas de argilas em achados arqueológicos pertencentes aos sumérios (5000 a.C.) e o papiro de Erbs (1500 a.C) descrevem e prescrevem rituais “médicos-mágicos” envolvendo extratos de plantas e animais para o tratamento. Pode-se notar que o interesse científico sobre o processo inflamatório é remoto e coube ao médico romano Cornelius Celsus (42 a.C) a descrição dos 4 sinais cardeais: *Signa inflammationis quattor sunt: Rubor et Tumor, cum Calor et Dolor*– rubor, tumor, calor e dor cuja a documentação foi redescoberta pelo papa Nicolas V em 1443, Virchow em 1871 acrescentou o quinto sinal cardinal como a perda de função do tecido afetado (LUENGO, 2005; VASCONCELOS, 2000).

A infamação conforme Kumar et al. (2010) é uma reação complexa em tecidos que consiste principalmente nas respostas dos vasos sanguíneos e leucócitos, tendo como objetivo a eliminação do agente agressor ou de células necróticas, que tem como representação sintomática os cinco sinais cardinais, sendo os quatro primeiros ilustrados na figura 2, que enfatiza também os fatores iniciantes da resposta. Assim, a resposta inflamatória argumenta Rang et al. (2011), constitui um mecanismo de defesa e não uma doença em si, o que, portanto, a princípio seria salutar ao hospedeiro, contudo quando não controlada ou

inapropriadamente direcionada pode ser causa de injúria e doença, então o tratamento medicamentoso concentra-se em aliviar os sintomas e preservar a função e em segundo plano deter ou retardar a lesão tecidual (KATZUNG et al., 2014).

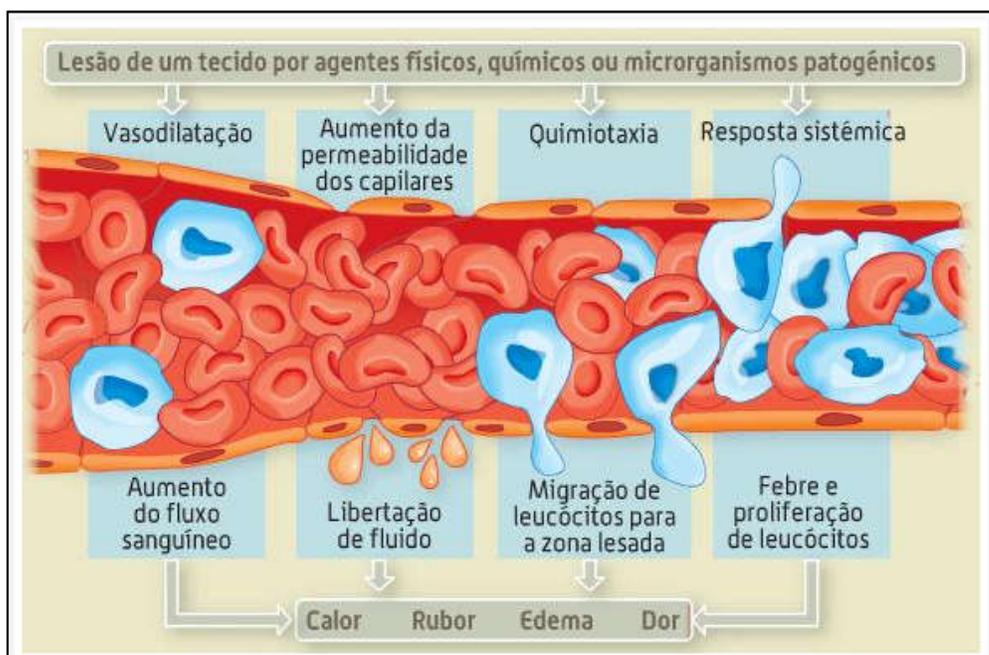


Figura 2 – Respostas desencadeadas pelo processo inflamatório;
 Fonte: Felipini (2013)

Sob o critério da temporalidade e características histopatológicas a inflamação é subdividida em aguda e crônica. A primeira caracteriza-se por uma rápida resposta do hospedeiro servindo para levar leucócitos e proteínas do plasma, tais como anticorpos, para o local da infecção ou tecido injuriado. A crônica tem duração prolongada (semanas a meses), a injúria tecidual e tentativas de reparo coexistem em diferentes combinações (KUMAR et al., 2010).

Conforme Abbas, Lichtman e Pillai (2015) os principais estímulos iniciais a inflamação geralmente são: a infecções, necrose tecidual, corpo estranho e reações imunes, contudo há outras causas de menor frequência. Embora haja diversas causas as sequências dos eventos e os aspectos morfológicos permanecem conservados: vasodilatação, permeabilidade vascular aumentada, dor e extravasamento leucocitário.

Conforme Kumar et al. (2010) a vasodilatação é uma das primeiras manifestações observada, durando alguns segundos, sendo este o principal responsável pelo rubor e aumento de calor local, este evento é mediado, notavelmente, pela histamina e o óxido nítrico (NO), no músculo liso vascular. A permeabilidade vascular aumentada segue a vasodilatação

imediatamente, leva ao escape de exsudato rico em proteínas para dentro do tecido extravascular, causando o edema, os principais mecanismos envolvidos neste processo são três, conforme Kumar et al. (2010), Hammer e McPhee (2014) e Ren-Smith e Church (2015):

1 – Contração das células endoteliais que resulta em espaços interendoteliais aumentados, sendo elicitado por histamina, bradicinina, leucotrienos, neuropeptídeos, e substância P e outros. Usualmente dura de 15 a 30 minutos, mas em injúrias brandas (como na queimadura por sol) inicia-se tardiamente e podem durar várias horas.

2 – Injúria endotelial, resultando em necrose da célula endotelial e desprendimento, ocorre em traumas ou micróbios que alcançam as células endoteliais, inicia-se logo após a injúria e é mantido por horas até que vasos sejam trombosados ou reparados.

3 – Transporte aumentado de fluido e proteínas – transcitose – através da célula endotelial, este processo envolve canais constituído de vesículas localizados próximo as junções intercelulares.

A dor inicia-se principalmente pela compressão das terminações nervosas pelo edema formado, além de obviamente das ligações diretas com o trauma originário. A sensação dolorosa pode ser amplificada e gerada, principalmente, pelos mediadores prostaglandinas e bradicinina.

O extravasamento refere-se à transferência dos leucócitos da luz dos vasos para o tecido intersticial, podendo ser dividido em três passos e são responsáveis pela perda de função do tecido, aqui apresentado em resumo para mais detalhes ver Kumar et al. (2010) e Abbas, Lichtman e Pillai (2015), conforme ilustra a figura 3:

1 – Na luz: marginação, rolamento e adesão ao endotélio – Normalmente os leucócitos circulam na parte central do sangue, mas devido ao fluxo sanguíneo mais lento na região da inflamação há alterações nas condições hemodinâmicas e cisalham na parede do vaso ocorrendo a marginação. Inicialmente, individualmente e posteriormente em fila os leucócitos aderem transitoriamente ao endotélio, se desligam e ligam novamente, rolando assim na parede do vaso. Finalmente os leucócitos se aderem firmemente. Esta adesão dos leucócitos é mediada por moléculas de adesão, cuja a expressão é aumentada por citocinas secretadas nos tecidos em resposta ao agente injuriante, garantido o recrutamento para área afetada. A fase de rolamento é mediada pelas selectinas que podem ser expressas pelos leucócitos (L-selectinas), no endotélio (E-selectinas) e por plaquetas e no endotélio (P-selectina). Principalmente os macrófagos e mastócitos que entram em contato com os micróbios ou tecidos mortos secretando várias citocinas, dentre elas o fator de necrose

tumoral (TNF) e interleucina-1 (IL-1) que induzem a expressão endotelial de ligantes de integrinas no leucócito. No endotélio a Molécula-1 de adesão vascular (VCAM-1) e molécula-1 de adesão intercelular (ICAM-1) (figura 3 – etapa 1).

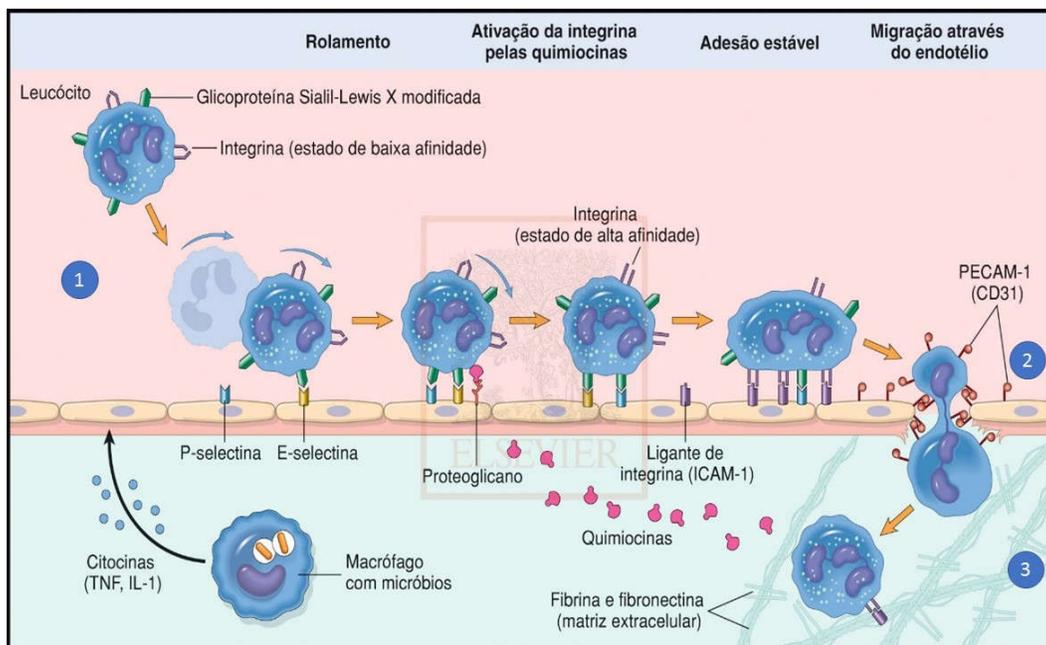


Figura 3 - Processo com múltiplas etapas da migração de neutrófilos ao longo dos vasos sanguíneos. Primeiro os leucócitos rolam, então se tornam ativados e aderem ao endotélio, então transmigram pelo endotélio, penetrando na membrana basal e migrando em direção aos quimioatraentes liberados na fonte da injúria. Diferentes moléculas têm papéis predominantes em diferentes fases desse processo – selectinas na rolagem; quimiocinas (usualmente mostradas ligadas aos proteoglicanos) nos neutrófilos ativados para aumentar a avidéz das integrinas em firme adesão e CD31 (PECAM-1) na transmigração. Os neutrófilos expressam baixos níveis de L-selectinas; eles se ligam às células endoteliais predominantemente via P- e E-selectinas. Icam-1, molécula 1 de adesão intercelular; TNF, Fator de necrose tumoral. 1- Na luz: marginação, rolamento e adesão ao endotélio; 2 - Migração através do endotélio e parede do vaso; 3 - Migração nos tecidos em direção aos estímulos quimiotáticos; Fonte: adaptado de Kumar et al. (2010);

2 – Migração através do endotélio e parede do vaso – conhecida como transmigração ou diapedese – ocorre principalmente nas vênulas pós-capilares, onde quimiocinas estimulam a migração através do espaço interendoteliais, em direção ao grande quimiotático, dado que as quimiocinas se acumulam por extravasamento no local que o agente flogístico está atuante. Vários mediadores químicos estão envolvidos neste processo, também se destaca neste processo a imunoglobulina PECAM-1 (molécula de adesão de célula endotelial e plaqueta) (figura 3 – Etapa 2).

3 – Migração nos tecidos em direção aos estímulos quimiotáticos – após sair da circulação os leucócitos migram para o local da injúria, pelo processo de quimiotaxia. Há substâncias tanto exógenas como endógena que podem agir como quimioatraentes. Os

exógenos mais comuns são produtos bacterianos, os endógenos podem ser subdivididos em três categorias: (A) citocinas, em particular da família das quimiocinas, como a Interleucina -8 – IL-8; (B) componentes do sistema complementos, particularmente C5a (fragmento do componente complemento C5) e (C) metabólitos do ácido araquidônico (AA) principalmente o leucotrieno B4 (LTB₄) (figura 3 – Etapa 3).

Conforme Ren-Smith e Church (2015) os leucócitos, principalmente os neutrófilos (nas primeiras 6 a 24 horas) e monócitos (24 a 48 horas), ao chegarem ao local da inflamação reconhecem o agente agressor, e liberam sinais que ativam outros leucócitos para ingerir e destruir o agente iniciante da resposta inflamatória, bem como a amplificação da reação.

Conforme Kumar et al. (2010), Hammer e McPhee (2014) e Ren-Smith e Church (2015) o passo final para eliminação de células necróticas ou do agente infeccioso e sua morte e/ou degradação. Deve-se principalmente as espécies reativas de oxigênio (ERO), que em organelas próprias culminam em liberação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂), hipoclorito (OCl⁻) e radicais livres de hidroxila (OH⁻) e as espécies reativas denitrogênio por reação do óxido nítrico (NO) liberam um radical livre altamente reativo, o peroxinitrito (ONOO⁻). Há ainda participação de outras substâncias como a elastase, defensinas e lactoferrina dentre outras, que podem ter suas ações superpostas.

Portanto o processo inflamatório e a consequente liberação de produtos pelos leucócitos, são um potente mecanismo de defesa do organismo, contudo podem ser causa de injúria a células normais Kumaret al. (2010) e Hammer e McPhee (2014), como: (A) no dano colateral que ocorre por ataque a tecidos adjacentes, como no caso de infecções de difícil resolução como a tuberculose e certas doenças virais, (B) por direcionamento inapropriado contra tecidos do hospedeiro como ocorre em certas doenças autoimunes, e (C) reações exacerbadas contra substâncias do ambiente usualmente inofensivas, enquadrando-se neste computo as doenças alérgicas.

Como os danos ao organismo são potenciais, é previsível que haja um controle firme para minimizar qualquer dano. A inflamação cede porque os mediadores químicos são produzidos em grandes picos tendo meia-vida curta conforme Rang et al.(2011) e Katzung et al., (2014) e os leucócitos sofrem apoptose em poucas horas fora do leito vascular, segundo Abbas, Lichtman e Pillai (2015). Contudo conforme o processo de inflamação avança, também dispara uma variedade de sinais de parada como por exemplo na mudança do metabólito do ácido araquidônico produzido (lipoxina), liberação de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10 (KUMAR et al., 2010).

3.2.2 Mediadores químicos

A sequência de eventos que ocorrem na inflamação são iniciados e coordenados por uma série de mediadores não completamente compreendidos, contudo conforme Kumar et al. (2010) há cinco princípios gerais compartilhados:

- (A) Mediadores são gerados a partir de células ou de proteínas plasmáticas – ocorre liberação por exocitose do grânulo (p. ex. histamina nos grânulos dos mastócitos), e no plasma e estão presentes na circulação e para adquirir propriedades biológicas devem passar por clivagem proteolíticas (p. ex. cininas);
- (B) Mediadores ativos são produzidos em resposta a vários estímulos – podem incluir produtos microbianos, células necróticas, proteínas do sistema complemento, dentre outros estímulos;
- (C) Um mediador pode estimular a liberação de outros mediadores – p. ex. a citocina IL-1 age estimulando a produção de outra citocina o TNF;
- (D) Os mediadores variam em seus alcances de alvos celulares;
- (E) Uma vez ativados e liberados da célula, a maioria desses mediadores tem curta meia-vida – p. ex. os metabólitos do ácido araquidônico decaem rapidamente ou são inativados como no caso da bradicinina é inativada por cininases.

Os principais mediadores podem ser agrupados em dois grandes grupos segundo Hammer e McPhee (2014) os (1) derivados de células são: as aminas vasoativas, os metabólitos do ácido araquidônico (AA) também chamados de eicosanoide, o fator ativador de plaquetas, as espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico, citocinas; (2) e os derivados de proteínas plasmáticas: sistema complemento, sistema da coagulação e das cininas.

3.2.3 Metabolitos do Ácido Araquidônico (AA)

O AA é um ácido graxo que é derivado de fontes da dieta ou pela conversão do ácido linoleico, e geralmente é esterificado na membrana fosfolipídica. Como ilustra a figura 4, quando sinais físicos ou biológicos ativam as fosfolipases que liberam o AA da membrana.

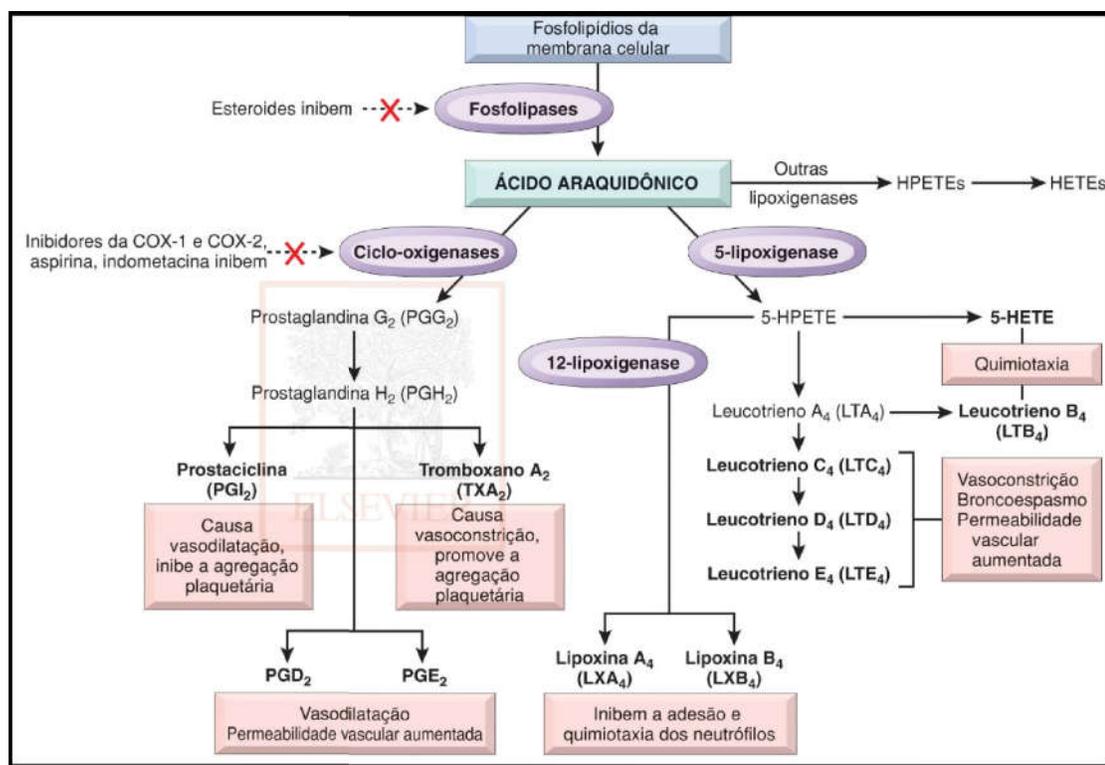


Figura 4 – Geração de metabolitos do Ácido Araquidônico

Os alvos moleculares das ações de alguns fármacos anti-inflamatórios são indicados por um X vermelho. Os agentes que inibem a produção de leucotrienos pela inibição da 5-lipoxigenase (p. ex. Zileuton) ou bloqueiam os receptores de leucotrienos (p. ex. Montelukast) não são mostrados. COX, ciclo-oxigenase; HETE, ácido hidroxieicosatetraenoico; HPETE, ácido hidroperoxieicosatetraenoico. Fonte: Kumar et al. (2010).

Após a liberação do ácido araquidônico, duas principais enzimas agem no citoplasma para formar os derivados: (1) a ciclo-oxigenase responsável pelas prostanoídes e (2) lipoxigenases ligadas a produção de leucotrienos e lipoxinas.

As prostaglandinas são produzidas principalmente em mastócitos, macrófagos e células endoteliais, sendo geradas principalmente pelas ações da ciclooxigenase 1 – COX-1 – e a enzima induzida COX-2. As prostaglandinas (P) foram nomeadas conforme suas características estruturais, seguida pela letra G devido a via de acionamento dos receptores pela proteína G conforme Ricciotti e FitzGerald (2011) e por um número subscrito que indica

o número de duplas ligações no composto (p. ex. PGE₂) e os tromboxanos. A tabela 3 apresenta os principais derivados pela ação das cicloxigenases na inflamação segundo Kumar et al. (2010) e Katzung et al. (2014) e seus efeitos biológicos na inflamação.

Tabela 3 – Prostaglandina e seus efeitos biológicos na inflamação

Prostaglandina	Efeito biológico na inflamação
PGE ₂	↑permeabilidade vascular ^{2,6} ↑infiltração de leucócitos ² ↑hiperalgesia ³ Causa vasodilatação ^{1,2,5,6} Causa Febre ³ Dor ⁶
PGI ₂	↑permeabilidade vascular ² ↑infiltração de leucócitos ² Causa vasodilatação e edema ^{1,4,5} Inibe a agregação plaquetária ¹
PGD ₂	↑infiltração de eosinófilos ² ↑quimiotaxia de linfócitos ² ↑biossíntese de leucotrienos
PGF _{2α}	Estimula a contração do músculo liso inclusive de pequenas arteríolas ¹ Participa da dor e edema ⁵ Sua presença pode iniciar a inflamação aguda ⁵
TXA ₂	↑interação entre os leucócitos e plaquetas ² ↑vasoconstrição ^{2,4} Agente plaquetário ¹

Fonte: Elaborado a partir de: 1- Kumar et al. (2010); 2 - Katzung et al. (2014); 3 - Chizzolini e Brembilla (2009); 4 - Gryglewski, Dembínska e Korbut (1978); 5 – Ricciotti e FitzGerald (2011); 6 - Ren-Smith e Church (2015)

Na figura 4 destaca-se o local de ação dos inibidores da COX-1 e COX-2, conhecidos como anti-inflamatórios não esteroidais – AINE. O mecanismo de ação destes fármacos segundo Katzung et al. (2014) é a inibição da biossíntese de prostaglandinas, contudo há possíveis mecanismos adicionais incluindo a inibição da quimiotaxia, a infrarregulação da IL-1 e a produção diminuída de radicais livres. Tradicionalmente COX-1 tende a ser classificada como constitutiva enquanto a COX-2 é induzida durante a resposta inflamatória, o que levou ao desenvolvimento de fármacos seletivos a esta segunda isoforma com intenção de evitar os efeitos tóxicos, principalmente gástricos e renais dos AINE. Contudo Ray et al. (2002) mostrou que o uso trazia risco cardiovasculares e cerebrovasculares, estes fatos levaram a Kumar et al. (2010) a elaboração da hipótese que a COX-2 também tem papel constitutivo.

O AA também é alvo das enzimas lipoxigenases, esta via é responsável pela produção de leucotrienos e lipoxinas conforme Kumar et al. (2010) e Katzung et al. (2014). A 5-lipoxigenase converte o AA em ácido 5-hidroperoxieicosatraenoico (5-HPETE), deste deriva-se o leucotrieno A4 (LTA4) que é precursor dos demais leucotrienos e o ácido 5-

hidroxieicosatetraenoico (5-HETE), processo ilustrado na tabela 4 que também contém a via das lipoxinas. O 5-HPETE pode ser convertido pela 12-lipoxigenase dando origem as lipoxinas, que predominantemente possuem ação anti-inflamatória inibindo a quimiotaxia, a adesão e outros componentes celulares da inflamação. A tabela 4 apresenta uma síntese dos principais metabólitos da via da lipoxigenase e seus efeitos no processo inflamatório

Tabela 4 – Via da lipoxigenase e as principais ações na inflamação

Eicosanoide		Principais ações na inflamação
Leucotrienos	5-HETE	Quimiotático para neutrófilos ¹
	LTB ₄	Quimiotático ^{1,3} Ativação de neutrófilos, monócitos e eosinófilos ³ ↑adesão celular ao endotélio ^{1,3} ↑Geração de ERO ^{1,3}
	LTC ₄	↑ Vasoconstrição ¹ ↑Permeabilidade vascular ¹
	LTD ₄	
	LTE ₄	
Lipoxinas	LXA ₄	↓ quimiotaxia ^{1,2} ↓ adesão ^{1,2}
	LXB ₄	

Fonte: elaborado a partir de 1- Kumar et al. (2010); 2 – Serhan, Chiang e Van Dyke (2008); 3 – Crooks e Stockley (1998). LTC₄, Leucotrieno C₄; LTD₄, Leucotrieno D₄; LTE₄, Leucotrieno E₄; LXA₄, Lipoxina A₄; LXB₄, Lipoxina B₄

Serhan, Chiang e Van Dyke (2008) detectam que existe uma relação proporcionalmente inversa entre a produção de lipoxina e leucotrienos, sugerindo que pode haver uma relação de regulação negativa endógena e que pode ter papel central na resolução da inflamação.

Retornando a figura 4, pode-se observar em esquema o local de ação dos esteroides inibidores das fosfolipases, conhecidos como corticosteroides como afirma Katzung et al. (2014), que reduzem radicalmente toda geração de metabólitos do AA e também são utilizados como imunossupressores, dado que inibem as funções dos macrófagos teciduais e outras células apresentadoras de antígenos, e ainda podem provocar vasoconstrição e diminuir a permeabilidade.

As prostaciclinas, tromboxanos, e leucotrienos não tem ação somente na resposta inflamatória, participando de diversos processos fisiológicos, como no músculo liso vascular, no trato gastrointestinal, nas vias respiratórias, no sistema reprodutor, nas plaquetas, rins dentre outros órgãos, uma revisão completa é encontrada em Katzung et al. (2014).

Embora não indicado na figura 4, a via da lipoxigenase também pode ser alvo de inibição, dado que os AINE não a afetam, e em caso como o da asma estão mais presentes os leucotrienos conforme Kumar et al. (2010). Ainda de acordo com Katzung et al. (2014) uma estratégia emergente para controle dos processos inflamatórios é a via dietética dado que o

ácido araquidônico deriva em sua maior parte dos ácidos linoleico e α -linoleico, pode-se introduzir o ácido eicosapentaenoico e docosaexaenoico, conhecidos popularmente como ômega-3, o que diminui a disponibilidade de AA para a formação da cadeia de reação, Serhan, Chiang e Van Dyke (2008) ainda acrescentam que são excelentes substratos para a produção de produtos lipídicos anti-inflamatórios como as resolvinas e protectinas.

3.2.4 Histamina e Serotonina

A histamina e a serotonina são denominadas aminas vasoativas pois têm importantes ações nos vasos sanguíneos conforme Kumar et al. (2010), encontrando-se pré-formadas nas células estando entre os primeiros a serem liberados no processo inflamatório, lesão tecidual e reações alérgicas donde deriva-se a importância do seu estudo (AIRES, 2013).

A maior parte da histamina tecidual é sequestrada em vesículas nos mastócitos e basófilos, e nesta forma é biologicamente inativa, contudo vários estímulos químicos e mecânicos podem estimular sua liberação permitindo a amina livre exercício no tecido circundante, de forma interessante os mastócitos estão presentes de forma mais numerosa em locais onde a lesão é potencialmente mais fácil segundo Katzung et al. (2014) como boca, nariz e pés, Rang et al. (2011) grifa a intensidade que são encontradas no pulmão e vias aéreas, donde segundo Benly (2015) dar-se a importância nos processos alérgicos.

Conforme Kumar et al. (2010) e Rang et al. (2011) a histamina após um estímulo mecânico ou químico é liberada e provoca vasodilatação local, atração quimiotática, aumento da permeabilidade vascular, edema e contração do músculo liso, Gutzmer et al. (2005) acrescenta que a amina atua em quatro receptores acoplados a proteína G até agora identificados (H_1 , H_2 , H_3 e H_4 : receptor de histamina 1, 2, 3 e 4) e todos estão associados ao processo inflamatório. Benly (2015) enfatiza e inclui o papel fundamental também em muitos processos alérgicos, neste caso a principal fonte de histamina são os mastócitos, a reação varia de acordo com a dose e do grau de sensibilização prévia ao alérgeno, a via exposta (local *versus* sistêmica) e do local de exposição (inalados, cutâneos, dentre outros). De forma paradoxal Rang et al. (2011) discute que embora haja diversas evidências da participação na inflamação os antagonistas H_1 tem pouco efeito sobre a inflamação aguda.

No organismo há também histamina não leucocitária, e pode ser encontrada em diversos tecidos como no cérebro onde atua como neurotransmissor de diversas funções tais como controle neuroendócrino, regulação cardiovascular, termorregulação, regulação do peso

corporal, sono e vigília. Em humanos ainda desempenha outras ações como o estímulo da secreção gástrica, estímulo cardíaco e contração da maioria dos músculos lisos, exceto em vasos sanguíneos (KATZUNG et al., 2014; RANG et al., 2011; KUMAR et al., 2010; AIRES, 2011).

A serotonina ou 5-hidroxitriptamina (5-HT) também é uma amina atuante na inflamação que conforme Kumar et al. (2010) a similaridade da histamina é um mediador vasoativo pré-formado, após uma lesão tecidual ocorre liberação da 5-HT plaquetária.

Segundo Shajib e Khan (2015) a 5-HT ficou amplamente conhecida por seu papel no sistema nervoso central, contudo 95% está presente na periferia e nas células enterocromafins residentes no intestino que são a fonte primária para as plaquetas, que não a produzem, a captando na corrente sanguínea com auxílio da SERT – *sodium-dependent serotonin transporter*– transportador de serotonina dependente de sódio, sendo então armazenada em vesículas próprias (BERTRAND e BERTRAND, 2010).

Fidalgo, Ivanov e Wood (2012) identificaram a expressão de receptores para serotonina (5-HTR1, 5-HTR2, 5HTR3, 5-HTR4 e 5-HTR7) em células do sistema imune, em especial nos monócitos, mastócitos, neutrófilos, que segundo Shajib e Khan (2015) podem estar ligados a quimiotaxia e em especial a liberação de outros mediadores do processo inflamatório, é interessante notar que os receptores 5-HTR5 e 5-HTR6 predominantes no sistema nervoso central ainda não foram identificados em células de defesa.

Katzung et al. (2014) registra que a 5-HT causa vasodilatação, estimulação de terminações nervosas nociceptivas, adicionalmente Shajib e Khan (2015) também registram a quimiotaxia e promoção da liberação de diversos outros mediadores como interleucinas e interferonas cujo o mecanismo subjacente ainda não foi desvendado. Antagonistas seletivos para diversos modelos inflamatório estão em teste com resultados de mitigação ou inibição do processo inflamatório. Kim et al. (2013) utilizou o antagonista para 5-HTR7 para a doença inflamatória intestinal obtendo redução de mediadores e achados histopatológicos significativos em camundongos e Bai et al. (2013) utilizou inibidor da triptofano hidroxilase (precursor da serotonina) que levou a supressão da expressão das IL-8 e do fator de necrose tumoral α (TNF α).

Além da atuação como mediador na resposta inflamatória a serotonina, também tem efeitos e importância no sistema nervoso onde atua como neurotransmissor, no sistema respiratório – estimula o músculo liso bronquiolar, no cardiovascular - contração da musculatura lisa e dilatação da esquelética, no trato gastrointestinal – aumento do tônus e

facilitando a peristalse, no músculo esquelético - o seu papel ainda não foi elucidado contudo está associada a síndrome serotoninérgica, e no globo ocular – onde antagonista reduzem a pressão intraocular em casos de glaucoma, como lista e apresenta Katzung et al. (2014).

Conforme Ogonowski et al. (1997) a histamina e a serotonina, possivelmente por se tratarem de aminas pré-formadas, atuam na primeira linha de defesa do organismo, manifestando-se na fase inicial da inflamação aguda, geralmente entre os 60 a 90 minutos após a interação com o elemento flogístico.

3.2.5 Outros mediadores inflamatórios

A robustez e a complexidade da resposta inflamatória envolvem outros mediadores químicos que não somente os derivados do AA, a histamina e a serotonina. Aqui tratados em conjunto por delineamento da pesquisa, já que suas importâncias e participações podem ser equivalentes ou superiores no mecanismo discutido, resumidos na tabela 5.

O fator de ativador de plaquetas – PAF ou AGEPC (acetil-gliceril-éter-fosforilcolina), foi inicialmente assim denominado pois em sua descoberta creditava-se a ele somente a ação na agregação plaquetária, contudo agora é conhecido por múltiplos efeitos na inflamação conforme Kumar et al. (2010). De acordo com Balestrieri et al. (2003) é sintetizado principalmente em plaquetas, granulócitos, monócitos, macrófagos, e células endoteliais e também em células de diversos órgãos como nos rins, a sua biossíntese conforme os estudos de Camussi, Tetta e Baglioni (1990) ocorre com mediação da fosfolipase A2 comumente sobre o ácido graxo fosfatidilcolina.

Para Kumar et al. (2010), Rang et al. (2011), Balestrieri et al. (2003) e Camussi, Tetta e Baglioni (1990), o PAF em concentrações tão baixas quanto 10^{-10} mols causa vasoconstrição e broncoconstrição, em concentrações maiores induz a vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, sendo 100 a 10.000 vezes mais potente do que a histamina. Promove quimiotaxia de neutrófilos, monócitos e eosinófilos e auxilia na adesão ao endotélio, produz hiperalgesia e induz a produção de radicais livres de oxigênio, ainda tem capacidade de induzir a produção eicosanoides e TXA.

O PAF em níveis muito baixos quando 10 nMol tem funções fisiológicas importantes, no sistema nervoso central atua na formação da memória e modula o potencial de ação de longa duração, aumentando a plasticidade neuronal (Toscano, 2016), e embora não seja o principal responsável conforme Frenkel, Muguruma e Johnston (1996) atua na

maturação pulmonar fetal, iniciação e manutenção do parto, e complicações associadas com o parto prematuro.

Ao óxido nítrico (NO) inicialmente foi atribuído somente a função de vasodilatador das células endoteliais, contudo sabe-se atualmente que também é produzido por macrófagos e alguns neurônios. O NO é um gás solúvel de meia-vida de apenas alguns segundos que lhe confere ação local, é sintetizado a partir da L-arginina pela enzima óxido nítrico sintase (NOS), sendo que a NOS endotelial e a neuronal tem papel constitutivo sendo expressa em baixos níveis, em contraste com a induzida que tem ação quando algum macrófago e outras células são ativadas por citocinas ou produtos microbianos (KUMAR et al., 2010; KATZUNG et al., 2014).

Conforme Kumar et al. (2010) o NO na inflamação promove a vasodilatação e relaxa o músculo liso vascular, também em conjunto com seus derivados é um potente microbicida, Katzung et al. (2014) e Rang et al. (2011) acrescenta que é contribuinte para o aumento da permeabilidade vascular e do edema, contudo em quadros com excessiva produção de NO pode haver agravamento da lesão tecidual. Contraditoriamente, reduz a agregação e adesão plaquetária, inibe a inflamação induzida por mastócitos e o recrutamento de leucócitos, levando a hipótese que é um mecanismo endógeno para controle da inflamação, o que levou a Cirino, Distrutti e Wallace (2006) a firmar que não podemos tratar a molécula como pró ou anti-inflamatória.

No sistema nervoso central o NO é um importante neurotransmissor, não sendo estocado e somente produzido por demanda, no sistema nervoso periférico é amplamente distribuído atuando no sistema gastrointestinal. No rim desempenha importante papel na regulação renal, tanto pelo efeito vascular, quanto pela ação direta sobre os transportadores tubulares (AIRES, 2013).

Citocinas são proteínas produzidas principalmente por linfócitos e macrófagos ativados, mas podem ser produzidos por outros tipos de células como as endoteliais. Segundo Kumar et al. (2010) as principais envolvidas na inflamação são: o fator de necrose tumoral (TNF – *Tumors necrosis factor*) e as interleucinas 1 e 6 (IL-1 e IL6), podem ser estimulados por endotoxina, produtos microbianos, injúria física ou outro mediador inflamatório.

Conforme Walsh et al. (1991) o TNF geralmente atua em conjunto com IL-1 e IL-6, tem capacidade de induzir a febre, quimiotático para neutrófilos e promove adesão as células endoteliais. Aumentos locais da citocina evocam todos os sinais cardinais da inflamação, nos macrófagos além de estimular a fagocitose, aumenta a produção de IL-1 e PGE₂, além da

resposta inflamatória o TNF tem capacidade de regular os receptores sensíveis ao sabor amargo e suprimir o apetite, pode conduzir a resistência à insulina por promover a fosforilação do receptor de insulina 1 e exposição prolonga a baixas concentrações leva ao desenvolvimento caquexia (PETRUZZELLI; WAGNER, 2016).

IL-1, conforme Dinarello (2011) na verdade é uma família com 11 citocinas, responsáveis por aumentar a expressão de fatores de adesão endotelial e ativam a transmigração, atuam no hipotálamo no centro de termorregulação levando a febre, Contassot, Beer e French (2012) também a responsabilizam pela hiperalgesia e vasodilatação local e hipotensão.

IL-6, é um mediador da febre agindo tanto no hipotálamo como mobilizando energia do tecido adiposo (Ferguson-Smith et al., 1988), inicia a síntese de PGE₂ e estimula a produção de neutrófilos na medula óssea. Kumar et al. (2010) relata que esta interleucina participa de várias patologias como artrite reumatoide, câncer, esquizofrenia, depressão maior e asma, o que justifica o amplo estudo e importância.

Quimioquinas conforme Kumar et al. (2010) e Graham e Locati (2012) é uma família com cerca de 40 membros e 20 receptores, são quimioatraentes para leucócitos, sendo os indutores mais importantes os produtos microbianos, a IL-1 e o TNF. Em nível basal são produzidas no timo e nos tecidos linfóides, suportando a migração para diversos órgãos.

Segundo Rang et al. (2011) os neuropeptídeos liberados de neurônios sensitivos podem promover a inflamação, dentre os existentes o principal para Katzung et al. (2014) é a substância P que é um neuropeptídeo. É um potente vasodilatador arteriolar dependente de liberação de óxido nítrico, provoca contração da musculatura lisa venosa, também aumenta a permeabilidade vascular, O'Connor et al. (2004) acrescenta que tem a capacidade de induzir a liberação de histamina, prostaglandinas e leucotrienos.

A Substância P, ainda exercer uma série de atividades centrais ainda não totalmente elucidadas, estando o peptídeo relacionado com a ansiedade, a depressão, náuseas e vômito, também é um neurotransmissor do sistema nervoso entérico e está implicado com a inflamação intestinal (Kumar et al., 2010; O'Connor et al. 2004; Bossaler et al., 1992) e Katzung et al. (2014) complementa informando que os antagonistas são potenciais alvos terapêuticos.

As cininas conforme Kumar et al. (2014) são peptídeos vasoativos, derivados de proteínas plasmáticas chamadas de cininogênio, pela ação de proteases específicas chamadas de calicreínas, para Rang et al. (2011) o principal representante deste sistema é a bradicinina

que causa vasodilatação, em parte pela produção induzida de PGI₂ e liberação de óxido nítrico, aumento da permeabilidade vascular. Sendo um potente agente de dor que é acrescido pelas ações das prostaglandinas cuja a liberação é mediada pela própria cinina.

Conforme revisado por Golias et al. (2007) a bradicinina apresenta outros papéis fisiológicos entre eles: controle local do fluxo sanguíneos e taxa metabólica nas glândulas salivares e sudoríparas, protege o sistema cardiovascular, modula a produção de NO e de prostaglandinas uma vez que promove a síntese de fosfolipase A₂ e desta maneira consegue modular a função renal (AIRES et al., 2013).

Tabela 5 – Outros mediadores inflamatórios

Mediador	Ação na resposta inflamatória
PAF	Vasoconstrição e broncoconstrição ¹ Baixa concentração – vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular ^{1,3} Quimiotaxia e adesão ao endotélio ^{1,2} Geração de radicais de oxigênio ² Hiperalgisia ³
NO	Vasodilatação ^{1,4} Permeabilidade vascular ⁴ Edema ⁴
TNF	Febre ⁵ Quimiotático e adesão ao endotélio ⁵
IL-1	Febre ⁶ Adesão endotelial ⁶ Transmigração ⁶ Hiperalgisia ⁷ Vasodilatação ⁷
IL-6	Febre ⁸ Indução da produção de neutrófilos ⁸
Quimiocinas	Quimioatraentes ^{1,9}
Substância P	Vasodilatador arteriolar ^{10,12} Contração do músculo liso venoso ^{11,12} Aumenta a permeabilidade ^{1,12}
Bradicinina	Vasodilatação ³ Aumento da Permeabilidade vascular ³ Dor ³

Fonte: elaborado a partir de: 1 – Kumar et al. (2010); 2- Camussi, Tetta e Baglioni (1990); 3 – Rang et al. (2011); 4 – Katzung et al. (2014); 5 -Walsh et al. (1991); 6 – Dinarello (2011); 7 – Contassot, Beer e French (2012); 8 - Ferguson-Smith et al. (1988); 9 – Graham e Locati (2012); 10 – Bossaler et al. (1992); 11 - Katzung et al. (2014); 12 – O’Connor et al.(2004).

A discussão sobre os mediadores químicos não tem por objetivo uma revisão completa do tema, mas sim síntese das principais substâncias, funções na inflamação e destaques homeostáticos, que deram base ao desenvolvimento da pesquisa. As tabelas 3, 4 e 5 lidos em conjuntos permite concordar com Rang et al. (2011) que afirma que era de esperar que um mecanismo de defesa tão robusto fosse repleto de funções replicadas, e ilustra a complexidade de se entender profundamente o tema como afirma Kumar et al. (2010), e por

fim Katzung et al. (2014) alerta que cada vez mais mediadores são descobertos e o mapa ainda não se fecha.

3.2.6 Dor Inflamatória

A dor foi definida pela IASP (*International Association for the Study of Pain* – Associação Internacional para o estudo da dor) em 1994 como: “Uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a uma lesão tecidual real ou potencial ou descrita em termos de tal dano”, contudo esta definição contém os componentes psicológico, sociológico e nociceptivo, entretanto os dois primeiros não podem ser explorados conforme Albers (2016) pelo modelos animais atuais, cabendo então o estudo da nocicepção que é um evento real ou potencialmente prejudicial ao tecido transduzida e codificada por nociceptores (IASP, 1994).

Woolf et al. (1998) propôs classificar a sensação nociceptiva pelo critério do seu mecanismo de origem em: (A) nociceptiva; (B) inflamatória; (C) neuropática; e Vardeh et al. (2016) acrescenta uma quarta a (D) disfuncional/centralizada. Esta divisão foi corroborada por estudos posteriores como Ferreira et al. (2010), Vardeh et al. (2016) e publicada como definição pela ASP (*American Pain Society* – Sociedade Americana da Dor). A tabela 6 expressa as principais características de cada táxon e a figura 5 ilustra os três primeiros.

Tabela 6 – Classificação da nocicepção quanto ao mecanismo de origem

Classificação	Principais Características
Nociceptiva	Evidência de injúria (física) nociva Sintomas: dor localizada na área de estímulo / lesão Sinais: imagem / patologia mecânica Geralmente produzidas por forças excessivas suficientes para ativar nociceptores
Inflamatória	Evidência de inflamação quer seja estéril ou infecciosas Sintomas: vermelhidão, calor, edema Sinais: alterações inflamatórias, detecção de patógenos/resposta a antibióticos e/ou anti-inflamatórios
Dor patológica	Evidência de lesão dos nervos sensoriais Sintomas: queimação, choque, dor espontânea; parestesias Sinais: diminuição da sensibilidade a picada ou vibração, alodinia mecânica
Disfuncional/centralizada	Dor na ausência de patologia detectável Nenhum estímulo nocivo identificável, inflamação ou dano neural;

Fonte: Elaborado a partir de: Vardeh et al. (2016); APS (2016); Woolf et al. (1998)

Além das principais características apresentadas na tabela 6, a dor nociceptiva, como esquematizado na figura 5-A, geralmente leva a uma resposta autonômica de reflexo de retirada configurando-se seu caráter protetor. Enquanto o processo inflamatório pode gerar

dor espontânea e hipersensibilidade ao estímulo, tendo caráter reparatório (figura 5 -B). A dor patológica ou neuropática como tem origem em uma lesão neurológica e leva a um processamento anormal dos estímulos pela área central do sistema nervoso caracterizando como doença deste sistema (figura 5 – C) (WOOLF et al., 2010).

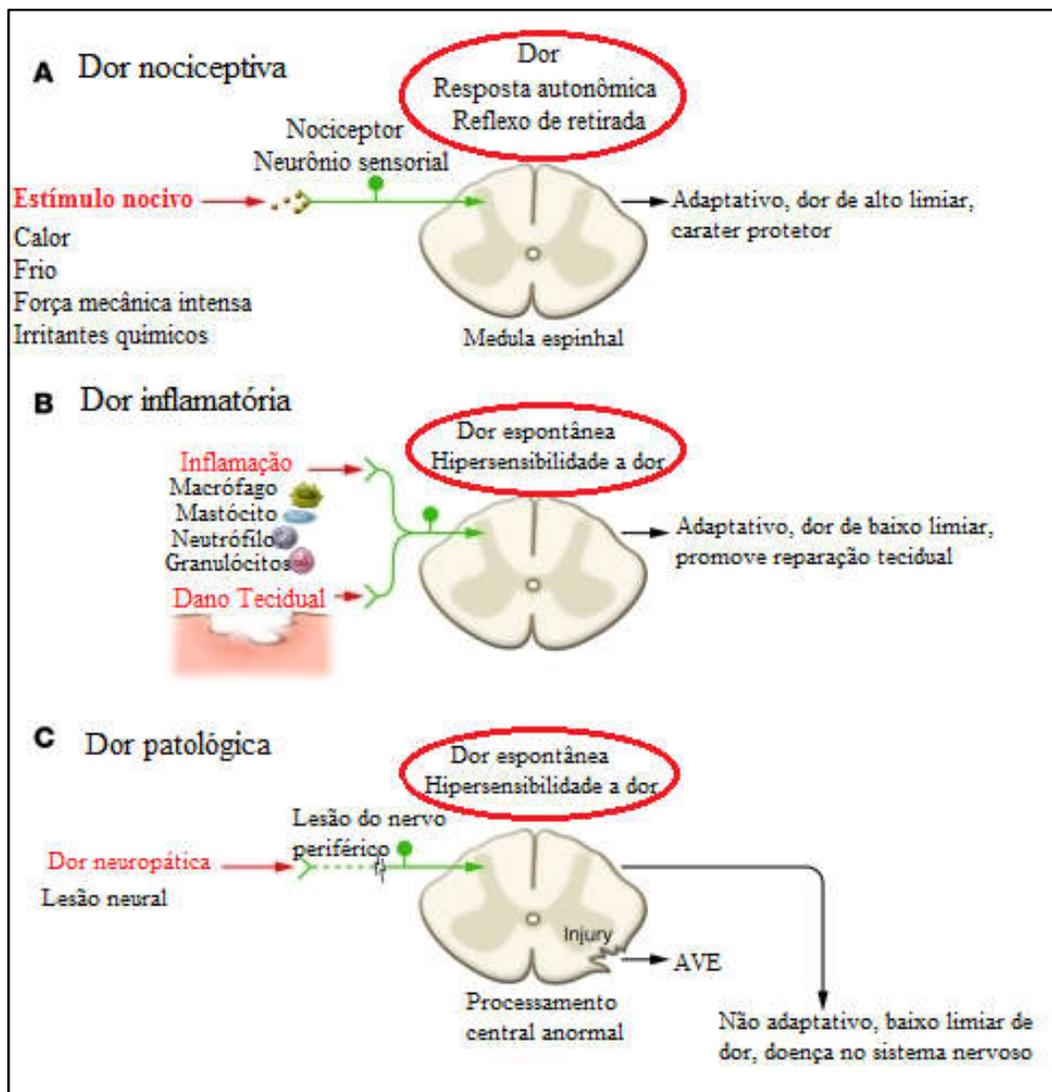


Figura 5 – Principais classes de dor em relação ao estímulo (A) A dor nociceptiva representa a sensação associada com a detecção de estímulos nocivos potencialmente prejudiciais dos tecidos, possui caráter protetor. (B) A dor inflamatória é associada a danos nos tecidos e a ação de mediadores inflamatórios podem promover a reparação e causar hipersensibilidade a dor até que ocorra a cura. (C) A dor patológica é um estado de doença causada por danos no sistema nervoso, sendo a principal a dor neuropática; Fonte: Adaptado de Woolf (2010).

Por questão de recorte metodológico foi enfatizada a nociceção de origem inflamatória. Conforme Ferreira et al. (2010) e Vardeh et al. (2016) a dor na resposta inflamatória tem origem na interação do tecido danificado e os neurônios nociceptivos

periféricos, por intermédio dos mediadores químicos. Ainda Kumar et al. (2010) acrescenta que podem haver diversos mecanismos subjacentes: (A) vasodilatação; (B) ativação direta dos nociceptores e (C) hiperalgesia / hipernocicepção inflamatória.

A vasodilatação inicial provocada por diversos mediadores tais como histamina, o óxido nítrico e as prostaglandinas em conjunto com a permeabilidade vascular aumentada por meio da histamina, serotonina, bradicinina, PAF dentre outros mediadores conforme (Katzung et al., 2014) acarretam na formação do edema este conforme Kumar et al. (2010) pressiona os nociceptores o que dá origem há um potencial de ação de conteúdo nociceptivo.

Os danos nos tecidos ou a inflamação resultam na liberação local do conteúdo intracelular de células lesadas e de moléculas de sinalização inflamatória de células imunitárias, cujo os mediadores químicos produzidos podem ativar diretamente os nociceptores, este mecanismo é ilustrado na figura 5 item1, tem-se por exemplo, a bradicinina (Rang et al., 2011), dentre outras moléculas mediadoras.

A hiperalgesia /hipernocicepção, conforme Ferreira et al. (2010), é resultado de modificações funcionais nos neurônios aferentes primários nociceptivos, ocorrendo por meio de uma ativação metabotrópica em todo neurônio sensitivo, acarretando em mudanças metabólicas nessas células neuronais facilitam a sua ativação (figura 6, item1). Esta modificação da excitabilidade neuronal pode ser induzida por mediadores inflamatórios, como por exemplo a $PGF_{2\alpha}$ (Ricciotti e FitzGerald,2011), IL-1 (Dinarello, 2011) e o $TNF\alpha$ (Vardeh, 2016), e pelo reconhecimento de um elemento exógeno ao organismo por células residentes, como os macrófagos que após identificarem a presença de um patógeno secretam citocinas ou ainda a presença de receptores *Toll-like* (similares ao receptor *Toll*) que reconhecem a parede celular bacteriana e o RNA viral (figura 6, item 3).

A hiperalgesia / hipernocicepção, ressaltam Ferreira et al. (2010) e Vardeh et al. (2016), podem ocorrer por diversos mecanismos subjacentes sendo os dois principais o aumento na expressão de canais de cátions e a redução do limiar de ativação de canais de sódio (Na^+), potássio (K^+) e cálcio (Ca^{2+}), o que induz alteração no potencial de repouso ou diminui o limiar de ativação da membrana, facilitando a ativação por estímulos anteriormente inócuos ou pouco efetivos, estes estímulos podem ser tanto exógenos quanto endógenos (figura 6, item 1 e 2).

Como pode ser observado na figura 5, após serem recepcionados os estímulos são transduzidos em impulsos elétricos, que devem ser transmitidos a centro superiores para então tornar-se uma sensação dolorosa, que está sujeita a modulação, para que este mecanismo de

defesa esteja presente é necessária uma parte especializada do sistema nervoso, denominado nociceptivo e possui fibras características distribuídas nos tecidos.

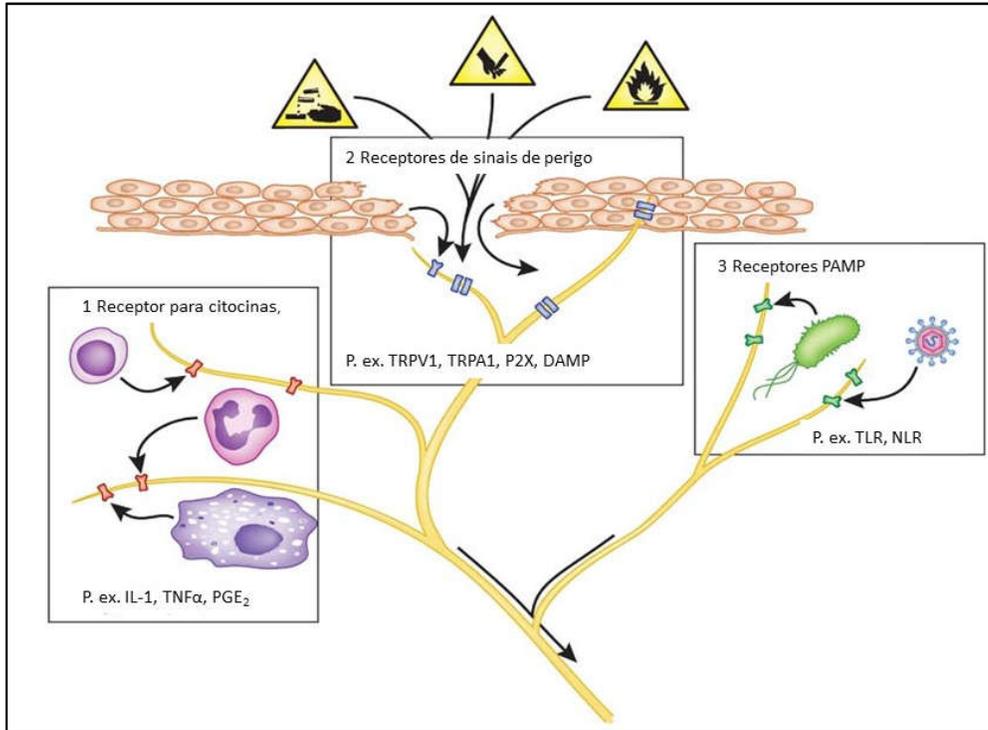


Figura 6 - Estímulos nocivos, caminhos de reconhecimento microbiano e inflamatório desencadeiam a ativação do sistema nervoso periférico.

1 – Receptores para citocinas, mas existem outros não representados na figura envolvidos na ativação direta como a Bradicinina e as prostaglandinas, IL-1 – Interleucina 1, TNF α – Fator de necrose tumoral α ; PGE₂ – Prostaglandina E₂, no mesmo item pode estar ilustrado quando o acionamento provoca hiperalgesia / hipernocicepção; 2 – Receptores de sinais de perigo: ácido, perfurações, calor. TRPV1 - *transient receptor potential vanilloid 1* – Receptor transiente de potencial vaniloíde 1, TRPA1 - *Transient receptor potential cation channel, subfamily A, member 1* – Receptor transiente potencial de canal de cátions, subfamília A, membro 1, P2X – Purinoreceptor, DAMP – *damage associated molecular patterns* - Padrões moleculares associados a danos; 3 – Receptores PAMP - *pathogen-associated molecular patterns* - Padrões moleculares associados a patógenos, TLR - *Toll-like receptors* – receptores tipo Toll, NLR – *NOD-like receptors* – receptores tipo NOD, NOD - *nucleotide-binding oligomerization domain* – domínio de oligomerização de ligação de nucleotídeos; Fonte: Adaptado de Chiu, Hehn e Woolf (2012).

Os nociceptores (figura 6, item2), que são receptores específicos para os mais diversos estímulos dolorosos, estão localizados nas terminações das fibras nervosas A δ e C.

As fibras A δ são mielinizadas e transmitem dor aguda e bem localizada segundo Rang et al. (2011) e estão associadas a receptores térmicos e mecânicos como acrescenta Aires et al. (2013), Ferreira et al. (2010) ainda destaca que devido a presença da bainha de mielina a velocidade de transmissão é maior variando de 12 a 30 m/s.

As fibras C não são mielinizadas, estão associadas às terminações nociceptivas polimodais e transmitem dor profunda, difusa e em queimação segundo Rang et al. (2011), transmitem principalmente sinais mecânicos, químicos e térmicos de alta intensidade como acrescenta Aires et al. (2013), Ferreira et al. (2010) ainda destaca que devido à ausência da bainha de mielina as informações são transmitidas em menor velocidade, variando entre 0,5 a 2 m/s.

Ambas as fibras transmitem informação nociceptiva proveniente do músculo e das vísceras, bem como da pele segundo Rang et al. (2011), respondem igualmente a estímulos mecânicos e se diferem quanto ao térmico como acrescenta Aires et al. (2013).

Tanto a fibra A δ quanto a C (figura 7 - 1) entram na medula espinal bifurcando-se ascendendo ou descendo alguns segmentos, para projetar-se até às lâminas I, II e V da substância cinzenta (figura 7 - 2) trazendo informações de nociceção de todo o organismo, com exceção recepção nociceptiva de qualquer região do crânio que acessa os centros superiores pelo sistema trigêmico, V par craniano. Nestas fibras o neurotransmissor mais importante é o glutamato e está envolvido na geração de potenciais sinápticos rápidos (AIRES et al., 2013).

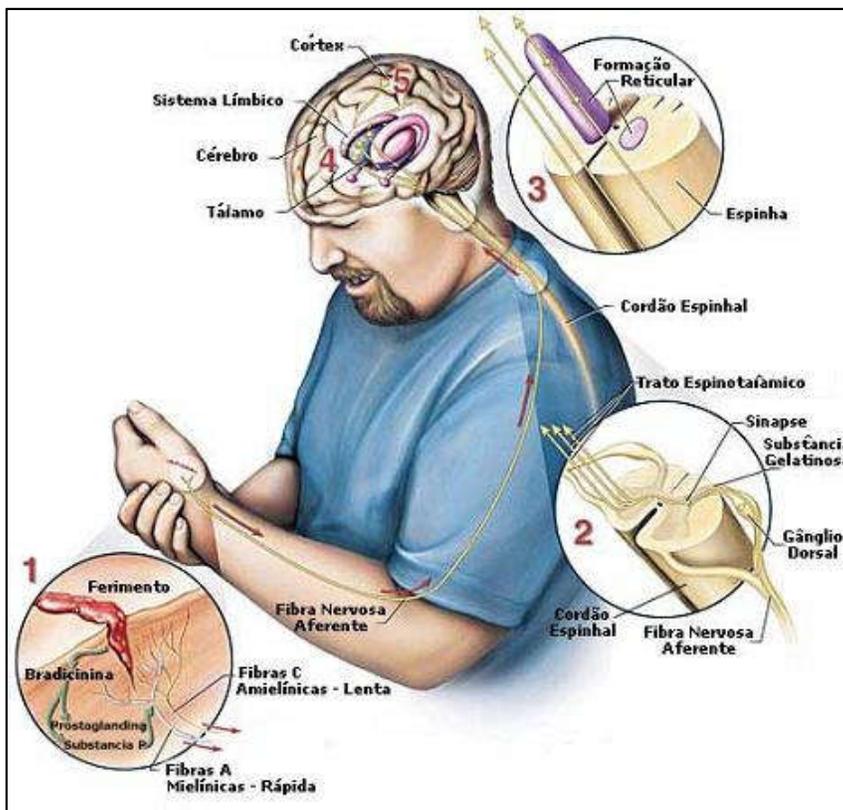


Figura 7 – Transmissão e processamento da dor;
 Fonte: Miguel Júnior (2009)

Depois de adentrarem na medula espinal, as fibras se projetam aos centros superiores, através do trato espinotalâmico projetando-se para o tálamo ou na formação reticular bulbopontina (figura 7, item 2 e 3). Outra projeção nociceptiva importante é representada pelo trato espinomesencefálico, que termina em algumas regiões do mesencéfalo, como a formação reticular mesencefálica e a substância cinzenta periaquedutal. Destes dois pontos as projeções são difusas no córtex cerebral onde são processadas dando origem a sensação dolorosa (RANG et al., 2011; AIRES et al., 2013).

Aires et al. (2013), enfatiza que o trato espino-talâmico lateral é a principal via que medeia a sensibilidade dolorosa e térmica e envolve uma cadeia de três neurônios. O neurônio de 1ª ordem que penetra a medula. A sinapse com o neurônio de 2ª ordem (da substância gelatinosa). Os neurônios de 2ª ordem cruzam o plano mediano pela comissura branca, ganham o funículo lateral do lado oposto e ascendem até o tálamo. Do tálamo, os neurônios de 3ª ordem (Núcleo ventral pósterolateral) partem para o córtex somestésico primário situado no giro póscentral e se dirigem para a área secundária Lóbulo Parietal Superior. Através desta via sensações térmicas e nociceptivas são trazidas dos membros e do tronco do lado oposto, sendo que esta via medeia a sensação de dor rápida e bem localizada (somatotopia) (figura 7).

Ainda Aires et al. (2013) apresenta a via do trato espino-retículo-talâmico, que possui maior número de neurônios em cadeia, os neurônios periféricos que penetram na medula do mesmo modo que a via espino-talâmico lateral. Os neurônios de 2ª ordem estão localizados na coluna posterior da medula e seus axônios cruzam o plano mediano, ganham o funículo lateral do lado oposto, e projetam-se para vários pontos da formação reticular (neurônios de 3ª ordem), onde ocorrem várias sinapses antes dos neurônios reticulares projetarem-se para os núcleos intralaminares do tálamo. Os neurônios de 2ª ordem também sobem pelo funículo lateral do mesmo lado. Do tálamo, os neurônios projetam-se para várias regiões corticais, sendo que a sensação dolorosa mediada por esta via se torna consciente já ao nível do tálamo. Esta via ao contrário da anterior, não estabelece somatotopia e a sensibilidade dolorosa mediada é a difusa e crônica. Esses sinais periféricos levam a informação as fibras aferentes secundárias que ascendem e estimulam áreas como tálamo e córtex sensorial, bem como a formação reticular, sistema límbico e hipocampo, as quais estão relacionadas com a experiência de memória, cognição e emoção, que contribuem para a percepção global da dor (RANG et al., 2011).

Aires et al. (2013) discute que um estímulo doloroso pode ser percebido de formas diferentes quanto a sua intensidade o que indica que existe uma modulação. Na década 1960 inicia-se por Melzak e Wall a discussão sobre a teoria da “comporta” que tenta explicar este mecanismo, que sugere que por meio de interneurônios inibitórios, e pelo balanço entre as aferências nociceptivas vinculadas a fibra C, e outras não nociceptivas transmitidas pelas fibras mielínicas A α e A β ocorra a modulação. Já Rang *et al.* (2011) defende que pode haver uma parte chave na área cinzenta periaquedutal do mesencéfalo, que se projeta para a medula rostroventral inibindo a propagação de estímulos para áreas centrais atuando também como um mecanismo de comporta. Vardeh et al. (2016) afirma que a modulação na dor inflamatória ainda necessita de maiores estudos.

Vale destacar a participação dos neurotransmissores e moduladores da via nociceptiva, são expressos nos neurônios nociceptivos aferentes quer nos terminais nervosos periféricos como nos centrais, principalmente a substância P, o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina e galanina, sendo que as duas primeiras têm efeito inflamatório conhecidos. Estão envolvidos também o glutamato responsável pela transmissão sináptica rápida. Na modulação de supressão, teoria da comporta, outros mediadores estão envolvidos e destaca-se: o GABA (ácido gama aminobutírico) que é liberado por interneurônios da medula espinal e inibe a liberação de transmissor por terminações aferentes primárias; A serotonina que é o transmissor inibitório na medula rostroventral; e norepinefrina que é transmissor da inibitório da via do Locus coeruleus (RANG et al., 2011; KATZUNG et al., 2014).

4 MATERIAIS E METÓDOS

4.1 Animais

Foram empregados no experimento camundongos (*mus musculus*) da linhagem SW55 (*Swiss Webster*), machos adultos afim de se evitar mais uma variável experimental que seria o ciclo estral da fêmea, pesando de 20 a 35 gramas fornecidos pelo biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Os animais foram mantidos sob iluminação controlada em um ciclo claro/escuro cada um durando 12 horas seguindo o ciclo circadiano da espécie, a temperatura foi mantida em 22 ± 1 °C e com regime de água e ração *ad libitum*.

Todos os experimentos foram realizados pautando pelo cumprimento das normas e considerações éticas que envolvem os cuidados com animais em laboratório. Antes de cada experimento receberam apenas água por oito horas para evitar interferências na absorção das substâncias, principalmente quando administradas por via oral. Os estímulos nocivos foram os mínimos necessários para demonstrar os efeitos consistentes do extrato. Após a realização dos métodos de pesquisa os animais foram eutanasiados e suas carcaças foram armazenadas sob refrigeração para posterior incineração. Os procedimentos submetidos ao comitê de ética em uso animal (CEUA) interno da instituição, já aprovado.

4.2 Fármacos, Reagentes e Solventes

As seguintes substâncias foram utilizadas: Indometacina e carragenina (Sigma Chemical Co., St.Louis, MO, USA); Dexametasona (Decadron®, Ache Laboratórios Farmacêutico, São Paulo, Brasil), solução NaCl(salina 0,9%), formaldeído(Merck),moleculsol 5%, serotonina, histamina(Sigma Chemical Co., St.Louis, MO, USA), solução de PBS (phosphate buffered saline – Tampão fostato-salino), Solução de turk, heparina, Fentanil 0,3 mg/kg (Dimorf ®, Cristália, São Paulo – Brasil), ácido acético 1,2%; Diazepan® (Santisa, Laboratório Farmacêutico, São Paulo – Brasil).

Os extratos metonólicos das folhas (EMF) e do caule (EMC) foram produzidos na Universidade Federal Rural de Pernambuco e relatados em subtópico a parte.

4.3 Obtenção Extratos da *Eugenia uvalha*

O extrato metanólico da folha (EMF) e do caule (EMC) foram cedidos pelo grupo de pesquisa de química de produtos naturais da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro liderado pelo professor Dr. Mario Geraldo de Carvalho e confeccionados pela mestra e doutoranda Ilzenaide de Araújo Neves.

O material botânico, folhas e caule da *Eugenia uvalha* Cambess foram coletados no período da manhã no município de Recife – Pernambuco no Campus da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) em julho de 2011, a espécie foi identificada pela Dr. Maria de Fátima de Araújo Lucena do Centro de Saúde e Tecnologia Rural-Unidade Acadêmica de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Campina Grande. Uma amostra desta espécie foi depositada no Herbário Vasconcelos Sobrinho da UFRPE sob o número 48.216.

A preparação dos extratos vegetais seguiu-se a obtenção do caule e folhas que foram secos e moídos, em seguida macerados separadamente em hexano, diclorometano e metanol PA (pró-análise) exaustivamente. Após a obtenção, os extratos foram filtrados e concentrados em evaporador rotatório sob pressão reduzida, em banho-maria com temperatura a 60°C para o metanol (NEVES et al., 2012).

A escolha pelo extrato que utiliza o metanol como solvente base, além da disponibilidade se justifica com base em Mattos (2013) que investigou a quantificação de ácidos fenólicos e flavonoides usando diferentes solventes (água, etanol, metanol e combinações de 50% entre os candidatos), onde o extrato com base em metanol superou em 35% o segundo colocado, e embora outros compostos não tenham sido avaliados, pode-se deduzir que também se apresentam em maior concentração neste estudo semelhante foi conduzido por Haminiuk et al. (2012) corroborando com estes dados, destacando a presença pronunciada do ácido gálico e a quercetina, ambos ácidos fenólicos com concentrações respectivas de 255,91 e 58,31 mg/Kg.

4.4 Modelos experimentais

4.4.1 Ensaio de toxicidade aguda (dose simples)

Para o ensaio de toxicidade aguda *in vivo* foi empregado o protocolo publicado por Brito (1994). Foram utilizados dez camundongos, cinco machos e cinco fêmeas, sendo estas não-grávida e nulíparas, após a dose teste de 1000 mg/kg foram observados cuidadosamente durante os primeiros 30 minutos, posteriormente com 60, 120, 240 e 360 minutos, e depois uma vez a cada 24 horas por 14 dias durante 30 minutos.

Durante este período ocorreu a observação clínica sobre a alteração de pelos, pele, mucosas, sistema respiratório, sistema nervoso central e periférico, a atividade motora e comportamental, dando atenção especial a sintomas tais como: tremores, convulsões, salivação, diarreia, letargia e coma. Em caso de ocorrência de qualquer sintoma deve ser procedida a análise anatomopatológica e histopatológica. A figura 8 ilustra a realização do ensaio.

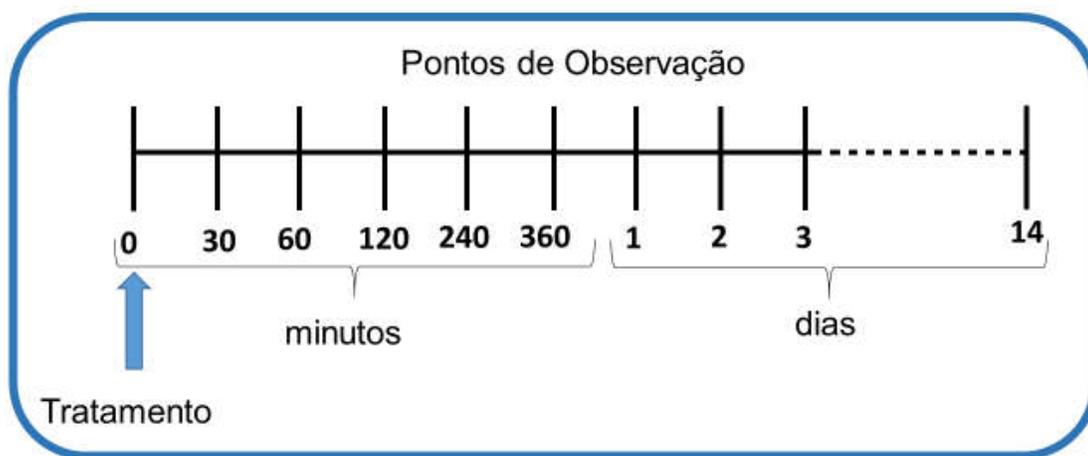


Figura 8 – Esquema do ensaio de toxicidade aguda

O ponto zero refere-se ao momento de administração da substância teste; Primeiras observações ocorrem em intervalos progressivos em minutos, posteriormente uma observação a cada 24 horas; Fonte: Elaborado a partir de Brito (1994).

A dose teste foi administrada por via oral em uma única aplicação, mantido em regime normal de laboratório, com ciclo de claro e escuro de 12 horas e com ração e água potável *ad libitum*. A extrapolação dos resultados para seres humanos de estudos de efeitos tóxicos produzidos pela administração aguda de uma substância em roedores é

internacionalmente aceita, embora outros métodos complementares devem ser feitos para a validade desses estudos para seres humanos.

4.4.2 Contorções abdominais

O método de contorções abdominais induzidas por ácido acético foi idealizado por Koster, Anderson e Beer (1959), mas ganhou status de modelo experimental e protocolo atualmente utilizados por Collier et al. (1968) que validou estatisticamente o método avaliando mais de 30 fármacos conhecidos em sua época pelos efeitos antinoceptivos, concluindo que é consistente e muito sensível podendo ser utilizados para analgésicos de menor potencial e o estímulo nocivo é mínimo.

Deraedt et al. (1980) ao investigar o método o estende para avaliação anti-inflamatória dado que a injeção de ácido acético gera dor indiretamente, via mediadores endógenos como a bradicinina, serotonina, histamina, substância P e prostaglandinas, que estimulam os neurônios nociceptivos periféricos que são sensíveis a analgésicos opioides e anti-inflamatórios não esteroidais.

A figura 9 resume a execução do modelo, onde os animais são deixados em jejum prévio de 8 horas, no momento zero foram administrados os extratos e substâncias controle por via oral, o ácido acético (1,2%) administrado por via intraperitoneal na dose de 0,01 mL/g é aplicada após 60 minutos, procedendo-se pelos próximos 30 minutos a contagem das contorções abdominais.

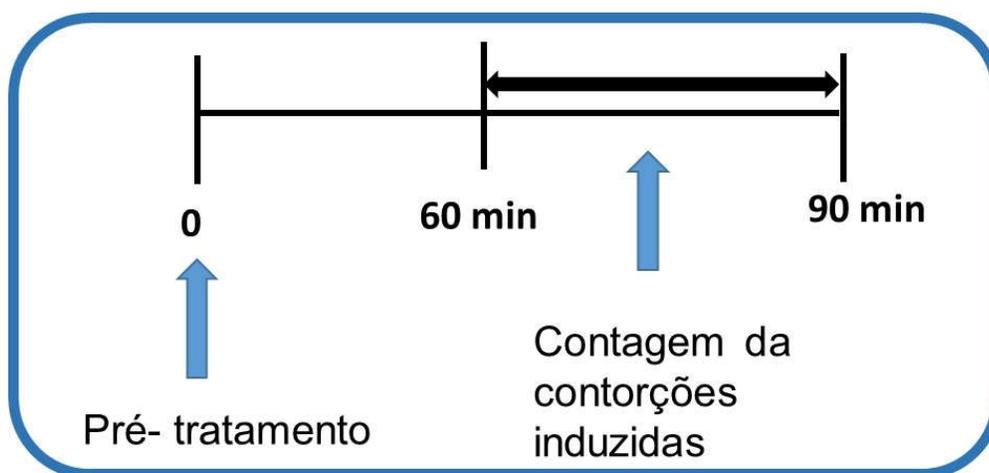


Figura 9 – Esquema do método de contorções abdominais induzidas por ácido acético. No momento zero ocorre o pré-tratamento com as substâncias em teste; A administração do ácido acético ocorre quando se completa 60 minutos; Fonte: Elaborado a partir de Koster, Anderson e Beer (1959) e Collier et al. (1968);

A contorções observadas em ratos e camundongos, após a injeção intraperitoneal do agente nociceptivo, caracterizam-se por contração e rotação do abdômen, seguida pela extensão de uma ou ambas as patas traseiras, a contagem acumulada desta reação no intervalo padronizado é tomada como resposta nociceptiva, sendo empregada em análise estatística (COLLIER et al., 1968; DERAEDT et al., 1980).

A inibição foi calculada pela equação 1, conforme Chattopadhyay et al. (2012).

$$\% \text{ inibição} = \frac{M.\text{de contorções no grupo controle} - M.\text{de contorções no grupo teste}}{M.\text{de contorções no grupo controle}}, (1)$$

Onde:

M = média

4.4.3 Formalina

O método de formalina foi proposto por Dubuisson e Dennis (1977) e revisto por Tjølsen et al. (1992), em termos básicos consiste na aplicação de uma injeção de formalina que induz o aparecimento de diferentes respostas motoras em camundongos, ratos e gatos, cuja a quantificação permite que se avalie a intensidade nociceptiva, tendo alta sensibilidade e sendo mais adequando para dor aguda.

O resumo da técnica empregada encontra-se na figura 10. Foi administrado uma injeção intraplantar na pata traseira direita da formalina à 2,5%, em seguida computa-se o tempo em segundos que o animal lambe, morde e sacode a pata injetada, uma hora antes receberam o EMC e EMF ambos na dose de 100, 300 e 1000 mg/kg, também o controle positivo (indometacina 10 mg/kg) e o controle negativo (moleculsol 5%) todos por via oral, um segundo controle positivo foi empregado por via subcutânea o fentanil a 0,3 mg/kg.

O método da formalina possui duas fases distintas já observadas por Dubuisson e Dennis (1978) cuja da distinção fora confirmada por Hunskaar e Hole (1987). A primeira fase que vai de 0 a 5 minutos é denominada neurogênica, pois a dor é resultante da estimulação direta dos nociceptores. Há um período de silêncio de 5 a 15 minutos evocado por mecanismos endógenos de supressão da dor, após este inicia-se a segunda fase conhecida como inflamatória, dado que dor se deve a liberação de mediadores que provocam a inflamação e a hiperalgesia. Esta distinção ampliou a capacidade do método pois além de

inferir sobre a capacidade álgica é possível deduzir por similaridade o mecanismo de ação subjacente.

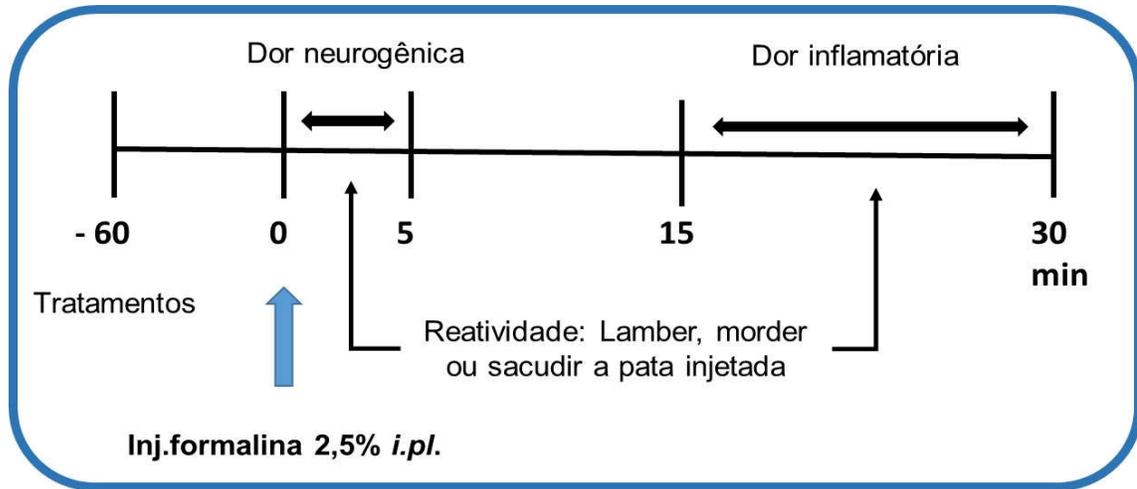


Figura 10 – Esquema do método de formalina

O ponto zero refere-se ao momento da injeção da formalina, os tratamentos com as substâncias testes ocorrem 60 minutos antes; Fonte: elaborado com base em Dubuisson e Dennis (1978) e Tjolsen et al. (1992)

4.4.4 Pleurisia induzida por carragenina

O método da pleurisia induzida por carragenina a 1% foi descrito por Henriques et al. (1990), e ilustrado na figura 11. Os animais são colocados em jejum prévio de 8 horas, no momento zero são administradas as substâncias testes, sendo o controle negativo o moleculsol 5%, EMF e EMC nas doses de 30, 100 e 1000 mg/kg administrados por via oral, o controle positivo foi a dexametossana 2 mg/kg por via subcutânea. Após sessenta minutos foi aplicado carragenina a 1% via intratorácica, depositando elemento flogístico na cavidade pleural. Transcorridos 240 minutos os animais foram sacrificados e o líquido pleural foi extraído por lavagem empregando 500 μ L de solução salina tamponada (PBS – pH 7,6) e heparinizada (20 μ L/mL). Após a coleta do lavado este foi depositado em *eppendorf* para posterior análise.

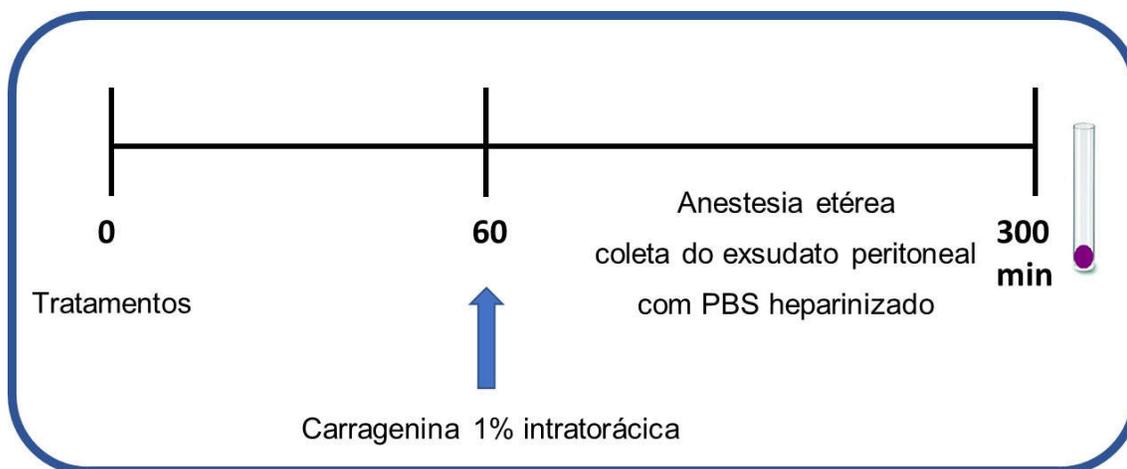


Figura 11 – Esquema do método de pleurisia induzida por carragenina
 No momento zero ocorre administração das substâncias teste; A carragenina foi aplicada 60 minutos após; Fonte: elaborado a partir de Henriques et al. (1990);

Segundo Frode (2000) esta técnica visa avaliar a inflamação aguda, e o exsudato produzido permite determinar a quantidade de leucócitos migrados para área bem como os mediadores liberados. Nesta pesquisa os leucócitos foram contados em câmara de Neubauer com auxílio de microscopia ótica. O mediador inflamatório TNF α teve sua leitura realizada com um espectrofotômetro de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), onde empregou-se o KMC3011- TNF *alpha* ELISA kit mouse da *ThermoFisher Scientific*®, em comprimento de onda de 450 nm, sendo as concentrações determinadas por regressão não linear de quatro pontos da curva padrão conforme Ramana et al. (2007), e recomendação do fabricante, os cálculos seguem os indicados em Costa et al. (2010), equação 2 obtida por regressão linear simples, com $R^2 = 0,989$ o que valida seu emprego com razoável precisão.

$$C = 1 / \frac{DO}{447,6}, \text{ onde:} \quad (2)$$

C = concentração de TNF α

DO = densidade óptica registrada

4.4.5 Edema de pata

O método analítico do edema de pata inicialmente descrito por Vinegar, Schreiber e Hugo (1969) e divulgado como método de avaliação anti-edematogênica por Van Arman (1979), ilustrado na figura 12, consiste na aplicação intraplantar na pata direita traseira de 0,02 mL de carragenina (1% p/v) e na esquerda o mesmo volume de salina a 0,9%.

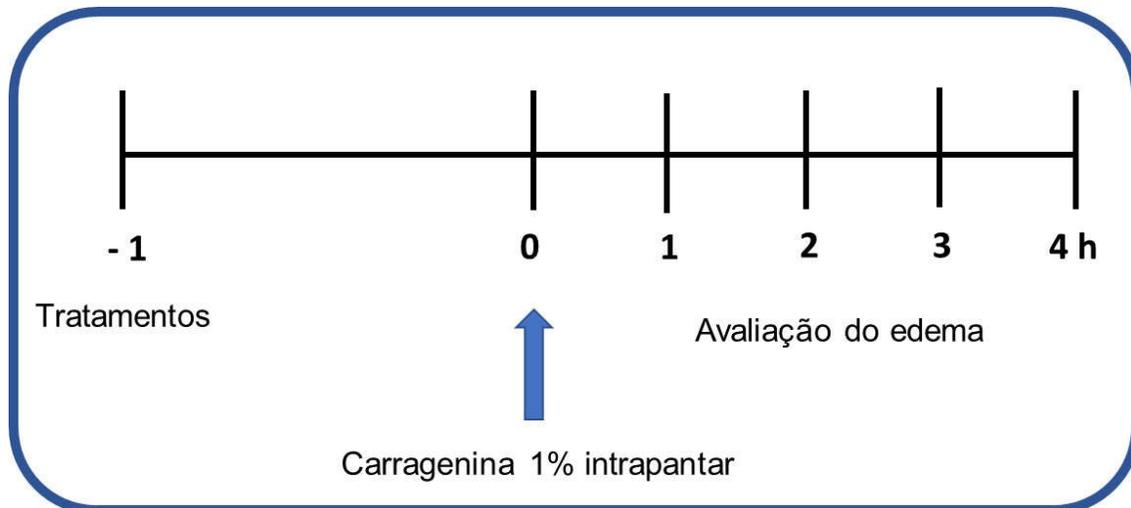


Figura 12 – Esquema do método de edema de pata induzido por carragenina
 Os tratamentos com as substâncias em teste ocorrem no momento -1 hora; O zero refere-se ao momento de administração do agente flogístico; Fonte: Elaborado com base em Vinegar, Schreiber e Hugo (1969) e Van Arman (1979).

Inicialmente os animais tiveram o volume da pata basal determinados e separados de forma que a média entre grupos seja semelhante. O edema produzido foi avaliado com auxílio de um plestismômetro digital, que registra a variação no volume de água em seu interior após a imersão da pata até a articulação tíbio-társica. Conforme Van Arman (1979) para análise estatística considera-se a diferença registrada entre as duas patas do mesmo animal.

A indução por carragenina neste caso é bifásica com a formação de edema resultante da rápida produção de vários mediadores inflamatório. A fase inicial (60-90 minutos) é atribuída a uma liberação de histamina, serotonina e bradicinina, enquanto a fase tardia (4-6 horas) é devido ao pico de produção de prostaglandina (OGONOWSKI et al., 1997).

A carragenina é um indutor da inflamação que evoca diversos processos de mediação, desta forma Malling et al. (1974) propõem um protocolo onde o agente flogístico é substituído pela histamina, serotonina e bradicinina, com finalidade de verificar qual o efeito que a substância em teste tem sobre estes mediadores inflamatórios, deu-se métrica ao volume do edema induzido conforme a figura 12, e concentrou-se a análise na primeira hora seguindo os argumentos de Pires et al. (2015), onde foram administrados histamina (100 η mol/ por pata) e serotonina (100 μ g / pata), ressalta-se que todos os dois mediadores atuam em curto prazo no processo inflamatório(KUMAR et al., 2010; RANG et al., 2011; e KATZUNG et al., 2014).

4.4.6 Rota-rod

O método de rota-rod (roda giratória) foi proposto inicialmente por Dunham e Miya (1957) e adaptado para camundongos por Carlini et al. (1986) cujo o protocolo foi seguido, permitindo avaliar se determinada droga produz falta de coordenação motora, quer seja por relaxamento muscular ou sedação. O aparelho utilizado é constituído por uma barra giratória subdividida em compartimentos, regulada para girar a uma velocidade 12 rotações por minuto a 25 centímetros de altura. Os animais foram colocados para caminhar sob a barra durante 1 minuto com até três reconduções.

Foram utilizados grupos com oito animais, sendo um controle de salina a 0,9%, veículo moleculsol a 5%, e o EMF 300 mg/kg, todos administrados por via oral e controle positivo o diazepam® 2mg/kg subcutâneo, tendo sido avaliado o tempo de permanência total no equipamento após 1 hora da administração.

4.4.7 Campo aberto

O método de campo aberto visa avaliar atividade depressora ou estimulante do sistema nervoso central conforme revisão promovida por Walsh e Cummin (1976) também servindo para outras avaliações comportamentais de maior interesse a psicologia. O ensaio farmacológico foi realizado seguindo as prescrições de Barros et al. (1991) que embora utilize um campo circular sua praxe pode ser empregada para outro formato geométrico, um campo quadrado de lado igual a 30 cm de fundo preto, foi dividido em 9 quadros iguais e cercado por uma caixa de acrílico de 15 cm de altura, neste local avaliou-se a atividade exploratória dos animais.

No dia da aplicação do método, após oito horas de jejum admitindo somente água, os camundongos receberam por via oral em diferentes grupos salina a 0,9% (controle negativo), moleculsol 5%, EMF 300 mg/kg e por via subcutânea 2 mg/kg de diazepam® (controle positivo). Decorridos 60 minutos do tratamento cada animal foi observado durante cinco minutos com auxílio do *software* Any-Maze versão 5.0 por meio de uma câmera instalada acima do campo.

Foram observados os seguintes parâmetros distância total percorrida, entradas no quadrante central (atividade ansiolítica ou sedativa), *rearing* (apoiar-se nas paredes da caixa, relaciona-se com a atividade ansiolítica), *grooming* (autolimpeza), o tempo que permanece

parado (imobilidade = sedação ou medo) e número de bolos fecais (emocionalidade) (PRUT e BELZUNG, 2003).

4.4.8 Análise Estatística

A análise estatística foi desenvolvida com auxílio do *software* GraphPad Prism versão 5.00 para Windows®, registrado pela GraphPad Software, San Diego Califórnia, USA. Os resultados são expressos como média aritmética \pm EPM (erro padrão da média), a comparação foi executada pela técnica de ANOVA (Análise de variância) – *one way* (com um fator) com pós-teste de Tukey, considerando os resultados significativos quando, no mínimo, $p < 0,05$. Os dados utilizados foram validados em grupo pelo teste de *Grubbs* que visa detectar a existência de *outliers* (pontos fora da curva) com significância de 95%.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Ensaio de toxicidade aguda (dose simples)

Conforme o protocolo foram selecionados 10 animais e divididos em dois grupos com iguais quantidades de machos e fêmeas, tanto para o EMF e EMC, após 14 dias de observação não foram encontrados quaisquer sintomas (alteração de pelos, pele, mucosas, sistema respiratório, sistema nervoso central e periférico, a atividade motora e comportamental, tremores, convulsões, salivação, diarreia, letargia e coma) ou morte que indicassem efeito tóxico.

A tabela 7 resume o resultado de ensaios de toxicidade para a *Eugenia uvalha* Cambesse outras espécies do gênero eugenia

Tabela 7 – Outros Ensaios de toxicidade

Espécie	Ensaio de Toxicidade	Tipo de extrato	Resultado encontrado
<i>Eugenia uvalha</i> Cambess	microcrustáceo <i>Artemia salina</i> Leach ¹	Extrato etanolico de folhas, frutos e caule	Não houve toxicidade
	Administração <i>ad libitum</i> de frutos a ovinos ²	Frutos <i>in natura</i>	Efeito tóxico, após o 6 dia de consumo de 45,45 kg/dia
<i>Eugenia uniflora</i> L	Determinação de dose letal (DL ₅₀) ³	Extrato hidroetanólico de folhas	Dose Letal de 5,93 g/kg
	Aguda (dose simples)	Óleo essencial das folhas	Não houve toxicidade
<i>Eugenia jambolana</i>	Aguda (dose simples) Citóxico com eritrócitos humanos ⁵	Extrato aquoso, etanólico e de acetona das sementes	Aguda (dose simples) - 2000 mg/kg Citóxico com eritrócitos humanos - 1000µg/mL
<i>Eugenia stipitata</i> Mc Vaugh	Aguda (dose simples)	Extrato etanólico das folhas	1000 mg/kg

Fonte: Elaborado a partir de: 1 - Silva et al. (2015), 2 - Emmerich et al. (2014); 3 - Auricchio et al. (2007); 4 - Victoria et al. (2012);5 - Bag et al. (2012)

Auricchio et al. (2007) empregando extrato hidroetanólico das folhas da *Eugenia uniflora* L realizou experimento afim de determina a DL₅₀ (dose letal de 50% da população), determinando o valor de 5,93 g/kg, contudo o próprio autor defende que este resultado representa baixíssimo risco dado que a inibição da atividade antioxidante foi registrada com 34,6 µg/mL. Já Victoria et al. (2012), utilizando o óleo essencial das folhas na dose de 200 mg/kg e efetuando o ensaio de toxicidade aguda, nos mesmos moldes desta pesquisa, não encontrou qualquer indicio de toxicidade

Bag et al. (2013) empregou extratos tendo por base a água, etanol e acetona das sementes da *Eugeniajambolana*, realizou dois ensaios para toxicidade. Para toxicidade aguda (dose simples) empregou dose de 2000 mg/kg e toxicidade com eritrócitos humanos na dose de 1000 µg/mL.

Neri-Numa et al. (2012), obteve extrato etanólico das folhas da *Eugenia stipitata* Mc Vaugh, e também empregou o protocolo para verificar toxicidade aguda simples na dose de 1000 mg/kg do extrato etanólico das folhas também não encontrando nenhum resultado, em complementariedade analisou a evolução do peso e a concentração de eritrócitos o que também não revelou qualquer alteração significativa.

Osachados de Silva et al. (2015), que embora tenham utilizado extrato folhas, frutos e caule da *Eugenia uvalha* Cambess obtidos com etanol, também não demonstraram nenhum efeito sobre o microcrustáceo *Artemia salina* Leach, atendendo ao anseio dos autores em realizar um ensaio *in vivo* em roedores.

Entretanto Emmerich et al. (2014) constata a partir de relato popular, efeito tóxico em ovinos após 6 dias com doses diárias de 45,45 kg/dia do fruto *in natura*, com sintomas que indicam alterações no sistema nervoso central, contudo sem achado anatômico, morfológico ou histopatológico que comprove qualquer lesão. Ainda sim evocando o uso popular registrado por Albuquerque, Figueiredo e Cerqueira (2012) em diversas regiões do país não há relato de envenenamento ou qualquer ação indesejada, contudo neste uso primitivo não há padronização e nem acompanhamento científico o que enfraquece, mas não inválida tal fonte de informação. Lembram Barreiro e Bolzani (2009) e Newman e Gragg (2012) que embora o uso tradicional esteja estabelecido, somente a pesquisa científica de produtos naturais pode estabelecer a segurança do uso.

Lendo em conjunto os achados desta pesquisa com os estudos de outros autores tanto para a *Eugenia uvalha* Cambess quanto de outras Eugénias infere-se que no quesito de toxicidade aguda provavelmente esta segura para uso terapêutico, pois além de não apresentar nenhum efeito tóxico até a dose de 1000 mg/kg, plantas do mesmo gênero também não registram efeitos que se possa considerar como indicativos de toxicidade.

5.2 Contorções abdominais induzidas por ácido acético

Foram utilizados grupos com 6 camundongos, sendo: salina 0,9% (controle negativo), o molecusol 5% (veículo), indometacina 10 mg/kg (controle positivo) e o EMF e EMC nas doses de 10, 30, 100, 300 e 1000 mg/kg todos por via oral e o ácido acético a 1,2% por via intraperitoneal conforme prescrito por Collier et al. (1968).

As contorções acumuladas foram contadas dentro de 30 minutos após a aplicação do estimulante álgico e os resultados expressos na tabela 8, onde a inibição foi calculada tendo como base o controle negativo, e empregando a equação 1.

Tabela 8 – Contorções abdominais induzidas por ácido acético

Substância	Dose (mg/kg)	Caa (m ± epm)	Inibição (%)
Salina 0,9%	0,01 ¹	104,2 ± 3,48	-
Molecusol 5%	0,01 ¹	103,0 ± 2,76	-
Indometacina	10	12,4 ± 0,51	88,45±0,47***
EMF	10	75,8 ± 3,56	29,37±3,32**
	30	64,20 ± 11,21	40,18±10,44***
	100	71,50 ± 4,53	33,38±4,22***
	300	48,17 ± 2,89	55,12±2,69***
	1000	33,33 ± 3,67	68,94±3,42***
EMC	10	95,80 ± 2,23	-
	30	95,20 ± 2,15	-
	100	91,17 ± 3,31	-
	300	98,83 ± 2,77	-
	1000	90,67 ± 1,22	-

Caa = Contorções abdominais acumuladas; 1 – dose de 0,01mL/g; ** p < 0,01 e *** p < 0,001 calculados tendo como referência o grupo controle salina; Após a aplicação do teste de Grubbs os grupos: salina 0,9%, Indometacina 10 mg/kg; EMC 30 mg/kg; EMF 10 mg/kg; EMF 30 mg/kg com n = 5; Demais grupos n = 6

Como esperado e registrado na tabela 8 não houve diferença significativa entre a salina e o molecusol, donde denota-se que o diluente utilizado para o preparo das soluções teste não interferiu no resultado. Extrai-se também que não foi observada inibição das contorções para o EMC o que permite inferir que não teve efeito antinociceptivo (tabela 8 e figura 15). O EMF apresentou resultados com plausibilidade estatística para a dose de 10 mg/kg (p < 0,01) e nas doses de 30, 100, 300 e 1000 mg/kg (p < 0,001), ainda os resultados de inibição apresentam-se de forma dose dependentes pode-se observar em conjunto na figura 13

cujo os dados constam na tabela 9, o que permitiu o cálculo da DI_{50} (dose inibitória de cinquenta por cento).

O cálculo da DI_{50} , que segundo Katzung et al. (2014) e Rang et al. (2011) é a dose que apresenta 50% do efeito de inibição, correspondendo a metade da área sob a curva. A regressão obtida apresentou um R^2 (qualidade) de 0,9433, a DI_{50} na dose de logaritmicamente decimal de 2,489 o que equivale a aproximadamente a dose de 308 mg/kg.

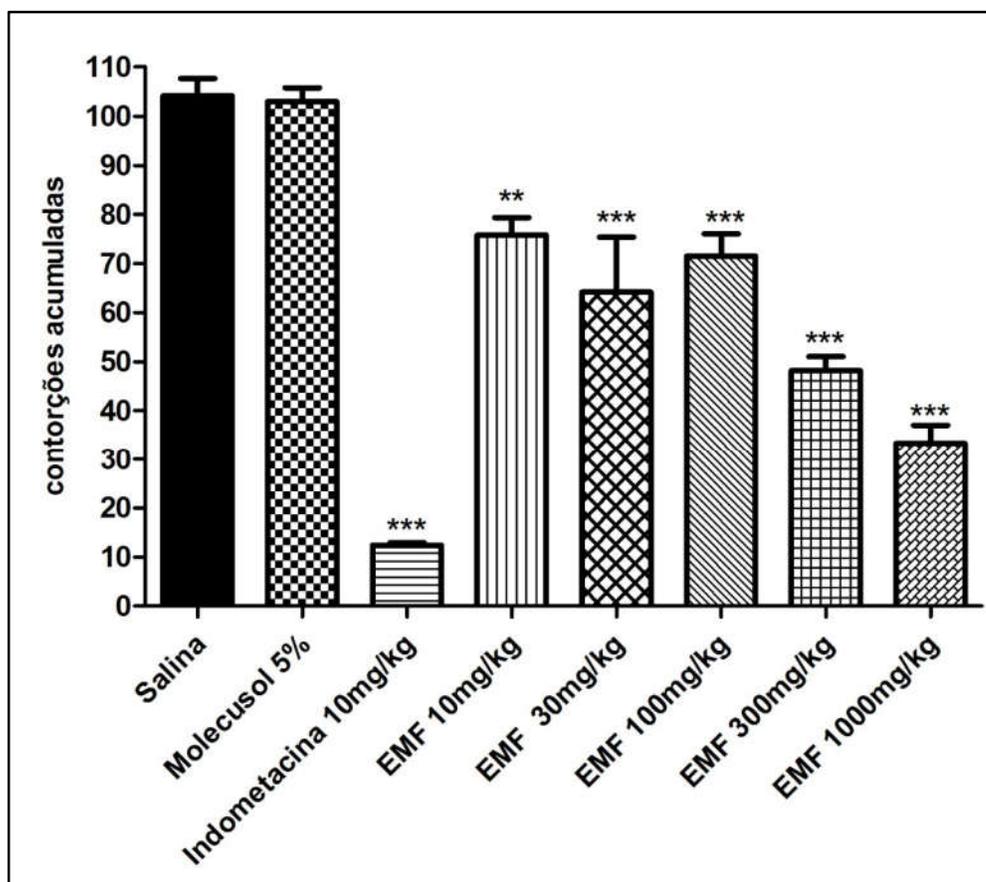


Figura 13 – Resultados das contorções abdominais induzidas por ácido acético para o EMF; ** = $p < 0,01$ e *** = $p < 0,001$, significância estatística calculada com referência ao grupo controle salina; salina a 0,9% (0,01 mL/g); Molecusol a 5% (0,01 mL/g); Indometacina 2 mg/kg; EMF nas concentrações 10, 30, 100, 300 e 1000 mg/kg; Após a aplicação do teste de Grubbs os grupos: salina, Indometacina; EMF 10 mg/kg; EMF 30 mg/kg com $n = 5$; Demais grupos $n = 6$

Tabela 9 - Resultados das contorções abdominais induzidas por ácido acético para o EMF e EMC

Substância Teste	Média	EPM	N do grupo
Salina 0,9%	104,2	3,48	5
Molecusol 5%	103,0	2,76	6
Indometacina 10mg/kg	12,40***	0,51	5
EMF 10 mg/kg	75,80**	3,56	5
EMF 30 mg/kg	64,20***	11,21	5
EMF 100 mg/kg	71,50***	4,53	6
EMF 300 mg/kg	48,17***	2,89	6
EMF 1000 mg/kg	33,33***	3,67	6
EMC 10 mg/kg	95,80	2,23	5
EMC 30 mg/kg	95,20	2,15	6
EMC 100 mg/kg	91,17	3,31	6
EMC 300 mg/kg	98,83	2,77	6
EMC 1000 mg/kg	90,67	1,22	5

** = $p < 0,01$ e *** = $p < 0,001$, significância estatística calculada com referência ao grupo controle salina 0,9% (0,01 mL/g); Molecusol 5% (0,01mL/g) Indometacina 10mg/g; EMF 10, 30, 100, 300 e 1000 mg/kg; Experimentos realizados com grupos de 6, resultado retirado quando *outlier* detectado pelo teste de *grubbs*.

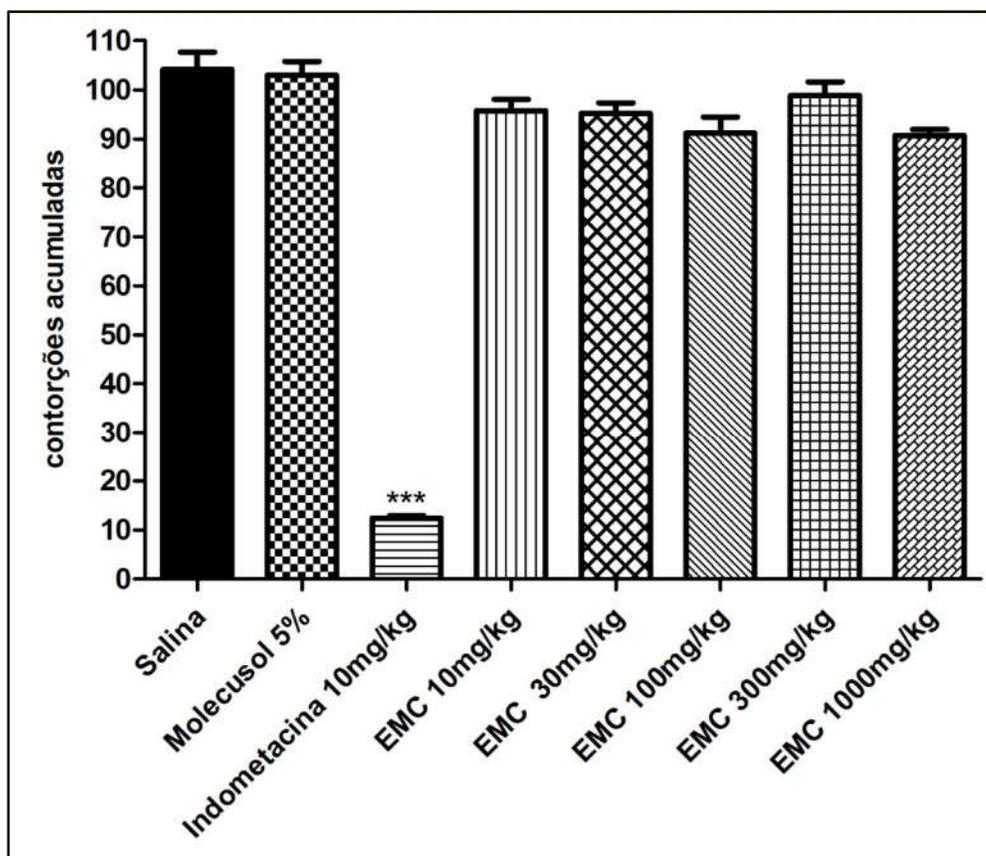


Figura 14 - Resultados das contorções abdominais induzidas por ácido acético para o EMC

*** = $p < 0,001$, significância estatística calculada com referência ao grupo controle salina; salina a 0,9%; Molecusol a 5%; Indometacina 2 mg/kg; EMC nas concentrações 10, 30, 100, 300 e 1000 mg/kg; Após a aplicação do teste de Grubbs os grupos: salina, Indometacina; EMF 10 mg/kg; EMF 30 mg/kg com $n = 5$; Demais grupos $n = 6$

Na figura 14 verifica-se que para as doses em avaliação não houve atividade de inibição nociceptiva quando da contorção induzida por ácido acético para o EMC. Já a o EMF apresentou inibição dose dependente conforme atestam a tabela 9 e figura 13, a DI50 pode ser determina em aproximadamente em 308,3 mg/kg, que representa a dose capaz de provocar 50% do efeito de inibição (Katzung et al., 2014).

Guimarães et al. (2009) utilizou o óleo essencial extraído das folhas da *Eugenia candolleana* DC, obtendo um resultado dose dependente, inibindo 73,9% das contorções com a dose de 100 mg/kg enquanto a dose equivalente de EMF inibiu 33,38±4,22% (tabela 8). Thaer et al. (2015) utilizou o óleo da semente da *Eugenia caryophyllata* obtendo inibição de 87,7% para a dose de 33 mg/kg enquanto a dose do EMF de 30 mg/kg inibiu 40,18±10,44% (tabela 8). Embora os efeitos relatados por Guimarães et al. (2009) e Thaer et al. (2015) sejam mais pronunciados que os obtidos com o EMF este resultado pode ter ocorrido por métodos de extração diferentes tanto em base como da parte da planta, o que pode ser corroborado observando o trabalho de Saha et al. (2013), onde a mesma utilizou o extrato metanólico da folha da *Eugenia jambolana* na dose de 300 mg/kg obtendo resultado de inibição de 48,57% o que se aproxima ao resultado obtido com EMF na mesma dose, 55,12±2,69 (tabela 8).

5.3 Formalina

Foram empregados grupos com seis animais sendo: (1) grupo controle positivo para a primeira fase o fentanil 0,3 mg/kg; (2) grupo controle positivo para a segunda fase a indometacina 10 mg/kg; (3) grupo controle negativo moleculol a 5% administrado na taxa de 0,01 mL/g; (4 – 6) EMC nas doses de 100, 300 e 1000 mg/kg; (7 – 9) EMF nas doses de 100, 300 e 1000 mg/kg. Como demonstrou-se no método das contorções induzidas por ácido acético não haver diferença estatística entre a salina e o moleculol na observação da reação em resposta nociceptiva, decidiu-se pelo não emprego do grupo salina, o que coaduna com a melhor utilização de animais em experimento.

A figura 15 apresenta o resultado para o EMC cujos valores estão expressos na tabela 10, onde tanto na fase de dor neurogênica como na fase de dor inflamatória não foram observados quais quer efeito, o que confirma o resultado da não inibição nociceptiva e indica que potencialmente não há efeito anti-inflamatório. Tanto o fentanil quanto a indometacina

apresentaram comportamento esperado na literatura conforme descrito por Hunskaar e Hole (1987).

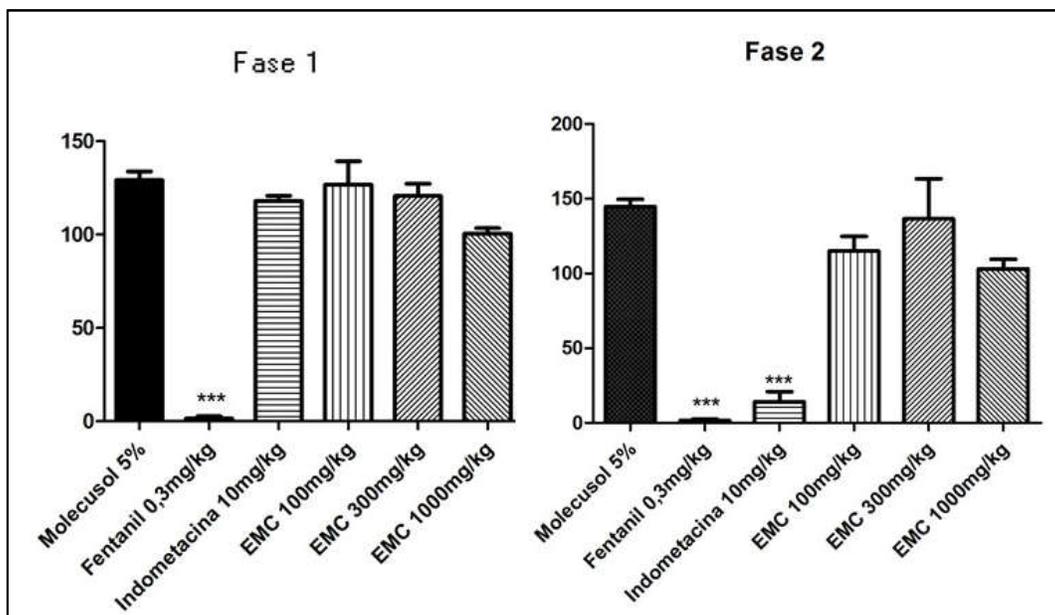


Figura 15 – Resultados do método da formalina do EMC

*** = $p < 0,001$ calculados tendo como referência o molecusol 5% (0,01 mL/g); Fentanil 0,3 mg/kg; Indometacina 10 mg/kg; EMC nas doses de 100, 300 e 1000 mg/kg. Fase 1 – Dor neurogênica; Fase 2 – Dor inflamatória. Na fase 1 e 2 os grupos molecusol, fentanil, indometacina e EMC 1000 mg/kg ($n = 5$) e demais grupos ($n = 6$) após o teste de Grubbs

Tabela 10 - Resultados do método da formalina para o EMC

Substância Teste	Fase 1		Fase 2		N do grupo
	Média	EPM	Média	EPM	
Molecusol 5%	129,2	4,66	144,6	4,90	5
Fentanil 0,3 mg/kg	1,60	1,03***	1,66***	0,84	6
Indometacina 10mg/kg	118,00	2,82	7,80***	2,88	5
EMC 100 mg/kg	126,80	12,51	115,00	9,74	6
EMC 300 mg/kg	120,7	6,70	136,50	26,72	6
EMC 1000 mg/kg	100,6	2,87	103,2	6,27	6

*** = $p < 0,001$, significância estatística calculada com referência ao grupo controle salina 0,01 mL/g; Molecusol 5% (0,01 mL/g); Fentanil 0,3mg/kg; Indometacina 10mg/kg; EMC 100, 300 e 1000 mg/kg. Experimentos realizados com grupos de 6, resultado retirado quando *outlier* detectado pelo teste de grubbs

O método aplicado ao EMF, é apresentado na figura 16. Na primeira fase não houve efeito sobre a dor neurogênica, enquanto na segunda fase houve significativo efeito anti-inflamatório, semelhante ao comportamento da indometacina, o que sugere um mecanismo de ação semelhante. Os tempos de reação estão expressos na tabela 11.

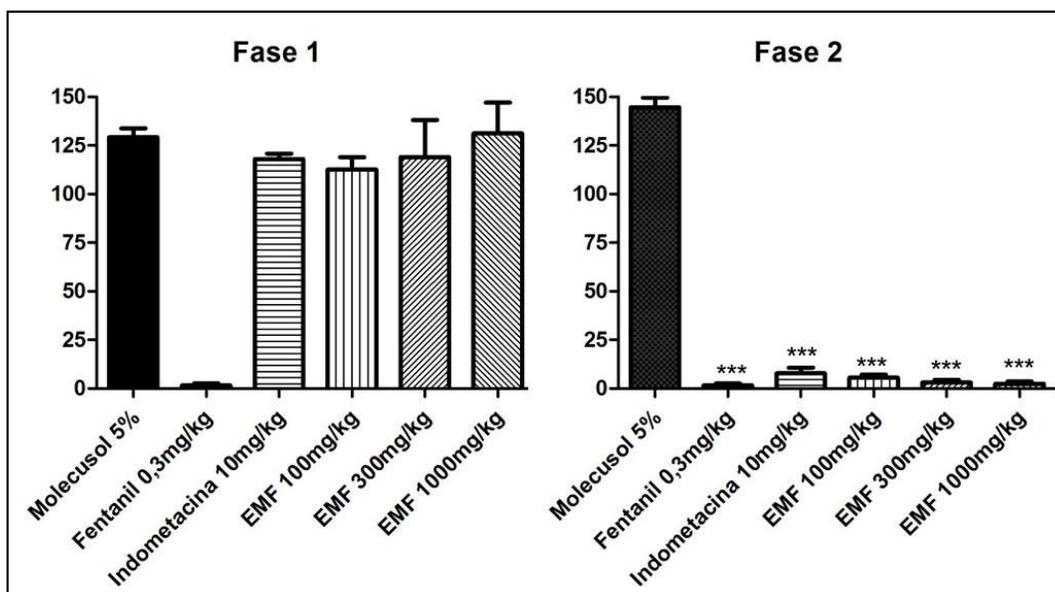


Figura 16 – Resultado do método da formalina para EMF

*** = $p < 0,001$, cálculos efetuados tendo como controle o molecusol 5% (0,01mL/g); Fentanil 0,3 mg/kg; Indometacina 10 mg/kg; EMF nas doses de 100, 300 e 1000 mg/kg. Grupos Molecusol, Fentanil Indometacina ($n = 5$), demais grupos $n = 6$, após o teste de Grubbs

Tabela 11 - Resultados do método da formalina para o EMF

Substância Teste	Fase 1		Fase 2		N do grupo
	Média	EPM	Média	EPM	
Molecusol 5%	129,2	4,66	144,6	4,90	5
Fentanil 0,3 mg/kg	1,60	1,03***	1,66***	0,84	5
Indometacina 10mg/kg	118,00	2,82	7,80***	2,88	5
EMF 100 mg/kg	112,70	6,28	5,50***	1,72	6
EMF 300 mg/kg	119,00	19,07	3,00***	1,48	6
EMF 1000 mg/kg	131,2	15,89	2,40***	1,16	6

*** = $p < 0,001$, significância estatística calculada com referência ao grupo controle Molecusol 5% (0,01 mL/kg); Fentanil 0,3mg/kg; Indometacina 10 mg/kg; EMF 100, 300 e 1000 mg/kg Experimentos realizados com grupos de 6, resultado retirado quando *outlier* detectado pelo teste de grubbs

Os resultados encontrados são de comportamento semelhante ao de Saha et al. (2013) que empregou o extrato metanólico das folhas da *Eugenia jambolana*, onde na primeira fase de dor neurogênica não se observou qualquer ação indicando que não há inibição das vias da dor, já na fase inflamatória houve inibição de 73,77% para a dose de 300 mg/kg enquanto no EMF 98,97%. Contudo Halder et al. (2012) utilizando óleo essencial obtido das sementes da *Eugenia caryophyllata* obteve inibição em ambas as fases do método da formalina, o que embora discordante do resultado para *Eugenia Uvalha* Cambess confirma o uso popular da espécie que emprega para alívio de dores agudas como a de dente, uso empírico não registrado para o espécime em estudo.

5.4 Pleurisia induzida por carragenina

Foi seguido o protocolo de Henriques et al. (1990). Os animais foram colocados em jejum prévio de 8 horas, inicialmente foram administradas as substâncias testes, sendo o controle negativo o moleculsol 5%, EMF e EMC nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg administrados por via oral, o controle positivo foi a dexametasona 2 mg/kg por via subcutânea. Após sessenta minutos foi aplicado carragenina a 1% via intratorácica depositando-a na cavidade pleural. Transcorridos 240 minutos os animais foram eutanasiados e o líquido pleural foi extraído por lavagem empregando 500 µL de solução salina tamponada (PBS – pH 7,6) e heparinizada (20 µL/mL). Onde o lavado foi recolhido para análise.

Os lavados obtidos na pleura dos camundongos foram encaminhados diretamente para contagem de leucócitos em câmara de Neubauer, com objetivo de aferir-se a capacidade dos extratos em reduzir a quimiotaxia e outros fenômenos inflamatórios. Os resultados para o caule são apresentados na figura 17, cujo o gráfico revela inatividade do extrato do caule para estes parâmetros avaliados, embora aparente alguma redução na migração leucocitária não houve significância estatisticamente comprovada

Já o gráfico que apresenta os resultados para o EMF, indo a figura 18, verifica-se uma considerável redução na migração leucocitária, o que pode-se atribuir a mitigação de fatores que evocam a quimiotaxia.

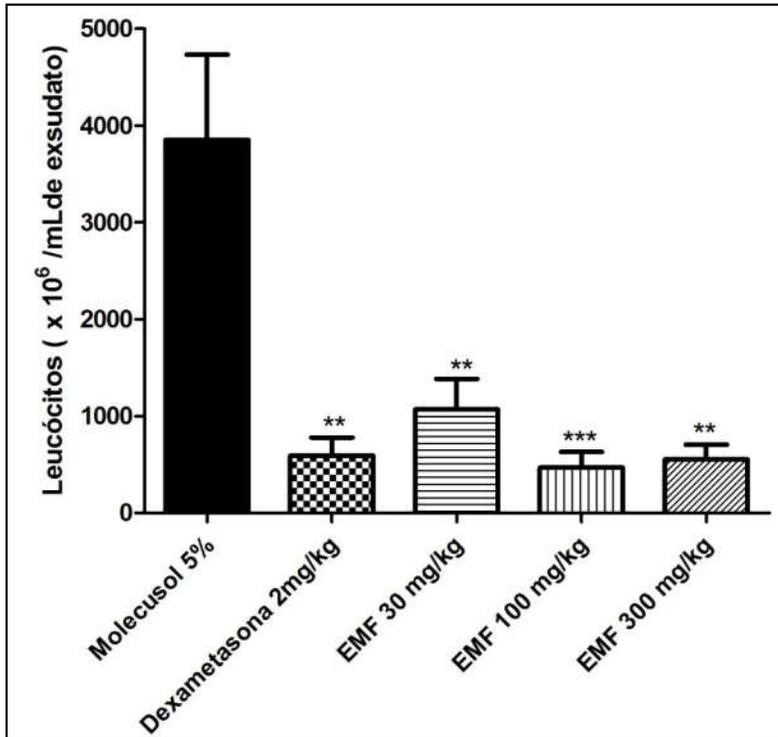


Figura 17– Contagem de Leucócitos no exsudato sob ação do EMC

** = $p < 0,01$ calculado com referencia ao grupo controle Molecusol 5% (0,01 mL/g); Dexametasona 2 mg/kg; EMC nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg. Grupo Dexametasona $n = 6$, os demais grupos $n = 5$ após o teste de Grubbs

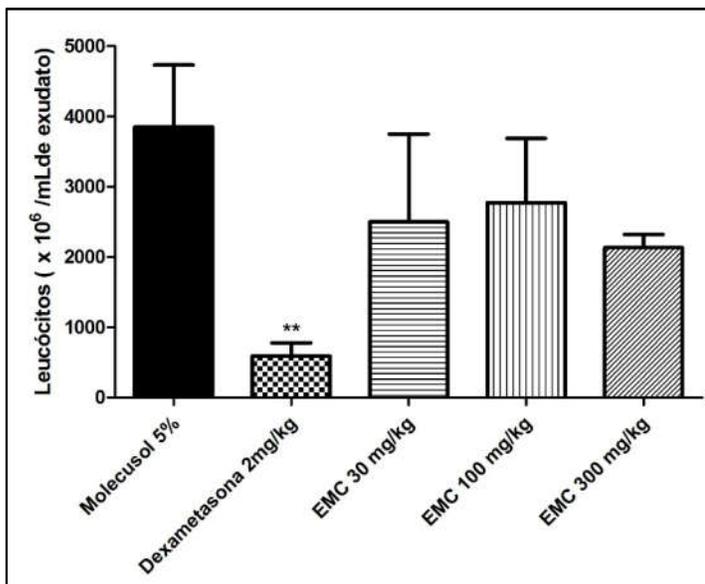


Figura 18 - Contagem de Leucócitos no exsudato sob ação do EMC

** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ em relação ao grupo controle Molecusol 5% (0,01 mL/g); Dexametasona 2 mg/kg; EMC nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg. Todos os grupos com $n = 6$.

A tabela 12 apresenta os dados das figuras 17 e 18.

Tabela 12 – Resultados do método de pleurisia – contagem leucocitária do exsudato

Substância Teste	EMC		EMF		
	Média	EPM	Média	EPM	Inibição (%)
Molecúsol 5%	3850	882,5	3850	927,1	0
Dexametasona 2mg/kg	591,7**	186,4	591,7**	186,4	80,45±3,49
30 mg/kg	2500	1250	1067**	318,5	67,35±18,37
100 mg/kg	2755	914,8	466,7***	162,5	85,71±9,18
300 mg/kg	2133	187,8	550,0**	155,5	83,16±7,65

** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$, significância estatística calculada com referência ao grupo controle salina; Experimentos realizados com grupos de 6, resultado retirado quando *outlier* detectado pelo teste de grubbs; Os dados estão expressos em $\times 10^6$ de leucócitos/mL

O EMF, cujos os efeitos podem ser verificados nas figuras 13, 16 e 18, demonstram um promissor efeito redutor da inflamação, ressalta-se que a inibição da migração leucocitária nas doses de 30, 100 e 300 mg/kg foi de 67,35±18,37; 85,71±9,18 e 83,16±7,65% motivo pelo qual nesta pesquisa a partir deste ponto passou somente a se investigar o extrato metanólico obtido das folhas, o que coaduna com os objetivos expressos e com a política de uso racional de animais.

Empregando-se a equação 2 obteve-se a concentração de TNF α por ELISA para cada concentração teste de EMF (30, 100 e 300 mg/kg), o veículo (molecúsol 5%) e o controle positivo dexametasona 2 mg/kg subcutânea, os dados agrupados estão expressos na figura 20. Onde verifica-se uma diferença significativa ($p < 0,001$) em relação ao veículo, percebe-se ainda que não houve diferença significativa entre as doses EMF provavelmente por ocorrência de saturação do efeito sobre o TNF α que pode ter ocorrido em doses inferiores a 30 mg/kg resultando em um platô. A inibição respectiva para cada dose foi de 69,22±0,76; 69,01±3,57 e 70,27±8,00%

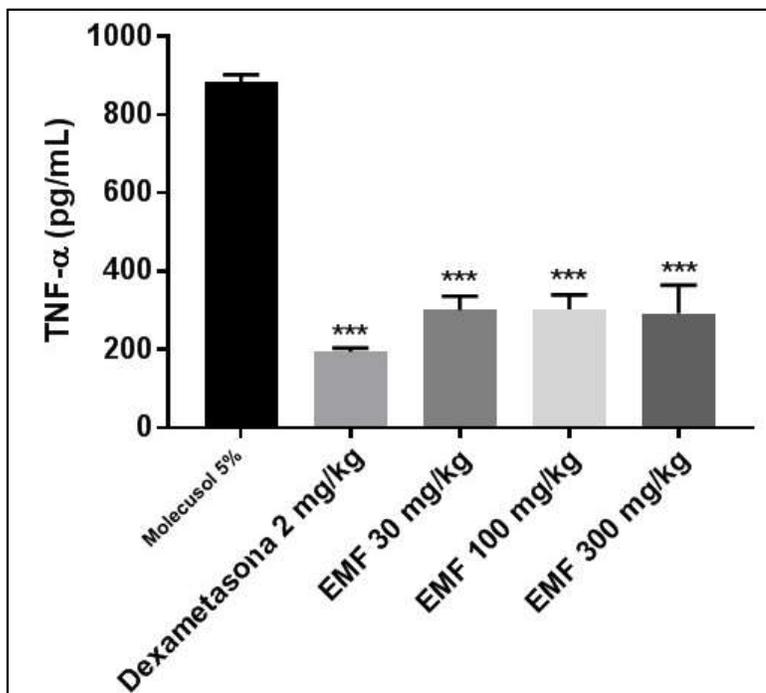


Figura 19 – Concentração de TNF α no exsudato da pleurisia induzida por carragenina
 *** = p<0,001 sendo a referência o veículo molecusol a 5% (0,01mL/g); Dexametasona 2 mg/kg via subcutânea; EMF nas concentrações de 30, 100 e 300 mg/kg. Grupos com n = 6

Guimarães et al. (2009) utilizou o óleo essencial extraído das folhas da *Eugenia candolleana* DC e na dose de 100 mg/kg obtendo inibição da migração leucocitária em 58,6% enquanto o equivalente do EMF foi de 85,71 \pm 9,18%, contudo utilizou exsudato de peritonite. Já Daniel et al. (2009) utilizando óleo extraído das sementes da *Eugenia caryophyllata*, também empregando peritonite somente conseguiu resultado na redução do volume do edema, mas não na migração leucocitária.

5.5 Avaliação anti-edematogênica

O modelo de edema de pata induzido por carragenina foi empregado afim de se avaliar a capacidade anti-edematogênica do extrato metanólico das folhas (EMF), dado que é um dos fenômenos eminentes da inflamação aguda. Optou-se em avaliar a dose de 300 mg/kg por ser próxima da DI₅₀ determinada. O controle negativo, o veículo molecusol 5% e os extratos foram administrados por via oral, já como controle positivo a dexametasona 2 mg/kg de administração subcutânea. O método foi conduzido seguindo o protocolo estabelecido por Vinegar, Schreiber e Hugo (1969) e Van Arman (1979), sendo a carragenina a 1%

administrada na pata direita via intraplantar e na pata esquerda o mesmo volume de salina 0,9%. Os resultados de cada grupo foram tabelados a cada hora gerando a figura 20e calculou-se a área sob a curva gerada na dimensão tempo *versus* o volume da pata, expresso na figura 21cujo os dados estão na tabela 13.

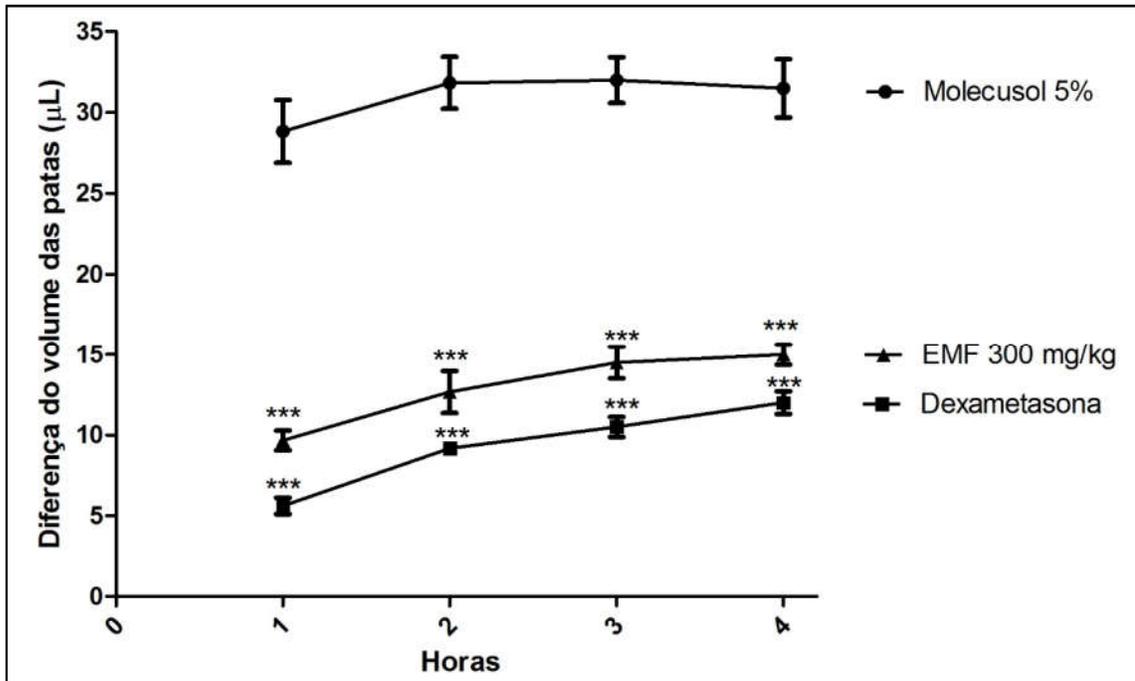


Figura 20 – Evolução do edema de pata induzido por carragenina

*** = $p < 0,001$; Molecusol 5% (0,01 mL/g); EMF 300 mg/kg; Dexametasona 2mg/kg; Grupos com n=6

Tabela 13 - Resultados do método de edema de pata induzido por carragenina

Período	Molecusol 5 %	Dexametasona 2mg/kg	EMF 300 mg/kg
1h	28,83 ± 3,50	5,60 ± 0,88 ***	9,67 ± 1,22 ***
2h	31,83 ± 3,11	9,17 ± 0,56 ***	12,67 ± 2,11 ***
3h	32,00 ± 2,40	10,50 ± 1,17***	14,50 ± 1,67 ***
4h	31,50 ± 3,67	12,00 ± 1,20 ***	15,00 ± 1,33 ***

*** = $p < 0,001$, significância estatística calculada com referência ao grupo controle molecusol; Experimentos realizados com grupos de 6, resultado retirado quando *outlier* detectado pelo teste de grubbs;

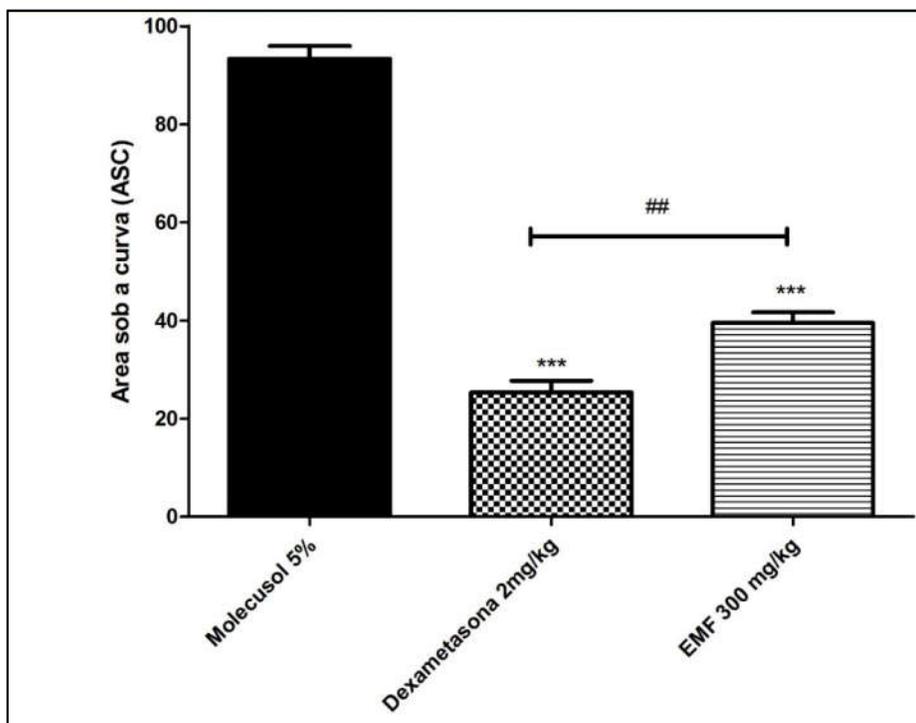


Figura 21 – Edema de pata induzido por carragenina (Área sob a curva)

*** = $p < 0,001$ calculo tendo como referência o moleculsol 5% (0,01 mL/g); ## = $p < 0,01$ diferença entre a dexametasona 2 mg/kg e EMF 300 mg/kg.; Grupos n = 6

Tabela 14 - Área sob a curva para o edema de pata induzido por carragenina

Substância teste	Média	EPM
Moleculsol 5%	93,33	2,61
Dexametasona 2mg/kg	25,33***	2,38
EMF 300 mg/kg	39,50***	2,12

***= $p < 0,001$, significância estatística calculada tendo como parâmetro o grupo controle Moleculsol 5% (0,01 mL/g); Dexametasona 2mg/kg; EMF 300 mg/kg; Grupos com n=6

Na figura 20, observa-se além do efeito significativo do extrato e da dexametasona, considerando os cálculos sob área sobre as curvas da figura 21, o EMF 300 mg/kg apresentou diferença significativa (** $p < 0,001$) em relação ao veículo moleculsol, evidenciando efeito antiedematogênico, inibindo $58,44 \pm 5,08\%$ do edema, (** $p < 0,01$) apresentou diferença significativa em relação ao grupo o dexametasona 2 mg/kg ($75,35 \pm 3,06\%$) e o extrato, o que permite inferir que há efeito sob o edema pronunciado.

Continuando-se a avaliação sobre o efeito no edema empregou-se o protocolo apresentado em Pires et al. (2015) afim de se proceder ao edema de pata induzido por histamina e serotonina que visam a avaliação de curto prazo entre 30 a 90 minutos, donde a medição procedeu-se com 1 hora (durante 4 horas) conforme o trabalho citado, as aminas empregadas são de ação rápida e agem sobre a formação do edema de maneira semelhante.

Utilizou-se como controle positivo a dexametasona na dose de 2 mg/kg subcutânea, o extrato metanólico da folha na dose de 300 mg/kg via oral e a histamina 100 η mol e serotonina 100 μ g aplicados por pata via intraplantar, cujo os resultados estão expressos nas figuras 22, 23, 24 e 25.

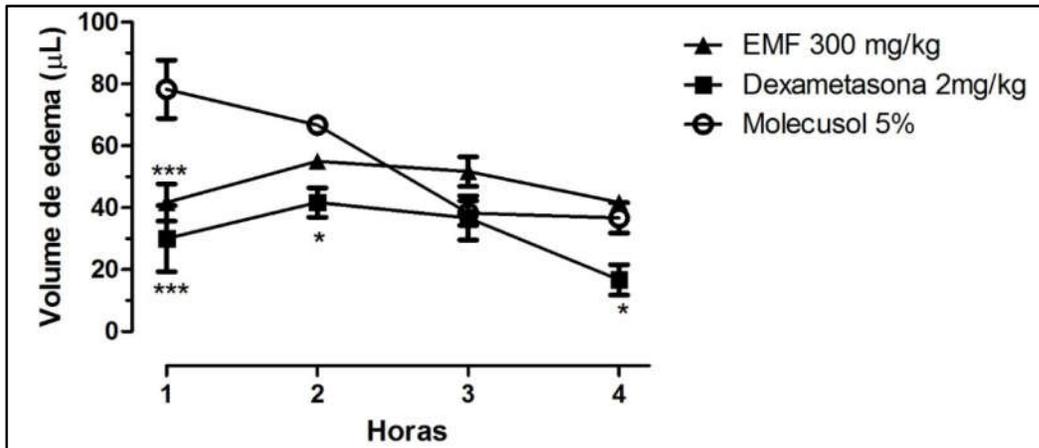


Figura 22 - Evolução do edema de pata induzido por histamina

Molecusol 5% (0,01 mL/g) via oral; Dexametasona 2 mg/kg via subcutânea; EMF 300 mg/ kg via oral; histamina 100 η Mol/pata intraplantar; Significância estatística tem referência o grupo molecusol; * = $p < 0,05$; *** = $p < 0,001$

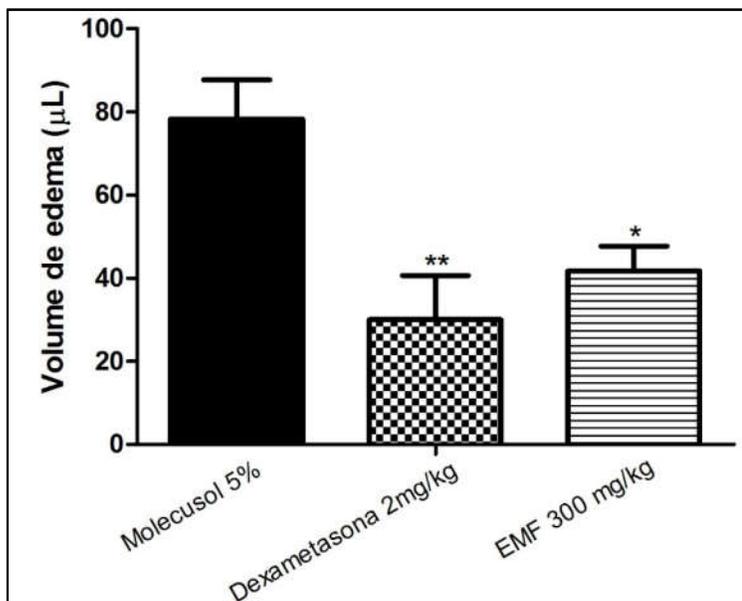


Figura 23 – Edema de pata induzido por histamina em 1 hora

Molecusol 5% (0,01 mL/g) via oral; Dexametasona 2 mg/kg via subcutânea; EMF 300 mg/ kg via oral; histamina 100 η Mol/pata intraplantar; Significância calculada em relação ao grupo controle molecusol; ** = $p < 0,01$; * = $p < 0,05$

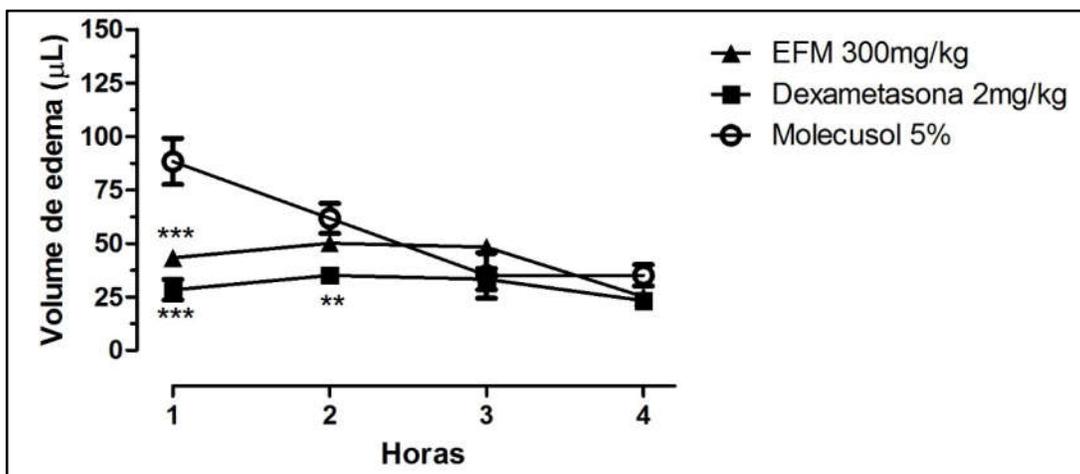


Figura 24 – Evolução do edema de pata induzido por Serotonina Molecusol 5% (0,01 mL/g) via oral; Dexametasona 2 mg/kg ,via subcutânea; EMF 300 mg/kg via oral; Serotonina 100 µg / pata intraplantar; Referência estatística grupo molecusol; ***= p < 0,001; **= p < 0,01

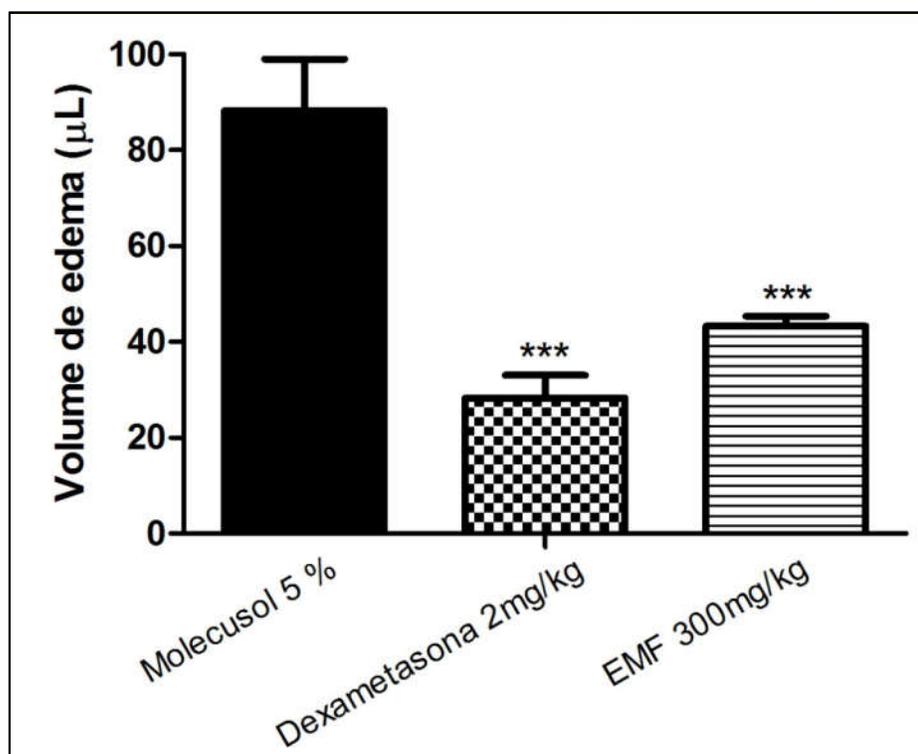


Figura 25 – Edema de pata induzido por serotonina em 1 hora; Molecusol 5% (0,01 mL/g) via oral; Dexametasona 2 mg/g via subcutânea; EMF 300 mg/kg via oral; Serotonina 100 µg / pata intraplantar; grupo de referência estatística Molecusol; ***= p < 0,001

Os dados das figuras 23 e 25 estão expressos na tabela 15.

Tabela 15 - Área sob a curva para o edema de pata induzido por histamina e serotonina

Substância teste	Histamina (100 η Mol/pata)		Serotonina (100 μ g/pata)	
	Média	EPM	Média	EPM
Molecosol 5%	78,3	9,46	88,3	10,78
Dexametasona 2mg/kg	30,0**	10,65	28,3***	4,77
EMF 300 mg/kg	41,7*	6	43,3***	2,11

*= $p < 0,05$; **= $p < 0,01$; ***= $p < 0,001$, significância estatística calculada entre o grupo veículo Molecosol 5% (0,01 mL/g); Dexametasona 2 mg/kg; EMF 300 mg/kg; Histamina 100 η mol/pata; Serotonina 100 μ g/pata; Grupos com n=6

O efeito edematogênico da histamina foi inibido em $46,74 \pm 10,00\%$ pelo EMF enquanto a dexametasona apresentou redução de $61,69 \pm 17,75\%$, demonstrando um efeito significativo ($p < 0,05$) em relação ao veículo. Já a produção de edema foi reduzida em $50,96 \pm 3,52\%$ pelo EMF quando induzida pela serotonina, enquanto o controle positivo $67,95 \pm 7,95\%$. Os resultados para o veículo são semelhantes ao de Pires et al. (2015). É interessante notar que o efeito sobre o edema provocado pela serotonina foi maior, embora ambas as substâncias sejam potentes vasodilatadoras (Katzung et al., 2014), a histamina tem outros efeitos complementares como a contração das células endoteliais venulares e quimiotaxia, mais marcantes que a outra amina (Benly, 2015). Todavia as duas aminas têm ação predominantes nos primeiros momentos da inflamação aguda até 90 minutos, por este motivo além dos gráficos de evolução do edema (figuras 22 e 24) foram apresentados os gráficos com a inibição média do edema medidos após 1 hora (figuras 24 e 26) que melhor avaliam os dados coletados. Os valores após 2 horas (inclusive) nas figuras 22 e 24 não podem ser explicados com base nos efeitos das aminas.

Daniel et al. (2008) utilizando óleo extraído das sementes da *Eugenia caryophyllata* também aplicou o teste de edema de pata induzido por carregenina obtendo somente redução significativa na 3 e 4 horas do experimento indicando que o óleo deve ter somente ação sobre as prostaglandinas geradas nesta fase, em contraste com o EMF que apresentou resultado nas primeiras horas (figura 22) o que foi confirmado com o teste da serotonina e histamina que agem neste momento.

Saha et al. (2013) utilizou o extrato metanólico da folha da *Eugenia jambolana* na dose de 300 mg/kg, inibindo o edema de pata nas 4 horas resultado semelhante ao encontrado nesta pesquisa, inibindo $57,78\%$, enquanto o EMC inibiu em $57,67\%$

5.6 Rota-rod

O método de rota-rod (roda giratória) foi conduzido tendo como atenção o protocolo estabelecido por Carlini et al. (1986), afim de se determinar se havia alguma interferência na coordenação motora dos animais provocados por ação central ou relaxamento muscular, cujo o resultado avaliado foi o tempo total de permanência e o número de quedas, durante 1 minuto com até três reconduções na velocidade de 12 rotações por minuto, as figuras 26 e 27 apresentam os resultados.

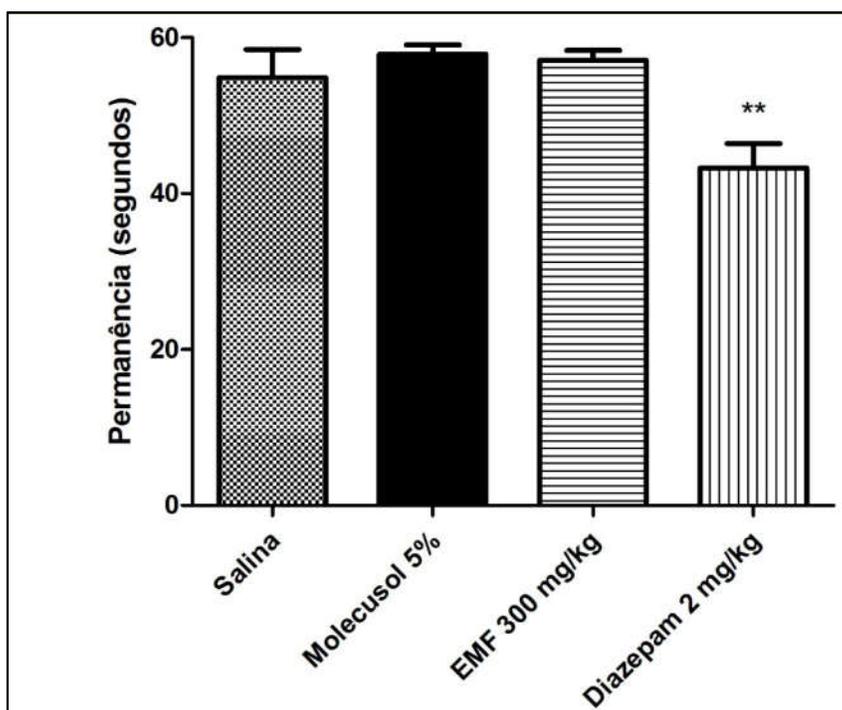


Figura 26 – Tempo de permanência na roda giratória (*rota-rod*); Salina a 0,9% (0,01 mL/g); molecusol 5% (0,01 mL/g) e EMF 300 mg/kg administração oral; Diazepam 2 mg/kg via subcutânea; ** = $p < 0,01$, em referência ao grupo Salina.

Na figura 26 para o tempo de permanência na barra o EMF apresentou resultado muito próximo ao veículo e ao controle negativo e destacando o efeito significativo ($p < 0,01$) apresentado pelo Diazepam (com comportamento dentro do esperado), já quando se analisa o número de quedas registradas limitadas a 3 pelo delineamento metodológico não há registro de nenhuma diferença estatisticamente válida, conforme visualiza-se na figura 27, contudo o grupo Diazepam registrou uma queda superior em média de 50%, o que pode-se inferir no não efeito do extrato sobre o número de quedas. Lendo os dois resultados em conjunto pode-se

deduzir que a substância em análise não produziu qualquer efeito que acarretasse na falta de coordenação motora.

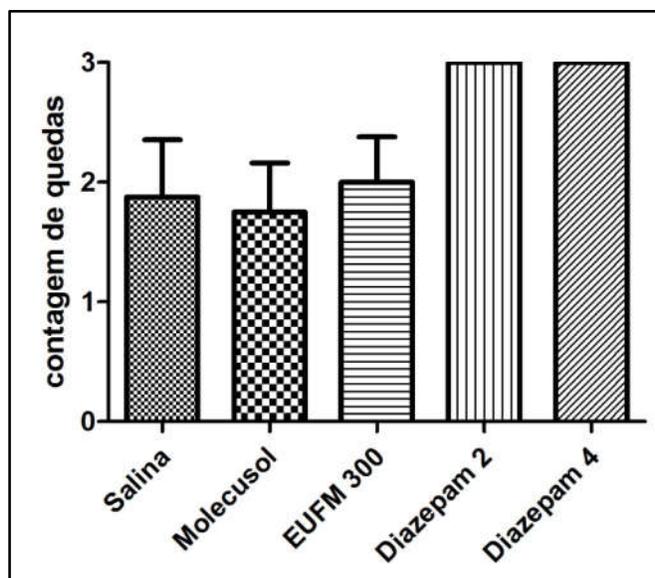


Figura 27 – Número de quedas no método da roda giratória (*rota-road*) Salina a 0,9% (0,01mL/g); molecusol 5% (0,01 mL/g) e EMF 300 mg/kg administração oral; Diazepam 2 mg/kg via subcutânea. Dados expresso média±EPM

Os dados referentes as figuras 27 e 28 estão expressos na tabela 16.

Tabela 16- Resultados do método da roda giratória

Substância teste	Tempo de permanência		Número de quedas	
	Média	EPM	Média	EPM
Salina	54,88	3,62	1,87	0,47
Molecusol 5%	57,88	1,20	1,75	0,41
EMF 300 mg/kg	57,13	1,24	2,00	0,37
Diazepam 2 mg/kg	43,29**	3,13	3,00	0,00

**= $p < 0,01$, significância estatística calculada com o grupo controle Molecusol 5% (0,01 mL/g); Salina 0,01 mL/g; EMF 300 mg/kg; Diazepam 2 mg/kg; Grupos com $n=6$

Mehta et al. (2013) utilizou o óleo extraído da semente *Eugenia caryophyllata* administrados por via intraperitoneal na dose de 0,1 mg/kg durante 3 semanas o que aumento a coordenação motora dos ratos diminuindo o número de quedas e aumentando o tempo de permanência, o que não pode ser aferido por esta pesquisa á que a administração foi aguda.

Basting (2012) utilizou o extrato hidroetanólico das folhas da *Eugenia puniceifolia*, com a dose de 250 mg/kg, executando o mesmo protocolo desta pesquisa e chegando a resultados semelhantes, não registrando nenhum efeito do extrato.

5.7 Campo Aberto

Os animais foram divididos em quatro grupos: (1) salina a 0,9% (controle negativo), (2) molecusol a 5%, e (3) EMF 300 mg/kg por via oral e (4) Diazepam 2 mg/kg administrado por via subcutânea (controle positivo). Cada animal foi colocado, após 60 minutos da administração da substância, na área central do campo de observação e avaliados durante cinco minutos quanto a sua atividade exploratória com auxílio do *software* Any-Maze versão 5.0, com os dados construiu-se a tabela 17

Tabela 17 – Resultados do método de campo aberto

Parâmetro	Objetivo	Unidade	Salina	Molecusol	EMF (300 mg/kg)	Diazepam (2 mg/kg)
Entradas no quadrante central	Verificar atividade ansiolítica ou sedativa	Quantidade	8,8±1,8	8,5±2,1	8,2±1,3	14,6±1,4**
Distância total percorrida		Metros	12,9±0,8	11,8±1,3	12,3±1,3	7,1±0,7***
<i>Rearing</i>	Sedação ou medo	Quantidade	28,1±2,0	27,2±1,9	28,8±1,7	16,8±1,5***
<i>Grooming</i>		Quantidade	13,8±3,3	14,1±2,9	13,6±3,2	9,2±1,5*
Imobilidade		Segundos	10,8±2,9	11,6±3,0	11,7±2,4	15,7±1,9**
Bolos fecais	Emocionalidade	Quantidade	1,6±1,5	1,5±1,3	1,4±1,0	1±0,8

A correspondência dos parâmetros medidos e os objetivos estão de acordo com Prut e Belzung (2003); e ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$ calculados entre o grupo Salina 0,01 mL/g; Molecusol 5% (0,01mL/g); EMF 300 mg/kg; Diazepam 2mg/kg

Na tabela 17 observa-se que não houve registro de atividade ansiolítica ou sedativa para o extrato em relação ao grupo positivo controle salina foi observada diferença significativa quando analisa-se os parâmetros: número de entradas no quadrante central, as distâncias totais percorridas alcançaram resultado significativo ($p < 0,01$) e *rearing* ($P < 0,001$). Resultado semelhante obteve-se nos parâmetros avaliados para sedação e medo, quanto aos bolos fecais que estão ligados a critérios de emocionalidade não houve diferença significativa, possivelmente devido os números absolutos pequenos somado ao fato dos animais estarem vindo de um jejum de 8 horas anterior a aplicação do método, contudo a diferença entre o controle positivo (diazepam) e o negativo (salina) é de 38,4% enquanto que para o extrato foi de apenas 15,3%, donde pode se inferir por não alteração. Somados os resultados indicam pela inexistência de atividade central.

Colla (2012) investigou o efeito antidepressivo do extrato hidroalcoólico das *Eugenias beaurepaireana*, *brasiliensis*, *catharinae*, *umbelliflora* e *uniflora*, obteve resultado para administração aguda dos extratos de *beaurepaireana* (10 e 100 mg/kg), *brasiliensis* e *catharinae* (1, 10 e 100 mg/kg) produziu efeito tipo-antidepressivo.

6 CONCLUSÕES

No ensaio de toxicidade aguda (dose única) não foi observado nenhum efeito deletério para o EMC e EMF, o que sinaliza na direção da segurança em seu uso, coadunando com observação anterior de Silva et al. (2015).

O método das contorções abdominais induzidas por ácido acético revelou que o EMC não possui efeito inibitório, contudo o EMF obteve resultados estatisticamente significativos e crescentes com a dose, o que permitiu o cálculo da DI_{50} em 308 mg/kg.

O método da formalina também revelou inatividade do EMC, enquanto o EMF apresentou resultados significativos na fase inflamatória, o que indica que o seu mecanismo de ação é possivelmente *indometacina-like*.

A contagem de leucócitos realizado em câmara de Neubauer a partir do lavado coletado em pleurisia induzida por carragenina, revelou redução na quimiotaxia do EMF. Para o EMC revelou-se inativo, este resultado em conjunto com o obtido nas contorções abdominais e na formalina, indicam que o extrato metanólico do caule não apresenta efeito anti-inflamatório detectável nesta pesquisa, sendo assim os demais métodos prosseguiram somente com o EMF, por razões éticas e de economicidade. O ensaio de ELISA para $TNF\alpha$ demonstrou um resultado significativo ($p < 0,001$) sendo o platô atingido com a dose de 30 mg/kg, com inibição média de 74,1%.

O efeito anti-edematogênico foi evidenciado com redução na área sob a curva de (1 a 4 horas) de 57,7% em média (relação entre o moleculsol 5% e o extrato 300 mg/kg), houve diferença significativa ($p < 0,001$) em relação a dexametasona que inibiu 72,8% do edema, o que permite inferir que pelo menos no que tange ao fenômeno do edema o extrato não possui mecanismo de ação similar ao controle positivo. Na fase inicial da inflamação aguda há grande presença da histamina e da serotonina duas potentes aminas vasodilatadoras (Katzung et al., 2014) que quando utilizadas como elemento flogístico para o edema de pata, observou-se redução no edema, produzido pelo EMF respectivamente de 41,7% e 43,3% em relação ao veículo utilizado.

No método de *rota-rod*, não foi identificada qualquer falta de coordenação motora provocada pelo extrato, tanto quanto se avalia o tempo de permanência sob a barra quanto número de quedas registrada em 1 minuto. No método de campo aberto não foi evidenciado qualquer alteração nos parâmetros indicativos de ansiedade, sedação, medo e emocionalidade, o que somados indicam que não há atividade central.

Lidos em conjunto os métodos indicaram não haver atividade anti-inflamatória para o extrato metanólico do caule da *Eugenia Uvalha* Cambess, enquanto o extrato metanólico das folhas apresenta efeito anti-inflamatório promissor possivelmente com mecanismo de ação semelhante ao da indometacina, apresentando resultados expressivos quanto a redução da quimiotaxia, da expressão do TNF α e do edema. Não apresentou indicativo de toxicidade aguda, efeito sobre a motricidade e no sistema nervo central, fatos que convergem para a segurança do seu uso. Assim é necessário a continuação da pesquisa afim de se estabelecer precisamente o mecanismo de ação e o princípio ativo que pode resultar em uma nova opção a terapêutica.

Os resultados encontrados podem ser atribuídos em parte pela presença do E-cariofileno presente no óleo essencial (LIMA et al., 2010), ou pelo ácido gálico e a quercetina, ambas identifica altas concentrações na extração que tem base o metanol, cujo estudos confirmatórios para ação anti-inflamatória foram desenvolvidos por Kroes et al. (1992).

Para pesquisas futuras é recomenda-se que se execute método de toxicidade crônica descritos por Brito (1994) afim de se estabelecer possíveis efeitos deletérios acumulativos. Sobre a perspectiva anti-edematogênica é interessante que se estabeleça a influência do extrato na ação sobre a bradicinina e das prostaglandinas que tem efeitos proeminentes na fase intermediária e tardia da inflamação, o que ajudaria a entender o mecanismo de ação sobre o edema, bem como investigar as propriedades dos extratos sobre a inflamação crônica dados que os métodos empregados visam a investigação da inflamação aguda.

REFERÊNCIAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S.. **Imunologia celular e molecular**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

AIRES, Margarida de Mello et al. (Org.). **FISIOLOGIA**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. 1335 p.

ALBERS, Kathryn M. **Pain Models: Raonale, testing and interpretation**: New York: Kathryn M Albers, 2016. 49 slides, color. Disponível em: <www.paincenter.pitt.edu/sites/default/files/Inflamamatory_pain_models_lecture.pdf>. Acesso em: 04 fev. 2017.

ALBUQUERQUE, Helder Neves de; FIGUÊREDO, Djalma José Correia de; CERQUEIRA, Joaci dos Santos. Os vegetais com potencial fitoterápico do complexo Aluizio Campos, Campina Grande - PB. **Revista Brasileira de Informações Científicas**, [s.i], v. 2, n. 3, p.17-26, abr. 2012.

APS - AMERICAN PAIN SOCIETY (United States). **Education**. 2016. Disponível em: <<http://americanpainsociety.org/education/overview>>. Acesso em: 04 fev. 2017.

ARANTES, Adriana A.; MONTEIRO, Reinaldo. A família Myrtaceae na Estação Ecológica do Panga, Uberlândia, Minas Gerais, Brasil. **Lundiana**, Belo Horizonte, v. 3, n. 2, p.111-127, jul. 2002. Disponível em: <<https://www2.icb.ufmg.br/lundiana/Contents/full/vol322002/4.pdf>>. Acesso em: 08 dez. 2016.

AURICCHIO, Mariângela T. et al.. Atividades Antimicrobiana e Antioxidante e Toxicidade de Eugenia uniflora. **Latin American Journal Of Pharmacy**, [s.i], p.76-81, out. 2006. Disponível em: <http://www.latamjpharm.org/trabajos/26/1/LAJOP_26_1_1_13_M4UGP1G3U6.pdf>. Acesso em: 12 fev. 2017.

BAG, Anwesa et al.. In vitro antibacterial potential of Eugenia jambolana seed extracts against multidrug-resistant human bacterial pathogens. **Microbiological Research**, [s.l.], v. 167, n. 6, p.352-357, jun. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2012.02.005>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22444436>>. Acesso em: 12 fev. 2017.

BAI, Yang et al.. 4-Chloro-DL-phenylalanine protects against monocrotaline?induced pulmonary vascular remodeling and lung inflammation. **International Journal Of Molecular Medicine**, [s.l.], p.373-384, 16 dez. 2013. Spandidos Publications. <http://dx.doi.org/10.3892/ijmm.2013.1591>.

BALESTRIERI, M. L. et al.. Modulation by flavonoids of PAF and related phospholipids in endothelial cells during oxidative stress. **The Journal Of Lipid Research**, [s.l.], v. 44, n. 2, p.380-387, 4 nov. 2003. American Society for Biochemistry & Molecular Biology (ASBMB). <http://dx.doi.org/10.1194/jlr.m200292-jlr200>.

BARREIRO, Eliezer J.; BOLZANI, Vanderlan da Silva. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Quim. Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p.679-688, jun. 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v32n3/a12v32n3.pdf>>. Acesso em: 16 jan. 2017.

BARROS, Helena M.t. et al.. Enhanced detection of hyperactivity after drug withdrawal with a simple modification of the open-field apparatus. **Journal Of Pharmacological Methods**, [s.l.], v. 26, n. 4, p.269-275, dez. 1991. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0160-5402\(91\)90037-6](http://dx.doi.org/10.1016/0160-5402(91)90037-6). Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0160540291900376>>. Acesso em: 05 jan. 2017.

BASTING, Rosanna Tarkany. **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIINFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE Eugenia punicifolia (Kunth) DC.** 2012. 101 f. TCC (Graduação) - Curso de Ciências Biológicas., Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2012. Disponível em: <<http://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/118235/000785851.pdf?sequence=1>>. Acesso em: 12 fev. 2017.

BENFATTI, Camila Simões et al.. Atividade antibacteriana in vitro de extratos brutos de espécies de Eugenia sp frente a cepas de mollicutes. **Revista Pan-amazônica de Saúde**, [s.i.], v. 2, n. 1, p.33-39, mar. 2010. Disponível em: <<http://scielo.iec.pa.gov.br/pdf/rpas/v1n2/v1n2a03.pdf>>. Acesso em: 17 jan. 2017.

BENLY, P. Role of Histamine in Acute Inflammation. **Journal Of Pharmaceutical Sciences And Research**, [s.i.], v. 7, n. 6, p.373-376, jun. 2015. Disponível em: <<http://www.jpsr.pharmainfo.in/Documents/Volumes/vol7Issue06/jpsr07061526.pdf>>. Acesso em: 14 dez. 2016.

BERTRAND, Paul P.; BERTRAND, Rebecca L.. Serotonin release and uptake in the gastrointestinal tract. **Autonomic Neuroscience**, [s.l.], v. 153, n. 1-2, p.47-57, fev. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.autneu.2009.08.002>.

BOSSALLER, C et al.. In vivo measurement of endothelium-dependent vasodilation with substance P in man. **Herz**, [s.i.], v. 17, n. 5, p.284-290, out. 1992. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1282120>>. Acesso em: 18 dez. 2016.

BOTTING, Regina. COX-1 and COX-3 inhibitors. **Thrombosis Research**, [s.l.], v. 110, n. 5-6, p.269-272, jun. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0049-3848\(03\)00411-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0049-3848(03)00411-0). Disponível em: <[http://www.thrombosisresearch.com/article/S0049-3848\(03\)00411-0/pdf](http://www.thrombosisresearch.com/article/S0049-3848(03)00411-0/pdf)>. Acesso em: 13 dez. 2016.

BRITO, Alba Souza. **Manual de ensaios toxicológicos in vivo.** Campinas: Universidade Estadual de Camponas, 1994. 122 p.

CAMUSSI, Giovanni; TETTA, Ciro; BAGLIONIS, Corrado. The Role of Platelet-Activating Factor in Inflammation. **Clinical Immunology And Immunopathology**, Nova York, v. 57, n. 1, p.331-338, 1990. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0090122990901083>>. Acesso em: 13 dez. 2016.

CARLINI, E.a. et al.. Pharmacology of lemongrass (*Cymbopogon citratus* Stapf). I. Effects of teas prepared from the leaves on laboratory animals. **Journal Of Ethnopharmacology**, [s.l.], v. 17, n. 1, p.37-64, jul. 1986. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0378-8741\(86\)90072-3](http://dx.doi.org/10.1016/0378-8741(86)90072-3). Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0378874186900723>>. Acesso em: 04 jan. 2017.

CHATTOPADHYAY, Chandan et al.. Evaluation of acute anti-inflammatory and analgesic activities of green tea decoction on experimental animal models. **International Journal Of Nutrition, Pharmacology, Neurological Diseases**, [s.l.], v. 2, n. 1, p.20-25, 2012. Medknow. <http://dx.doi.org/10.4103/2231-0738.93128>. Disponível em: <<http://www.ijnpnd.com/article.asp?issn=2231-0738;year=2012;volume=2;issue=1;spage=20;epage=25;aulast=Chattopadhyay>>. Acesso em: 27 dez. 2016.

CHAVASCO, Juliana Moscardini et al.. EVALUATION OF ANTIMICROBIAL AND CYTOTOXIC ACTIVITIES OF PLANT EXTRACTS FROM SOUTHERN MINAS GERAIS CERRADO. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, [s.l.], v. 56, n. 1, p.13-20, jan. 2014. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0036-46652014000100002>. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-46652014000100013&lng=en&nrm=iso&tlng=en>. Acesso em: 20 dez. 2016.

CHIU, Isaac M; VON HEHN, Christian A; WOOLF, Clifford J. Neurogenic inflammation and the peripheral nervous system in host defense and immunopathology. **Nature Neuroscience**, [s.l.], v. 15, n. 8, p.1063-1067, 26 jul. 2012. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nn.3144>. Disponível em: <Neurogenic inflammation and the peripheral nervous system in host defense and immunopathology>. Acesso em: 04 fev. 2017.

CHIZZOLINI, Carlo; BREMBILLA, Nicolò C. Prostaglandin E2: igniting the fire. **Immunology And Cell Biology**, [s.l.], v. 87, n. 7, p.510-511, 11 ago. 2009. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/icb.2009.56>. Disponível em: <<http://www.nature.com/icb/journal/v87/n7/full/icb200956a.html>>. Acesso em: 13 dez. 2016.

CIRINO, Giuseppe; DISTRUTTI, Eleonora; WALLACE, John. Nitric Oxide and Inflammation. **Inflammation & Allergy-drug Targets**, [s.l.], v. 5, n. 2, p.115-119, 1 abr. 2006. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/187152806776383143>. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/7165815>>. Acesso em: 17 dez. 2016.

COLLA, André Roberto da Silva. **Efeito tipo-antidepressivo de espécies do gênero Eugenia L. e envolvimento dos sistemas monoaminérgicos na ação de Eugenia brasiliensis Lamarck no teste de suspensão pela cauda em camundongos**. 2012. 83 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós Graduação em Neurociências, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012. Disponível em: <<https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/96243>>. Acesso em: 12 fev. 2017.

COLLIER, H. O. J. et al.. THE ABDOMINAL CONSTRICTION RESPONSE AND ITS SUPPRESSION BY ANALGESIC DRUGS IN THE MOUSE. **Br. J. Pharmac. Chemother.**, [s.i.], v. 32, n. 1, p.295-310, jan. 1968. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1570212/>>. Acesso em: 27 dez. 2016.

CONSOLINI, Alicia E.; BALDINI, Osvaldo A.n.; AMAT, Aníbal G.. Pharmacological basis for the empirical use of *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) as antihypertensive. **Journal Of Ethnopharmacology**, [s.i], v. 66, n. 1, p.33-39, jul. 1999. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10432205>>. Acesso em: 08 dez. 2016.

CONTASSOT, Emmanuel; BEER, Hans-dietmar; FRENCH, Lars E.. Interleukin-1, inflammasomes, autoinflammation and the skin. **Swiss Med Wkly**, [s.i.], v. 0, n. 142, p.142-153, jan. 2012.

COSTA, Tânia Alves da. **A função da IL-10 na paracoccidiodiose pulmonar murina**. 2010. 85 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-graduação em Imunologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

COSTA, Théo R. et al.. Antifungal activity of volatile constituents of *Eugenia dysenterica* leaf oil. **Journal Of Ethnopharmacology**, [s.i], v. 72, n. 1-2, p.111-117, ago. 2000. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10967461>>. Acesso em: 08 dez. 2016.

CROOKS, S.w; STOCKLEY, R.a. Leukotriene B4. **The International Journal Of Biochemistry & Cell Biology**, [s.l.], v. 30, n. 2, p.173-178, mar. 1998. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s1357-2725\(97\)00123-4](http://dx.doi.org/10.1016/s1357-2725(97)00123-4). Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1357272597001234>>. Acesso em: 13 dez. 2016.

DANIEL, Aparecido N. et al.. Anti-inflammatory and antinociceptive activities A of eugenol essential oil in experimental animal models. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s.l.], v. 19, n. 1, p.212-217, mar. 2009. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-695x2009000200006>. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-695X2009000200006>. Acesso em: 12 fev. 2017.

DERAEDT, Roger et al.. Release of prostaglandins E and F in an algogenic reaction and its inhibition. **European Journal Of Pharmacology**, [s.l.], v. 61, n. 1, p.17-24, jan. 1980. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0014-2999\(80\)90377-5](http://dx.doi.org/10.1016/0014-2999(80)90377-5). Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0014299980903775>>. Acesso em: 27 dez. 2016.

DIAS, Jose Pedro Sousa. **A Farmácia e a História: Uma introdução à História da Farmácia, da Farmacologia e da Terapêutica**. Lisboa: Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa, 2005. 90 p.

DINARELLO, C. A.. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. **Blood**, [s.l.], v. 117, n. 14, p.3720-3732, 8 fev. 2011. American Society of Hematology. <http://dx.doi.org/10.1182/blood-2010-07-273417>.

DUBUISSON, David; DENNIS, Stephen G.. The formalin test: A quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain**, [s.l.], v. 4, n. , p.161-174, out. 1977. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). [http://dx.doi.org/10.1016/0304-3959\(77\)90130-0](http://dx.doi.org/10.1016/0304-3959(77)90130-0). Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0304395977901300>>. Acesso em: 28 dez. 2016.

DUNHAM, N.w.; MIYA, T.s.. A Note on a Simple Apparatus for Detecting Neurological Deficit in Rats and Mice**College of Pharmacy, University of Nebraska, Lincoln 8. **Journal Of The American Pharmaceutical Association (scientific Ed.)**, [s.l.], v. 46, n. 3, p.208-209, mar. 1957. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1002/jps.3030460322>.

EMMERICH, Tiffany et al.. Intoxicação espontânea e experimental por frutos de *Eugenia uvalha* Cambess. (Myrtaceae) em ovinos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, [s.l.], v. 34, n. 5, p.438-442, maio 2014. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-736x2014000500009>. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-736X2014000500009&script=sci_abstract&tlng=pt>. Acesso em: 27 dez. 2016.

FELIPINI, R. C.; Video de Inflamação Aguda. Araçatuba: Unesp, 2013. Son., color. Disponível em: <<http://www.youtube.com/watch?v=gqCIIpHifqw>>. Acesso em: 29 jan. 2017.

FERGUSON-SMITH, Anne C. et al.. Regional localization of the interferon- γ -cell stimulatory factor 2/hepatocyte stimulating factor gene to human chromosome 7p15-p21. **Genomics**, [s.l.], v. 2, n. 3, p.203-208, abr. 1988. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/0888-7543\(88\)90003-1](http://dx.doi.org/10.1016/0888-7543(88)90003-1). Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0888754388900031>>. Acesso em: 17 dez. 2016.

FERREIRA, Raíssa C.; FERREIRA, Sindynara; CORRÊA, Wallace R.. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE FRUTOS, FOLHAS E GALHOS DE *Eugenia pyriformis* Cambess. In: 7ª JORNADA CIENTÍFICA DO IFSULDEMINAS, 7., 2015, Poços de Caldas - Mg. **Anais da 7ª Jornada científica do IFSULDEMINAS**. Poços de Caldas: Ifsuldeminas, 2015. v. 1, p. 1 - 6. Disponível em: <<https://jornada.ifsuldeminas.edu.br/index.php/jcpcs/jcpcs/paper/viewFile/1016/1149>>. Acesso em: 08 dez. 2016.

FERREIRA, S. H. et al.. Dor Inflamatória. In: ALVES NETO, Onofre et al.. **Dor: Princípios e Prática**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. Cap. 19. p. 265-279. Disponível em: <<http://www.dol.inf.br/html/DorInflamatoria/DorInflamatoria-Titulo1.html>>. Acesso em: 03 fev. 2017.

FIDALGO, Sara; IVANOV, Dobril K.; WOOD, Shona H.. Serotonin: from top to bottom. **Biogerontology**, [s.l.], v. 14, n. 1, p.21-45, 26 out. 2012. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s10522-012-9406-3>. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/s10522-012-9406-3>>. Acesso em: 16 dez. 2016.

FRENKEL, Rene A.; MUGURUMA, Kouei; JOHNSTON, John M.. The biochemical role of platelet-activating factor in reproduction. **Progress In Lipid Research**, [s.i.], v. 35, n. 2, p.155-168, fev. 1996.

FRÕDE, Tânia Silvia. **MEDIADORES E MECANISMOS ENVOLVIDOS NA PLEURISIA INDUZIDA PELA CARRAGENINA EM CAMUNDONGOS**. 2000. 209 f. Tese (Doutorado) - Curso de Pósgraduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2000.

GIAROLA, Tales Márcio de Oliveira. **Desenvolvimento e caracterização de Sherbets light de Uvaia (*Eugenia Uvalha* Cambess) fortificados com diferentes níveis de ferro**. 2011.

100 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Ciências do Alimento, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2011.

GOLIAS, Ch et al.. The kinin system - bradykinin: biological effects and clinical implications. Multiple role of the ki. **Hippokratia**, [s.i], v. 11, n. 3, p.124-128, jul. 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19582206>>. Acesso em: 17 dez. 2016.

GRAHAM, Gerard J; LOCATI, Massimo. Regulation of the immune and inflammatory responses by the 'atypical' chemokine receptor D6. **The Journal Of Pathology**, [s.l.], v. 229, n. 2, p.168-175, 12 dez. 2012. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/path.4123>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23125030>>. Acesso em: 17 dez. 2016.

GRYGLEWSKI, R J; DEMBÍNSKA, A Kie; KORBUT, R. A possible role of thromboxane A2 (TXA2) and prostacyclin (PGI2) in circulation. **Acta Biol Med Ger.**, [s.i], v. 5-6, n. 37, p.715-723, out. 1978. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/369254>>. Acesso em: 13 dez. 2016.

GUTZMER, R. et al.. Histamine H4 Receptor Stimulation Suppresses IL-12p70 Production and Mediates Chemotaxis in Human Monocyte-Derived Dendritic Cells. **The Journal Of Immunology**, [s.l.], v. 174, n. 9, p.5224-5232, 20 abr. 2005. The American Association of Immunologists. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.174.9.5224>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15843518>>. Acesso em: 14 dez. 2016.

HALDER, Sumita et al.. Acute effect of essential oil of *Eugenia caryophyllata* on cognition and pain in mice. **Naunyn-schmiedeberg's Archives Of Pharmacology**, [s.l.], v. 385, n. 6, p.587-593, 28 mar. 2012. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00210-012-0742-2>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22453493>>. Acesso em: 12 fev. 2017.

HAMINIUK, Charles Windson Isidoro et al.. Extraction and quantification of phenolic acids and flavonols from *Eugenia pyriformis* using different solvents. **Journal Of Food Science And Technology**, [s.l.], v. 51, n. 10, p.2862-2866, 24 jun. 2012. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s13197-012-0759-z>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25328239>>. Acesso em: 19 jan. 2017.

HAMMER, Gary D.; MCPHEE, Stephen J. **Fisiopatologia da doença: uma introdução a medicina clinica**. 7. ed. Porto Alegre: Amgh, 2014.

HENRIQUES, Maria G.m.o. et al.. Differential inhibition by two hexazepine PAF antagonists of acute inflammation in the mouse. **British Journal Of Pharmacology**, [s.l.], v. 99, n. 1, p.164-168, jan. 1990. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1476-5381.1990.tb14671.x>. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1476-5381.1990.tb14671.x/abstract>>. Acesso em: 03 jan. 2017.

HUNSKAAR, Steinar; HOLE, Kjell. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, [s.l.], v. 30, n. 1, p.103-114, jul. 1987. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). [http://dx.doi.org/10.1016/0304-3959\(87\)90088-1](http://dx.doi.org/10.1016/0304-3959(87)90088-1). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3614974>>. Acesso em: 28 dez. 2016.

IASP - INTERNATIONAL ASSOCIATION FOR THE STUDY OF PAIN (United States). **IASP Taxonomy**. 1994. Disponível em: <<http://www.iasp-pain.org/Taxonomy?navItemNumber=576#Nociception>>. Acesso em: 04 fev. 2017.

JUNQUEIRA, Virgínia Maria Santos et al.. AVALIAÇÃO ANTIMICROBIANA E ANTIULCEROGÊNICA DA EUGENIA DYSENTERICA. **Horizonte Científico**, [s.i], v. 1, n. 1, p.1-14, mar. 2007. Disponível em: <<http://www.seer.ufu.br/index.php/horizontecientifico/article/view/3800/2805>>. Acesso em: 2 nov. 2016.

JUSTO, Cristina Filomena et al.. Efeito da secagem, do armazenamento e da germinação sobre a micromorfologia de sementes de Eugenia pyriformis Camb. **Acta Botanica Brasilica**, [s.l.], v. 21, n. 3, p.539-551, set. 2007. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-33062007000300004>. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0102-33062007000300004&script=sci_abstract&tlng=pt>. Acesso em: 27 dez. 2016.

KATZUNG, Bertram G. et al.. **Farmacologia Básica e Clínica**. 12. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 1228 p.

KIM, J. J. et al.. Targeted Inhibition of Serotonin Type 7 (5-HT7) Receptor Function Modulates Immune Responses and Reduces the Severity of Intestinal Inflammation. **The Journal Of Immunology**, [s.l.], v. 190, n. 9, p.4795-4804, 3 abr. 2013. The American Association of Immunologists. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.1201887>. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23554310>>. Acesso em: 16 dez. 2016.

KOSTER, R; ANDERSON, M; BEER, E. J. Acetic acid for analgesic screening. **Fed. Proced**, [s.i.], v. 18, n. 1, p.412-412, jan. 1959.

KUMAR, Vinay et al.. **Robbins & Cotran Patologia: Bases Patológicas das Doenças**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. 1458 p.

LAMARCA, Edmir Vicente et al.. Contribuições do conhecimento local sobre o uso de Eugenia spp. em sistemas de policultivos e agrofl. **Revista Brasileira Agroecologia**, [s.i], v. 3, n. 8, p.119-1130, jul. 2013. Disponível em: <[http://orgprints.org/25708/1/Lamarca_Contribuições do conhecimento local sobre o uso de EUGENIA SPP.pdf](http://orgprints.org/25708/1/Lamarca_Contribuições%20do%20conhecimento%20local%20sobre%20o%20uso%20de%20EUGENIA%20SPP.pdf)>. Acesso em: 16 jan. 2017.

LIMA, Danielle da Cunha Amaral. **Estudo comparativo da atividade antioxidante de plantas medicinais da caatinga utilizadas como anti-inflamatórias**. 2011. 88 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Pernambuco, Recife, 2011.

LIMA, Talita P. de et al.. **AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE ESPÉCIES DA FAMÍLIA MYRTACEAE NATIVAS DO CERRADO COM POTENCIAL DE USO ECONÔMICO**. Campinas: Instituto Agrônomo, 2010. Disponível em: <<http://www.iac.sp.gov.br/areadoinstituto/pibic/anais/2010/artigos/re10136.pdf>>. Acesso em: 27 dez. 2016.

LOPES, Juliana MÁrcia Macedo. **EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO COM SUCO DE UVAIA (*Eugenia uvalha Cambess*) NO PERFIL LIPÍDICO E NO ESTRESSE**. 2014. 86 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pósgraduação em Saúde e Nutrição, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2014.

LUENGO, Marcos B.. UMA REVISÃO HISTÓRICA DOS PRINCIPAIS ACONTECIMENTOS DA IMUNOLOGIA E DA FARMACOLOGIA NA BUSCA DO ENTENDIMENTO E TRATAMENTO DAS DOENÇAS INFLAMATÓRIAS. **Revista Eletrônica de Farmácia**, [s.i.], v. 2, n. 2, p.64-72, 15 dez. 2005.

MAGINA (A), Michele A. et al.. Atividade antioxidante de três espécies de *Eugenia* (Myrtaceae). **Latin American Journal Of Pharmacy**, Blumenau, v. 3, n. 29, p.376-382, out. 2009. Disponível em: <<http://sedici.unlp.edu.ar/handle/10915/7921>>. Acesso em: 20 dez. 2016.

MAGINA (B), Michele D. A. et al.. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of *Eugenia* species. **Journal Of Natural Medicines**, [s.l.], v. 63, n. 3, p.345-350, 24 mar. 2009. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s11418-009-0329-5>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19308653>>. Acesso em: 22 out. 2016.

MAGINA, Michele Debiasi Alberton et al.. Topical antiinflammatory activity and chemical composition of the epicuticular wax from the leaves of *Eugenia beaurepaireana* (Myrtaceae). **Brazilian Journal Of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 45, n. 1, p.171-176, jan. 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/bjps/v45n1/21.pdf>>. Acesso em: 08 dez. 2016.

MALING, Harriet M. et al.. INFLAMMATION INDUCED BY HISTAMINE, SEROTONIN, BRADYKININ AND COMPOUND 48/80 IN THE RAT: ANTAGONISTS AND MECHANISMS OF ACTION. **The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics**, [s.i.], v. 191, n. 2, p.300-310, jun. 1974.

MARÓSTICA JÚNIOR, Mário Roberto; PASTORE, Gláucia Maria. BIOTRANSFORMAÇÃO DE LIMONENO: UMA REVISÃO DAS PRINCIPAIS ROTAS METABÓLICAS. **Química Nova**, Campinas, v. 30, n. 02, p.382-387, 24 out. 2006. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v30n2/26.pdf>>. Acesso em: 17 jan. 2017.

MATTOS, Gisely de. **EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DE ÁCIDOS FENÓLICOS E FALVONÓIDES DE EUGENIA PYRIFORMIS CAMBESS USANDO DIFERENTES SOLVENTES**. 2013. 35 f. TCC (Graduação) - Curso de Curso Superior de Engenharia de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campos Mourão, 2013.

MEHTA, Ashish K. et al.. The effect of the essential oil of *Eugenia caryophyllata* in animal models of depression and locomotor activity. **Nutritional Neuroscience**, [s.l.], v. 16, n. 5, p.233-238, set. 2013. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1179/1476830512y.0000000051>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23462195>>. Acesso em: 12 fev. 2017.

MIGUEL JUNIOR, Armando. **Medicina Geriátrica**. 2007. Disponível em: <<http://www.medicinageriatrica.com.br/2007/08/01/fisiologia-da-dor/>>. Acesso em: 11 fev. 2017.

NERI-NUMA, Iramaia Angélica et al.. Evaluation of the antioxidant, antiproliferative and antimutagenic potential of araçá-boi fruit (*Eugenia stipitata* Mc Vaugh — Myrtaceae) of the Brazilian Amazon Forest. **Food Research International**, [s.l.], v. 50, n. 1, p.70-76, jan. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2012.09.032>. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996912003912>>. Acesso em: 12 fev. 2017.

NEVES, I. A. et al.. Atividades antioxidantes das folhas e caule *Eugenia uvalha* Cambess. In: XXII SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 22., 2012, Bento Gonçalves. **Atividades antioxidantes das folhas e caule Eugenia uvalha Cambess**. Porto Alegre: Ufrgs, 2012. p. 1 - 1. Disponível em: <http://www.ufrgs.br/spmb2012/Trabalhos/3430_1336490674_Resumo_SBPM_2012_Final.pdf>. Acesso em: 27 dez. 2016.

NEWMAN, David J.; CRAGG, Gordon M.. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. **Journal Of Natural Products**, [s.l.], v. 75, n. 3, p.311-335, 23 mar. 2012. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/np200906s>.

O'CONNOR, Terence M. et al.. The role of substance P in inflammatory disease. **Journal Of Cellular Physiology**, [s.l.], v. 201, n. 2, p.167-180, 2004. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1002/jcp.20061>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15334652>>. Acesso em: 18 dez. 2016.

OGONOWSK, Alison A. et al.. Antiinflammatory and Analgesic Activity of an Inhibitor of Neuropeptide Amidation. **The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics**, [s.i.], v. 2, n. 280, p.846-853, out. 1997.

OLIVEIRA, José C. S. de et al.. Composição química do óleo essencial de *Eugenia uvalha* Cambess. (Myrtaceae). In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 30., 2007, Águas de Lindóia. **Anais...** [s.i.]: Sociedade Brasileira de Química, 2007. v. 1, p. 58 - 58. Disponível em: <<http://sec.s bq.org.br/cdrom/30ra/resumos/T0238-1.pdf>>. Acesso em: 27 dez. 2016.

PEREIRA, Marina C. et al.. Characterization and Antioxidant Potential of Brazilian Fruits from the Myrtaceae Family. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, [s.l.], v. 60, n. 12, p.3061-3067, 28 mar. 2012. American Chemical Society (ACS). <http://dx.doi.org/10.1021/jf205263f>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22397467>>. Acesso em: 27 dez. 2016.

PESSINI, G.I. et al.. Avaliação da atividade antibacteriana e antifúngica de extratos de plantas utilizados na medicina popular. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s.i.], v. , n. 13, p.21-24, maio 2003. Disponível em: <<http://scielo.iec.pa.gov.br/pdf/rpas/v1n2/v1n2a03.pdf>>. Acesso em: 17 jan. 2017.

PETRUZZELLI, Michele; WAGNER, Erwin F.. Mechanisms of metabolic dysfunction in cancer-associated cachexia. **Genes & Development**, [s.l.], v. 30, n. 5, p.489-501, 1 mar. 2016. Cold Spring Harbor Laboratory Press. <http://dx.doi.org/10.1101/gad.276733.115>.

PINTO, Angelo C. et al.. Produtos Naturais: Atualidade, Desafios e Perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 1, p.45-61, jan. 2002. Disponível em: <http://quimicanova.sbq.org.br/detalhe_artigo.asp?id=5277>. Acesso em: 26 nov. 2016.

PIRES, Alana F. et al.. A novel N-acetyl-glucosamine lectin of *Lonchocarpus araripensis* attenuates acute cellular inflammation in mice. **Inflammation Research**, [s.l.], v. 65, n. 1, p.43-52, 6 nov. 2015. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1007/s00011-015-0889-7>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26546610>>. Acesso em: 04 jan. 2017.

PRUT, Laetitia; BELZUNG, Catherine. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review. **European Journal Of Pharmacology**, [s.l.], v. 463, n. 1-3, p.3-33, fev. 2003. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0014-2999\(03\)01272-x](http://dx.doi.org/10.1016/s0014-2999(03)01272-x). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12600700>>. Acesso em: 12 jan. 2017.

QUEIROZ, Julia M. G. et al.. Aspectos populares e científicos do uso de espécies de *Eugenia* como fitoterápico. **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, v. 9, n. 2, p.87-100, abr. 2015. GN1 Genesis Network. <http://dx.doi.org/10.5935/2446-4775.20150008>. Disponível em: <<http://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/228>>. Acesso em: 08 dez. 2016.

RAMANA, Kota V. et al.. Aldose Reductase-Regulated Tumor Necrosis Factor- α Production Is Essential for High Glucose-Induced Vascular Smooth Muscle Cell Growth. **Endocrinology**, [s.l.], v. 148, n. 9, p.4371-4384, set. 2007. The Endocrine Society. <http://dx.doi.org/10.1210/en.2007-0512>.

RANG, H. P. et al.. **Rang e Dose Farmacologia**. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011.

RAY, Wayne A. et al.. COX-2 selective non-steroidal anti-inflammatory drugs and risk of serious coronary heart disease. **The Lancet**, [s.l.], v. 360, n. 9339, p.1071-1073, out. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736\(02\)11131-7](http://dx.doi.org/10.1016/s0140-6736(02)11131-7). Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673602111317>>. Acesso em: 13 dez. 2016.

REN-SMITH, Chantelle M; CHURCH, Frank C. Resposta Vascular a lesão e doenças. In: REISNER, Howard. **Patologia: Uma Abordagem por Estudos de Casos**. Porto Alegre: Artmed, 2015. Cap. 2. p. 21-92.

RICCIOTTI, E.; FITZGERALD, G. A.. Prostaglandins and Inflammation. **Arteriosclerosis, Thrombosis, And Vascular Biology**, [s.l.], v. 31, n. 5, p.986-1000, 20 abr. 2011. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1161/atvbaha.110.207449>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3081099/>>. Acesso em: 13 dez. 2016.

ROCHA, Marina Souza et al.. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (in vitro) DE FRUTOS DO CERRADO PIAUIENSE. **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal, v. 4, n. 35, p.933-941, dez. 2013. Disponível em: <https://www.researchgate.net/profile/Raimundo_Figueiredo/publication/260765183_Physical_and_chemical_Characterization_and_antioxidant_activity_in_vitro_of_fruit_of_the_Piaui_Savanna/links/54f46a2e0cf2f9e34f0a2b55.pdf>. Acesso em: 17 jan. 2017.

SAHA, Santanu et al.. Evaluation of antinociceptive and anti-inflammatory activities of extract and fractions of *Eugenia jambolana* root bark and isolation of phytoconstituents. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, [s.l.], v. 23, n. 4, p.651-661, jul. 2013. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1590/s0102-695x2013005000055>. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0102695X13700826>>. Acesso em: 12 fev. 2017.

SCALON, Silvana de Paula Quintão; SCALON FILHO, Homero; RIGONI, Marilúcia Rossi. Armazenamento e germinação de sementes de uvaia *Eugenia uvalha* Cambess. **Ciência e Agrotecnologia**, [s.l.], v. 28, n. 6, p.1228-1234, dez. 2004. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s1413-70542004000600002>. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-70542004000600002>. Acesso em: 27 dez. 2016.

SERHAN, Charles N.; CHIANG, Nan; VAN DYKE, Thomas E.. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. **Nature Reviews Immunology**, [s.l.], v. 8, n. 5, p.349-361, maio 2008. Springer Nature. <http://dx.doi.org/10.1038/nri2294>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18437155>>. Acesso em: 13 dez. 2016.

SHAJIB, M. S.; KHAN, W. I.. The role of serotonin and its receptors in activation of immune responses and inflammation. **Acta Physiologica**, [s.l.], v. 213, n. 3, p.561-574, 11 dez. 2015. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/apha.12430>.

SILVA, Yuri Lisik da et al.. Triagem fitoquímica e avaliação de propriedade biológicas do extrato alcoólico das folhas *Eugenia Uvalha* Cambess. **Arq. Cienc. Saúde Unipar**, Umuarama, v. 19, n. 3, p.205-211, set. 2015. Disponível em: <<http://revistas.unipar.br/index.php/saude/article/viewFile/5550/3145>>. Acesso em: 08 dez. 2016.

SOUZA, Angela Maria de. **AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO DE *Eugenia pyriformis* CAMBESS., MYRTACEAE E ESTUDO DA ASSOCIAÇÃO SINÉRGICA COM AGENTES ANTIBACTERIANOS E ANTIFÚNGICOS DE USO CLÍNICO**. 2013. 120 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013. Disponível em: <http://acervodigital.ufpr.br/bitstream/handle/1884/32579/R_-_D_-_ANGELA_MARIA_DE_SOUZA.pdf?sequence=1&isAllowed=y>. Acesso em: 17 jan. 2017.

TAHER, Yousef A. et al.. Experimental evaluation of anti-inflammatory, antinociceptive and antipyretic activities of clove oil in mice. **Libyan Journal Of Medicine**, [s.l.], v. 10, n. 1, p.1-7, jan. 2015. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.3402/ljm.v10.28685>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26333873>>. Acesso em: 12 fev. 2017.

THE PLANT LIST. **Eugenia uvalha Cambess.** 2013. Disponível em: <<http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-77165>>. Acesso em: 16 jan. 2017.

TJØLSEN, Arne et al.. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, [s.l.], v. 51, n. 1, p.5-17, out. 1992. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). [http://dx.doi.org/10.1016/0304-3959\(92\)90003-t](http://dx.doi.org/10.1016/0304-3959(92)90003-t). Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/030439599290003T>>. Acesso em: 28 dez. 2016.

TOMAZZONI, Marisa Ines. **SUBSÍDIOS PARA A INTRODUÇÃO DO USO DE FITOTERÁPICOS NA REDE BÁSICA DE SAÚDE DO MUNICÍPIO DE CASCAVEL.** 2004. 125 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós Graduação em Enfermagem, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

TOSCANO, Eliana Cristina de Brito. **INIBIÇÃO DO RECEPTOR DO FATOR ATIVADOR DE PLAQUETAS PROMOVE REDUÇÃO DE DÉFICITS NEUROLÓGICOS E NEUROPROTEÇÃO NA ISQUEMIA E REPERFUSÃO CEREBRAL MURINA.** 2016. 81 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Patologia Geral, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2016. Disponível em: <http://www.bibliotecadigital.ufmg.br/dspace/bitstream/handle/1843/BUBD-ABZMU2/disserta__o_eliana_toscano_.pdf?sequence=1>. Acesso em: 16 dez. 2016.

VAN ARMAN, C. G.. Oedema and Increased Vascular Permeability. **Handbook Of Experimental Pharmacology**, [s.l.], p.75-91, 1979. Springer Nature. http://dx.doi.org/10.1007/978-3-642-66891-3_3.

VARDEH, Daniel; MANNION, Richard J.; WOOLF, Clifford J.. Toward a Mechanism-Based Approach to Pain Diagnosis. **The Journal Of Pain**, [s.l.], v. 17, n. 9, p.750-769, set. 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jpain.2016.03.001>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27586831>>. Acesso em: 03 fev. 2017.

VASCONCELOS, Anilton César. **Patologia em Hipertexto.** Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, 2000. Color. Disponível em: <<http://depto.icb.ufmg.br/dpat/old/historia.htm>>. Acesso em: 08 dez. 2016.

VICTORIA, Francine Novack et al.. Essential oil of the leaves of *Eugenia uniflora* L.: Antioxidant and antimicrobial properties. **Food And Chemical Toxicology**, [s.l.], v. 50, n. 8, p.2668-2674, ago. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2012.05.002>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22583648>>. Acesso em: 12 fev. 2017.

VIEGAS, Cláudio; BOLZANI, Vanderlan da Silva; BARREIRO, Eliezer J.. Os Produtos Naturais e a Química Medicinal Moderna. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 2, p.326-337, 20 jan. 2006. Disponível em: <http://quimicanova.sbq.org.br/detalhe_artigo.asp?id=2424>. Acesso em: 26 nov. 2016.

VINEGAR, R.; SCHREIBER, W.; HUGO, R.. BIPHASIC DEVELOPMENT OF CARRAGEENIN EDEMA IN RATS. **Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics**, [s.i.], v. 1, n. 166, p.96-103, mar. 1969.

VOSS-RECH, Daiane et al.. Atividade antibacteriana de extratos vegetais sobre sorovares de Salmonella. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 2, n. 41, p.314-320, fev. 2011. Disponível em: <<http://revistas.bvs-vet.org.br/crural/article/download/20802/21631>>. Acesso em: 17 jan. 2017.

WALSH, Laurence J. et al.. Human dermal mast cells contain and release tumor necrosis factor α , which induces endothelial leukocyte adhesion molecule 1. **Medical Sciences**, [s.i], v. 88, n. 1, p.4220-4224, maio 1991. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1709737>>. Acesso em: 17 dez. 2016.

WALSH, Roger N.; CUMMINS, Robert A.. The open-field test: A critical review.. **Psychological Bulletin**, [s.l.], v. 83, n. 3, p.482-504, 1976. American Psychological Association (APA). <http://dx.doi.org/10.1037/0033-2909.83.3.482>. Disponível em: <<http://psycnet.apa.org/index.cfm?fa=buy.optionToBuy&id=1976-27066-001>>. Acesso em: 05 jan. 2017.

WOOLF, Clifford J. et al.. Towards a mechanism-based classification of pain? **Pain**, [s.l.], v. 77, n. 3, p.227-229, set. 1998. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). [http://dx.doi.org/10.1016/s0304-3959\(98\)00099-2](http://dx.doi.org/10.1016/s0304-3959(98)00099-2). Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9808347>>. Acesso em: 03 fev. 2017.