

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

**DISSERTAÇÃO**

**Avaliação dos efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório de extrato, frações e compostos de *Borreria verticillata* (L.) G. Mey (Vassourinha de botão)**

**Geysa de Matos Dutra Mariano**

**Seropédica, RJ**  
**Fevereiro de 2017**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**



**INSTITUTO DE BIOLOGIA**

**DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FISIOLÓGICAS**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTINOCICEPTIVO E ANTI-  
INFLAMATÓRIO DE EXTRATO, FRAÇÕES E COMPOSTOS DE  
*Borreria verticillata* (L.) G. Mey (VASSOURINHA DE BOTÃO)**

**GEYSA DE MATOS DUTRA MARIANO**

*Sob a Orientação do Professor*  
**Frederico Argollo Vanderlinde**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências**, no Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Área de Concentração: Fisiologia e Farmacologia.

Seropédica, RJ  
Fevereiro de 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)

d333a de Matos Dutra Mariano, Geysa, 1985-  
Avaliação dos efeitos antinociceptivo e anti  
inflamatório de extrato, frações e compostos de  
Borreria verticillata (L.) G. Mey (Vassourinha de  
botão) / Geysa de Matos Dutra Mariano. - 2017.  
73 f.: il.

Orientador: Frederico Argollo Vanderlinde.  
Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal Rural  
do Rio de Janeiro, Ciências Fisiológicas, 2017.

1. Nocicepção. 2. Inflamação. 3. Borreria  
verticillata. 4. Rutina. 5. Ácido clorogênico. I.  
Argollo Vanderlinde, Frederico , 1954-, orient. II  
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.  
Ciências Fisiológicas III. Título.

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

**GEYSA DE MATOS DUTRA MARIANO**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Fisiológicas** no Programa de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas área de Concentração em: (Fisiologia e Farmacologia).

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 22/02/2017

---

Prof. Dr. Frederico Argollo Vanderlinde (Orientador, Membro Interno – UFRRJ)

---

Prof. Dr. Bruno Guimarães Marinho (Membro Interno – UFRRJ)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Eline Matheus (Membro Externo – UFRJ)

## DEDICATÓRIA

*Dedico a Deus, por me permitir realizar este sonho,  
ao meu esposo Lenon e família que lutaram esta batalha  
comigo, sem vocês eu não conseguiria, amo vocês!*

## RESUMO

MARIANO, Geysa de Matos Dutra. **Avaliação dos efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório de extrato, frações e compostos de *Borreria verticillata* (L.) G. Mey (Vassourinha de botão)**. 2017. 73f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas). Departamento de Ciências Fisiológicas, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

A *Borreria verticillata* (L.) G. Mey é uma planta herbácea da família Rubiaceae, considerada uma erva daninha e conhecida como vassourinha-de-botão. Por ser usada pela população como analgésica e antipirética, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antinociceptivo e anti-inflamatório do extrato aquoso das folhas de *B. verticillata* (EFBV), das frações flavonoídica (Flav), butanólica (BuOH) e acetato de etila (AcOEt) e dos compostos rutina (Ru, rendimento de 58%) e ácido clorogênico (AC, rendimento de 3%), administrados via oral em camundongos. Estudos anteriores, mostraram a atividade do extrato de EFBV, do flavonóide rutina e do composto fenólico ácido clorogênico em diversas atividades biológicas, incentivando nossa pesquisa com estes compostos, objetivando a confirmação dos usos da *B. verticillata*. A avaliação da atividade antinociceptiva pelo modelo das contorções abdominais (ácido acético), mostrou que a administração de EFBV (100, 300 e 1000mg/kg) produziu inibições no número de contorções de 23,6%, 30,3% e 47,3% respectivamente, quando comparados ao veículo, assim como o controle positivo (CP) indometacina reduziu as contorções. No modelo de imersão cauda, a administração de EFBV não mostrou alterações no tempo de latência dos animais diante do estímulo térmico e para confirmar estes resultados antinociceptivos, avaliamos a atividade motora do EFBV, no qual sua administração não modificou o tempo de permanência dos animais no *rota-rod*. A avaliação da atividade anti-inflamatória, utilizando o modelo de pleurisia por carragenina, mostrou que a administração de EFBV (1g/kg) inibiu a migração leucocitária em 33,7%, comparativamente ao veículo e as frações Flav (20mg/kg), BuOH (200mg/kg) e AcOEt (25mg/kg) também apresentaram reduções na migração leucocitária de 38,9%, 71,1%, 78,8% respectivamente. Avaliando a atividade antiedematogênica com o modelo de edema de orelha (óleo de cróton), a administração de EFBV (1g/kg) reduziu o edema de orelha em 47,6%. Na artrite articular por zimosan, o EFBV (1g/kg), a Ru (30mg/kg) e o AC (2mg/kg) reduziram o edema da articulação fêmur-tibial em 57,8%, 49,2% e 51,7% respectivamente, quando comparados aos veículos. Neste mesmo modelo, o EFBV (1g/kg), os compostos Ru (30mg/kg) e AC (2mg/kg) inibiram a migração leucocitária para cavidade articular em 64,9%, 79,5% e 77,8%, quando comparados aos seus respectivos veículos, assim como a CP dexametasona também produziu reduções nos dois parâmetros avaliados neste modelo. Na mensuração do diâmetro fêmur-tibial, seguida da dosagem da citocina TNF- $\alpha$  no macerado articular, EFBV, Ru e AC reduziram a espessura articular em 58,1% (EFBV, Ru) e 40,7% (AC), quando comparados ao controle salina-zimosan. Avaliamos a concentração de TNF- $\alpha$  após administração de EFBV, Ru ou AC, onde observamos reduções de 30,4%, 37,0%, 21,7%, respectivamente, na concentração da citocina, comparados com controle salina-zimosan e semelhante ao CP, reduzindo em 50,0% esta concentração. Estes resultados evidenciam que a antinocicepção do EFBV, no modelo das contorções abdominais mostrando envolvimento de mecanismos anti-inflamatórios, tendo este extrato apresentado atividade antiedematogênica no modelo de edema de orelha e, juntamente com os compostos Ru e AC, no modelo de artrite por zimosan. Adicionalmente, o EFBV e as frações (Flav, BuOH e AcOEt) inibiram a migração leucocitária na pleurisia por carragenina, tendo também o extrato, Ru e AC apresentado efetividade semelhante na artrite articular por zimosan, reduzindo também a concentração de TNF- $\alpha$ . Esses resultados sugerem que os efeitos anti-inflamatório, antinociceptivo e anti-artrite obtidos envolve a inibição do TNF- $\alpha$ , justificando os efeitos biológicos do EFBV, da rutina e do ácido clorogênico, podendo explicar alguns dos usos da *B. verticillata* (L.) G. Mey.

Palavras-chave: Antinociceptivo, Anti-inflamatório, *Borreria verticillata* (L.) G. Mey.

## ABSTRACT

MARIANO, Geysa de Matos Dutra. **Evaluation of antinociceptive and anti-inflammatory effects of extract, fractions and compounds of *Borreria verticillata* (L.) G. Mey (Vassourinha de botão)**. 2017. 73p. Dissertation (Master in Physiological Sciences). Department of Physiological Sciences, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2017.

*Borreria verticillata* (L.) G. Mey is a herbaceous plant of the family Rubiaceae, considered a weed and known as vassourinha-de-botão. Because it is used in the population as analgesic and antipyretic, the objective of this work was to evaluate the antinociceptive and anti-inflammatory potential of *B. verticillata* (EFBV) aqueous extract of the leaves, flavonoid (Flav), butanol (BuOH) and ethyl acetate (AcOEt) fractions and compounds rutin (Ru, 58% yield) and chlorogenic acid (AC, 3% yield), administered orally in mice. Previous studies have shown the activity of the EFBV extract, the flavonoid rutin and the phenolic compound chlorogenic acid in several biological activities, encouraging our research with these compounds, aiming to confirm the uses of *B. verticillata*. The evaluation of antinociceptive activity by the writhing test (acetic acid), showed that the administration of EFBV (100, 300 and 1000mg/kg) produced inhibitions in the number of writhes of 23.6%, 30.3% and 47.3%, respectively, when compared to the vehicle, as well as the positive control (CP) indomethacin reduced of the writhes. In the tail-immersion test, the administration of EFBV did not show changes in the latency time of the animals in front of the thermal stimulus and to confirm these antinociceptive results, we evaluated the motor activity of the EFBV, in which its administration did not modify the dwell time of the animals in the *rota-rod*. The evaluation of anti-inflammatory activity through the carrageenan-induced pleurisy test showed that EFBV (1g/kg) inhibited leukocyte migration in 33.7%, compared to the vehicle and the fractions Flav (20mg/kg), BuOH (200mg/kg), AcOEt (25mg/kg) presented reductions in the migration of 38.9%, 71.1%, 78.8% and 85.5% respectively. Evaluating the antiedematogenic activity with the ear edema test (croton oil), the administration of EFBV (1g/kg) reduced edema by 47.6%. In zymosan-induced articular arthritis, EFBV(1g/kg), Ru (30mg/kg) and AC (2mg/kg) reduced edema of the femoral-tibial joint in 57.8%, 49.2% and 51.7%, respectively, when compared to vehicles. In the same test, EFBV (1g/kg), Ru (30mg/kg) and AC (2mg/kg) compounds inhibited the leukocyte migration to the joint cavity in 64.9%, 79.5% and 77.8%, when compared to their respective vehicles and CP dexamethasone also produced reductions in the two parameters evaluated in this model. In the measurement of the femoral-tibial diameter, followed by cytokine TNF- $\alpha$  dosing in the joint macerate, EFBV, Ru and AC reduced joint thickness by 58.1% (EFBV, Ru) and 40.7% (AC), when compared to saline-zymosan control, with CP dexamethasone reduced the thickness by 76.5%. The concentration of TNF- $\alpha$  after administration of EFBV, Ru or AC, where we observed reductions of 30.4%, 37.0%, 21.7%, respectively, in the cytokine concentration, compared to saline-zymosan control and similar to CP, reducing this concentration by 50.0%. These results show that the antinociception of the EFBV, in the writhing test, participate in anti-inflammatory mechanisms, and this extract showed antiedematogenic activity (ear edema) and, together with the compounds Ru and AC, at the femoral-tibial joint in arthritis by zimosan. In addition, EFBV and fractions (Flav, BuOH and AcOEt) inhibited leukocyte migration in pleurisy by carrageenan, and the extract, Ru and AC also showed similar effectiveness in zymosan-induced arthritis, also reducing the concentration of TNF- $\alpha$ . These results suggest that the anti-inflammatory, antinociceptive and anti-arthritis effects involved the inhibition of TNF- $\alpha$ , justifying the biological effects of EFBV, rutin and chlorogenic acid, and may explain some of the uses of *B. verticillata* (L.) G. Mey.

Keywords: Antinociceptive, Anti-inflammatory, *Borreria verticillata*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Borreria verticillata</i> (L.) G. Mey.....	9
Figura 2. Aspectos da espécie <i>Borreria verticillata</i> (L.) G. Mey.....	10
Figura 3. Estrutura molecular da Rutina identificada a partir do EFBV.....	14
Figura 4. a) Estrutura molecular do Ácido 5-cafeoilquínico, b) Ácido clorogênico identificado a partir do EFBV.....	16
Figura 5. Sinais cardinais da inflamação.....	19
Figura 6. Cascata do ácido araquidônico e outras vias que compõem a resposta inflamatória.....	20
Figura 7. Etapas da migração leucocitária, quimiotaxia e fagocitose.....	21
Figura 8. Diferenças celulares da articulação normal <i>versus</i> articulação com artrite reumatoide.....	26
Figura 9. Ativação dos neurônios nociceptivos.....	29
Figura 10. Cascata de citocinas e quimiocinas induzidas por estímulos inflamatórios.....	30
Figura 11. Sinais de entrada na medula espinal.....	31
Figura 12. Condução dos impulsos nociceptivos.....	32
Figura 13. Processo de extração da folha de EFBV, flavonoide rutina e fenólico ácido clorogênico.....	37
Figura 14. Esquema do método de contorções abdominais induzidas por ácido acético.....	38
Figura 15. Esquema do método de imersão da cauda.....	39
Figura 16. Esquema do método de <i>rota-rod</i> .....	40
Figura 17. Esquema do método de edema de orelha induzida por óleo de cróton.....	41
Figura 18. Esquema do método de pleurisia induzida por carragenina.....	42
Figura 19. Esquema do método de artrite induzida por zimosan.....	43
Figura 20. Esquema de determinação da concentração de TNF- $\alpha$ pelo método de artrite induzida por zimosan.....	44
Figura 21. Efeito do extrato aquoso das folhas de <i>B. verticillata</i> (L.) G. Mey (EFBV) no teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético.....	45
Figura 22. Efeito do extrato aquoso das folhas de <i>B. verticillata</i> (L.) G. Mey (EFBV) no teste de imersão da cauda.....	46
Figura 23. Efeito do extrato aquoso das folhas de <i>B. verticillata</i> (L.) G. Mey no teste de <i>rota rod</i> .....	47
Figura 24. Efeito do extrato aquoso das folhas de <i>B. verticillata</i> (L.) G. Mey (EFBV) no teste do edema de orelha induzido por óleo de cróton.....	48
Figura 25. Efeito do extrato aquoso das folhas de <i>B. verticillata</i> (L.) G. Mey (EFBV) (a) e das Frações (b) no teste da pleurisia induzida por carragenina.....	49
Figura 26. Efeito do extrato aquoso das folhas de <i>B. verticillata</i> (L.) G. Mey (EFBV) no modelo de artrite induzida por zimosan.....	50
Figura 27. Efeito da Rutina (Ru) no modelo de artrite induzida por zimosan.....	51
Figura 28. Efeito do Ácido clorogênico (AC) no modelo de artrite induzida por zimosan.....	52
Figura 29. Efeito do extrato aquoso das folhas de <i>B. verticillata</i> (L.) G. Mey, dos compostos Ru e AC na concentração de TNF- $\alpha$ no modelo de artrite induzida por zimosan.....	54

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Atividades biológicas de materiais fitoquímicos extraídos de <i>Borreria verticillata</i> (L.) G. Mey.....	8
--	---

## LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

%: por cento  
±: mais ou menos  
®: marca registrada  
µg/kg: micrograma por kilo  
µg: microgramas  
µL/orelha: microlitro por orelha  
12/12h: 12 em 12 horas  
5-HT: serotonina  
5LOX: 5-lipoxigenase  
a.C.: Antes de Cristo  
AAAA: acetato de etila/acetona/ácido acético/água  
AC: ácido clorogênico  
AcOEt: fração acetato de etila  
Ag: antígeno  
AIES: anti-inflamatórios esteroidais  
AINES: anti-inflamatórios não-esteroidais  
AMP: adenosina monofosfato  
ANOVA: análise de variância  
ANVISA: Agência Nacional de Saúde  
ATP: adenosina trifosfato  
Aβ: A beta  
Aδ: A delta  
*B. verticillata*: *Borreria verticillata* (L.) G. Mey  
BAW: n-butanol/ácido acético/água  
BuOH: fração butanólica  
BV: *Borreria verticillata* (L.) G. Mey  
C5a: componente da cascata do complemento 5a  
Ca<sup>2+</sup>: cálcio  
Caco-2: linhagem de células de adenocarcinoma de cólon humano  
CCl<sub>4</sub>: tetracloreto de carbono  
ce: célula epidérmica  
CEUA: comissão de Ética no Uso de Animais  
CGRP: peptídeo relacionado ao gene de calcitonina  
cm: centímetros  
CMC: carboximetilcelulose  
COSY: espectroscopia de correlação homonuclear  
COX: cicloxigenase  
COX-1: cicloxigenase 1  
COX-2: cicloxigenase 2  
CTGF: fator de crescimento do tecido conjuntivo  
cut: cutícula  
d.C.: Depois de Cristo  
DAMPS: padrões moleculares associados a danos  
Dexa: dexametasona  
Diaz: diazepam  
DL<sub>50</sub>: Dose letal 50%  
DMARDs: anti-reumáticos modificadores da doença

*E. coli*: *Escherichia coli*  
 EFBV: extrato aquoso da folha de *Borreria verticillata* (L.) G. Mey  
 ELISA: imunoenensaio enzimático  
 EPM: erro padrão da média  
 est: estômato  
 Flav: fração flavonoídica  
 g/kg: gramas por kilo  
 g: gramas  
 GM-CSF: fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos  
 H<sup>+</sup>: íons hidrogênio  
 HMQC: correlação heteronuclear múltiplo-Quantum  
 HPLC: cromatografia líquida de alta eficiência  
*i.a.*: via intra-articular  
*i.p.*: via intraperitoneal  
*i.t.*: via intra-torácica  
 IASP- *International Association for the Study of Pain*  
 ICAM-1 – molécula de adesão intercelular -1  
 ID<sub>50</sub>: dose inibitória 50%  
 IFN: interferon  
 IFN $\gamma$  – interferon gama  
 IgA: imunoglobulina A  
 IgG: imunoglobulina G  
 IgM: imunoglobulina M  
 IL: interleucina  
 IL-1: interleucina 1  
 IL-12: interleucina 12  
 IL-18: interleucina 18  
 IL-1 $\beta$ : interleucina-1 beta  
 IL-2: interleucina 2  
 IL-6: interleucina 6  
 IL-8: interleucina 8  
 Indo: indometacina  
 iNOS: óxido nítrico sintase induzida  
 I $\kappa$  $\beta$ : inibidor do fator de transcrição NF $\kappa$  $\beta$   
 K<sup>+</sup>: potássio  
 KC: quimiocina derivada de queratinócito  
 Kg: quilograma  
 LDL: lipoproteínas de baixa densidade  
 LOX – lipoxigenase  
 LPS: lipopolissacarídeo bacteriano  
 LTA<sub>4</sub>: leucotrieno A<sub>4</sub>  
 LTB<sub>4</sub>: leucotrieno B<sub>4</sub>  
 LTC<sub>4</sub>: leucotrieno C<sub>4</sub>  
 LTD<sub>4</sub>: leucotrieno D<sub>4</sub>  
 LTE<sub>4</sub>: leucotrieno E<sub>4</sub>  
 MCP-1: proteína quimioatrente de monócito  
 mg/kg: miligrama por kilo  
 min: minutos  
 MIP-1  $\alpha$ : proteína inflamatória de macrófagos-1 $\alpha$   
 MIP-2: proteína inflamatória de macrófago-2

mL/articulação: mililitro por articulação  
mL/kg: mililitros por kilo  
mL: mililitros  
mm: milímetros  
MMP-2: metaloproteinase 2  
MMP-9: metaloproteinase 9  
n°.: Número  
Na<sup>+</sup>: sódio  
NADH: dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido  
NET: transportador de norepinefrina  
NF-κβ: fator nuclear kappa B  
NGF: fator de crescimento neural  
NLR: receptores NOD-like  
nm: nanômetros  
NO – óxido nítrico  
°C: graus celsius  
mg: miligramas  
OMS – Organização Mundial de Saúde  
*P. aeruginosa*: *Pseudomonas aeruginosa*  
*P. falciparum* - *Plasmodium falciparum*  
*P. vivax* – *Plasmodium vivax*  
*p.o.*: via oral  
*p/v*: peso/volume  
PAMPS: padrões moleculares associados a patógenos  
PGD<sub>2</sub>: prostaglandina D<sub>2</sub>  
PGE<sub>2</sub>: prostaglandina E<sub>2</sub>  
PGF<sub>2α</sub>: prostaglandina F<sub>2α</sub>  
PGG<sub>2</sub>: prostaglandina G<sub>2</sub>  
PGH<sub>2</sub>: prostaglandina H<sub>2</sub>  
PGI: prostaciclina  
PGI<sub>2</sub>: prostaciclina I<sub>2</sub>  
PKA: proteína quinase A  
PKC: proteína quinase C  
PLA<sub>2</sub>: fosfolipase A<sub>2</sub>  
r.p.m.: rotação por minuto  
RAW 264.7: linhagem de macrófagos murinos transformados pela injeção intraperitoneal do vírus de Leucemia Abelson  
RDC – Resolução de Diretoria Colegiada  
RMN: Ressonância Magnética Nuclear  
RNS: espécies reativas de nitrogênio  
ROS: espécies reativas de oxigênio  
RP-2: fase reversa-2  
RSC-364: linhagem de sinoviócitos semelhantes a fibroblastos  
Ru: rutina  
*S. aureus*: *Staphylococcus aureus*  
*s.c.*: subcutâneo  
s: segundos  
SERT: transportador de serotonina  
SNC: sistema nervoso central  
SP: substância P

TLR: receptores toll-like  
TNF- $\alpha$  – fator de necrose tumoral alfa  
TPA: 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato  
TXA<sub>2</sub>: tromboxano A<sub>2</sub>  
UFRRJ: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
UI/mL: Unidade internacional por mililitro  
UV: ultravioleta  
v/v: volume/volume  
VCAM-1: molécula de adesão celular vascular-1  
 $\Delta$ : diferença  
 $\mu$ L: microlitros  
 $\mu$ M: micromolar  
 $\mu$ mol/L: micromol por litro

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>4</b>
2.1 Plantas Medicinais e seu Uso na Dor e Inflamação	4
2.2 Família Rubiaceae: Gêneros <i>Spermacoce</i> e <i>Borreria</i>	7
2.2.1 Compostos Flavonoides e Rutina	13
2.2.2 Compostos Fenólicos e Ácido clorogênico	16
2.3 Bases da Inflamação	18
2.3.1 Ácido araquidônico e as prostaglandinas	22
2.3.2 Citocinas e quimiocinas	23
2.4 Artrite Reumatoide	25
2.5 Dor	27
2.5.1 Fisiopatologia da Dor	28
2.6 Tratamento da Dor	32
<b>3 OBJETIVOS</b>	<b>34</b>
<b>4 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>35</b>
4.1 Animais	35
4.2 Material Botânico	35
4.3 Substâncias, Reagentes e Solventes	35
4.4 Obtenção do Extrato, Rutina e Ác. Clorogênico	36
4.5 Métodos Farmacológicos	38
4.5.1 Métodos de Avaliação de Atividade Antinociceptiva	38
4.5.1.1 Modelo das Contorções Abdominais Induzidas por Ácido Acético	38
4.5.1.2 Modelo da imersão da cauda	38
4.5.2 Métodos de Avaliação de Atividade Motora	39
4.5.2.1 Modelo do <i>Rota-rod</i>	39
4.5.3 Métodos de Avaliação de Atividade Anti-edematogênica	40
4.5.3.1 Modelo do Edema de Orelha Induzido por Óleo de Cróton	40
4.5.4 Métodos de Avaliação de Atividade Anti-inflamatória	41
4.5.4.1 Modelo da Pleurisia Induzida por Carragenina	41
4.5.4.2 Modelo da Artrite na Articulação Fêmur-tibial Induzida por Zimosan	42
4.5.4.3 Determinação da concentração articular de TNF- $\alpha$	43
4.6 Análise Estatística	44
<b>5 RESULTADOS</b>	<b>45</b>
5.1 Avaliação da Atividade Antinociceptiva do EFBV	45
5.1.1 Modelo das Contorções Abdominais Induzidas por Ácido Acético	45
5.1.2 Modelo da Imersão da Cauda	45
5.2 Avaliação da Atividade Motora do EFBV	46
5.2.1 Modelo do Rota rod	46
5.3 Avaliação da Atividade Antiedematogênica do EFBV	47
5.3.1 Modelo do Edema de Orelha Induzido por Óleo de Cróton	47
5.4 Avaliação da Atividade Anti-inflamatória do EFBV, Frações e Compostos	48
5.4.1 Modelo da Pleurisia Induzida por Carragenina	48
5.4.2 Modelo da Artrite na Articulação Fêmur-tibial Induzida por Zimosan	49

5.4.3 Determinação do Edema e da Concentração de TNF- $\alpha$ articular	53
<b>6 DISCUSSÃO</b>	<b>55</b>
<b>7 CONCLUSÕES</b>	<b>63</b>
<b>8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>65</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais para o alívio e o tratamento de doenças vem sendo uma prática realizada por milênios, desde o período paleolítico médio e pelo menos há 60.000 anos, com registros na antiga Mesopotâmia e Egito, desempenhando até a atualidade um importante papel na saúde mundial, considerando a diversidade de espécies e de componentes químicos vegetais disponíveis, que favorecem o desenvolvimento de fármacos fitoterápicos.

De acordo com dados do ano de 1998 da Organização Mundial de Saúde (OMS), observou-se que mesmo em países desenvolvidos e com acesso a medicamentos alopáticos, grande parte da população fazia uso de medicamentos fitoterápicos, por popularidade histórica, razões culturais ou por preocupações com os efeitos adversos dos medicamentos sintéticos, a exemplo do desconforto gástrico e as hemorragias decorrentes da utilização de medicamentos anti-inflamatórios.

Em países em desenvolvimento da África, aproximadamente 80% da população dependia exclusivamente do uso medicinal das plantas na saúde básica, pelo custo mais baixo e pela facilidade de obtenção das fontes naturais. Em cidades rurais de Gana, Mali, Nigéria e Zâmbia, mais de 60% das crianças com febre alta eram tratadas com ervas medicinais, conforme pesquisas realizadas pelo programa de Malária da OMS (WHO, 2002). No ano de 2013, essa mesma organização reiterou que milhões de pessoas continuavam utilizando os medicamentos à base de plantas como única fonte de cuidado, pela maior acessibilidade e baixo custo, indicando que essa prática continuaria a crescer.

Nos dias atuais, o desenvolvimento e o uso de fármacos fitoterápicos tem mostrado crescimento e ganhado forças no mercado mundial, incrementado por novas tecnologias que garantem a detecção e a identificação dos constituintes químicos derivados de plantas, que associados com estudos farmacológicos e de biologia molecular, além de pesquisas de segurança, eficácia, toxicidade e ensaios clínicos, tem tornado o uso mais racional e menos empírico, podendo apresentar efeitos adversos menores quando comparados ao tratamento alopático, conforme revelam diversas pesquisas.

As leis e as políticas que regulamentam a utilização de medicamentos à base de plantas a nível regional e nacional, buscam a segurança e a eficácia dessa terapia, através de orientações, normas técnicas e treinamentos, avançando junto a OMS. No ano de 1999, dos 191 estados-membros pertencentes a esta Organização, apenas 65 faziam parte do grupo orientado e no ano de 2012 já eram 119 estados, que avançaram em pesquisas através da criação de

institutos nacionais de investigação, que antes eram 19 e no ano de 2012, numericamente aumentaram para 73 institutos (WHO, 2013).

Este avanço tecnológico e científico na descoberta de novos fármacos derivados de plantas utilizadas no tratamento e cura de doenças, tem resultado em inúmeras prêmiações. No ano de 2015, os farmacologistas Youyou Tu, William C. Campbell e Satoshi Omura, receberam o Prêmio Nobel de Medicina e Fisiologia pela descoberta de dois fitoterápicos importantes no tratamento de doenças parasitárias. Avaliando extratos de ervas chinesas no tratamento da malária, Tu descobriu que a artemisinina isolada do extrato de *Artemisia annua* L. produziu inibição do crescimento dos parasitas *Plasmodium falciparum* e *P. vivax*, desenvolvendo assim um novo antimalárico, já Campbell e Omura, descobriram as avermectinas, que foram isoladas de *Streptomyces avermitilis* em amostras de solo do Japão, passando a serem usadas com sucesso no tratamento de doenças como a filariose linfática (elefantíase) e a oncocercose, mostrando assim a importância do avanço nos estudos dos constituintes químicos extraídos de plantas e suas partes com finalidades terapêuticas (EFFERTH et al., 2015).

A *Borreria verticillata* (L.) G. Mey (BV) é uma planta herbácea, pertencente à família *Rubiaceae*, conhecida popularmente pelos nomes: vassourinha de botão, cordão-de-frade, erva-botão, erva de lagarto, poaia, poaia-comprida, poaia-falsa e perpétua do mato. Tem sido empregada empiricamente em diversos objetivos terapêuticos como anti-inflamatória, analgésica, antipirética, antitumoral, antioxidante, hepatoprotetora, antidiarreica, no tratamento de erisipelas e afecções de pele como psoríase e hanseníase, hemorroidas, diabetes e dismenorreia, além de ações antimicrobianas e antifúngicas. Diversos estudos científicos com a espécie têm avaliado algumas destas atividades, mas observa-se a necessidade do aprofundamento das propriedades terapêuticas específicas, principalmente no que diz respeito a presença de atividades anti-inflamatória e analgésica, tendo em vista que atualmente, há poucos estudos investigando essas propriedades terapêuticas.

A inflamação é uma resposta fisiopatológica protetora a uma lesão, trauma ou dano de um tecido vivo envolvendo uma cascata de eventos bioquímicos e celulares como a liberação de inúmeros mediadores (histamina, citocinas, quimiocinas, produtos da cascata do complemento), vasodilatação com aumento da permeabilidade vascular, edema e extravasamento de fluidos e proteínas, ativação da migração celular e quimiotaxia por neutrófilos, sensibilização e ativação de nociceptores, lise tecidual e processo de cura através de reparo ou regeneração, sendo os sinais desta resposta caracterizados por dor, calor, rubor (vermelhidão), tumor (edema) e conseqüente perda de função. Um dos sinais cardinais da

inflamação é a dor, sendo caracterizada por uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a danos real ou potencial dos tecidos. De caráter aguda ou crônica, a dor envolve mecanismos periféricos e centrais de transmissão a partir do corno dorsal da medula espinal, atravessando lâminas, chegando até o tálamo e o córtex somatossensorial, cujos nociceptores ativados frente a um estímulo potencialmente nocivo, liberam inúmeros mediadores e aminas biogênicas, que agem sobre receptores promovendo a sensibilização do nociceptor e as respostas de alodinia e hiperalgesia.

O tratamento e o alívio dos sinais e sintomas característicos da inflamação aguda podem ser realizados por algumas classes de fármacos, como os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINES), os anti-inflamatórios esteroidais (AIES) ou glicocorticóides, além dos analgésicos opióides, voltados somente para o tratamento da dor, sendo que a classe mais utilizada pela população é dos AINES. Contudo, sabemos que essa classe de fármacos apresentam inúmeros efeitos adversos, como a irritação gástrica, alterações da função renal e da coagulação, além de outros, e em decorrência destes efeitos, observa-se a preferência ao uso de fitoterápicos eficazes no tratamento da dor e da inflamação, creditando-se minimizarem estes efeitos colaterais. Desta forma, o estudo de plantas e de seus constituintes químicos com atividade anti-inflamatória busca ajudar a medicina de muitos países pela possibilidade de minimização desses efeitos, além da fácil acessibilidade pela população.

Estudos de atividades farmacológicas preliminares realizados pelo nosso grupo evidenciaram efeitos anti-inflamatório e anti-edematogênico no extrato aquoso da folha de BV, gerando assim perspectivas favoráveis para a prospecção fitoquímica biomonitorada, seguido do isolamento e da identificação de constituintes químicos responsáveis pelos efeitos inicialmente encontrados neste extrato, bem como a determinação de mecanismos envolvidos.

Este trabalho teve como objetivo avaliar o potencial antinociceptivo e anti-inflamatório do extrato da folha de *B. verticillata* (L.) G. Mey (EFBV), das frações extraídas do extrato por partição com solventes orgânicos: flavonoídica (Flav), butanólica (BuOH) e acetato de etila (AcOEt) e de compostos isolados a partir dessas frações, a Rutina (Ru) e o Ácido clorogênico (AC), administrados pela via oral em camundongos, através de métodos ou modelos farmacológicos apropriados, bem como a quantificação de citocinas inflamatórias para investigar mecanismos de ação envolvidos com estas atividades, podendo explicar algumas das indicações populares desta espécie, além de determinar a participação dos compostos isolados rutina e ácido clorogênico nestas atividades.

# 1 REVISÃO DE LITERATURA

## 2.1 Plantas Medicinais e seu Uso na Dor e Inflamação

Conforme a definição da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) na Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) N°. 10/2010, as plantas medicinais são espécies vegetais, cultivadas ou não, que possuem substâncias ou classe de substâncias utilizadas com finalidades terapêuticas, após processo de coleta, estabilização e secagem, na sua forma íntegra, rasurada, triturada ou pulverizada, cuja efetividade encontra-se comprovada pelo uso tradicional, alicerçado na tradição popular e na revisão de literatura de documentos técnico-científicos (BRASIL, 2010).

São organismos vivos encontrados na natureza, assim como os animais e os micro-organismos, que possuem em sua estrutura, misturas de substâncias quimicamente complexas com inúmeras habilidades como a cura e tratamento de doenças. Possuem atividades terapêuticas como anti-inflamatórias, analgésicas, antipiréticas, antimicrobianas, laxativas, eméticas, cardiotônicas, relaxante muscular, além de tratar obesidade, doença de Parkinson, Alzheimer, câncer e centenas de outras doenças. Além disso, também são usadas como precursoras para a síntese químico-farmacêutica devido à grande diversidade de seus constituintes químicos naturais, sendo fonte de compostos para a descoberta e a produção de novos medicamentos fitoterápicos (JI et al., 2009; BRAHMACHARI, 2011; LAHLOU, 2013).

As plantas também podem ser definidas como alimento, alimento funcional ou dietético complementar, tendo como principais fontes originadas das frutas, legumes e ervas, se apresentando geralmente na forma de extratos brutos, com mistura de material fresco e seco que podem revelar uma infinidade de propriedades terapêuticas. Diante disso, o consumo de frutas no Brasil tem aumentado, pelo reconhecimento do potencial terapêutico e nutricional oriundos de minerais, fibras, vitaminas e outros compostos secundários com importância para saúde humana e presentes neste alimento (RUFINO et al., 2010; SAHOO et al., 2010; BRAHMACHARI, 2011; LAHLOU, 2013).

A fitoterapia é definida pela Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos como a ciência que estuda o uso dos produtos de origem vegetal em suas diferentes preparações farmacêuticas, sem a utilização de substâncias ativas isoladas, ainda que de origem vegetal, na prevenção, atenuação ou cura de doenças, tendo a ANVISA na RDC N°. 26/2014, definido os fitoterápicos ou medicamentos fitoterápicos como aqueles obtidos de matérias-primas ativas

vegetais, com finalidade profilática, curativa ou paliativa, com segurança e eficácia baseadas em evidências clínicas, além da constância de sua qualidade. Esses medicamentos fitoterápicos conforme a OMS incluem ervas, materiais, preparações e produtos acabados à base de plantas que contêm como ingredientes ativos partes de plantas, ou outros materiais vegetais, ou combinações (BRASIL, 2006; SAHOO et al., 2010).

No Brasil, as plantas medicinais são amplamente utilizadas em áreas rurais e urbanas conforme a tradição popular desenvolvida ao longo dos anos, ou trazidos para o país por estrangeiros e empregadas em formulações caseiras como chás, decoctos, tinturas, xaropes e pós, ou como produtos do desenvolvimento farmacêutico (RATES, 2001; CALIXTO, 2005).

O uso de fitoterápicos sempre foi maior nos países em desenvolvimento, pela escassa disponibilidade de serviços de saúde, pela facilidade das fontes naturais e por estes poderem apresentar segurança, eficácia e baixo custo. Sabe-se, entretanto, que diante do desenvolvimento científico no século XX, gerando o conhecimento químico, botânico, farmacológico e toxicológico dos fitoterápicos, contrariou as tradições populares que informavam que o uso de produtos naturais não era prejudicial à saúde. Apesar desta terapia poder ser menos iatrogênica, desenvolvendo menos efeitos adversos, eles podem acontecer, produzindo reações de hipersensibilidade, toxicidade e interações entre medicamentos, sendo sempre necessário a avaliação criteriosa de estudos clínicos e pré-clínicos (RATES, 2001; JI et al., 2009; SAHOO et al., 2010; BRAHMACHARI, 2011, GHASEMIAN et al., 2016).

Conforme estimativas dos anos de 1998 e 1999, 65 a 80% da população de baixa renda dependia exclusivamente das plantas medicinais para a sua saúde, cerca de 25% dos medicamentos prescritos em todo o mundo eram derivados de plantas e 121 compostos ativos estavam sendo usados. Do total de 252 medicamentos na lista de medicamentos essenciais da OMS, 11% eram exclusivamente de origem vegetal e 60 % dos fármacos anti-tumorais e anti-inflamatórios já existentes no mercado ou sob ensaio clínico eram de origem natural (RATES, 2001; CALIXTO, 2005; AGRA et al., 2007; SAHOO et al., 2010).

De acordo com Newman e colaboradores (2012), em um estudo que apresenta os produtos naturais como fonte de novas substâncias químicas ao longo de 30 anos (1981 a 2010), mostra que a utilidade de produtos naturais de todas as origens como fonte de novas estruturas químicas ainda está muito forte. Em 1981, foram aprovadas 25,6% novos compostos químicos de origem natural, natural biológica e derivadas de produtos naturais, já no ano de 2010, estas aprovações chegaram a 50%, resultando num aumento significativo do número de novas moléculas naturais aprovadas ao longo dos anos, que dão origem a diversos medicamentos e

que irão, auxiliar no tratamento de inúmeras doenças, como por exemplo, doenças infecciosas e inflamatórias, o câncer e a hipertensão, dentre muitas outras.

O Brasil possui a maior biodiversidade natural, de origem vegetal, animal e mineral, sendo que, de todas as espécies de plantas existentes no mundo, 22% estão presentes no nosso país. Este fato, associado ao histórico de uso popular e ao aumento ano-a-ano dos estudos técnico-científicos, podem explicar que entre os anos de 1984 e 2004, o Brasil teve um aumento de 41,6% no número de publicações científicas relacionadas ao uso de plantas, quando comparados com países como México (19,9%), Argentina (19,5%) e Chile (6,4%). Fica assim evidenciado que os estudos e uso de fitoterápicos tem crescido ao longo dos anos, incentivando a descoberta de novos fitoterápicos a partir de pesquisas técnicos-científicos mais aprofundados, de modo a aumentar o quantitativo de medicamentos à base de plantas com custos baixos, eficácia, segurança e toxicidade conhecidas, além de boa qualidade para o tratamento e cura de doenças, alcançando todas as classes sociais em todo o mundo (RATES, 2001; CALIXTO, 2005).

O uso das plantas medicinais na dor e inflamação tem sido amplamente recomendado na medicina popular por muitos países e há muitos anos, existindo registros desde a antiga Mesopotâmia (2600 a.C.), com relatos do uso do suco de papoula. No Egito antigo (1500 a.C.) foi citado o uso do salgueiro, na Grécia e Roma antiga a obra “Corpus Hippocraticum” de Hipócrates (468-377 a.C.) mencionava o extrato de *Atropa belladonna* com efeitos anestésicos, além do uso da casca do Salgueiro (*Salix alba*) e do ópio (*Papaver somniferum*) para alívio da dor. Ao passar do tempo, outros estudiosos escreveram novas obras como Pedanius Dioscórides (100 d.C.) citando a Camomila como agente antiflogístico na cura de feridas, picadas e queimaduras, bem como Cláudio Galeno (129-200 d.C.) que estudou os efeitos tóxicos do ópio, referenciando o mesmo como “o mais forte dos medicamentos que adormecem os sentidos e induzem sono profundo”. (JI et al., 2009; LIMA, 2013; PETROVSKA, 2012; LAHLOU, 2013).

Até o início do século XIX a identidade dos compostos químicos responsáveis pelos efeitos medicinais das plantas ainda era desconhecida, sendo usadas de maneira doméstica em humanos e animais, se admitindo a existência de diferentes compostos químicos numa única espécie natural, que separadamente ou sinergicamente promoviam melhorias de determinadas doenças (JI et al., 2009; LIMA, 2013; PETROVSKA, 2012; LAHLOU, 2013).

Foi quando em 1805 o farmacêutico alemão Friedrich Wilhelm Sertürner, isolou o composto “morfina”, primeiro alcaloide farmacologicamente ativo extraído do ópio (*Papaver somniferum*), que representou a porta de entrada para o início do isolamento de diversos

compostos ativos de diferentes espécies de plantas usadas na dor e inflamação, como os alcaloides Chichonidina e Quinina da casca de Chinchona identificados em 1820 por Joseph Pelletier e Joseph Canventou e usados como antimalárico e antipirético, a salicilina isolada da casca de *Salix alba* (Salgueiro) em 1828 por Johann Buchner e empregada na dor e febre, a colchicina da espécie *Colchicum autumnale* (Colchicum) usada no tratamento de gota; a Curcumina extraída da *Curcuma longa*; a cafeína isolada da *Coffea arábica*, a cocaína isolada da *Erythroxylum coca*, dentre muitos outros (FALCÃO et al. 2005; JI et al., 2009; PETROVSKA, 2012; LIMA, 2013; GHASEMIAN et al., 2016; YUAN et al., 2016).

Estes isolamentos provaram que os compostos químicos individuais presentes nos extratos, sejam eles alcaloides, terpenoides e/ou flavonoides, eram os responsáveis pela atividade farmacológica esperada, estimulando o aumento de estudos e a criação de novas ferramentas de identificação de constituintes químicos a partir de plantas sendo garantido pelo avanço tecnológico e científico ocorridos nos séculos XX e XXI. Um bom exemplo foi a introdução no mercado em 2004, do primeiro fitoterápico anti-inflamatório de uso externo extraído da planta *Cordia verbenácea*, conhecido como Acheflan<sup>®</sup>, e usado para o tratamento de traumas, tendinites e dores musculares (YUNES et al., 2001; JI et al., 2009; LAHLOU, 2013; PERINI et al., 2015).

Apesar da ampla utilização das plantas medicinais pela população mundial nos dias atuais, acompanhada da evolução da química, biologia e farmacologia; as primícias deste emprego pelos povos ocidentais e orientais mostrou-se inicialmente desafiador, visto que no passado, resultaram na ingestão de substâncias tóxicas e/ou venenosas que culminaram em distúrbios como vômitos, diarreia, coma e até mesmo a morte. Por certo, esta prática foi necessária, desencadeando o desenvolvimento de amplos conhecimentos e práticas fitoterápicas utilizados até hoje com segurança e confiabilidade, a descoberta de uma infinidade de fitoterápicos e o desenvolvimento de técnicas mais sofisticadas de purificação e isolamento de constituintes químicos derivados das plantas (LAHLOU, 2013; YUAN et al., 2016).

## **2.2 Família Rubiaceae: Gêneros *Spermacoce* e *Borreria***

A família Rubiaceae é uma das maiores famílias de angiospermas da ordem Gentianales, com três subfamílias: Rubioideae, Cinchonoideae e Ixoroideae. Possui 650 gêneros e 13000 espécies, encontradas em diversas regiões, tropicais, subtropicais e em algumas áreas temperadas e frias. No Brasil, encontramos essa família na Mata atlântica, aproximadamente

130 gêneros e 1500 espécies, registrados 36 espécies diferentes de *Borreria*. As plantas dessa família apresentam diversos usos terapêuticos como antihipertensiva, antimicrobiana, antioxidante, antimalárica, antidiabética e anti-inflamatória pela presença de compostos isolados como alcalóides, terpenos e antraquinonas (AGUIAR et al., 2010; CONSERVA et al., 2012; FERREIRA-JUNIOR et al., 2012; BALDÉ et al., 2015; KALA, 2015).

Os gêneros *Spermacoce* e *Borreria*, pertencentes a tribo *Spermacoceae* e subfamília *Rubioideae*, compreendem entre 250-300 espécies cada um, distribuídos em regiões tropicais e subtropicais, como África, Ásia, América, Europa, com maior diversidade no planalto brasileiro, sendo comum na estação chuvosa por sua preferência a áreas úmidas. Na Guiné, pode ser encontrada em savanas, terrenos baldios, áreas não cultivadas e fendas de rochas. (AGUIAR et al., 2010; CONSERVA et al., 2012; FERREIRA-JUNIOR et al., 2012; MURTALA et al., 2015; BALDÉ et al., 2015).

Alguns autores tratam os dois gêneros de maneira separada, outros os caracterizam em combinação pela semelhança dos seus frutos maduros e outros consideram a espécie *Spermacoce verticillata* L. sinônímia da *B. verticillata* (L.) G. Mey. Essas duas espécies tem sido usadas na medicina tradicional da América Latina, Ásia, África e Oeste da Índia, por suas atividades analgésica, antipirética, anti-inflamatória, anti-tumoral, antimicrobiana, larvicida, antioxidante, anti-ulcerogênica e hepatoprotetora (Tabela 1) (MOREIRA et al., 2010; CONSERVA et al., 2012; MURTALA et al., 2015; BALDÉ et al., 2015; KALA, 2015).

**Tabela 1:** Atividades biológicas de materiais fitoquímicos extraídos de *Borreria verticillata* (L.) G. Mey (adaptado de CONSERVA et al., 2012).

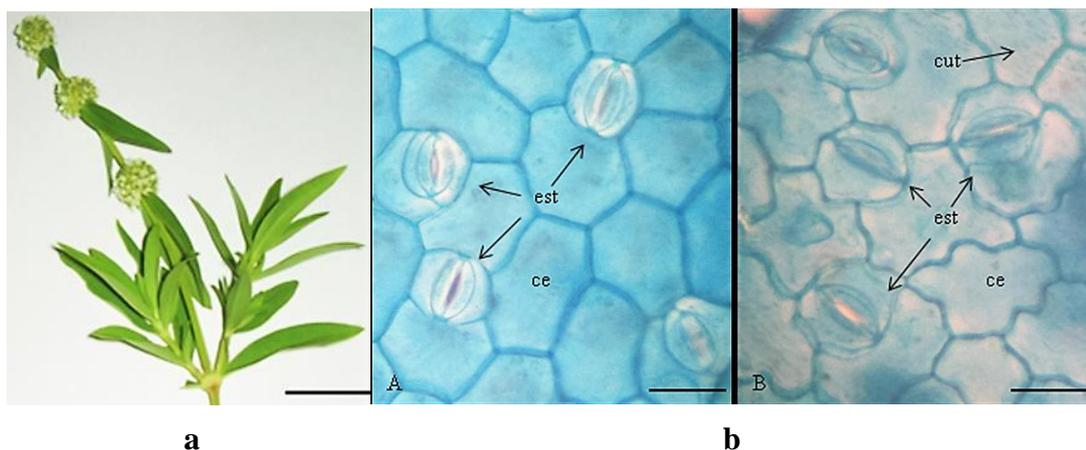
Atividades	Espécie ou partes da planta	Material Fitoquímico	Microorganismos testados
Antimicrobiana	<i>B. verticillata</i> (L.) G. Mey	Extrato indeterminado	<i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> e <i>Monilia albicans</i>
	Raízes	Metanol	Cepas multirresistentes de <i>P. Aeruginosa</i>
	Partes aéreas	Óleo volátil	<i>N. gonorrhoeae</i> , <i>P. aeruginosa</i> e <i>C. albicans</i>
Esquistossomicida	Folhas	Óleo essencial	Ovos, miracídeos e cercárias de <i>Schistosoma hematobium</i>
Estimulante uterino	Raízes	Extrato aquoso	-
Toxicidade	Folhas e raízes	Metanol	Camarão de água salgada (valores de DL <sub>50</sub> >250µg/mL)

A *Borreria verticillata* (L.) G. Mey é uma erva daninha pequena, perene e ereta, distribuída pela América do Sul e Central, sendo conhecida no Brasil como: erva-botão, erva de lagarto, perpétua do mato, poaia, falsa-poaia, poaia-preta, poaia-miúda, poaia-rosário, poaia-comprida, cordão de frade e vassourinha de botão, essa erva tem um histórico de uso em várias condições de saúde, como dor, inflamação e febre (Figura 1) (AGUIAR et al., 2010; MOREIRA et al., 2010; CONSERVA et al., 2012, FERREIRA-JUNIOR et al., 2012; USHIE et al., 2013).



**Figura 1:** *Borreria verticillata* (L.) G. Mey (Google imagens).

O estudo botânico das plantas tem como parte fundamental o processo de identificação da espécie que terá suas propriedades farmacológicas determinadas, de modo a contribuir na padronização, evitando conflitos e possibilidades de intoxicações pelo uso da espécie errada. Estudos botânicos das folhas de *Borreria verticillata* (L.) G. Mey mostram folhas sésseis e verticiladas, lâmina foliar com contorno lanceolado a linear, nervação primária peninérvia e secundária do tipo eucamptodódroma a acródroma e algumas folhas são ásperas pela presença de pêlos longos e grossos, observa-se também células epidérmicas em formato poliédrico com paredes retas na face adaxial e sinuosa na face abaxial, cutícula com estrias leves (Figura 2 a e b). O mesófilo é do tipo dorsiventral com cavidades secretoras e idioblastos com ráfides de oxalato de cálcio (AGUIAR et al., 2010).



**Figura 2:** Aspectos da espécie *Borreria verticillata* (L.) G. Mey. **a)** Aspecto geral do ramo florido **b)** Vista frontal da epiderme foliar. A – face adaxial. B – face abaxial. Legenda: célula epidérmica (ce), estômato (est), cutícula estriada (cut) (adaptado de AGUIAR et al., 2010).

São inúmeras as indicações e usos populares desta espécie. Empiricamente, a infusão das flores é usada como antipirética e analgésica, o macerado das raízes como emética, antidiarreica, antimalárica e no tratamento de hemorróidas e erisipela e o chá das raízes é usado para tratar leucorréias e blenorragias. As folhas são usadas na inflamação dos olhos e gengiva, cegueira, hemorragia, disenteria, diarreia, também como antipirética, analgésica e abortiva, além de tratar doenças hepáticas e renais. No Oeste da Índia, o decocto é empregado no tratamento da diabetes e dismenorréia, no Senegal trata infecções bacterianas da pele e hanseníase e a infusão atribui-se melhoras a digestão do estômago. Na Nigéria, o extrato ou suco das partes aéreas frescas é usada para eczema (*Tinea versicolor*), psoríase, sarna e furúnculo. O enema trata feridas de gonorréia, esquistossomose e paralisia e a loção alivia o prurido na pele. (Tabela 1) (PEIXOTO-NETO et al., 2002; CONSERVA et al., 2012; USHIE et al., 2013; ABDULLAHI-GERO et al., 2014; BALDÉ et al., 2015; MURTALA et al., 2015).

Essa gama de atividades atribuídas a *Borreria verticillata* (L.) G. Mey resultaram em estudos fitoquímicos e a descoberta de metabólitos secundários, sendo atualmente mais de 60 compostos, distribuídos em diferentes classes, no qual foram isolados alcalóides, iridóides, flavonóides e terpenóides, além de antraquinonas, saponinas, compostos fenólicos, taninos, glicosídeos, esteróis e carboidratos (CONSERVA et al., 2012; ABDULLAHI-GERO et al., 2014; MURTALA et al., 2015).

Investigações fitoquímicas apontaram compostos alcalóides indólicos como borrerina e verticilatinas A e B, cloretos bis-indólicos como borreverina, isoborreverina e espermacoceína, alcalóides tetrahydroisoquinolinas e emetinas. Destacando o tartarato de borreverina com atividade antimicrobiana *in vitro* contra diversos patógenos como *Sarcina lutea*, *Vibrio*

*cholerae*, *Staphylococcus aureus* e seis linhagens diferentes de *Pseudomonas aeruginosa*. Ogunwande e colaboradores (2010), mostraram que os óleos essenciais isolados das folhas de BV produziram inibição no crescimento de microorganismos como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans* (PEIXOTO-NETO et al., 2002; AGUIAR et al., 2010; MOREIRA et al., 2010; CONSERVA et al., 2012; FERREIRA-JUNIOR et al., 2012).

No óleo essencial de *B. verticillata* (L.) G. Mey, foram encontrados compostos terpenóides do tipo mono, di e sesquiterpenóides: cariofileno, guiaeno, campesterol, beta-sitosterol, estigmasterol, fitol, cimeno, germacreno, pineno, copaeno e uma infinidade de outros compostos (OGUNWANDE et al., 2010; CONSERVA et al., 2012).

Alguns compostos iridoides também foram identificados, como asperulosido, ácido asperulosídico, borrhieriagenina, diacetil-asperulosido dafiloside, ácido desacetil-asperulosídico, feretosido, diacetil-asperulosidato metila, escandosido e 6'-O-(2-gliceril) éster de metila escandosido, sendo o asperulosido responsável pelas atividades esteróide anabolizante muscular, inibidor do TNF- $\alpha$  (Fator de necrose tumoral alfa), redutor da produção de IL-1 $\beta$  (Interleucina-1 beta) e PGE<sub>2</sub> (Prostaglandina E<sub>2</sub>), além de serem eficazes no tratamento da artrite reumatoide. O asperulosido combinado com o ácido desacetil-asperulosídico e escandosido demonstraram atividade contra o vírus *Epstein Barr* e inibição contra a oxidação da LDL (lipoproteínas de baixa densidade). O ácido asperulosídico mostrou inibição fraca da inflamação induzida por 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato (TPA) em camundongos (AGUIAR et al., 2010; MOREIRA et al., 2010; CONSERVA et al., 2012; FERREIRA-JUNIOR et al., 2012).

Ferreira-Junior e colaboradores (2012), foram capazes de isolar pela primeira vez em um estudo, compostos das partes aéreas, caule e raízes de *B. verticillata* (L.) G. Mey, através de extração com solventes orgânicos. Isolando terpenos (ácido morólico, ácido ursólico, ácido oleanólico), um flavonoide (3-O-a-L-ramnopiranosil-quercetina), fitoesteróis (sitostenona e estigmastenona) e a primeira antraquinona (2-hidroxi-3-metil-antraquinona) isolada desta espécie, útil para a caracterização da quimiotaxonomia da tribo Spermaceae.

Misturas de ácidos alifáticos, triacilgliceróis, sacarose, glucose, compostos voláteis como ácidos graxos e compostos aromáticos, ácidos carboxílicos e aminoácidos, também foram encontrados na espécie *B. verticillata* (L.) G. Mey (AGUIAR et al., 2010; MOREIRA et al., 2010; CONSERVA et al., 2012;; USHIE et al., 2013).

Observando a diversidade de compostos químicos que podem ser extraídos da planta BV, bem como a gama de efeitos a ela atribuídos, dentre eles as atividades hepatoprotetora, analgésica e anti-inflamatória, diversos trabalhos buscam comprovar alguns destes efeitos, identificando compostos que possivelmente estariam atuando, além de ensaios de toxicidade.

Murtala e colaboradores (2015), determinaram em seus estudos a capacidade hepatoprotetora do extrato aquoso das folhas de *B. verticillata* (L.) G. Mey em ratos expostos a hepatotoxicidade induzida por tetracloreto de carbono (CCl<sub>4</sub>), atribuindo a essa propriedade a ação antioxidante dos compostos flavonoídicos presentes no extrato da *B. verticillata* (L.) G. Mey.

O extrato total de alcalóides extraído das partes aéreas de BV, mostrou potencial antimicrobiano significativo contra *Staphylococcus aureus*, moderada contra *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Mycobacterium fortuitum*, *Gardnerella vaginalis*, *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e fraca contra *Streptococcus viridans*, comprovando que este potencial esta intimamente ligado a presença de muitos alcalóides na solução extraída (BALDÉ et al., 2015)

Cherigo e colaboradores (2012), realizaram ensaios utilizando o extrato orgânico das partes aéreas de *B. verticillata* (L.) G. Mey, evidenciando atividade antiparasitária moderada contra *Plasmodium falciparum*, com inibição de 65% do crescimento de seus trofozoítos e com o isolamento de três compostos durante a triagem fitoquímica: esqualeno, epoxi-esqualeno e borrecapina, sendo o alcalóide indólico borrecapina responsável pelas atividades contra o *P. falciparum*.

Abdullahi-gero e colaboradores (2014), avaliaram o extrato etanólico da folha de *B. verticillata* (L.) G. Mey, evidenciando a atividade antinociceptiva nos modelos de contorções abdominais induzidas por ácido acético, placa quente e formalina, assim como efeitos antiedematogênico através dos testes de edema de pata induzida por carragenina e por formalina; atribuindo a participação de compostos alcaloides, flavonoides e terpenoides encontrados na triagem fitoquímica nessas atividades. Este estudo também mostrou baixa toxicidade do extrato etanólico da folha em ensaios *in vivo*, no qual foi possível observar que a DL<sub>50</sub> do extrato esta acima de 5000 mg/kg quando administrado pela via oral em camundongos.

Lima e colaboradores (2014) identificaram pela primeira vez três novos compostos encontrados no extrato aquoso das folhas de *B. verticillata* (L.) G. Mey (EFBV): fenólico (ácido clorogênico), flavonóide (quercetin-3-O-rutinosido (rutina) e kaempferol-3-O-rutinoside, compostos estes (ácido clorogênico (Ac) e rutina (Ru)) testados nesta dissertação por serem os

compostos majoritários encontrados nestas frações, com rendimentos de 3% e 58%, respectivamente, comprovando a riqueza e a importância dos metabólitos secundários desta espécie.

Estudos preliminares realizados pelo nosso grupo em parceria com Lima e colaboradores (2016), utilizando o EFBV administrado pela via oral em camundongos e nos métodos farmacológicos da pleurisia induzida por carragenina (1g/kg) e do edema de orelha por óleo de cróton (0,1g/kg, 0,3g/kg e 1g/kg), evidenciaram os efeitos anti-inflamatório e anti-edematogênico, com a redução na migração leucocitária e na diferença de peso das orelhas dos animais, tendo o extrato apresentado ID<sub>50</sub> de 0,95g/kg. Também as frações extraídas a partir do EFBV, a fração butanólica (200mg/kg) e a fração acetato de etila (25mg/kg) foram efetivas no modelo da pleurisia, revelando a participação dos compostos flavonóides na atividade anti-inflamatória, considerando serem ricos nessas frações.

### **2.2.1 Compostos Flavonoides e Rutina**

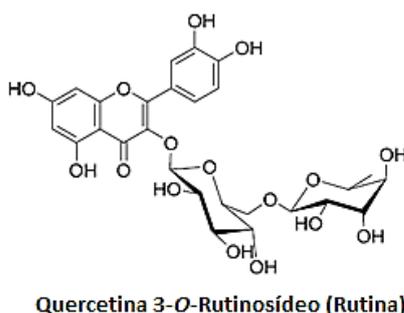
Os flavonoides são compostos polifenólicos de baixo peso molecular, presentes em grande quantidade na natureza na forma de glicosídeos, sendo essenciais para a função, crescimento, desenvolvimento e sobrevivência das plantas. São sintetizados naturalmente a partir das vias do ácido chiquímico e acético e se diferenciam por combinações entre as agliconas dos flavonóides e unidades de açúcares (CAZAROLLI et al., 2008; SALVAMANI et al., 2014; RASOULI et al., 2016).

Existem diferentes classes de flavonoides: flavonas, flavononas, flavanonol, flavonóis, catequinas, antocianidinas, isoflavonas, taninos, entre outros e são importantes na dieta humana presentes em frutas, legumes, sementes, nozes, grãos, trigo, vinho, chá, cerveja e algumas hortaliças (CAZAROLLI et al., 2008; SALVAMANI et al., 2014; RASOULI et al., 2016).

As ações biológicas dos flavonóides tem sido muito estudadas, sendo a principal, a ação antioxidante, que ocorre por inativação da peroxidação lipídica, com redução da formação de espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS), inibição de enzimas como mono-oxigenase microssomal, glutatona-S-transferase, succinoxidase mitocondrial e NADH oxidase, envolvidas no estresse oxidativo, possuem também atividade contra a deposição e oxidação das LDLs, combinados ao efeito antiagregante plaquetário, fatores esses, determinantes no desenvolvimento de doenças degenerativas do coração, cérebro e câncer, além

de outras atividades, como antineoplásica, antibacteriana, antifúngica, antiprotozoária e antiviral (CAZAROLLI et al., 2008; SALVAMANI et al., 2014; RASOULI et al., 2016).

Mais de 400 metabólitos secundários estão presentes em diferentes formas, os mais comuns são as quercetinas: quercetina-3-rutinosídeo, conhecida mundialmente por “rutina”, quercetina-4'-glucosídeo e quercetina-3,4'-glucosídeo, além de kaempferol, miricetina, naringenina, catequinas e muitos outros. A rutina é encontrada em mais de 130 preparações medicinais registradas, também conhecida como Vitamina P, estima-se que mais de 70 espécies de plantas contenham esse flavonoide em sua estrutura (Figura 3). A quercetina é a porção aglicona da rutina sintetizada por hidrólise pela flora intestinal e estudos comprovam que a quercetina e a rutina coexistem e são encontradas em alguns alimentos como cebolas, maçãs, bagas, chás e vinho (CAZAROLLI et al., 2008; CHUA, 2013; SALVAMANI et al., 2014; GANESHPURKAR et al, 2016).



**Figura 3:** Estrutura molecular da Rutina identificada a partir do EFBV (LIMA et al., 2014).

A rutina é responsável por diversas atividades biológicas: anti-inflamatória, antihipertensiva, antiulcerosa, antioxidante, antidepressiva, anticonvulsivante, antiobesidade, antiarteriosclerose, antihipercolesterolemia, anticarcinogênica, citoprotetora, possui capacidade renal, cardio e neuroprotetora, além de atividade anti-Alzheimer por supressão da atividade de citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  em microglias e melhora da discinesia tardia (CAZAROLLI et al., 2008, CHUA, 2013; SALVAMANI et al., 2014; GANESHPURKAR et al, 2016; RASOULI et al., 2016).

Com atividade anti-inflamatória, a quercetina, foi o primeiro flavonoide identificado como inibidor da enzima Fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), enzima chave na síntese dos eicosanóides, além da inibição da atividade das enzimas ciclooxigenase, lipoxigenase e redutase aldose e redução na produção de óxido nítrico (NO). Inibe também a liberação de histamina dos mastócitos, regulam a secreção de IgG, IgM e IgA (Imunoglobulinas G, M e A), inibem a síntese de IL-2, IL- 1 $\beta$ , IL- 6, TNF- $\alpha$  (Fator de necrose tumoral), NF –  $\kappa$ B (fator nuclear kappa

B) e reduzem a expressão e produção de moléculas de adesão ICAM – 1 (moléculas de adesão intercelular-1), agindo sobre a expressão, síntese e atividade de citocinas e quimiocinas importantes na resposta inflamatória (CAZAROLLI et al., 2008; SALVAMANI et al., 2014, NA et al., 2016).

A rutina apresentou atividade anti-inflamatória em estudos, como uma possível inibidora seletiva de COX-2 (cicloxiogenase-2), bem como inibidora da produção de óxido nítrico e PGE<sub>2</sub> induzido por LPS *in vitro* em macrófagos peritoneais e *in vivo* após injeção de LPS em camundongos, além de apresentar redução na migração de neutrófilos por redução da expressão da quimiocina MIP-2 (proteína inflamatória de macrófago-2) via NF-κB em modelos de lesão pulmonar aguda induzida por LPS (CHUA, 2013; CHEN et al., 2014;).

Esse flavonoide também tem mostrado potencial antinociceptivo no modelo de placa quente, bem como em modelos de hiperpermeabilidade induzida por ácido acético, inibindo o aumento da permeabilidade vascular e reduzindo a migração leucocitária em modelos de migração leucocitária induzida por carboximetilcelulose (CMC) (CHUA, 2013).

A rutina demonstrou efeitos benéficos na artrite reumatoide e osteoartrite, em modelos de artrite induzida por colágeno em macrófagos da linhagem RAW 264.7 de ratos, com inibição da transcrição de genes de citocinas pró-inflamatórias como: TNF-α, IL- 1, IL- 8. Em modelos de inflamação induzida por adjuvante completo de Freund e carragenina, a rutina inibiu as fases aguda e crônica da inflamação artrítica, apresentando redução de edemas, nódulos e anquiloses na pata de ratos (GUARDIA et al., 2001; CHUA, 2013).

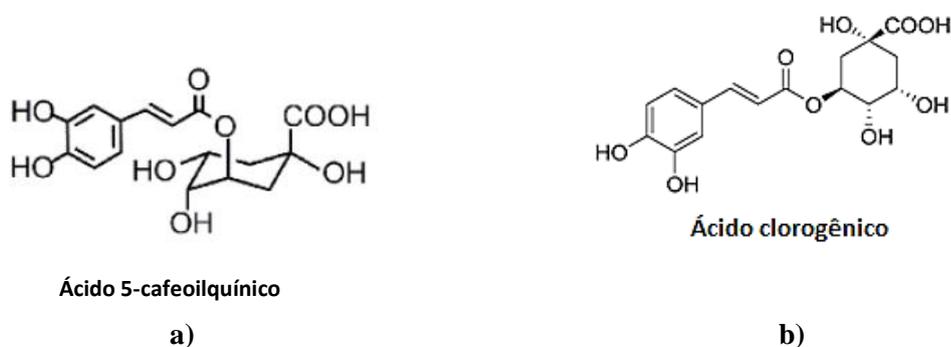
Em modelos de estresse oxidativo em condrócitos induzido por peróxido de hidrogênio, mostrou redução da expressão de citocinas como: TNF-α, IL-1β, MMP-2 e MMP-9 (metaloproteinasas de matriz 2 e 9), reduzindo o desgaste ósseo e cartilaginoso característicos dessas doenças. Na artrite séptica induzida por uma mistura de *Candida albicans* e adjuvante completo de Freund, mostrou potencial anti-artrítico com redução do edema da região plantar, redução da produção de NO e supressão da proliferação de células T (HAN, 2009; CHUA, 2013, NA et al., 2016).

Torres-Rêgo e colaboradores (2016), determinaram o isolamento de rutina e ácido clorogênico do extrato aquoso das frutas de mangabeira (*Hancornia speciosa*) em conjunto com Furtado e colaboradores (2016), que isolaram rutina e ácido clorogênico do extrato aquoso das folhas de salsa-brava (*Ipomoea asarifolia*), demonstrando seus potenciais anti-inflamatórios. Em modelos de edema de orelha induzido por xileno, de migração celular na peritonite induzida por carragenina e da bolha de ar induzida por zimosan combinados com a dosagem de citocinas

pró-inflamatórias, observou-se que a administração intravenosa ou intraperitoneal de diferentes doses de rutina (2,5 - 40 mg/kg) e ácido clorogênico (2 - 15mg/kg) isolados de *Hancornia speciosa* e *Ipomoea asarifolia*, promoveram redução da produção de citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-12, além de redução do número total de leucócitos na cavidade peritoneal e na bolha de ar, bem como redução do edema de orelha, mostrando assim potenciais anti-inflamatórios significativos.

### 2.2.2 Compostos Fenólicos e Ácido clorogênico

Os ácidos clorogênicos são compostos polifenólicos formados a partir da esterificação do ácido cinâmico com o ácido quínico (Figura 4b). Esses compostos foram primeiramente identificados em grãos de café verde, mas podem ser encontrados em bebidas preparadas a partir de ervas, em frutas (cítricas, maçãs, pêras e bagas) e em vegetais. Os ácidos clorogênicos mais conhecidos são os ácidos cafeoilquínico, dicafeoilquínico, feruloilquínico e p-cumaroilquínico, sendo o ácido 5-cafeoilquínico (Figura 4a), o mais abundante, fazendo parte de 76-84% do total dos ácidos clorogênicos (THOM, 2007; ZHAO et al., 2011; CRAIG et al., 2016; LIANG et al., 2016).



**Figura 4:** a) Estrutura molecular do Ácido 5-cafeoilquínico (LIANG et al., 2016), b) Ácido clorogênico identificado a partir do EFBV (LIMA et al., 2014).

Os ácidos clorogênicos são caracterizados por apresentar uma gama de atividades: antioxidante, antihipertensiva, antidiabética, antiobesidade, antibacteriana, anti-inflamatória, além de ações benéficas na Doença de Alzheimer, no cálculo biliar e na eclâmpsia (THOM, 2007; ZHAO et al., 2011; UPADHYAY et al., 2013; CRAIG et al., 2016; LIANG et al., 2016).

Todos os ácidos clorogênicos possuem atividade antioxidante potente, sendo o ácido 5-cafeoilquínico o mais estudado, protegem a planta da degeneração ambiental, modulam a

expressão de enzimas antioxidantes, doando átomos de hidrogênio e reduzindo metais e oxigênio, além de ações quelantes, inibindo assim, a formação de ROS e o estresse oxidativo por peróxido de hidrogênio em células humanas, além de atividade contra a oxidação do LDL, prevenindo doenças cardiovasculares e diabetes mellitus tipo 2 (UPADHYAY et al., 2013; CRAIG et al., 2016; LIANG et al., 2016).

Em diferentes modelos experimentais, a administração oral de ácido clorogênico extraído do café, mostrou efeitos anti-hipertensivos, cardioprotetores por supressão da expressão das P-selectinas nas plaquetas, através da inibição da atividade da COX-1 e COX-2 (cicloxigenases 1 e 2), além de reduzir o peso corporal e os níveis de glicose em animais obesos (THOM, 2007; UPADHYAY et al., 2013; ZHAO et al., 2011; CRAIG et al., 2016).

A capacidade anti-inflamatória dos ácidos clorogênicos também tem sido apresentada através de diversos modelos experimentais celulares, mostrando atividade contra secreção de IL-8, IL-6 em células extraídas de adenocarcinoma de colón humano (Caco-2) e estimuladas por um conjunto de mediadores inflamatórios (TNF- $\alpha$ , LPS, IL-1 e IFN) e peróxido de hidrogênio. Estudos também mostraram a redução da produção de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, NO, COX-2 e NF- $\kappa$ B em macrófagos da linhagem RAW 264.7 de murinos estimulados por LPS (UPADHYAY et al., 2013; LIANG et al., 2016).

Na indução de lesão hepática por CCl<sub>4</sub> em ratos, a administração oral de compostos fenólicos foi capaz de reduzir os níveis de TNF- $\alpha$ , NO e COX-2, reduzindo a inflamação e a fibrose do fígado por inibição da via inflamatória do NF- $\kappa$ B, além de favorecer a cicatrização hepática por ações sobre o estresse oxidativo (LIANG et al., 2016).

Estudos de Chauhan e colaboradores (2012), demonstraram o potencial antiartrítico através da administração por via oral de ácido clorogênico isolado da fração aquosa (40 mg/kg) de *Bidens pilosa*, utilizando modelos de indução da inflamação da articulação do joelho de ratos com LPS, produzindo supressão significativa da expressão de citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , além de redução de edema de pata e na contagem de células T.

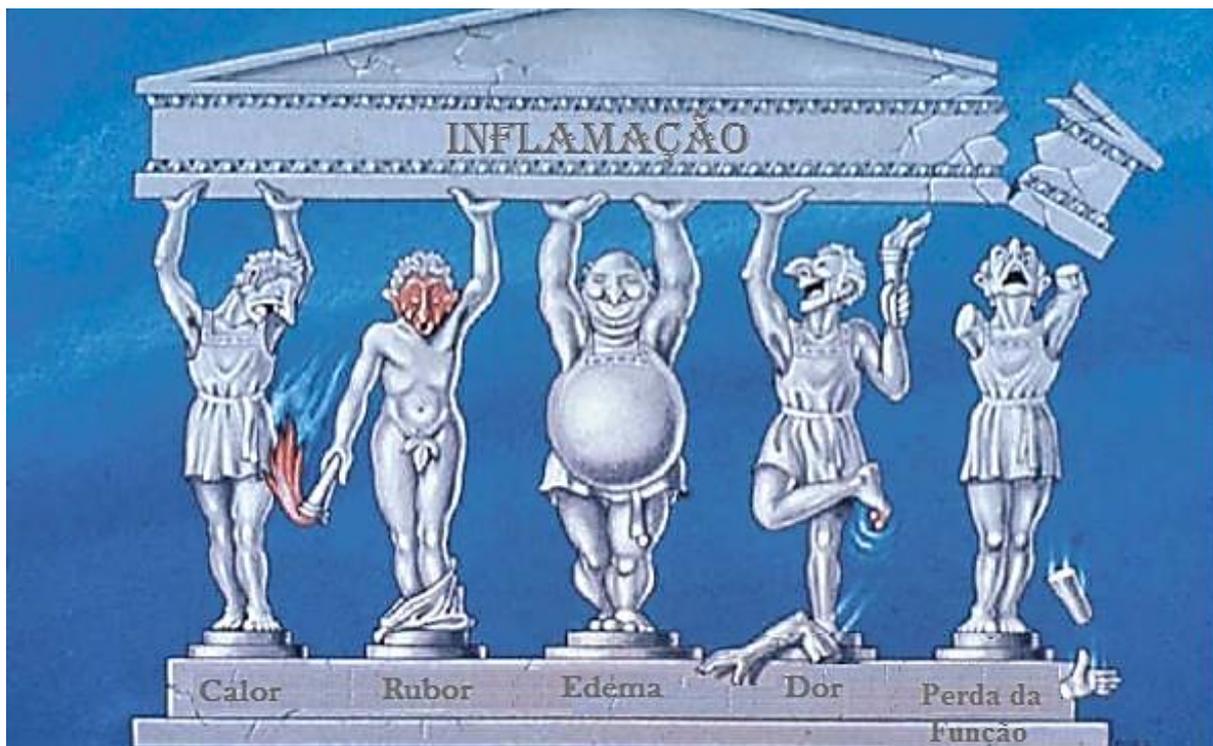
O tratamento de culturas de condrócitos de coelhos com ácido clorogênico mostrou resultados positivos na osteoartrite, reduzindo a expressão gênica e a produção de metaloproteinases, envolvidas na degradação da cartilagem. De forma semelhante, na avaliação morfológica e histológica de joelhos de coelhos com osteoartrite experimental induzida por transecção do ligamento cruzado anterior, a administração intra-articular de 0,3mL de ácido clorogênico (20 $\mu$ M) promoveu inibição da degradação da cartilagem e melhora do quadro artrítico (CHEN et al., 2011).

Modelos celulares que avaliaram o desenvolvimento da hiperplasia sinovial na artrite reumatoide, investigaram o potencial do ácido clorogênico em inibir a proliferação de uma linhagem de sinoviócitos semelhantes a fibroblastos (RSC-364) induzidas por IL-6, sendo possível observar que o tratamento desta linhagem celular com ácido clorogênico em diferentes doses (5 - 100  $\mu\text{mol/L}$ ), promoveu o bloqueio das respostas pró-inflamatórias via NF- $\kappa$ B através de sinalização mediada por IL-6, resultando em inibição da proliferação celular e apoptose, mostrando assim que o ácido clorogênico possui potencial anti-artrítico potente (LOU et al., 2016).

### **2.3 Bases da Inflamação**

A inflamação é considerada uma resposta protetora do organismo, representando uma defesa contra um estímulo nocivo, seja ele de origem mecânica, química ou térmica, de maneira a destruir, isolar ou neutralizar a fonte de inflamação, restabelecendo a homeostase dos tecidos com ações de resolução caracterizadas por reparo ou regeneração. Mas quando essa resposta não é regulada se tornando exacerbada, pode causar efeitos devastadores ao tecido exposto com evolução da inflamação aguda para crônica (HENSON, 2005; KUMAR et al., 2010; ASHLEY et al., 2012).

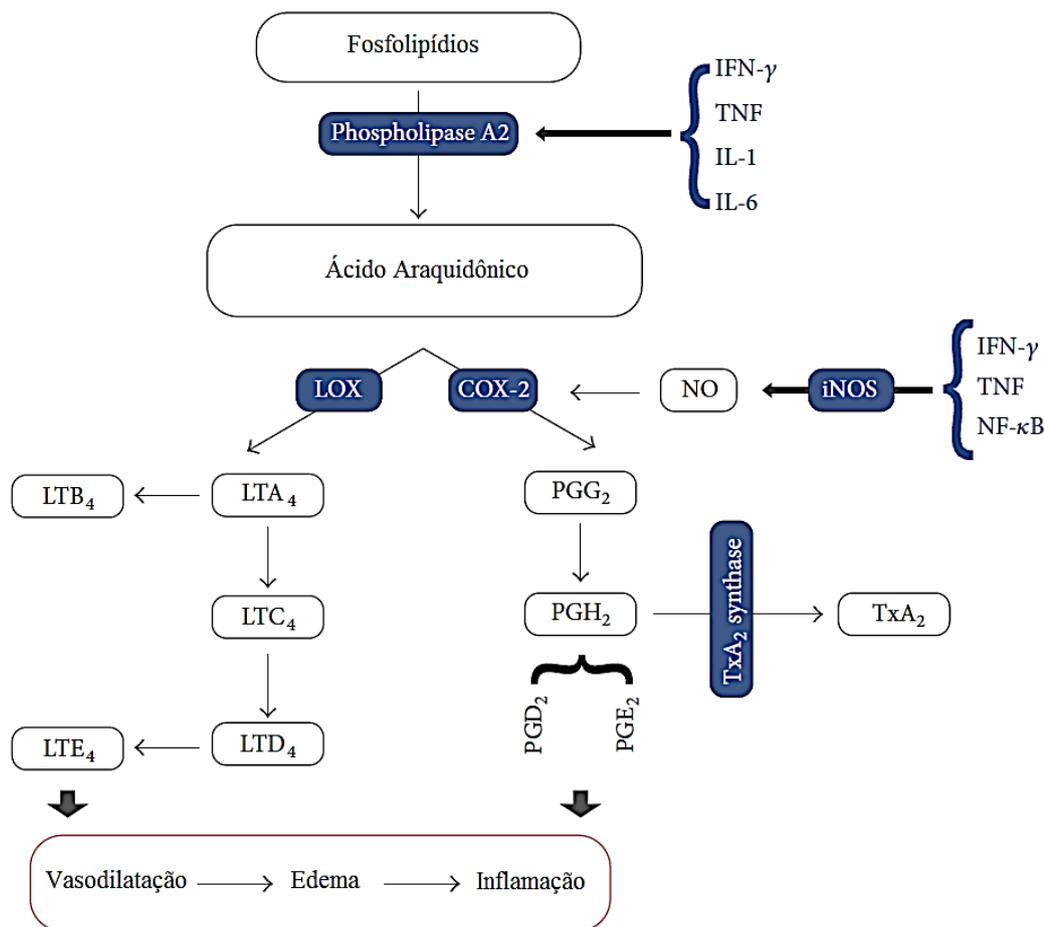
Seus sinais característicos vêm sendo descritos desde papiros egípcios de 3.000 a.C.. Celsius, no primeiro século d.C., apresentou os quatro sinais cardinais da inflamação, caracterizados por vermelhidão (rubor), edema (inchaço), calor (aumento da temperatura local) e dor (sensibilização periférica de nociceptores), e o quinto sinal cardinal caracterizado por perda da função (tumor) foi apresentado por Rudolf Virchow, no século XIX (Figura 5) (KUMAR et al., 2010).



**Figura 5:** Sinais cardinais da inflamação (Adaptado de LAWRENCE et al., 2002).

Os mecanismos de defesa do organismo contra um agente nocivo podem ocorrer pela imunidade inata e pela imunidade adaptativa. A inata é a primeira linha de defesa, auxiliando no reconhecimento do agente lesivo e na resposta da imunidade adaptativa. Sendo a imunidade inata um mecanismo inicial de resposta, esta promove uma cascata de eventos bioquímicos e celulares que se iniciam por meio do reconhecimento do agente nocivo pelas PAMPS (Padrões moleculares associados a patógenos) e pelas DAMPS (Padrões moleculares associados a danos), que sinalizam ao organismo possíveis prejuízos e/ou infecções causadas por danos, necrose ou agentes patogênicos, respectivamente (HAN et al., 2005; ASHLEY et al., 2012).

As PAMPS se ligam a receptores transmembranares específicos conhecidos como “toll-like” (TLR), que culminam na ativação de vias de sinalização, ativando o fator de transcrição NF- $\kappa$ B (fator nuclear kappa B), regulador de expressão gênica da resposta inflamatória, após liberação da proteína I $\kappa$ B (proteína inibidora do NF- $\kappa$ B) e translocação do fator até o núcleo celular, esse fator controla positivamente a expressão de genes responsáveis pela síntese de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IFN- $\gamma$ , em conjunto com quimiocinas, moléculas de adesão, eicosanóides, fatores de crescimento, metaloproteinasas, enzimas como ciclo-oxigenase 2 (COX-2) e óxido nítrico sintase induzível (iNOS) que sintetiza o óxido nítrico (NO) (Figura 6) (HAN et al., 2005; ASHLEY et al., 2012; HOLL et al., 2016).



**Figura 6:** Cascata do ácido araquidônico e outras vias que compõem a resposta inflamatória (Adaptado de GHASEMIAN et al., 2016).

Já as DAMPS, se ligam a receptores intracelulares de domínio de oligomerização de ligação de nucleotídeos conhecidos como “NOD-like” (NLR), capazes de identificar e agir contra patógenos bacterianos invasores intracelulares. Ativam a caspase-1 convertendo pró-citocinas inativas em citocinas ativas (IL-1 $\beta$ , IL-18), culminando em mecanismos de eliminação das células infectadas por vias de morte celular (HAN et al., 2005; ASHLEY et al., 2012).

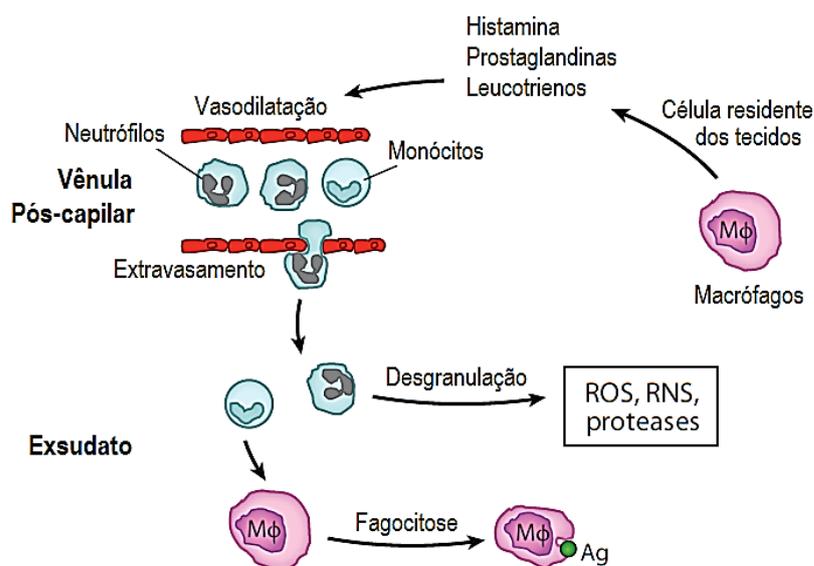
A ativação de células do tecido lesado em conjunto com a liberação de diversos mediadores solúveis como citocinas, quimiocinas, eicosanoides, aminas vasoativas (histamina e serotonina) e muitos outros, contribuem nas respostas vasculares agudas da inflamação, caracterizada por vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular com extravasamento de exsudato rico em proteínas e células, caracterizando os quatro sinais cardinais da inflamação (HENSON, 2005; ASHLEY et al., 2012).

A vasodilatação, o aumento da permeabilidade vascular e o extravasamento de fluidos que culminam nos sinais cardinais de rubor, calor e edema, ocorrem por ação de mediadores inflamatórios pré-formados como histamina, serotonina, substância P, dentre outros, seguido

da participação de bradicinina, prostaglandinas (PGE e PGI), óxido nítrico, fator ativador de plaquetas e leucotrienos C<sub>4</sub>, D<sub>4</sub> e E<sub>4</sub>, liberados sobre a musculatura lisa vascular no início da resposta inflamatória. A Prostaglandina E<sub>2</sub>, prostaciclina I<sub>2</sub>, a bradicinina e a substância P promovem sensibilização periférica dos nociceptores caracterizando o sinal cardinal de dor (Figura 5) (KUMAR et al., 2010; ASHLEY et al., 2012).

As respostas seguintes a essas ações são celulares, determinadas como subcrônica, com recrutamento de leucócitos (neutrófilos e macrófagos), reconhecimento e destruição do agente nocivo. A ação das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , induzem o aumento da expressão de moléculas de adesão de células endoteliais: VCAM-1 (molécula de adesão celular vascular 1) e ICAM-1 (molécula de adesão intercelular 1), promovem a síntese de outras citocinas, além de quimiocinas (IL-8), fatores de crescimento, eicosanoides e NO. O recrutamento é seguido de ações de adesão e rolamento dos leucócitos pelo endotélio, pela ação das L, P e E-selectinas em conjunto com as integrinas (LAWRENCE et al., 2002; HENSON, 2005; KUMAR et al., 2010).

Seguido ao rolamento, ocorre a diapedese, onde os leucócitos atravessam livremente os espaços interendoteliais junto ao exsudato, favorecidos pelas alterações vasculares da fase aguda, ocorrendo a quimiotaxia, com migração dos leucócitos em direção ao foco da inflamação, por ação de quimiocinas (IL-8), componentes da cascata do complemento (C5a) e leucotrienos (B<sub>4</sub>), reconhecendo e se ligando ao agente agressor (Figura 7) (KUMAR et al., 2010; ASHLEY et al., 2012).



**Figura 7:** Etapas da migração leucocitária, quimiotaxia e fagocitose. Legenda: Antígeno (Ag), Espécies reativas de oxigênio (ROS), Espécies reativas de nitrogênio (RNS) (Adaptado de ASHLEY et al., 2012).

Por conseguinte, os neutrófilos sofrem desgranulação, liberando substâncias citotóxicas como espécies reativas de oxigênio (ROS) e nitrogênio (RNS), além de enzimas proteolíticas, promovendo a neutralização do agente, seguida da substituição pelos macrófagos e ações de fagocitose, ingerindo e eliminando o agente causador da injúria, restaurando a homeostase do tecido e promovendo a resolução do quadro infeccioso por renovação e regeneração das células lesadas ou por reparo com formação de cicatriz, pela ação de fibroblastos e fatores de crescimento (Figura 7) (KUMAR et al., 2010; ASHLEY et al., 2012).

A fase crônica ou de prolongamento da inflamação, característicos de doenças como artrite reumatoide, asma, glomerulonefrite, dentre outras, podem ocorrer por problemas na resolução da inflamação, por persistência do agente nocivo ou por alterações em etapas do processo cura, como por exemplo, no momento da quimiotaxia e fagocitose, a ativação exacerbada dos leucócitos, pode promover destruição do tecido sadio pelas substâncias citotóxicas liberadas, gerando danos teciduais, cronicidade da inflamação e ações de resolução da inflamação com formação de fibrose (HENSON, 2005; KUMAR et al., 2010; ASHLEY et al., 2012).

### **2.3.1 Ácido araquidônico e as prostaglandinas**

O ácido araquidônico é um ácido graxo poli-insaturado essencial, que normalmente se apresenta esterificado na bicamada fosfolipídica da membrana das células. No momento do estímulo nocivo, seja ele químico, físico ou mecânico, a enzima fosfolipase A<sub>2</sub> hidrolisa os ácidos graxos dos fosfolipídios de membrana e libera o ácido araquidônico, tornando-os livres para sofrer a ação das enzimas Cicloxigenase 1 e 2 (COX-1 e COX-2) desencadeando a síntese dos prostanoides e também sofre ação da enzima 5-Lipoxigenase (5-LOX), produzindo os leucotrienos (Figura 6) (KUMAR et al., 2010; CORNEJO-GARCÍA et al., 2016).

Os produtos da ação da COX-1, COX-2 e 5-LOX sintetizados a partir dos macrófagos, neutrófilos, células dendríticas, plaquetas e outras células, formam o grupo dos eicosanoides, com ações na imunidade, através da regulação da produção de citocinas, na formação de anticorpos, na proliferação celular, na migração e na apresentação de antígenos (HARIZI et al., 2008; KUMAR et al., 2010; CORNEJO-GARCÍA et al., 2016).

Os produtos finais da ação das cicloxigenases são a síntese das prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos, que agem promovendo efeitos considerados como pró-inflamatórios (Figura 6). Podem ser produzidos por duas isoformas de cicloxigenase, a isoforma

COX-1, considerada constitutiva, por agir na homeostase de órgãos e tecidos (proteção e motilidade gástrica, na contração uterina, na atividade plaquetária e em muitas outras ações), além de estar envolvida na inflamação e a isoforma COX-2, considerada induzida, agindo intimamente na reação inflamatória. Mas diversos estudos têm relatado as ações da COX-2 no mecanismo compensatório da hemodinâmica renal, por ser encontrada na mácula densa, glomérulos, arteríolas aferentes e eferentes, regulando a síntese de prostaglandina renal (HARIZI et al., 2008; KUMAR et al., 2010; CORNEJO-GARCÍA et al., 2016; KAEWPUT et al. 2016).

As prostaglandinas com ações na inflamação são as prostaglandinas PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, responsáveis pelas ações de vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular, dor, febre, quimioatração, além de ações sobre o útero e broncodilatação. As prostaciclina (PGI<sub>2</sub>) presentes no endotélio vascular, agem na vasodilatação e na inibição da agregação plaquetária e os tromboxanos (TXA<sub>2</sub>), presentes nas plaquetas, responsáveis pelas ações de vasoconstrição e ativação da agregação plaquetária (Figura 6) (KUMAR et al., 2010; CORNEJO-GARCÍA et al., 2016).

O produto final da ação da 5-LOX, é a síntese dos leucotrienos B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>), responsáveis pelas ações de quimiotaxia e os leucotrienos LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> e LTE<sub>4</sub>, responsáveis pelo aumento da permeabilidade vascular e ações de broncoconstrição (Figura 6) (KUMAR et al., 2010; CORNEJO-GARCÍA et al., 2016).

### **2.3.2 Citocinas e quimiocinas**

As citocinas são biomoléculas sintetizadas por linfócitos, macrófagos, células endoteliais e epiteliais além de tecido conjuntivo, agindo sobre um receptor na célula-alvo no momento de uma resposta a um estímulo nocivo, seja ela uma resposta inflamatória aguda ou crônica, sendo considerados os principais moduladores da inflamação. Podem ser do tipo monocinas, linfocinas, interleucinas, interferons, fatores estimuladores de colônias e quimiocinas (KUMAR et al., 2010; TURNER et al., 2014).

O TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral alfa) é uma citocina pró-inflamatória, sendo inicialmente identificada como um fator sérico com atividade citolítica e citostática contra células tumorais, mas se revelou um importante mediador inflamatório, agindo na orquestração da resposta inflamatória aguda. É sintetizada por células do sistema imunológico (macrófagos, mastócitos, monócitos, linfócitos T), além de fibroblastos, queratinócitos e neurônios e

secretada após um estímulo nocivo, ativando o fator NF- $\kappa$ B, que induz a expressão de citocinas como IL-1 $\beta$ , IL-6 e a síntese de quimiocinas (IL-8), eicosanoides e NO. Ativa moléculas de adesão endotelial e auxilia no remodelamento da matriz, além de funções adicionais no metabolismo lipídico, resistência insulínica e muitos outros (KUMAR et al., 2010; LAVETI et al., 2013; TURNER et al., 2014).

A IL-1 $\beta$  (Interleucina-1 $\beta$ ) é uma citocina pró-inflamatória essencial a resposta imune inata. Sintetizada por macrófagos e monócitos, células endoteliais e algumas epiteliais, é secretada no momento da estimulação dos receptores Toll-like e NOD-like, sendo identificada como um pirogênio endógeno, agindo assim na febre. Age de forma sinérgica com o TNF- $\alpha$ , favorecendo as respostas de fase aguda da inflamação, promovendo a quimiotaxia e a produção de mais citocinas pela ativação do fator NF- $\kappa$ B. A Interleucina-6 é expressa em fagócitos, células T e B, fibroblastos, células endoteliais, além de outras, agindo na maturação de células B, bem como na ativação e diferenciação de células T (KUMAR et al., 2010; LAVETI et al., 2013; TURNER et al., 2014).

O IFN- $\gamma$  (Interferon gama) é uma citocina secretadas de células T, responsável pelo aumento da permeabilidade vascular, ativação de macrófagos, além do aumento da expressão de moléculas de adesão (KUMAR et al., 2010; TURNER et al., 2014).

As quimiocinas são glicoproteínas de baixo peso molecular sintetizadas no momento de sua ação e/ou constitutivamente em tecidos, sendo secretadas por macrófagos e monócitos, células endoteliais e linfócitos T, agindo no recrutamento de leucócitos na inflamação, controlando o rolamento e a migração dessas células através dos tecidos, a diapedese e a quimiotaxia (KUMAR et al., 2010; TURNER et al., 2014).

Existem aproximadamente 44 tipos de quimiocinas diferentes, separadas em grupos conforme arranjo dos resíduos de cisteína em sua estrutura. As primeiras a agirem sobre os neutrófilos são as quimiocinas alfa, como a IL-8, induzidas pelo TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , atuando na ativação e quimiotaxia de neutrófilos. As quimiocinas  $\beta$  são quimioatratantes de outras células como monócitos, eosinófilos, basófilos e linfócitos, como a MCP-1 (proteína quimioatrente de monócito), MIP-1 $\alpha$  (proteína inflamatória de macrófagos 1 $\alpha$ ) e muitas outras. As quimiocinas  $\gamma$  são específicas de linfócitos, como a linfotactina e pôr fim a quimiocina fractalquina, do grupo de quimiocinas CX3C, responsável pela forte adesão e quimiotaxia de monócitos e células T (KUMAR et al., 2010; TURNER et al., 2014).

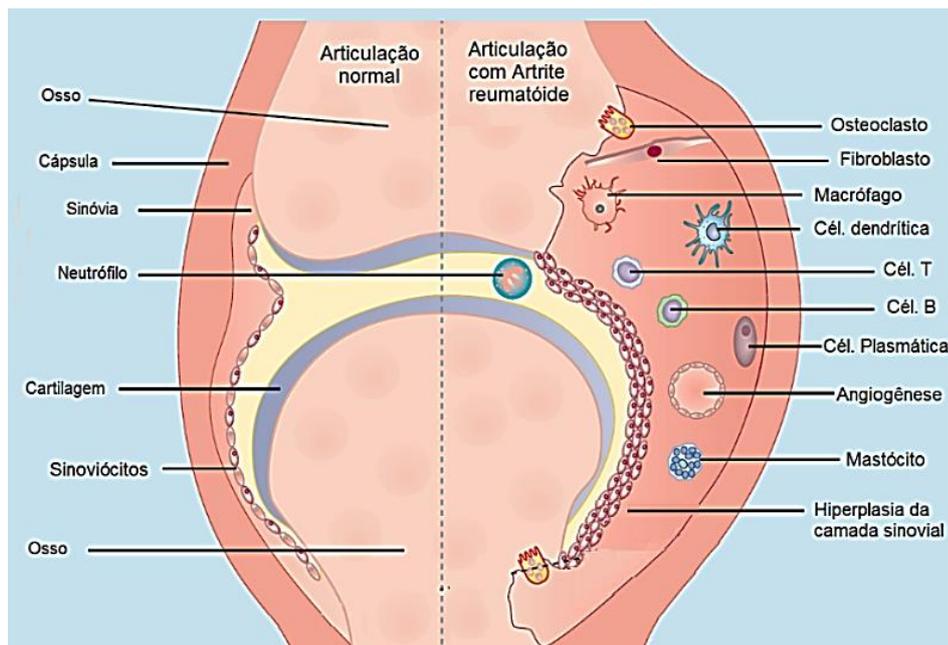
A Interleucina-8 (IL-8/CXCL8 ou KC/CXCL1 (identificada em camundongos)) é uma quimiocina mediadora de respostas inflamatórias, identificada como ativadora e quimioatrativa

de neutrófilos, além da capacidade de recrutamento, adesão e migração de neutrófilos e ativação de monócitos, linfócitos, basófilos e eosinófilos para os locais da inflamação. A quimiocina CXCL2 (ou MIP-2 (identificada em camundongos)) possui a mesma função da IL-8, sendo um potente quimioatraente de neutrófilos, promovendo recrutamento e migração maciça de neutrófilos, além de ações na produção de espécies reativas de oxigênio e na fagocitose (TURNER et al., 2014, INOUE et al., 2016, LI et al., 2016).

## **2.4 Artrite reumatoide**

A artrite reumatoide é uma doença inflamatória crônica auto-imune ainda de origem desconhecida, pressupondo-se que esteja relacionada a uma suscetibilidade genética somada a fatores ambientais e autoimunidade, que promove dor, inchaço e rigidez das articulações, podendo levar a destruição progressiva, ao déficit do músculo-esquelético e a incapacidade física com redução da qualidade de vida caso não suprimida. Afeta inicialmente as pequenas articulações das mãos e dos pés e também podem envolver manifestações extra-articulares como na pele, vasos, coração, pulmões e músculos, causando fibrose pulmonar, amiloidose, doenças cardiovasculares e outras comorbidades (KUMAR et al., 2010; BRZUSTEWICZ et al, 2015; SMOLEN et al., 2016, THOMPSON et al., 2016).

É caracterizada por diversas alterações fisiológicas que se inicia com a ativação de linfócitos TCD4+, infiltração de células imunes (neutrófilos, macrófagos, células dendríticas e linfócitos), liberação exacerbada de citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6, produção de quimiocinas (IL-8 e MIP-2) e prostanoídes. Ocorre hiperplasia dos sinoviócitos caracterizada por pannus, seguido de angiogênese, destruição de cartilagem e erosão óssea. As células que infiltram a camada sinovial são células da imunidade inata e células da imunidade adaptativa (células T e B), além de plasmócitos e células plasmáticas (Figura 8). Essas células ativam fibroblastos e condrócitos, que promovem a síntese de osteoclastos promovendo a destruição articular e óssea, o agravamento do processo inflamatório e a produção de auto-anticorpos (KUMAR et al., 2010; BRZUSTEWICZ et al, 2015; INOUE et al., 2016; LI et al., 2016; SMOLEN et al., 2016).



**Figura 8:** Diferenças celulares da articulação normal *versus* articulação com artrite reumatoide (adaptado de SMOLEN et al., 2016).

As principais citocinas envolvidas na resposta inflamatória sinovial são o TNF- $\alpha$ , a IL-1, a IL-6 e o GM-CSF (fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos). O TNF- $\alpha$  é a primeira citocina a ser ativada promovendo a síntese das outras citocinas: IL-1, IL-6 e GM-CSF, resultando em ativação de fibroblastos e fator de crescimento do tecido conjuntivo (CTGF) na sinóvia, com indução de metaloproteinases, ativação de osteoclastos e condrócitos promovendo a destruição óssea, a formação de pannus por ativação de células endoteliais e quimiotaxia, além de produzir dor (nocicepção) e febre por síntese de PGE<sub>2</sub>. A IL-1 atua em conjunto com o TNF- $\alpha$ , promovendo a síntese de outras citocinas, recrutando leucócitos e ativando linfócitos T, enquanto a IL-6 ativa quimiocinas e moléculas de adesão, ativa linfócitos T e B e matura osteoclastos, favorecendo todas em conjunto, a destruição da cartilagem e a erosão óssea (BRZUSTEWICZ et al, 2015; SMOLEN et al., 2016, THOMPSON et al., 2016).

Os sintomas da artrite reumatoide podem ser melhorados com algumas classes de fármacos como os AINES, os AIES e DMARDs (anti-reumáticos modificadores da doença), reduzindo a dor, a inflamação e os danos as articulações e ossos, quando usados no início da doença, pois não são capazes de reverter os danos já ocorridos, tornando sua eficácia limitada, necessitando assim de maiores estudos sobre terapias que possam inibir os danos articulares da artrite reumatoide, assim como a inflamação e a dor crônica (THOMPSON et al., 2016).

Atualmente as citocinas pró-inflamatórias limitantes desta doença tem sido alvo da indústria farmacêutica, que tem trabalhado de forma a encontrar possíveis tratamentos com

inibidores dos receptores de citocinas, através de anticorpos monoclonais, interrompendo suas ações inflamatórias, reduzindo assim a gravidade da doença e a destruição dos tecidos circundantes (BRZUSTEWICZ et al, 2015; SMOLEN et al., 2016, THOMPSON et al., 2016).

## 2.5 Dor

A dor e sua origem tem sido estudado desde tempos muito antigos, tendo Charles Darwin em 1872, descrito como uma emoção importante para a sobrevivência da espécie. Desde 1986, a dor é definida pela Associação Internacional para Estudo da Dor (IASP- *International Association for the Study of Pain*) como uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a danos real ou potencial dos tecidos (D'MELLO et al., 2008; KLAUMANN et al., 2008; KUNER, 2010, MITSU et al, 2016).

Classificada como um dos cinco sinais cardinais da inflamação, a dor tem função protetora, sinalizando ao organismo a presença de uma lesão ou dano que necessite de tratamento ou fuga, mas no momento de uma inflamação, ela perde o caráter protetor se tornando uma doença. A dor é um problema que afeta a sociedade e a todos em um determinado momento da vida, podendo comprometer de forma permanente um indivíduo (D'MELLO et al., 2008; KLAUMANN et al., 2008, KANDEL et al., 2014, DINAKAR et al. 2016).

A palavra Dor é mais corretamente usada para seres humanos, pois envolve mais do que a transmissão de impulsos elétricos nociceptivos, mas também a percepção da dor, que envolve componentes emocionais, afetivos, além de condições psicológicas do indivíduo no momento em que ela acontece. Já nos animais, o termo que mais se aplica seria Nocicepção, onde só se caracteriza a transmissão e a condução do sinal nociceptivo, sem o envolvimento emocional, pois os animais não são capazes de responder ou avaliar a intensidade da dor na qual estão sentindo (VERRI et al., 2006; KLAUMANN et al., 2008, JOHNSON, 2016).

Pode ser caracterizada como dor aguda aquela de ocorrência recente e rápida, causada por um trauma, lesão ou inflamação, devendo ser eliminada no momento da cura, pois sua função é facilitar o processo de cicatrização. Já a dor crônica é caracterizada como persistente, que perdura por um longo tempo (acima de 6 meses) mesmo depois da cura, podendo surgir até mesmo na ausência de uma patologia, debilitando o indivíduo e reduzindo sua qualidade de vida, pois não respondem aos tratamentos analgésicos convencionais. A dor pode ser de alguns tipos: como dor nociceptiva quando ocorre ativação direta de nociceptores em resposta a uma lesão ou inflamação e a dor neuropática quando ocorre lesão dos nervos periféricos ou disfunção no sistema nervoso central, podendo ser acompanhada de sensação de queimação e choque

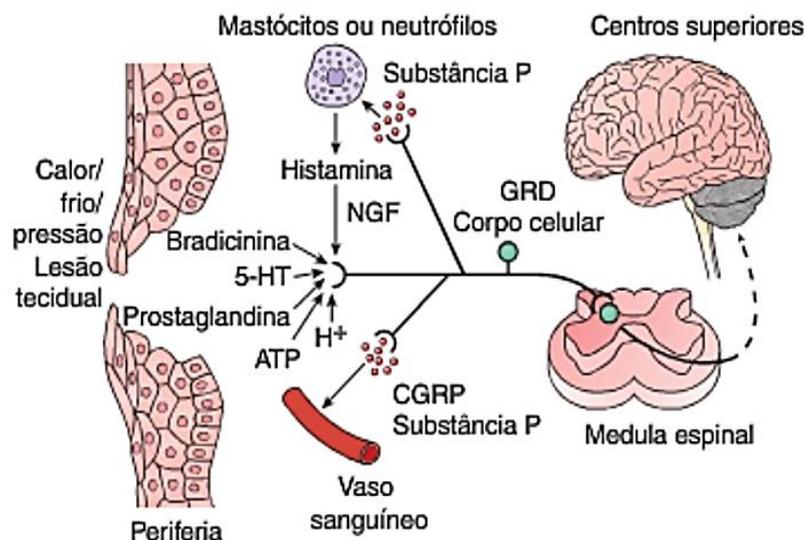
(KUNER, 2010; KLAUMANN et al., 2008, KANDEL et al., 2014, PETERSON et al. 2016, MITSI et al., 2016).

### **2.5.1 Fisiopatologia da Dor**

A sensação ou percepção de dor inicia-se na periferia, através dos nociceptores, terminações nervosas livres compostas de fibras aferentes primárias presentes na pele, tecido subcutâneo, articulações e músculos, responsáveis por responder a uma série de estímulos (térmico, mecânico ou químico), transformando-os em impulsos elétricos e transmitindo esses impulsos ao gânglio da raiz dorsal da medula espinal (KLAUMANN et al., 2008, KANDEL et al., 2014, JOHNSON, 2016, FRIAS et al., 2016).

As fibras responsáveis por essa condução são de três tipos e transmitem diferentes tipos de informações: as fibras A $\beta$  (A beta), de grande diâmetro e mielinização, promove condução rápida, sendo responsáveis por sensações inócuas táteis como o toque e a pressão, as fibras A $\delta$  (A delta), de médio diâmetro e mielinização, promove condução intermediária e são responsáveis pelo primeiro estágio da dor, aquele de caráter forte, rápido e localizado, oriundas de sensações nocivas térmicas (mudanças de temperatura bruscas) e mecânicas (pressão intensa) e as fibras C, de pequeno diâmetro, amielinizadas e condução lenta, são responsáveis pelo segundo estágio da dor, aquele de caráter prolongado, sensação penetrante e difuso, sendo consideradas nociceptores polimodais, pois são ativadas por estímulos nocivos mecânicos, térmicos ou químicos, necessitando de um limiar de excitabilidade mais alto. Além destes, existem os nociceptores silenciosos, expresso nas vísceras, ativados em momentos de estimulação intensa, acredita-se que eles contribuam para as ações de hiperalgesia na inflamação (D'MELLO et al., 2008; KLAUMANN et al., 2008, MARCHAND, 2008; KUNER, 2010; KANDEL et al., 2014, FRIAS et al., 2016, DINAKAR et al. 2016).

No momento de uma lesão ou inflamação, os nociceptores são ativados por uma série de mediadores locais como bradicinina, histamina, serotonina (5-HT), íons hidrogênio (H<sup>+</sup>) e potássio (K<sup>+</sup>), fator de crescimento neural (NGF), NO, adenosina trifosfato (ATP), citocinas e prostaglandinas liberados de macrófagos, leucócitos, mastócitos, linfócitos, plaquetas, além de mediadores liberados dos próprios nociceptores como o glutamato, o peptídeo relacionado ao gene de calcitonina (CGRP) e a substância P (SP), que vão promover uma sensibilização periférica local por modificação do limiar de disparo ou ativação dos nociceptores (Figura 9) (D'MELLO et al., 2008; KLAUMANN et al., 2008, RANG et al., 2012, DINAKAR et al. 2016).



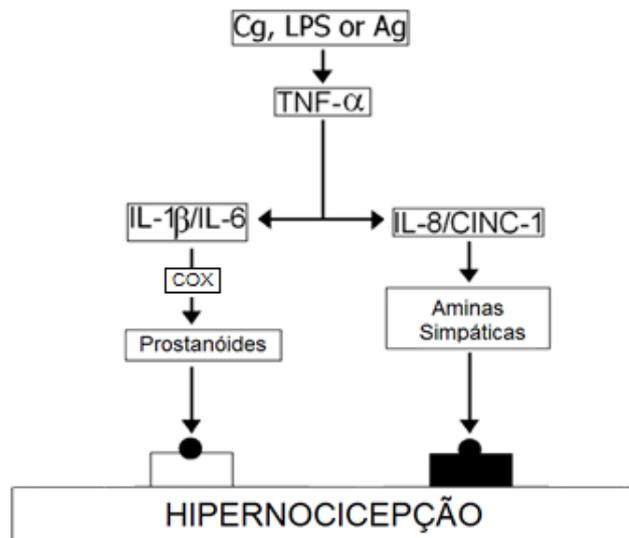
**Figura 9:** Ativação dos neurônios nociceptivos. Legenda: Gânglio da raiz dorsal (GRD), Fator de crescimento neural (NGF), Adenosina trifosfato (ATP), Peptídeo relacionado ao gene de calcitonina (CGRP), Serotonina (5-HT), Íons hidrogênio ( $H^+$ ) (RANG et al., 2012).

A histamina e a serotonina promovem aumento da permeabilidade vascular dos vasos da área lesada, a bradicinina ativa diretamente as fibras A $\delta$  e C, assim como as células lesadas promovem aumento da expressão de COX-2, culminando em aumento da síntese e liberação de prostaglandinas, como a prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) que em conjunto com as monoaminas (histamina e serotonina), atuam em receptores metabotrópicos das fibras C, ativando segundos mensageiros como adenosina monofosfato cíclico (AMP cíclico), proteína quinase A (PKA) e proteína quinase C (PKC). Em seres humanos, esse aumento de sensibilidade é definido como hiperalgesia, uma resposta exacerbada frente a um estímulo doloroso e como alodinia, dor frente a um estímulo que antes era inócua, envolvendo a reorganização do processamento central das fibras A $\beta$  de limiar baixo no corno dorsal da medula (VERRI et al., 2006; KLAUMANN et al., 2008; KUNER, 2010, DINAKAR et al. 2016).

Também sabemos que as citocinas e as quimiocinas pró-inflamatórias, liberadas de células locais ou que migram até a área afetada, são precursoras da liberação desses mediadores hiperalgésicos e até mesmo, as próprias citocinas podem sensibilizar diretamente os nociceptores. As citocinas e quimiocinas IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e quimiocinas como IL-8/CINC-1 (CINC-1: IL-8 experimental em ratos) apresentaram efeitos nas ações de hipernocicepção através de modelos animais com carragenina, LPS e antígenos (Figura 10) (VERRI et al., 2006, GUERRERO et al., 2012, JOHNSON, 2016).

O TNF-  $\alpha$  é uma citocina pró-inflamatória responsável por ativar a IL-6, IL-1 $\beta$  e a IL-8, a IL-1 $\beta$  aumenta a expressão de COX-2 e conseqüentemente a síntese de prostaglandinas, além de NGF, que aumenta a expressão de SP, glutamato, NO e CGRP, a IL-6 também aumenta

a síntese de prostanóides e a IL-8/CINC-1 induz a liberação de aminas simpáticas, promovendo assim todos em conjunto, as ações de hipernocicepção (Figura 9) (VERRI et al., 2006; KLAUMANN et al., 2008, GUERRERO et al., 2012, BRZUSTEWICZ et al., 2015).

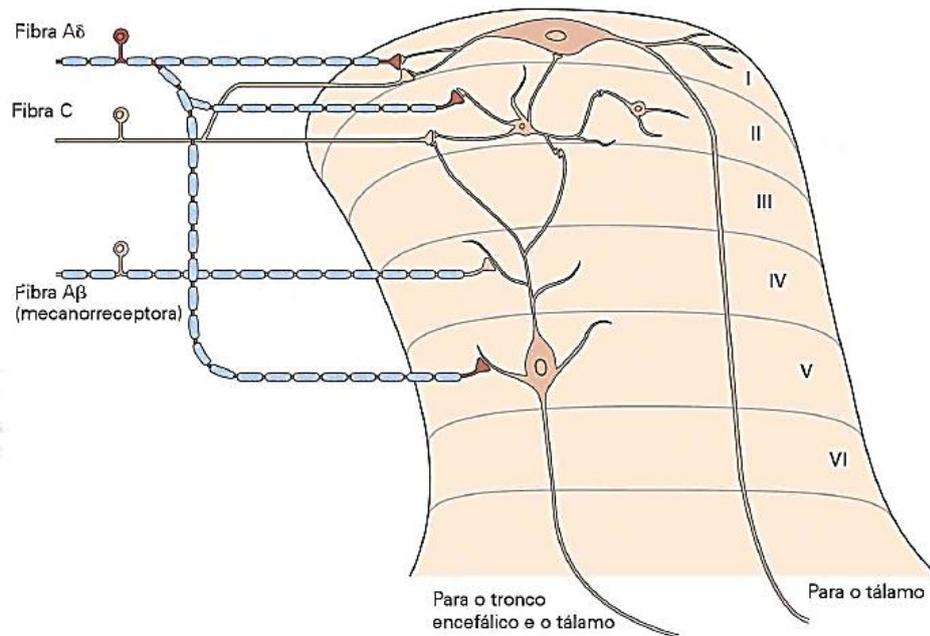


**Figura 10:** Cascata de citocinas e quimiocinas induzidas por estímulos inflamatórios. Legenda: Carragenina (Cg), Lipopolissacarídeo (LPS), Antígeno (Ag) (adaptado de VERRI et al., 2006).

Estudos também mostraram que neurônios expressam receptores de TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , podendo diretamente sensibilizar nociceptores. O TNF- $\alpha$  promoveu a formação de potenciais de ação em neurônios nociceptivos quando aplicado topicamente em axônios periféricos, além de aumentar a sensibilidade a estímulos mecânicos e químicos, já a IL-1 $\beta$  agiu sobre neurônios sensoriais aumentando a sua sensibilidade a estímulos térmicos nocivos. Diante das evidências sobre o efeito direto das citocinas e quimiocinas na hipernocicepção, seus principais efeitos ainda são os indiretos, através da síntese de outras citocinas e mediadores inflamatórios que sensibilizam os nociceptores (VERRI et al., 2006; KLAUMANN et al., 2008, GUERRERO et al., 2012).

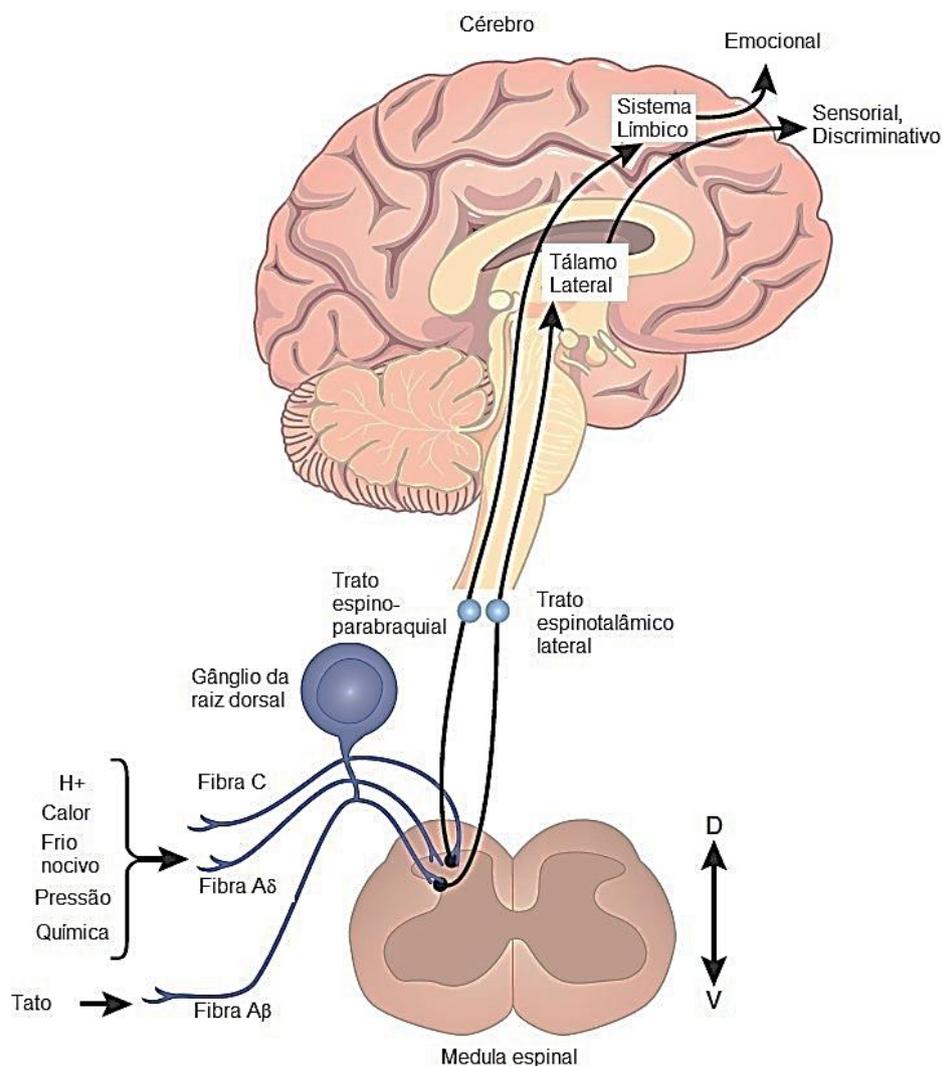
Após a liberação dos mediadores, ativação e sensibilização dos nociceptores periféricos, esses sinais são codificados em impulsos elétricos e conduzidos a medula espinal. Os axônios das fibras aferentes primárias são despolarizados, conduzindo as informações através de potenciais de ação para os neurônios de segunda ordem no corno dorsal da medula espinal, mais especificamente nos corpos celulares dos gânglios da raiz dorsal, área disposta em lâminas e ali nas fibras aferentes primárias se encerram. As fibras A $\delta$  e C transmitem estímulos nociceptivos as lâminas I (lâmina marginal) e II (substância gelatinosa), mas a lâmina II também possui interneurônios que respondem a estímulos inócuos provenientes das fibras A $\beta$ , que também

transmite estímulos inócuos táteis aos interneurônios das lâminas III e IV. A lâmina V recebe informações de nociceptores viscerais provenientes de fibras A $\delta$ , no qual desenvolve uma sensação de dor proveniente de uma lesão visceral espelhada sobre uma região da superfície do corpo (Figura 11) (KUNER, 2010; KANDEL et al., 2014, DINAKAR et al. 2016).



**Figura 11:** Sinais de entrada na medula espinal (adaptado de KANDEL et al., 2014).

Para que as informações cheguem até níveis talamocorticais, após chegarem a medula espinal, os impulsos precisam atravessar os tratos ascendentes, os impulsos provenientes das fibras A $\delta$  e C chegarão até o córtex somatossensorial, mas ocorrerá em espaços de tempo diferentes. O trato espinotalâmico tem papel crucial na transmissão da informação nociceptiva, sendo composto de axônios das lâminas I, V, VI e VII, que cruzam a medula espinal, ascendendo em direção ao tálamo e depois ao córtex somatossensorial, enviando impulsos nociceptivos de caráter discriminativo da dor. O trato espinoparabraquial tem seus axônios nas lâminas I e V, transmitindo informações sobre os componentes emocionais da dor, indo da medula até a substância cinzenta periaquedutal e córtex cingulado anterior que faz parte do sistema límbico (Figura 12) (D'MELLO et al., 2008; KLAUMANN et al., 2008, KUNER, 2010; KANDEL et al., 2014, FRIAS et al., 2016, DINAKAR et al., 2016).



**Figura 12:** Condução dos impulsos nociceptivos (adaptado de KUNER, 2010). Legenda: Dorsal (D), Ventral (V).

## 2.6. Tratamento da dor

O tratamento da dor pode ser realizado por algumas classes de fármacos, esses fármacos podem ser administrados profilaticamente antes da injúria acontecer, no caso, administrados antes de uma cirurgia invasiva como por exemplo, uma extração de dente, de forma a diminuir o tempo de recuperação desse paciente, ou podem ser administrados no momento da dor por um trauma, lesão ou inflamação, depois de desenvolvida a hiperalgesia e alodinia (KLAUMANN et al., 2008).

Os mais usados para o controle da dor são os fármacos opióides, mas o controle da dor pode depender de outras classes como AINES (quando a dor for de origem inflamatória), além de anticonvulsivantes e antidepressivos. Os opióides (morfina, metadona, codeína e outros)

atuam em receptores do tipo  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\kappa$ , impedindo a condução do impulso nociceptivo a nível espinal e supra-espinal, agindo na dor aguda e crônica, mas esses fármacos são conhecidos por promover efeitos adversos, destacando a morfina que pode desenvolver depressão respiratória, tolerância e dependência em seus usuários. Os AINES também são usados com frequência, pois inibem a atividade das enzimas Cicloxigenase 1 e 2, impedindo a síntese de mediadores que promovem a sensibilização dos nociceptores a nível periférico e espinal, mas seu uso está sempre relacionado ao desenvolvimento de efeitos adversos, como o ácido acetilsalicílico e o ibuprofeno, responsáveis pelo desenvolvimento de ulcerações gástricas, distúrbios da coagulação como hemorragias e muitos outros. Os anticonvulsivantes como o topiramato e a gabapentina podem agir na dor por bloqueio do canal de  $\text{Na}^+$  e  $\text{Ca}^{2+}$ , respectivamente, reduzindo a condução do impulso nociceptivo a nível espinal e supra-espinal, mas podem desenvolver alterações cognitivas como sonolência e tonturas e os antidepressivos da classe dos tricíclicos (amitriptilina) e os antidepressivos inibidores da receptação de serotonina-norepinefrina (venlafaxina e duloxetina) que agem inibindo a receptação de serotonina e noradrenalina, através do bloqueio de seus transportadores (SERT e NET), impedindo suas ações nociceptivas também a nível espinal e supra-espinal, mas estes podem desencadear sedação e hipertensão diastólica, respectivamente. Por estes fármacos apresentarem uma gama de efeitos adversos, como por exemplo a constipação intestinal e a tolerância produzida pelo opióide morfina ou os distúrbios da coagulação e as úlceras gástricas pelo anti-inflamatório ácido acetilsalicílico, se faz necessário novas abordagens farmacológicas, buscando diferentes mecanismos de ação, de forma a minimizar ou inibir estes efeitos adversos, de forma a melhorar a qualidade de vida dos pacientes com dor (KLAUMANN et al., 2008; BRUNTON et al., 2012, PETERSON et al., 2016, DINAKAR et al., 2016).

## 2 OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo é avaliar o potencial antinociceptivo e anti-inflamatório do extrato aquoso das folhas de *Borreria verticillata* (L.) G. Mey (EFBV), das frações flavonoídica (Flav), butanólica (BuOH) e acetato de etila (AcOEt) e de compostos identificados: a Rutina (Ru) e o Ácido clorogênico (AC), utilizando métodos farmacológicos *in vivo* e *in vitro*.

Este estudo se justifica ao se fundamentar nos usos empíricos da espécie e no biomonitoramento fitoquímico, identificando substâncias farmacologicamente ativas, bem como mecanismos de ação envolvidos, podendo explicar alguns dos usos populares da *Borreria verticillata* (L.) G. Mey; criando perspectivas para o desenvolvimento de novos fitofármacos eficazes e inovadores, que apresentem efeitos colaterais mínimos no tratamento da dor e de doenças inflamatórias.

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 4.1 Animais

Para a realização dos experimentos foram utilizados camundongos machos e adultos (*Mus musculus*) da linhagem Swiss, pesando entre 25 e 35 g e fornecidos pelo Biotério de Criação de Roedores do Departamento de Ciências Fisiológicas da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro (UFRRJ).

Os animais foram mantidos sob iluminação controlada em um ciclo claro/escuro (12/12h) e com regime de água e ração *ad libitum*. Todos os experimentos foram realizados seguindo normas que envolvem cuidados com animais de laboratório e normas éticas para seu uso em experimentos com dor (ZIMMERMANN, 1983; 1986; PORTER, 1992). Após as avaliações experimentais os animais foram submetidos à eutanásia com injeção intraperitoneal (*i.p.*) de pentobarbital 100mg/kg, associado a injeção subcutânea (*s.c.*) de lidocaína 5mg/kg e os métodos foram submetidos e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA – ICBS/UFRRJ, nº 010/2014).

#### 4.2 Material Botânico

As folhas de *Borreria verticillata* (L.) G. Mey. (Rubiaceae) foram coletadas durante o período de floração em Liomeiro, Pernambuco - Brasil, pelo Professor Dr. Pedro Germano do Departamento de Biologia da UFRRJ. Uma exsicata foi depositada no herbário do Departamento de Botânica da UFRRJ (Exsicata: RBR 26925) pelo Professor Dr. Douglas Siqueira De Almeida Chaves do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFRRJ.

#### 4.3 Substâncias, Reagentes e Solventes

O extrato das folhas de *B. verticillata* (L.) G. Mey., frações e compostos foram fornecidos pelo Professor Dr. Douglas Siqueira De Almeida Chaves do Departamento de Ciências Farmacêuticas da UFRRJ.

Dexametasona (Decadron<sup>®</sup>, Aché Lab. Farm., São Paulo, Brasil), água destilada, solução salina 0,9%, ácido acético, indometacina, carragenina, zimosan, rutina e ácido clorogênico (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA), morfina (Dimorf<sup>®</sup>, Cristália, São Paulo - Brasil), fentanil (Fentanest<sup>®</sup>, Cristália, São Paulo - Brasil) diazepam (Laboratório União Quím. Farm. Nacional S.A. São Paulo, Brasil), ELISA kits para TNF- $\alpha$  (Duo set R&D systems<sup>®</sup>, Minneapolis, MN), formaldeído 3,0%, éter, solução de PBS, heparina, tween<sup>®</sup>

80 (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA), solução de Turk, violeta de genciana (ADV., São Paulo, Brasil).

#### **4.4 Obtenção do Extrato, Rutina e Ác. Clorogênico**

O processo extrativo das folhas de *B. verticillata* (L.) G. Mey (EFBV) foi realizado por decocção 10% (p/v), 15 minutos, utilizando o material vegetal seco (100 g) e previamente pulverizado, seguido por filtração, congelamento (-20 °C) e secagem por liofilização (Liobras<sup>®</sup> K101) obtendo 12,1 g de decocto.

O fracionamento e monitoramento do extrato das folhas foram realizados por três técnicas: precipitação com etanol, partição com solventes orgânicos [acetato de etila (AcOEt) e butanol (BuOH)] e uso da cromatografia para monitoramento e obtenção das frações. O extrato foi purificado por precipitação com etanol e repartido, sucessivamente, com acetato de etila (3 x 400 mL), obtendo-se a fração acetato de etila e n-butanol (3 x 400 mL), obtendo-se a fração butanólica (BuOH).

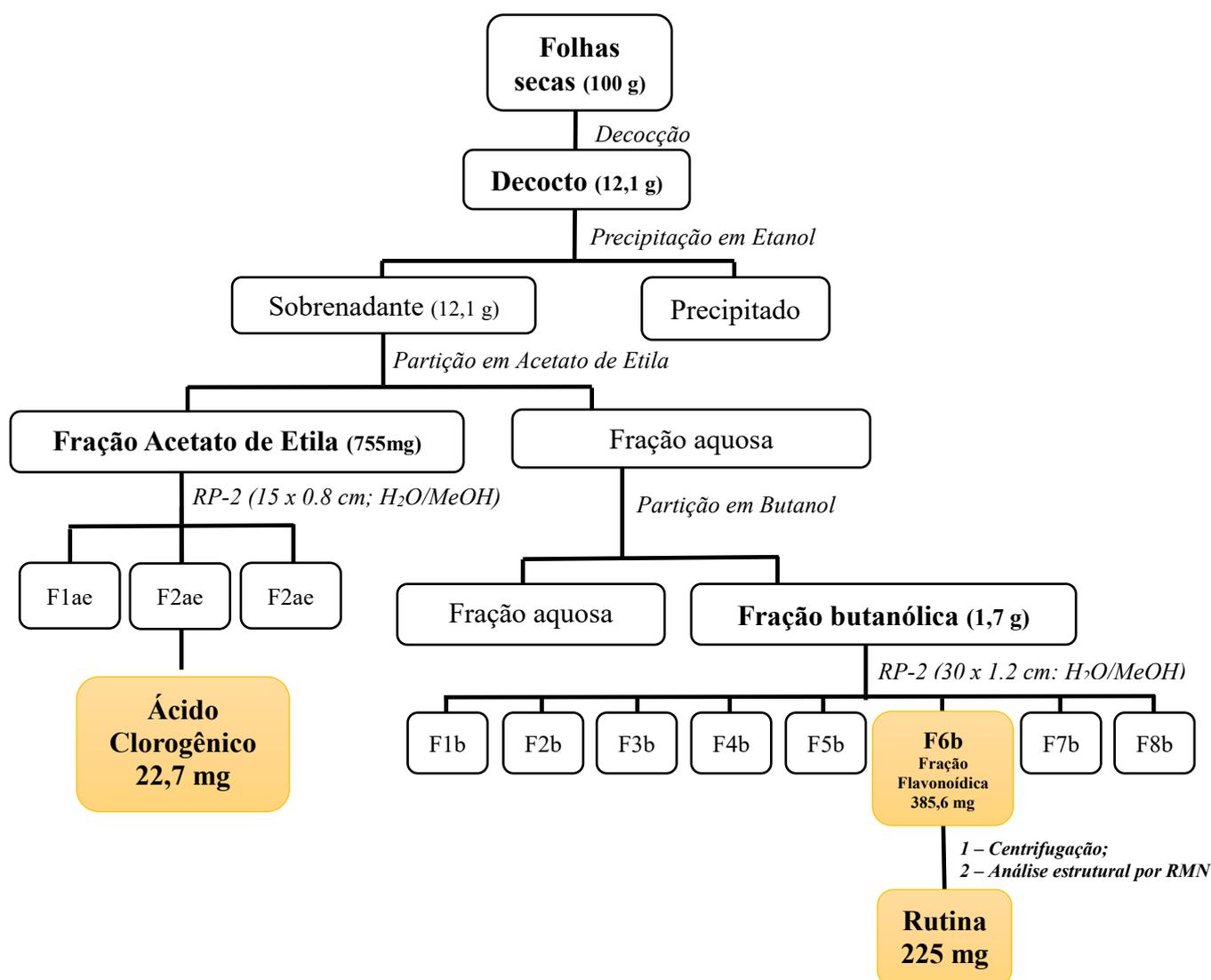
A purificação dos extratos foi realizada por cromatografia líquida clássica utilizando sílicas silanizadas de fase inversa (RP-2) com fase móvel em gradiente de água/metanol e cromatografia por exclusão molecular em gel de Sephadex (LH-20 e G15-125). O fracionamento em colunas cromatográficas foi monitorado por cromatografia em camada delgada (CCD-Merck<sup>®</sup>) utilizando Silica 60F 254 como suporte e n-butanol/ ácido acético/água (BAW 8:1:1) e acetato de etila/acetona/ácido acético/água (AAAA 30:3:1:1) como eluentes. Os cromatogramas foram analisados sob luz ultravioleta (UV; 254 nm e 365 nm) e visualizados com reveladores químicos específicos para cada classe química e as concentrações de todas as substâncias obtidas foram definidas a partir dos rendimentos obtidos durante o processo de extração (Figura 13).

Análises qualitativa e quantitativa do extrato foram realizadas por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a detector fotométrico por arranjo de diodos SPD-20A. Os compostos foram quantificados a partir de uma curva de calibração de rutina em triplicata contendo cinco concentrações (0,02-0,1 mg/mL). Os compostos fenólicos correspondentes foram analisados pelo tempo de retenção e as suas características espectrais frente aos padrões. Padrão de quercetina-3- O-rutinosídeo (rutina) e do ácido clorogênico foram adquiridos de Sigma Aldrich.

Para caracterização da substância isolada foi realizada a Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de Hidrogênio, Carbono-13 e técnicas bidimensionais de

espectroscopia de correlação homonuclear (COSY) e correlação heteronuclear múltiplo-Quantum (HMQC).

A partição do extrato de BV com solventes orgânicos (acetato de etila e butanol), permitiu a identificação de três frações: a fração acetato de etila (AcOEt), a fração butanólica (BuOH), fração esta, que possibilitou a identificação da fração flavonoídica (Flav). A obtenção destas frações favoreceu o processo de identificação dos compostos rutina e ácido clorogênico presentes no extrato bruto. Neste processo, a fração acetato de etila apresentou rendimento de 6% (755 mg) e o composto isolado a partir desta fração, o ácido clorogênico 3% (22,7 mg). A fração butanólica apresentou rendimento de 14% (1,7 g), da qual originou a fração flavonoídica com rendimento de 22% (385,6 mg), fração esta, rica em rutina, total de 58% (225 mg).



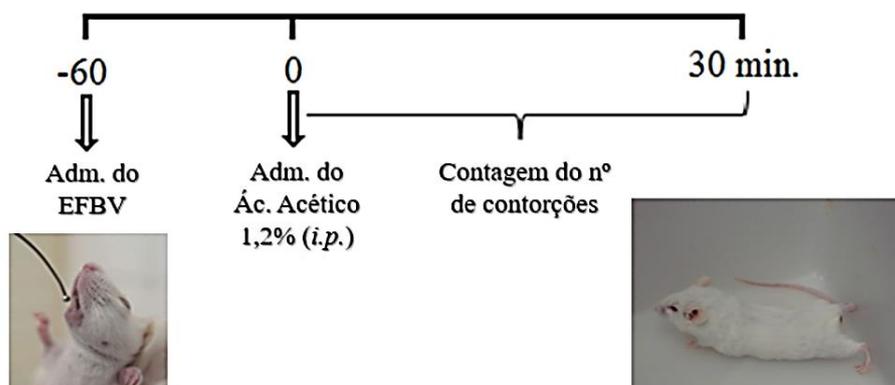
**Figura 13:** Processo de extração da folha de EFBV, flavonoide rutina e fenólico ácido clorogênico (Laboratório de Química UFRRJ – Professor Dr. Douglas Siqueira Chaves).

## 4.5 MÉTODOS FARMACOLÓGICOS

### 4.5.1 Métodos de avaliação de atividade antinociceptiva

#### 4.5.1.1 Modelo das contorções abdominais induzidas por ácido acético:

Inicialmente, os camundongos foram separados em 5 grupos (n=8) e tratados por via oral (*p.o.*) com veículo (água: 10 mL/kg), com o EFBV (100, 300 e 1000 mg/kg), ou com o controle positivo indometacina (10 mg/kg), um anti-inflamatório não-esteroidal inibidor da atividade das enzimas cicloxigenases (vide discussão). As contorções abdominais foram induzidas 60 minutos após os tratamentos através da administração intraperitoneal (*i.p.*) de ácido acético diluído em salina (1,2%; 10 mL/kg). Em seguida, o número de contorções abdominais, consideradas como contrações da parede abdominal com peritonite seguida por extensão de pelo menos uma das patas posteriores, foram registradas por 30 minutos (Figura 14). Os animais foram colocados individualmente sob funis de vidro, com um período de adaptação prévia de 15 minutos antes da administração do ácido acético. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média dos números de contorções acumuladas durante os 30 minutos de avaliação, permitindo desta forma, através de regressão linear a determinação da dose inibitória 50% (ID<sub>50</sub>) (KOSTER et al., 1959).

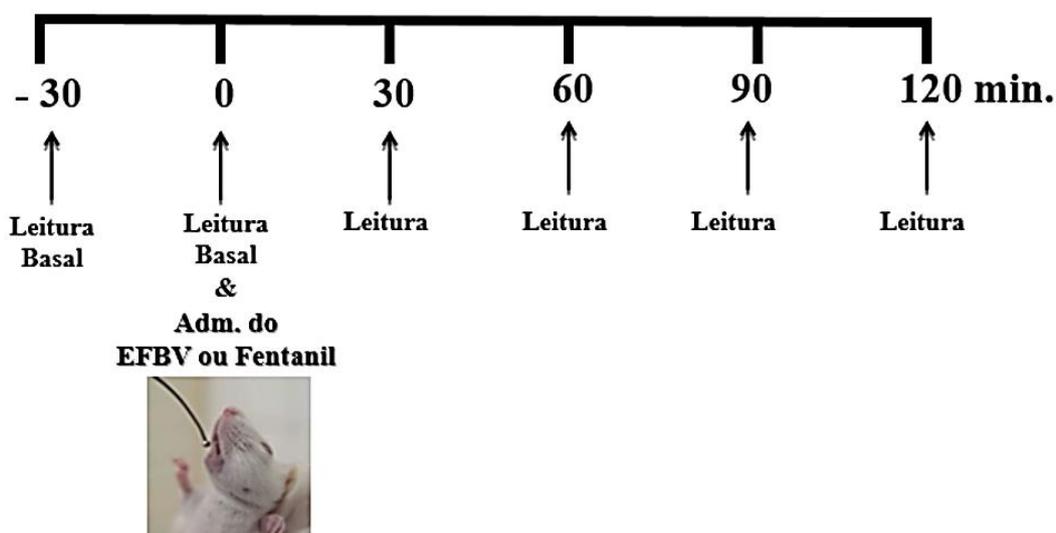


**Figura 14:** Esquema do método de contorções abdominais induzidas por ácido acético.

#### 4.5.1.2 Modelo da imersão da cauda:

Conforme D'amour e Smith (1941), este modelo permite o estudo de substâncias com atividades antinociceptivas centrais semelhantes aos opióides, avaliando o tempo em segundos (s) que o animal leva para responder ao estímulo térmico doloroso, com o reflexo de retirada da cauda do banho aquecido a 55°C.

Neste modelo, foram separados 3 grupos de camundongos (n=8), no qual estes animais foram individualmente contidos e o terço inferior da cauda imergido em água aquecida a 55°C ( $\pm 1^\circ\text{C}$ ). Foi realizada uma leitura controle 30 minutos antes, seguida de leituras 30, 60, 90 e 120 minutos após administração *p.o.* do veículo (água), do EFBV (1 g/kg) ou administração subcutânea (*s.c.*) do controle positivo, o opióide fentanil (50  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ), responsável pelo bloqueio da condução do estímulo doloroso a níveis espinais e supra-espinais (vide discussão) (JANSSEN et al. 1963, LAPA, et al., 2007). Para evitar a lesão tecidual, foi estabelecido como período máximo de latência 20 segundos (Figura 15). Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  o erro padrão da média do tempo de latência necessário até o reflexo de retirada da cauda de cada grupo analisado, dentro dos tempos determinados.



**Figura 15:** Esquema do método de imersão da cauda.

#### 4.5.2 Métodos de avaliação de atividade motora

##### 4.5.2.1 Modelo do *Rota-rod*:

Considerando que os testes de nocicepção propostos nesta dissertação envolveram respostas motoras dos animais, caracterizadas por contorções abdominais e reflexos de retirada da cauda, tornou-se necessário a avaliação da influência do extrato da folha de *Borreria verticillata* (L.) G. Mey na atividade motora dos animais, avaliando incoordenação motora, seja por sedação e/ou por relaxamento muscular.

Inicialmente, os animais foram colocados em uma barra giratória de 2,5 cm de diâmetro que giram em velocidade constante de 12 r.p.m. a 25 cm de altura da superfície do aparelho, por 1 minuto, sendo selecionado apenas os animais que não apresentaram quedas neste período.

Em seguida, grupos de camundongos (n=10) foram tratados com veículo (água, *p.o.*), EFBV (1 g/kg, *p.o.*) ou o controle positivo, o benzodiazepínico diazepam (0,75 mg/kg, *i.p.*), fármaco sedativo e relaxante muscular (vide discussão) (LAPA et al. 2007). Trinta minutos após o tratamento com diazepam (via intraperitoneal) ou 1 hora após os tratamentos com EFBV ou veículo (via oral), os animais foram novamente colocados na barra giratória, sendo avaliado o tempo de permanência na barra giratória e número de quedas (Figura 16). Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média do tempo de permanência na barra durante 1 minuto no aparelho *rota-rod* (DUHAM & MYIA, 1957).

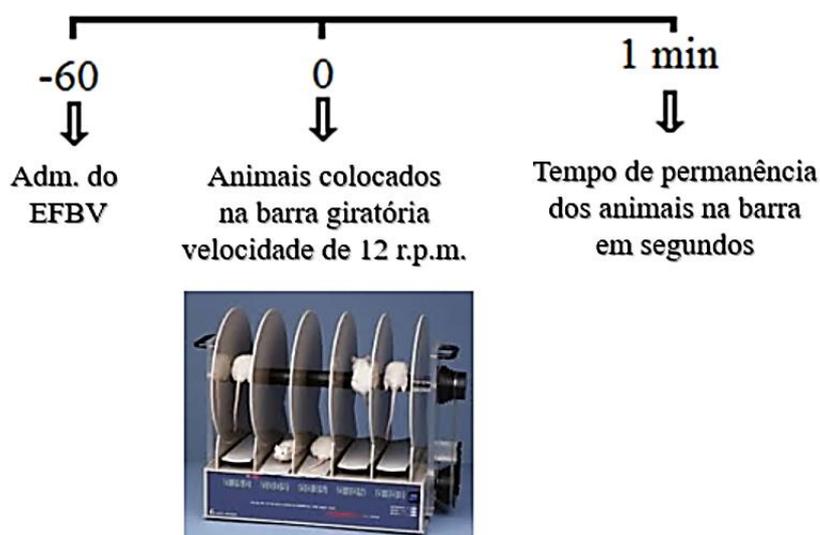


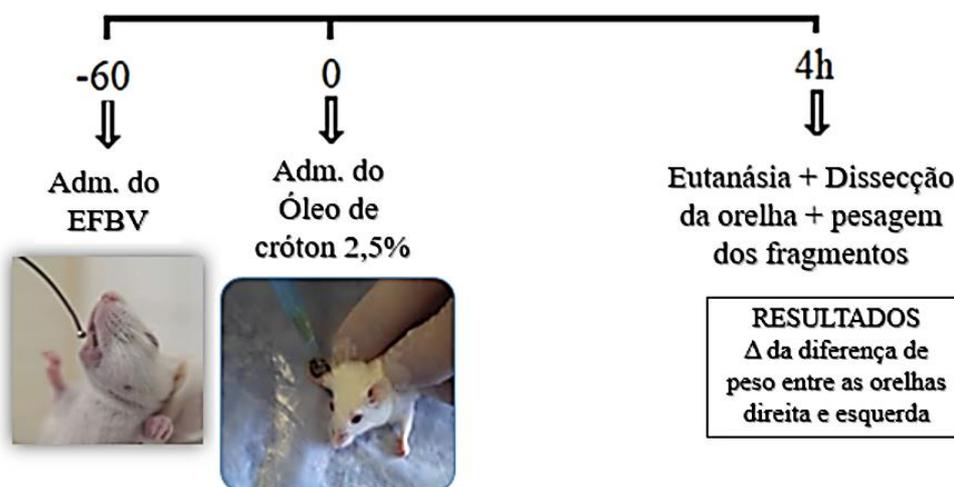
Figura 16: Esquema do método de *rota-rod*.

### 4.5.3 Métodos de avaliação de atividade anti-edematogênica

#### 4.5.3.1 Modelo do edema de orelha induzido por Óleo de Cróton:

Grupos de camundongos (n=8) foram tratados por via oral (*p.o.*) com veículo (água), EFBV (1 g/kg) ou tratados por via subcutânea (*s.c.*) com o controle positivo dexametasona (2 mg/kg). Uma hora após os tratamentos com veículo e EFBV ou 30 minutos após tratamento com controle positivo dexametasona, um anti-inflamatório esteroideal com capacidade de inibir a síntese dos eicosanoides em conjunto com a redução da síntese de mediadores inflamatórios (vide discussão), foram aplicados topicamente 10  $\mu$ L de óleo de cróton (2,5 % v/v em acetona) na orelha direita e o mesmo volume de acetona na orelha esquerda. Após 4 horas os animais foram eutanasiados e foram coletados fragmentos de 6 mm de diâmetro de cada orelha com *punch* de biópsia. Em seguida, os tecidos coletados foram pesados em balança analítica. Os

resultados foram representados como médias  $\pm$  erro padrão da média da diferença de peso ( $\Delta$ ), em miligramas (mg), entre o material coletado das duas orelhas (Figura 17) (TUBARO et al., 1986).

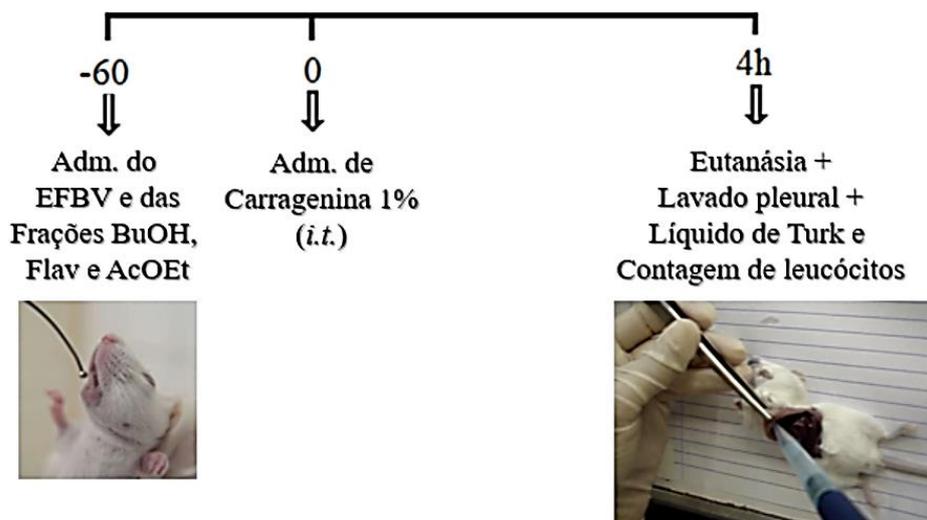


**Figura 17:** Esquema do método de edema de orelha induzida por óleo de cróton.

#### 4.5.4 Métodos de avaliação de atividade anti-inflamatória

##### 4.5.4.1 Modelo da pleurisia induzida por carragenina:

Grupos experimentais de camundongos ( $n=10$ ) foram tratados via oral (*p.o.*) com veículo (água), EFBV (1 g/kg), com as frações Flav (20 mg/kg), BuOH (200 mg/kg) e AcOEt (25 mg/kg) ou foram tratados por via subcutânea (*s.c.*) com controle positivo dexametasona (2 mg/kg), as concentrações de extrato e das frações foram definidas a partir dos rendimentos obtidos durante o processo de extração. A pleurisia foi induzida através da administração intratorácica (*i.t.*) de 100  $\mu$ L de carragenina (1% diluído em salina estéril) 1 hora após os tratamentos com veículo, EFBV, frações e veículo ou 30 minutos após tratamento com controle positivo dexametasona. Após 4 horas, os animais foram submetidos à eutanásia, sendo realizada a abertura e a lavagem da cavidade pleural com 1000  $\mu$ L de solução de PBS heparinizado (20 UI/mL) (Figura 18). O lavado pleural foi coletado e armazenado em tubos Eppendorf<sup>®</sup> imersos em gelo (amostras com sangue foram descartadas). Uma alíquota de 20  $\mu$ L do lavado pleural de cada animal foi transferida para um Eppendorf<sup>®</sup> contendo 380  $\mu$ L de líquido de Turk (diluição 1:20), possibilitando assim a coloração dos leucócitos e sua posterior contagem em câmara de Neubauer sob microscopia óptica. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média do número de leucócitos totais  $\times 10^6$ /mL (VINNEGAR et al., 1973).

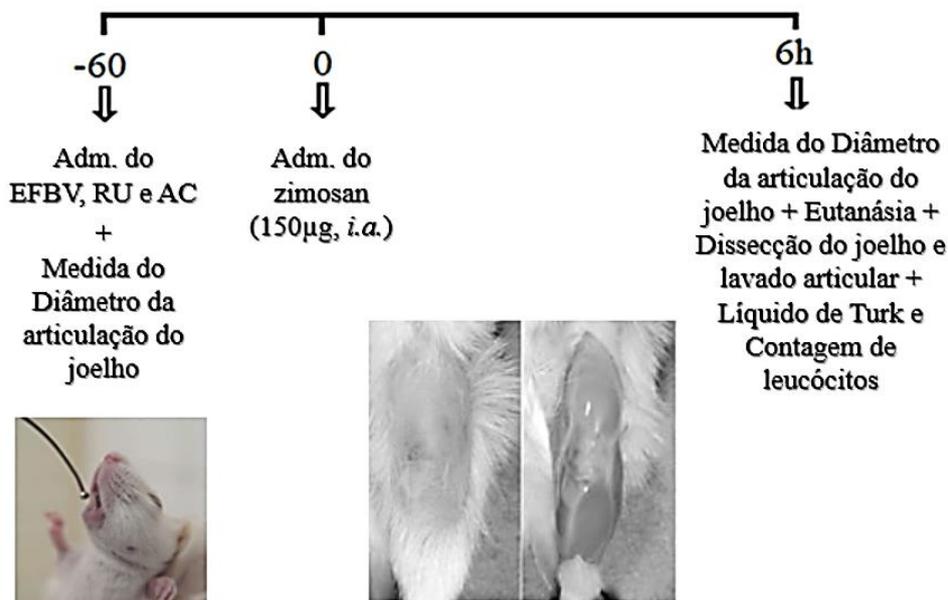


**Figura 18:** Esquema do método de pleurisia induzida por carragenina.

#### 4.5.4.2 Modelo da Artrite na articulação Fêmur-tibial induzida por Zimosan:

Grupos de camundongos (n=10) foram tratados com veículo (água, *p.o.*), EFBV (1 g/kg, *p.o.*), rutina (1, 10, 30 mg/kg, *p.o.*), ácido clorogênico (0,2, 0,6, 2,0mg/kg, *p.o.*) e controle positivo dexametasona (2 mg/kg, *s.c.*), as concentrações dos compostos foram definidas a partir dos rendimentos obtidos durante o processo de extração. Uma hora após os tratamentos com veículo, EFBV, Ru e AC ou 30 minutos após o tratamento com controle positivo dexametasona os animais foram brevemente anestesiados com isoflurano (2%) para determinação do diâmetro basal da articulação fêmur-tibial com auxílio de paquímetro digital, seguido da administração intra-articular (*i.a.*) de 150 µg de zimosan (glicano derivado da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*, que promove ativação de receptores toll-like 2 e do sistema complemento, vide discussão) diluído em 10 µL de salina na cavidade articular fêmur-tibial direita dos camundongos e igual volume de salina na articulação contralateral, utilizando uma agulha diretamente no espaço fêmur-tibial. Após 6 horas, os animais foram eutanasiados e uma nova avaliação do diâmetro da articulação fêmur-tibial foi realizada. Em seguida, a cavidade articular fêmur-tibial foi exposta para realização do lavado articular com PBS contendo heparina (10 UI/mL). Ao lavado articular foi adicionado líquido de Turk (1:20) para contagem de leucócitos em câmara de Neubauer usando microscópio óptico (aumento de 400x) (Figura 19) (KEYSTONE et al., 1977). Os valores da espessura da articulação foram expressos como a média ± erro padrão da média da diferença ( $\Delta$ ) do diâmetro medido no tempo 0 e após 6 horas da injeção intra-articular de zimosan em milímetros e os resultados da

migração leucocitária foram expressos como a média do número total de células/cavidade articular ( $\times 10^4/\text{mL}$ ) (CONTE et al., 2010).



**Figura 19:** Esquema do método de artrite induzida por zimosan.

#### 4.5.4.3 Determinação da concentração articular de TNF- $\alpha$ :

O modelo de artrite induzida por zimosan foi repetido e 2 horas após a administração *i.a.* de zimosan os animais foram eutanasiados para dissecação da articulação e ossos do joelho. Os limites anatômicos proximal e distal para a dissecação da articulação fêmur-tibial foram a epífise distal do fêmur e a epífise tibiofibular proximal, respectivamente. Após a dissecação, as articulações foram pesadas, maceradas em PBS (400µL) com homogeneizador, centrifugadas e o sobrenadante coletado e utilizado para determinação da concentração articular de citocinas inflamatórias (Figura 20). Os resultados foram expressos como a média  $\pm$  erro padrão da média da concentração de TNF- $\alpha$  no sobrenadante foi corrigido pelo peso de cada articulação dissecada.

A determinação dos níveis de TNF- $\alpha$ , foram analisadas por ELISA utilizando kits comerciais da Duo set R&D systems, de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante, de grupos tratados com EFBV (1 g/kg) e Ru (30 mg/kg) e AC (2 mg/kg) (CONTE et al., 2010; DOMICIANO et al., 2013).



**Figura 20:** Esquema de determinação da concentração de TNF- $\alpha$  pelo método de artrite induzida por zimosan.

#### 4.6 Análise Estatística

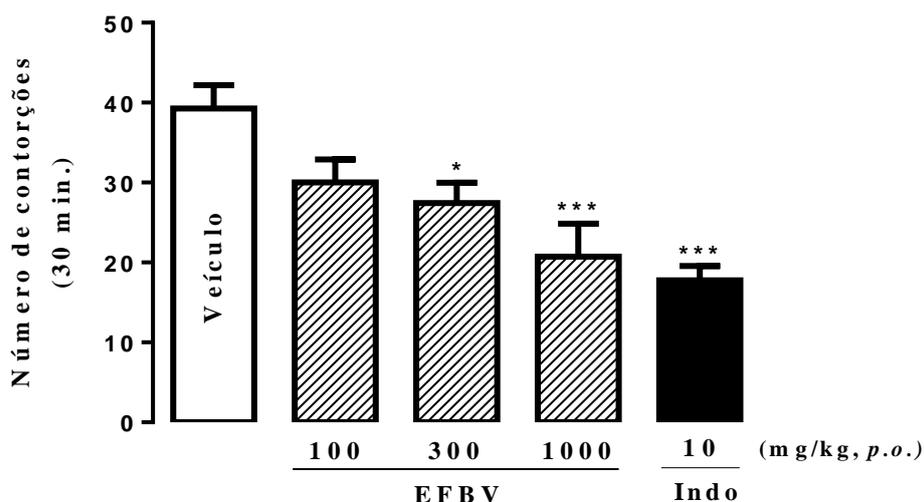
Os resultados obtidos nos métodos farmacológicos empregados, foram inseridos no programa *GraphPad Prism 6* para a análise estatística. Os Resultados foram expressos como a média  $\pm$  o erro padrão da média (EPM). As diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foram detectadas pela análise de variância (One-Way ANOVA), seguido pelo pós-teste Tukey, considerando diferença significativa de  $p < 0,05$  (SOKAL & ROHLF, 1981).

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Avaliação da atividade antinociceptiva do EFBV

#### 5.1.1 Modelo das contorções abdominais induzidas por ácido acético:

O pré-tratamento dos camundongos pela via oral com o EFBV produziu antinocicepção nas duas maiores doses (300 e 1000 mg/kg), representado pela inibição dose-dependente do número de contorções abdominais induzidas por ácido acético em 30,3% ( $27,4 \pm 2,5$  contorções) e 47,3% ( $20,7 \pm 4,1$  contorções), respectivamente, quando comparado com o grupo veículo ( $39,3 \pm 2,9$  contorções). De forma semelhante, o grupo controle positivo indometacina (10 mg/kg, *p.o.*) também inibiu em 54,7% ( $17,8 \pm 1,8$  contorções) o número de contorções abdominais (Figura 21).

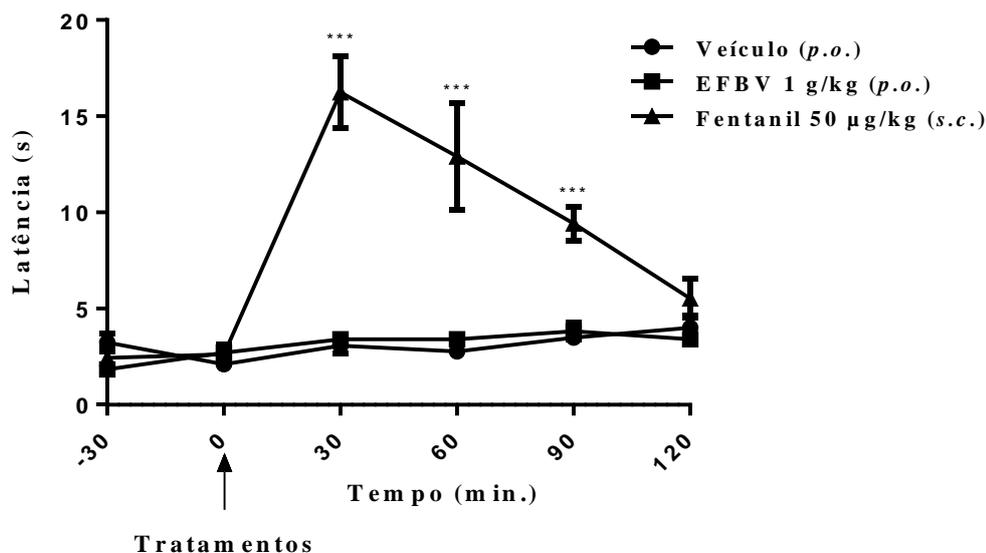


**Figura 21.** Efeito do extrato aquoso das folhas de *B. verticillata* (L.) G. Mey (EFBV) no teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético. Veículo (água, *p.o.*), EFBV (100, 300 e 1000 mg/kg, *p.o.*) ou controle positivo Indometacina (Indo, 10 mg/kg, *p.o.*) foram administrados 1 hora antes da injeção de ácido acético (1,2% diluído em salina, 0,01 mL/1 g). \* $P < 0,05$  e \*\*\* $P < 0,001$  significativamente diferente do grupo tratado com veículo. As colunas e barras verticais representam a média  $\pm$  EPM ( $n=8$ ).

#### 5.1.2 Modelo de imersão da cauda:

Nesse modelo, o pré-tratamento pela via oral dos camundongos com o EFBV (1 g/kg) não modificou os tempos das latências ao estímulo térmico em nenhum dos tempos avaliados: 30 min ( $3,4 \pm 0,4$  s), 60 min ( $3,4 \pm 0,4$  s), 90 min ( $3,8 \pm 0,4$  s) e 120 min ( $3,4 \pm 0,3$  s), quando comparado as latências observadas para o grupo veículo: 30 min ( $3,1 \pm 0,41$  s), 60 min ( $2,8 \pm 0,2$

s), 90 min ( $3,5 \pm 0,3$  s) e 120 min ( $4,0 \pm 0,6$  s). Por outro lado, o controle positivo fentanil ( $50 \mu\text{g}/\text{kg}$ , *s.c.*) ampliou significativamente a reatividade dos animais ao estímulo térmico em 81,0% ( $16,3 \pm 1,9$  s), 78,5% ( $12,9 \pm 2,8$  s), 62,9% ( $9,4 \pm 0,9$  s) e 27,5% ( $5,5 \pm 1,0$  s) para os tempos de: 30, 60, 90, 120 min, respectivamente, quando comparadas as latências do grupo veículo (Figura 22).

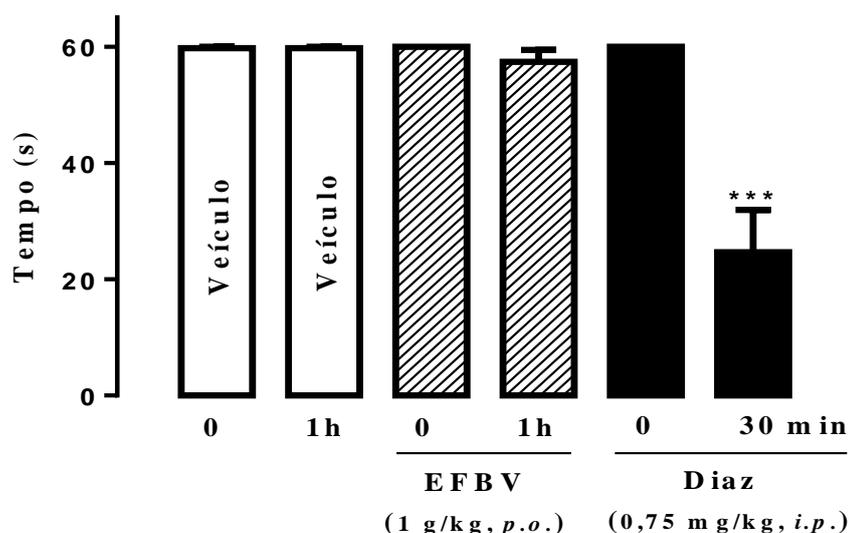


**Figura 22.** Efeito do extrato aquoso das folhas de *B. verticillata* (L.) G. Mey (EFBV) no teste de imersão da cauda. Veículo (água, *p.o.*), EFBV ( $1 \text{ g}/\text{kg}$ , *p.o.*) ou controle positivo Fentanil ( $50 \mu\text{g}/\text{kg}$ , *s.c.*) foram administrados uma hora ou 30 minutos, respectivamente, antes da imersão da cauda em água quente ( $55 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$ ). \*\*\* $P < 0,001$  significativamente diferente do grupo tratado com veículo. Os símbolos e as linhas horizontais representam a média  $\pm$  EPM ( $n=8$ ).

## 5.2 Avaliação da atividade motora do EFBV

### 5.2.1 Modelo do *rota-rod*:

No modelo de *rota-rod*, o pré-tratamento com o EFBV ( $1 \text{ g}/\text{kg}$ , *p.o.*) não modificou o tempo de permanência na barra giratória ( $57 \pm 2,0$  s), quando comparado ao grupo veículo ( $59,8 \pm 0,3$  s). De forma contrária, o grupo controle positivo, pré-tratado com o diazepam ( $0,75 \text{ mg}/\text{kg}$ , *i.p.*), apresentou significativa redução de 56,1% ( $25 \pm 7,3$  s) no tempo de permanência dos animais na barra giratória, indicando que o EFBV não possui efeitos sobre a motricidade dos animais, reforçando o indicativo de efeito antinociceptivo do EFBV evidenciados nos modelos de antinocicepção (Figura 23).

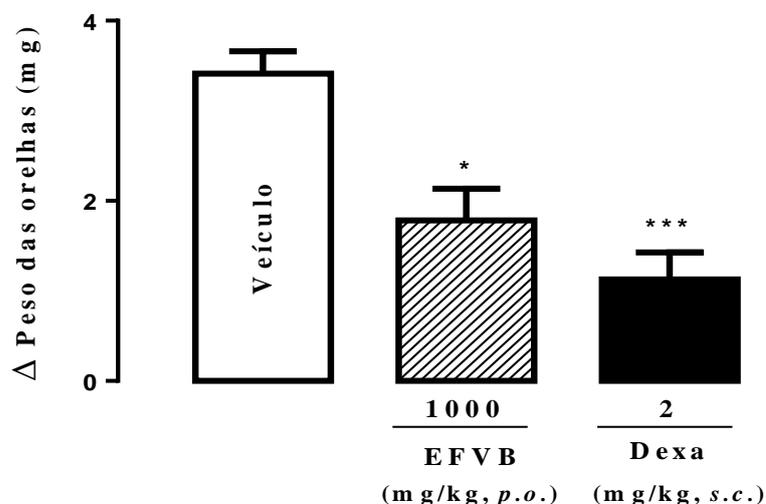


**Figura 23.** Efeito do extrato aquoso das folhas de *B. verticillata* (L.) G. Mey no teste de *rota-rod*. Veículo (água, *p.o.*), EFBV (1 g/kg, *p.o.*) e o diazepam (0,75 mg/kg, *i.p.*) foram administrados 1 hora ou 30 minutos, respectivamente, antes da condução à barra giratória, observando o tempo de permanência dos camundongos na barra giratória (12 r.p.m.) por 1 minuto. \*\*\* $P < 0,001$  significativamente diferente do grupo tratado com veículo. As colunas e barras verticais representam a média  $\pm$  EPM ( $n=8$ ).

### 5.3 Avaliação da atividade anti-edematogênica do EFBV

#### 5.3.1 Modelo do Edema de orelha induzido por Óleo de Cróton:

O EFBV (1000 mg/kg, *p.o.*) apresentou efeito anti-edematogênico evidenciado através da redução do edema na orelha induzido por óleo de cróton em 47,6% ( $\Delta=1,8\pm0,4$  mg), quando comparado com o grupo tratado com veículo ( $\Delta=3,4\pm0,2$  mg). De forma semelhante, o controle positivo dexametasona (2 mg/kg, *s.c.*) também inibiu o edema em 66,8% ( $\Delta=1,1\pm0,3$  mg) (Figura 24).



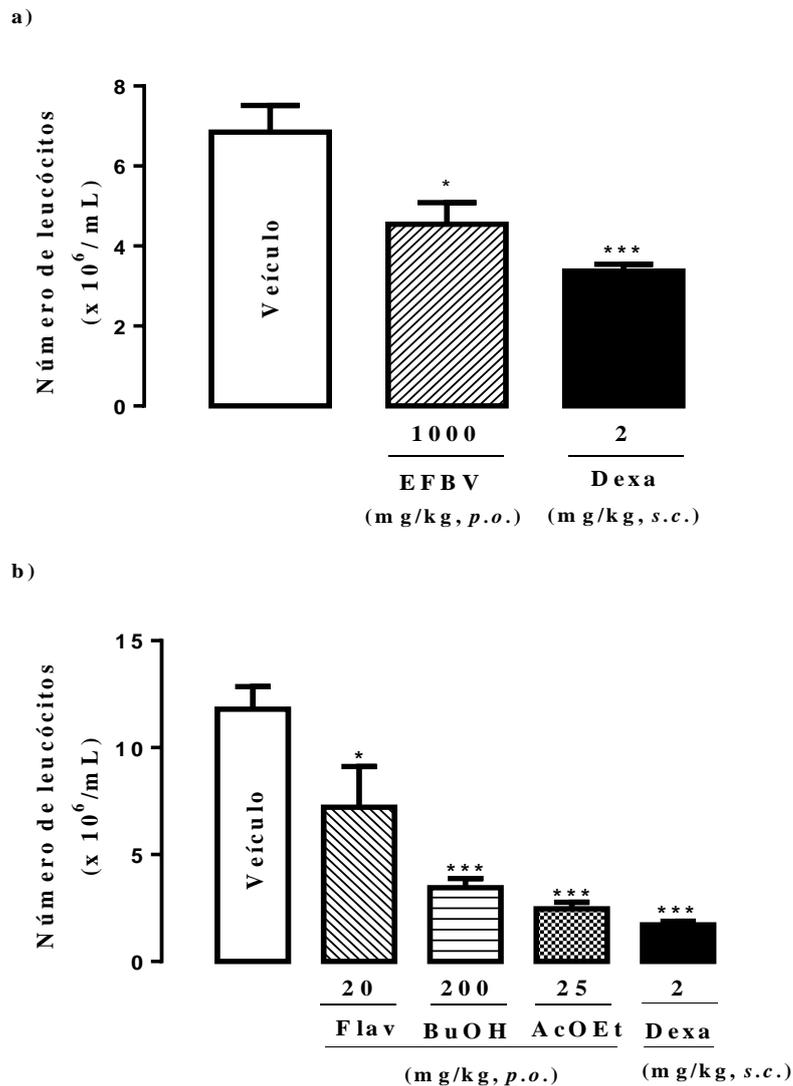
**Figura 24.** Efeito do extrato aquoso das folhas de *B. verticillata* (L.) G. Mey (EFBV) no teste do edema de orelha induzido por óleo de cróton. Foram administrados óleo de cróton (2,5% em acetona, 20  $\mu$ L/orelha) na superfície interna da orelha direita e acetona (20  $\mu$ L/orelha) na superfície interna da orelha esquerda de camundongos, 1 hora antes da administração de veículo (água, *p.o.*) EFBV (1000 mg/kg, *p.o.*) ou 30 minutos antes do controle positivo dexametasona (2 mg/kg, *s.c.*). ( $\Delta$ ) representa as diferenças de peso entre as orelhas direita e esquerda. \*\* $P < 0,01$  e \*\*\* $P < 0,001$  significativamente diferente do grupo tratado com veículo. As colunas e barras verticais representam a média  $\pm$  EPM (n=8).

## 5.4 Avaliação da atividade anti-inflamatória do EFBV, frações e compostos

### 5.4.1 Modelo da pleurisia induzida por carragenina:

No ensaio de pleurisia induzida por carragenina, o pré-tratamento de camundongos por via oral (*p.o.*) com o EFBV (1 g/kg) reduziu a migração de leucócitos para a cavidade pleural em 33,7% ( $4,5 \pm 0,5$  leucócitos  $\times 10^6$ /mL), quando comparado com o grupo tratado com veículo ( $6,9 \pm 0,7$  leucócitos  $\times 10^6$ /mL), semelhantemente ao controle positivo dexametasona (2 mg/kg, *s.c.*) que reduziu em 50,8% ( $3,4 \pm 0,2$  leucócitos  $\times 10^6$ /mL) a migração leucocitária para a cavidade pleural (Figura 25a).

Após o pré-tratamento *p.o.* com as frações Flavonoídica (Flav, 20 mg/kg), butanólica (BuOH, 200 mg/kg) ou acetato de etila (AcOEt, 25 mg/kg), todas as frações avaliadas foram capazes de reduzir a migração leucocitária para a cavidade pleural em 38,9% ( $7,2 \pm 1,9$  leucócitos  $\times 10^6$ /mL), 71,1% ( $3,4 \pm 0,4$  leucócitos  $\times 10^6$ /mL) e 78,8% ( $2,5 \pm 0,3$  leucócitos  $\times 10^6$ /mL), respectivamente, quando comparado com o grupo tratado com veículo ( $11,8 \pm 1,0$  leucócitos  $\times 10^6$ /mL). O grupo controle positivo dexametasona (2 mg/kg, *s.c.*) reduziu a migração leucocitária em 85,5% ( $1,7 \pm 0,2 \times$  leucócitos  $10^6$ /mL) na cavidade pleural (Figura 25b).

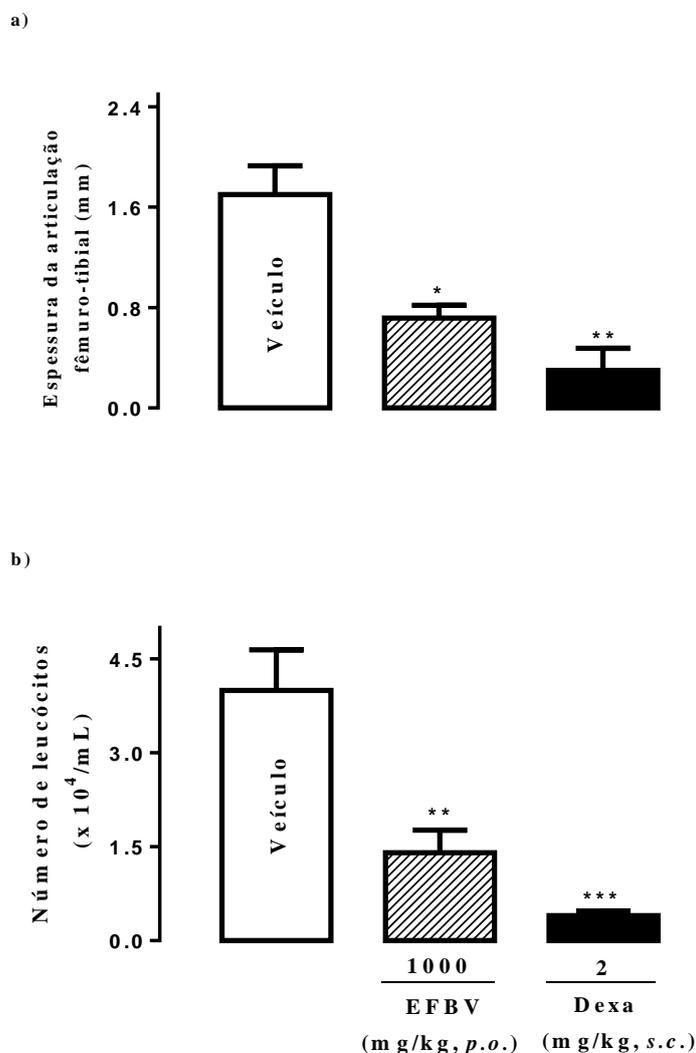


**Figura 25.** Efeito do extrato aquoso das folhas de *B. verticillata* (L.) G. Mey (EFBV) (a) e das Frações Flav (b) no teste da pleurisia induzida por carragenina. Veículo (água, *p.o.*), EFBV (1000 mg/kg, *p.o.*) e as Frações Flav (Flavonoídica: 20 mg/kg, *p.o.*), BuOH (Butanólica: 200 mg/kg, *p.o.*) e AcOEt (Acetato de etila: 25 mg/kg, *p.o.*) foram administrados 1 hora antes da injeção intra-torácica de carragenina (1%, 0,1 mL/10 g) e controle positivo dexametasona (2 mg/kg, *s.c.*) 30 minutos antes por via subcutânea. \* $P < 0,05$  e \*\*\* $P < 0,001$  significativamente diferente do grupo tratado com veículo. As colunas e barras verticais representam a média  $\pm$  EPM (n=10).

#### 5.4.2 Modelo da artrite na articulação fêmur-tibial induzida por zimosan:

Neste ensaio, o tratamento oral com EFBV (1 g/kg) reduziu a espessura da articulação fêmur tibial em 57,8% ( $0,7 \pm 0,1$  mm) e a migração de leucócitos para a cavidade articular em 64,9% ( $1,4 \pm 0,4$  leucócitos  $\times 10^4$ /mL) quando comparado com o grupo tratado com veículo ( $1,7 \pm 0,23$  mm e  $4,0 \pm 0,7$  leucócitos  $\times 10^4$ /mL, respectivamente) (Figura 26 a e b).

Assim como esperado, o controle positivo dexametasona (2 mg/kg, *s.c.*) também reduziu o edema articular em 82,4% ( $0,3 \pm 0,2$  mm) e a migração leucocitária para a cavidade articular em 89,9% ( $0,4 \pm 0,1$  leucócitos  $\times 10^4/\text{mL}$ ) (Figura 26 a e b).

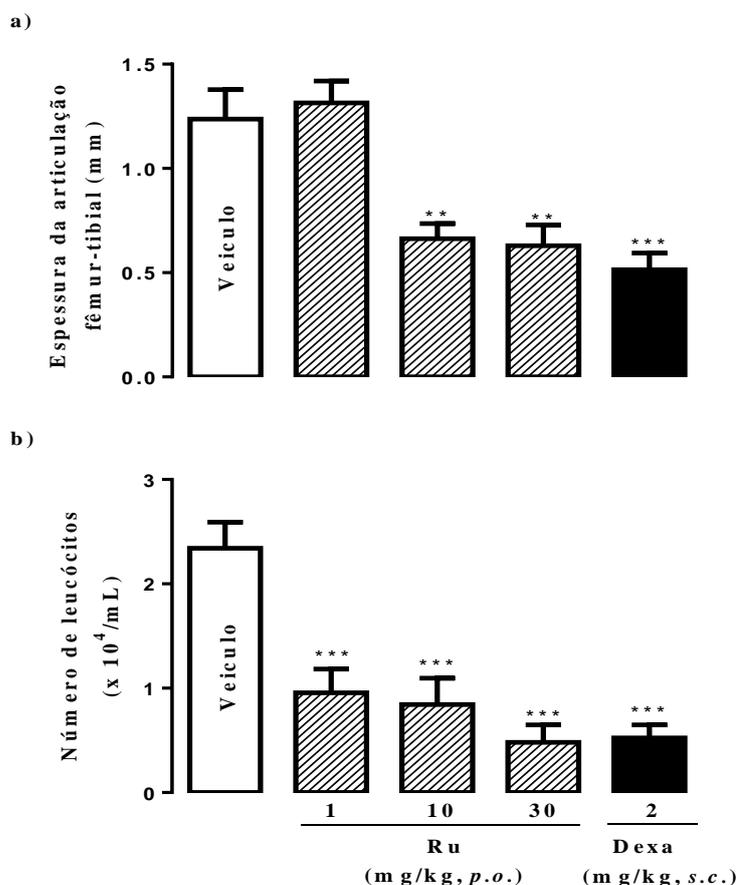


**Figura 26.** Efeito do extrato aquoso das folhas de *B. verticillata* (L.) G. Mey (EFBV) no modelo de artrite induzida por zimosan. Veículo (água, *p.o.*), EFBV (1 g/kg, *p.o.*) e controle positivo dexametasona (2 mg/kg, *s.c.*), foram administrados 1 hora ou 30 minutos antes, respectivamente da administração de zimosan (150  $\mu\text{g}$  diluídos em salina, 0,01 mL/articulação) na articulação fêmur-tibial de camundongos, sendo avaliados a espessura das articulações (a) e a contagem de leucócitos no exsudato articular (b) seis horas após a aplicação do zimosan. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  e \*\*\* $P < 0,001$  significativamente diferente do grupo tratado com veículo. As colunas e barras verticais representam a média  $\pm$  EPM ( $n=10$ ).

Nesse mesmo modelo, o tratamento oral com o flavonoide rutina nas doses de 10 e 30 mg/kg, reduziram significativamente a espessura da articulação em 46,6% ( $0,7 \pm 0,07$  mm), 49,2% ( $0,6 \pm 0,1$  mm), respectivamente, quando comparado com o grupo tratado com veículo ( $1,2 \pm 0,1$  mm). Da mesma forma, o grupo controle positivo dexametasona também reduziu em

58,5% ( $0,5 \pm 0,1$  mm) a espessura da articulação. A dose de 1 mg/kg não foi efetiva em inibir este parâmetro (Figura 27a).

Estas três doses avaliadas de rutina (1, 10 e 30 mg/kg, *p.o.*) produziram inibições significativas na migração de leucócitos para a cavidade articular em 59,1% ( $0,9 \pm 0,2$  leucócitos  $\times 10^4/\text{mL}$ ), 64,1% ( $0,8 \pm 0,3$  leucócitos  $\times 10^4/\text{mL}$ ) e 79,5% ( $0,5 \pm 0,2$  leucócitos  $\times 10^4/\text{mL}$ ), respectivamente, quando comparado com o grupo tratado com veículo ( $2,3 \pm 0,2$  leucócitos  $\times 10^4/\text{mL}$ ). O controle positivo dexametasona reduziu em 77,6% ( $0,5 \pm 0,1$  leucócitos  $\times 10^4/\text{mL}$ ) a migração leucocitária na cavidade articular (Figura 27b).



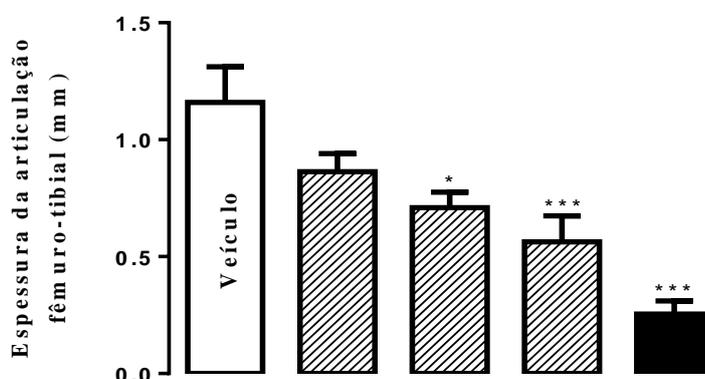
**Figura 27.** Efeito da Rutina (Ru) no modelo de artrite induzida por zimosan. Veículo (água, *p.o.*), Ru (1, 10 ou 30 mg/kg, *p.o.*) e controle positivo dexametasona (2 mg/kg, *s.c.*), foram administrados 1 hora ou 30 minutos antes, respectivamente, da administração de zimosan (150  $\mu\text{g}$  diluído em salina, 0,01 mL/articulação) na articulação fêmur-tibial de camundongos, sendo avaliados a espessura das articulações (a) e a contagem de leucócitos no exsudato articular (b) seis horas após a aplicação do zimosan. \*\* $P < 0,01$  e \*\*\* $P < 0,001$  significativamente diferente do grupo tratado com veículo. As colunas e barras verticais representam a média  $\pm$  EPM ( $n=10$ ).

O efeito anti-inflamatório do ácido clorogênico nas doses de 0,6 e 2 mg/kg (*p.o.*) também foi evidenciada através de reduções das espessuras das articulações em 38,9% ( $0,7 \pm 0,1$

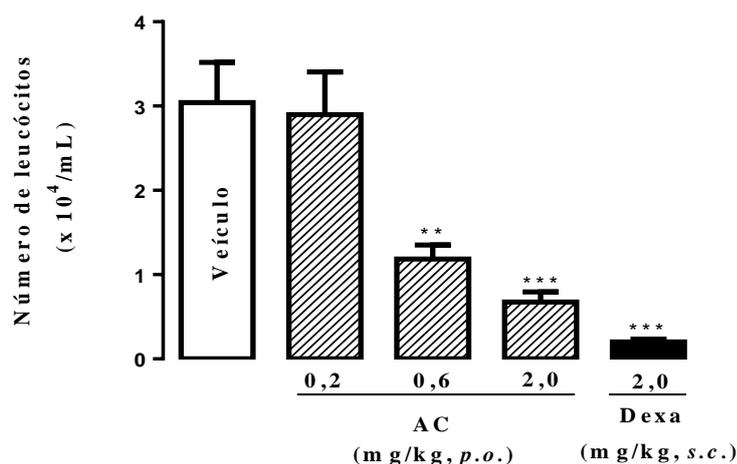
mm) e 51,7% ( $0,6 \pm 0,1$  mm) respectivamente, quando comparado com o grupo tratado com veículo ( $1,2 \pm 0,15$  mm) e, de maneira semelhante, o grupo controle positivo tratado com dexametasona que apresentou redução de 78,1% ( $0,3 \pm 0,1$  mm) (Figura 28a).

Essas mesmas doses do AC também foram capazes de inibir a migração de leucócitos para a cavidade articular em 61,0% ( $1,2 \pm 0,2$  leucócitos  $\times 10^4$ /mL) e 77,8% ( $0,7 \pm 0,1$  leucócitos  $\times 10^4$ /mL) quando comparado com o grupo tratado com veículo ( $3,0 \pm 0,5$  leucócitos  $\times 10^4$ /mL), assim como o controle positivo dexametasona que inibiu em 93,4% ( $0,2 \pm 0,03$  leucócitos  $\times 10^4$ /mL) (Figura 28b). A dose de 0,2 mg/kg de ácido clorogênico não foi capaz de alterar nenhum dos parâmetros avaliados (Figura 28 a e b).

a)



b)

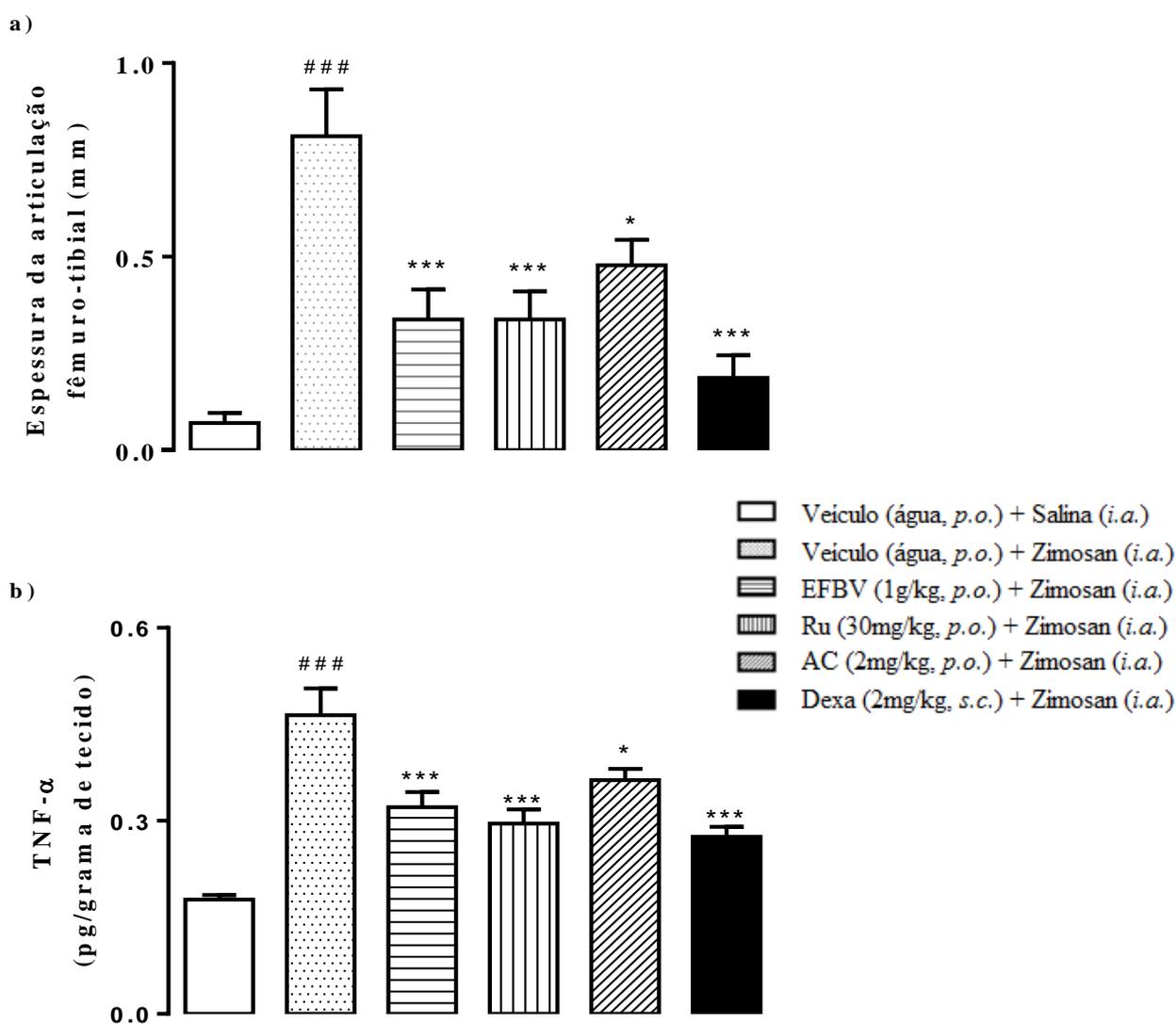


**Figura 28.** Efeito do Ácido clorogênico (AC) no modelo de artrite induzida por zimosan. Veículo (água, *p.o.*), AC (0,2, 0,6 ou 2,0 mg/kg, *p.o.*) e controle positivo dexametasona (2 mg/kg, *s.c.*), foram administrados 1 hora ou 30 minutos antes, respectivamente, da administração de zimosan (150  $\mu$ g diluído em salina, 0,01 mL/articulação) na articulação fêmur-tibial de camundongos, sendo avaliados a espessura das articulações (a) e a contagem de leucócitos no exsudato articular (b) seis horas após a aplicação do zimosan. \*\* $P < 0,01$  e \*\*\* $P < 0,001$  significativamente diferente do grupo tratado com veículo. As colunas e barras verticais representam a média  $\pm$  EPM (n=10).

#### 5.4.3 Determinação do edema e da concentração de TNF- $\alpha$ articular:

Na avaliação da formação do edema duas horas após a injeção de zimosan intra-articular (*i.a.*) (vide discussão), o pré-tratamento *p.o.* com o EFBV (1 g/kg), a rutina (30 mg/kg) ou o ácido clorogênico (2 mg/kg), produziu uma redução significativa da espessura da articulação fêmur-tibial dos camundongos de 58,1% ( $0,34\pm 0,1$ mm) (extrato e Ru) e 40,7% ( $0,48\pm 0,1$ mm) (AC), quando comparados com o controle zimosan ( $0,81\pm 0,1$ mm), e de forma semelhante que o controle positivo dexametasona que reduziu a espessura da articulação em 76,5% ( $0,19\pm 0,1$ ) (Figura 29a).

Adicionalmente, o tratamento *p.o.* com o EFBV (1 g/kg), a rutina (30 mg/kg) ou ácido clorogênico (2 mg/kg) reduziram significativamente a concentração articular de TNF- $\alpha$  em 30,4% ( $0,32\pm 0,02$  pg/g), 37,0% ( $0,29\pm 0,02$  pg/g), 21,7% ( $0,36\pm 0,02$  pg/g), respectivamente, quando comparados ao grupo controle zimosan ( $0,46\pm 0,04$  pg/g). De maneira esperada, o tratamento com controle positivo dexametasona também reduziu em 50,0% ( $0,23\pm 0,31$  pg/g) a concentração articular de TNF- $\alpha$  (Figura 29b). Este experimento foi realizado após 2hs, pois o TNF- $\alpha$  é uma citocina de síntese precoce, sendo sintetizada nas primeiras duas horas após o estímulo com zimosan.



**Figura 29.** Efeito do extrato aquoso das folhas de *B. verticillata* (L.) G. Mey, dos compostos Ru e AC na concentração de TNF- $\alpha$  no modelo de artrite induzida por zimosan. Veículo (gua, *p.o.*), EFBV (1 g/kg, *p.o.*), Rutina (Ru, 30 mg/kg, *p.o.*), ácido clorogênico (AC, 2,0 mg/kg, *p.o.*) e controle positivo dexametasona (2 mg/kg, *s.c.*) foram administrados 1 hora (Veículo, EFBV, Ru e AC) ou 30 minutos (Dexametasona) antes da administração de zimosan (150  $\mu$ g diluído em salina, 0,01 mL/articulação) na articulação fêmur-tibial de camundongos, sendo avaliados a espessura das articulações (a) e a concentração da citocina fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) (b) duas horas após a aplicação do zimosan. \* $P < 0,05$  e \*\*\* $P < 0,001$  significativamente diferente do grupo tratado com controle zimosan (###). As colunas e barras verticais representam a média  $\pm$  EPM (n=10).

## 6 DISCUSSÃO

Desde os primórdios, o uso das plantas medicinais no tratamento e cura de doenças sempre aconteceu por questões culturais e históricas, embasadas no seu uso empírico. O Brasil é conhecido por ser um país rico em biodiversidade natural e possuir em seu território uma parte significativa de plantas existentes no mundo todo. Essa vantagem, em conjunto com a preocupação com os efeitos adversos promovidos pelo uso dos medicamentos sintéticos, tem promovido a cada dia, um aumento no número de estudos científicos sobre as plantas e suas atividades terapêuticas, incentivando assim, o seu uso e a necessidade da descoberta e aprovação de novas fontes fitoterápicas menos iatrogênicas, de custo mais baixo e com eficácia comprovada (RATES, 2001; CALIXTO, 2005; AGRA et al., 2007).

Os gêneros *Spermacoce* e *Borreria*, pertencentes a família Rubiaceae, possuem aproximadamente 36 espécies, amplamente distribuídas em diversas aéreas e em diferentes países da América do Sul e Central, com grande diversidade no planalto brasileiro. A *Borreria verticillata* (L.) G. Mey é uma planta herbácea, caracterizada como uma erva daninha prejudicial ao desenvolvimento da vegetação ao seu redor, mas suas folhas, caules, flores e seu óleo essencial apresentaram diversos usos na terapêutica tradicional, tratando diversas doenças, incluindo as inflamatórias (AGUIAR et al., 2010; CONSERVA et al., 2012; ABDULLAHI-GERO et al., 2014; BALDÉ et al., 2015).

Estudos de Lima e colaboradores (2014), permitiram além do estudo fitoquímico do extrato aquoso das folhas de *B. verticillata* (L.) G. Mey (EFBV), a separação de frações a partir de partições com solventes orgânicos e a identificação de um flavonoide e um ácido fenólico extraídos a partir deste extrato, conhecidos como rutina e ácido clorogênico, respectivamente, relatados pela primeira vez na *B. verticillata* (L.) G. Mey. O flavonoide rutina foi o principal composto encontrado seguido pelo ácido clorogênico, identificados por tempo de retenção e absorção UV em comparação com os respectivos padrões. As condições de HPLC, permitiram uma boa separação para o ácido fenólico e flavonóides, sendo a quantidade de ácido clorogênico e da quercetina-3-O-rutinosídeo (rutina) nas folhas de *B. verticillata* (L.) G. Mey, de 0,022 e 0,248%, respectivamente.

O extrato de *B. verticillata* (L.) G. Mey vem mostrando efetividade ao longo dos anos, em uma gama de atividades, como analgésica, antipirética, anti-inflamatória, anti-tumoral, antimicrobiana, antioxidante e hepatoprotetora, ações estas, confirmadas pela presença de uma infinidade de compostos como alcaloides, iridoides, flavonoides e terpenoides. Sendo alguns

iridoides responsáveis por ações sobre a inibição do TNF- $\alpha$ , a redução da produção de IL-1 $\beta$  e PGE<sub>2</sub>, além de ações na artrite reumatoide. Estudos também evidenciaram baixa toxicidade do extrato da folha de BV *in vivo*, concluindo que a DL<sub>50</sub> do extrato esta acima de 5000mg/kg, por este motivo, utilizamos a dose de BV de 1000mg/kg (ABDULLAHI-GERO et al., 2014; AGUIAR et al., 2010; MOREIRA et al., 2010; CONSERVA et al., 2012; FERREIRA-JUNIOR et al., 2012; MURTALA et al., 2015).

Diversos estudos mostram que flavonoides e substâncias fenólicas são capazes de interferir no processo inflamatório, representando um incentivo a ampliação deste estudo, de forma a explicar alguns dos usos populares desta espécie. Estudos científicos mostraram que a rutina produz efeito anti-inflamatório pela redução da síntese de prostaglandinas, através da inibição da enzima cicloxigenase, bem como a inibição da secreção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- $\alpha$  e a IL-1 (CAZAROLLI et al., 2008). Além disso, a literatura também relata efeitos anti-inflamatórios do ácido clorogênico, evidenciado pela inibição do edema da pata induzido por carragenina e da fase inflamatória da nocicepção induzida por formalina em ratos (SANTOS et al., 2006).

Diante do exposto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito antinociceptivo e anti-inflamatório do extrato aquoso das folhas da *Borreria verticillata* (L.) G. Mey. (EFBV), bem como de frações (flavonoídica (Flav), butanólica (BuOH) e acetato de etila (AcOEt)) e compostos (rutina e ácido clorogênico) derivados deste extrato, buscando evidenciar possíveis mecanismos envolvidos com estas atividades.

Para avaliar a atividade antinociceptiva do EFBV foram utilizados dois modelos farmacológicos, de forma que possíveis mecanismos centrais e periféricos fossem investigados. O primeiro modelo utilizado foi das contorções abdominais induzidas por ácido acético, este é considerado um modelo de triagem de compostos sintéticos e naturais, através de estímulo químico, utilizado para o estudo da atividade antinociceptiva periférica. A administração intraperitoneal do ácido acético promove uma irritação que desencadeia uma peritonite, ativando nociceptores locais que desencadeiam um reflexo motor espinal de contorções abdominais caracterizadas por torção do tronco com extensão dos membros posteriores, sendo estes comportamentos indicativos de nocicepção, sendo possível sua observação e mensuração em um período de 30 minutos (KOSTER et al., 1959; PARVEEN et al., 2007).

A peritonite causada pela administração do ácido acético, transmite ao sistema nervoso central estímulos nociceptivo, resultantes da síntese e liberação de mediadores pró-inflamatórios como as prostaglandinas (PGE<sub>2</sub>, PGE<sub>2 $\alpha$</sub>  e PGF<sub>2</sub>), além de produtos oriundos da

lipoxigenase. Alguns autores acreditam que algumas citocinas como IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e quimiocinas como IL-8, também estejam envolvidas com o processo das contorções abdominais (VERMA et al., 2005, VERRI et al., 2006; PARVEEN et al., 2007).

Neste modelo, observamos que as doses de 100, 300 e 1000 mg/kg de EFBV administradas por via oral, promoveram uma redução dose-dependente no número de contorções abdominais induzidas por ácido acético. Da mesma forma, a indometacina, utilizada como controle positivo deste modelo, um anti-inflamatório não-esteroidal inibidor não seletivo da enzima cicloxigenase, uma importante enzima envolvida na síntese de PGE<sub>2</sub> (mediador responsável pela sensibilização de nociceptores e indução da hiperalgesia inflamatória), também inibiu as contorções abdominais induzidas por ácido acético (BRUNTON et al., 2012). Estes resultados indicam um possível efeito antinociceptivo do EFBV. Entretanto, este método é pouco específico, tornando sempre necessários novos ensaios para confirmar e determinar os possíveis mecanismos envolvidos com a antinocicepção obtida neste extrato.

Diante deste resultado, seguimos na avaliação da atividade do EFBV no modelo de imersão da cauda (55 °C) que promove um reflexo motor espinal de retirada da cauda dos camundongos no momento da percepção do estímulo térmico doloroso (D'AMOUR E SMITH, 1941). Este modelo permite avaliar mecanismos antinociceptivos centrais semelhantes aos dos analgésicos opióides, cuja nocicepção aguda não-inflamatória é produzida pelo estímulo térmico local, capaz de ativar neurônios periféricos e centrais, excitando fibras termossensíveis e nociceptores (LE BARS et al. 2001).

O analgésico opióide fentanil é um derivado sintético da fenilpiperidina, mais potente que a morfina, que se liga a receptores opióides expressos em neurônios nociceptivos periféricos, espinais e supraespinais, reduzindo a condução do impulso destes neurônios, implicando na redução da condução da dor e diminuição da resposta dos animais diante de um estímulo doloroso (LAPA et al., 2007; BRUNTON, 2012). A eficácia terapêutica de fármacos opióides no modelo de retirada de cauda decorre principalmente da capacidade destes em hiperpolarizar neurônios espinais por abertura de canais de potássio (K<sup>+</sup>) (LE BARS et al. 2001). Por este motivo, o fentanil foi utilizado como controle positivo deste teste. Conforme esperado, o controle positivo fentanil promoveu um aumento significativo nos tempos de latências dos animais ao estímulo térmico na quase totalidade das avaliações, entretanto a administração oral de EFBV na dose de 1 g/kg não foi capaz de promover alterações no tempo de latência dos animais diante do estímulo térmico em nenhum dos tempos avaliados, sugerindo

assim que a antinocicepção do EFBV possivelmente esteja relacionada a mecanismos antinociceptivos de origem inflamatória.

Considerando que os resultados do extrato aquoso das folhas da *Borreria verticillata* (L.) G. Mey obtidos na avaliação de atividade antinociceptiva através dos modelos das contorções abdominais e de imersão de cauda são respostas dependentes da atividade motora dos animais, como movimentar o tronco e os membros durante as contorções abdominais ou retirar a cauda da água aquecida, tornou-se imprescindível a avaliação da influência do EFBV na atividade motora destes animais, evitando assim resultados falso-positivos diante da possibilidade da presença de atividade sedativa e/ou relaxante muscular no extrato.

O modelo utilizado para avaliação da atividade motora dos animais foi o *rota-rod*, no qual após a administração do EFBV, os animais foram conduzidos a uma barra giratória numa velocidade constante (12 r.p.m.), sendo quantificado por 1 minuto o tempo de permanência desses animais sobre a barra giratória (DUHAM & MYIA, 1957). O controle positivo geralmente utilizado neste modelo é o diazepam, um fármaco da classe dos benzodiazepínicos, depressor do sistema nervoso central (SNC), que promove sedação e incoordenação motora quando administrado em animais (VEENA et al., 2015).

Neste modelo, a administração intraperitoneal de diazepam (0,75 mg/kg), promoveu uma redução no tempo de permanência dos camundongos na barra giratória e, de forma contrária, o EFBV (1 g/kg) não modificou este parâmetro, revelando assim, que o EFBV não interfere na motricidade dos animais, reforçando a especificidade da atividade antinociceptiva do EFBV evidenciada no modelo de contorções abdominais induzida pelo ácido acético.

A resposta inflamatória aguda que se inicia no momento de uma lesão e/ou trauma, culmina no desenvolvimento de uma série de eventos, vasculares e celulares. A dor se origina da síntese e liberação de mediadores locais no momento do estímulo nocivo, que ativa nociceptores locais, promovendo a condução dessa informação dolorosa a níveis espinais e supra-espinais. No momento de uma resposta inflamatória intensa, ocorre o fenômeno de hipernocicepção, desencadeado pela liberação de prostanoídes e aminas, exacerbando a dor diante de estímulos nocivos. As respostas vasculares, facilitarão as respostas celulares, cujo os sinais de vermelhidão, calor e edema, auxiliarão na diapedese e direcionamento dos leucócitos até o local da inflamação em conjunto com a ação das quimiocinas, promovendo as ações de resolução da inflamação e destruição do agente agressor. Quando estes eventos se exarcebam, o uso de substâncias com atividades sobre os mediadores inflamatórios liberados durante o momento da resposta inflamatória aguda, são necessários, de forma a minimizar estes eventos,

como a vermelhidão, o edema e a dor, de forma a acelerar o processo de resolução da inflamação (KUMAR et al., 2010; BRUNTON, 2012).

A inibição da formação do edema é uma característica importante de fármacos que possuem propriedades anti-inflamatórias. O edema é um dos cinco sinais cardinais da inflamação, sendo desencadeado pela vasodilatação e pelo aumento da permeabilidade vascular com consequente extravasamento de fluidos, proteínas e células (KUMAR et al., 2010).

O potencial antiedematogênico do EFBV foi investigado através do modelo de edema de orelha induzida por óleo de cróton (TUBARO et al., 1986). A formação deste edema é mediada por histamina e serotonina na fase inicial (1ª hora) e pela síntese e liberação de prostaglandinas e leucotrienos na fase posterior (4ª hora) (PARVEEN et al., 2007). Estudos relatam, que o 12-O-tetradecanoilforbol-13-acetato, uma espécie de éster de forbol presente no óleo de cróton, promove o aumento da expressão de óxido nítrico sintase induzível e ciclooxigenase-2 (LEE et al., 2013).

O controle positivo utilizado neste modelo é a Dexametasona, um anti-inflamatório esteroidal, caracterizado por diversas ações sobre a transcrição de genes, estimulando a produção de lipocortina (anexina-1) que age inibindo a Fosfolipase A<sub>2</sub>, enzima crucial na síntese dos eicosanoides, além de inibir a síntese de mediadores inflamatórios relevantes, em destaque o TNF- $\alpha$  e a IL-1, além da redução da expressão de COX-2 (BRUNTON, 2012).

A administração oral do extrato aquoso das folhas da *Borreria verticillata* (L.) G. Mey. (1 g/kg), produziu efeito antiedematogênico, sendo este resultado indicativo da atividade anti-inflamatória do EFBV. Contudo, é sabido que fármacos vasoconstritores podem reduzir o edema por mecanismos que não interferem na resposta inflamatória (BRUNTON, 2012).

Proseguimos a avaliação da atividade anti-inflamatória do EFBV utilizando o modelo de pleurisia induzida por carragenina, um polissacarídeo sulfatado isolado de algas. Neste modelo, a carragenina induz uma inflamação química e local na pleura, similar a produzida por doenças infecciosas e inflamatórias neste local (VINNEGAR et al., 1973). Como consequência, é possível observar um aumento de exsudato e do número de células inflamatórias na cavidade pleural, sendo esta migração dependente da síntese e liberação de mediadores quimioatraentes como leucotrienos (LTB<sub>4</sub>), citocinas (IL-1 e TNF- $\alpha$ ) e quimiocinas (KC e MIP-2) (KROGEL & ANTONY, 1997; FRODE et al., 2001; AFONSO et al., 2012; SANZ E KUBES, 2012). O direcionamento dos leucócitos até o local da origem da inflamação tem como principal objetivo o reconhecimento e a neutralização e/ou destruição de agentes estranhos/agressores (KUMAR

et al., 2010). A inibição da migração leucocitária também é indicada como uma característica de fármacos com propriedades anti-inflamatórias (LAPA et al. 2007).

Na busca de compostos ativos, a partição do extrato aquoso das folhas da *Borreria verticillata* (L.) G. Mey. com solventes orgânicos (acetato de etila e butanol), facilitou a identificação de três frações distintas que serão testadas neste modelo, a fração acetato de etila (AcOEt), a fração butanólica (BuOH) e a fração flavonoídica (Flav), que favoreceram o isolamento do composto ácido clorogênico, isolado a partir da fração acetato de etila com rendimento de 3% (22,7 mg) e o flavonóide rutina, isolado a partir da fração flavonoídica, identificada a partir da fração butanólica, com rendimento de 58% (225 mg), compostos estes majoritários nas frações e com previsível participação nas atividades antinociceptiva e anti-inflamatório do EFBV, testados a seguir.

Os resultados deste modelo mostraram que a administração oral de EFBV (1 g/kg) inibiu a migração leucocitária para a cavidade pleural induzida pela carragenina. Estes resultados reforçam o indicativo de efeito anti-inflamatório do EFBV. Da mesma forma, foi possível observar que a administração oral das frações extraídas a partir do extrato aquoso das folhas de *B. verticillata* (L.) G. Mey, as frações flavonoídica (Flav), butanólica (BuOH) e acetato de etila (AcOEt), também foram capazes de promover uma redução significativa da migração leucocitária, indicando que essas frações retiveram diferentes compostos responsáveis pelos efeitos anti-inflamatórios do EFBV e sugerindo que este efeito provavelmente decorra de uma ação sinérgica destes compostos, por mecanismos de ações diferentes, tendo em vista a possibilidade da presença de diversos compostos químicos diferentes como alcaloides, iridoides e flavonoides.

A identificação do ácido clorogênico e da rutina com a partição do EFBV explica os resultados anti-inflamatórios observados com o extrato e com as frações, no modelo de pleurisia induzida por carragenina, considerando que estudos de Chauhan e colaboradores (2012) e Torres-Rêgo e colaboradores (2016), dentre outros, já revelaram a efetividade destes compostos na inibição da dor e da inflamação.

Com frequência, os extratos de plantas podem conter inúmeros constituintes químicos como alcaloides, flavonoides, dentre outros, que podem agir sinergicamente na produção de uma determinada atividade farmacológica, como exemplo disto, estudos provaram que diferentes compostos de *Croton urucurana* (Sangra D'agua), como ácido acetilaleuritólico, catequina e galocatequina, possuem efeitos antinociceptivos com potência igual ou inferior aos

extratos e frações, sugerindo que isoladamente eles não agem tanto quanto em conjunto (CALIXTO et al., 2000).

As atividades antiedematogênica e anti-inflamatória do EFBV e dos compostos rutina e ácido clorogênico passaram a ser estudadas utilizando o modelo de artrite induzida por zimosan. Esta escolha foi fundamentada na possibilidade de avaliar diferentes parâmetros inflamatórios, tais como a formação do edema e a migração de leucócitos, usando um único modelo de doença inflamatória de importância clínica. Além disso, este modelo permite a caracterização de possíveis mecanismos de atividades, através da dosagem de citocinas e quimiocinas nas articulações inflamadas. Finalmente, a utilização deste modelo permite a redução do número de animais utilizados em experimentação, justificando assim sua implementação também por motivos éticos.

Neste método, a administração na articulação fêmur-tibial de zimosan, um glicano derivado da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae*, induz uma severa e rápida (2-6 h) mono-artrite por mecanismos dependente da ativação de receptores Toll-like 2 e do sistema complemento local. A ativação de receptores Toll-like 2 pelo zimosan promove, via ativação do fator NF- $\kappa$ B, aumento da expressão de genes e da síntese de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias locais, tais como o TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , MIP-2, IL-8/KC, além do aumento da expressão de COX-2 e, conseqüentemente, da síntese de PGE<sub>2</sub>, que culminam na propagação de uma inflamação característica de uma artrite reumatoide, doença auto-imune associada a inflamação, edema, hiperalgesia e aumento da migração leucocitária nas articulações afetadas. Estes eventos, possibilitam mensurar o inchaço da articulação (edema) e o aumento do número de leucócitos na cavidade articular (migração leucocitária), além de possibilitar a dosagem de citocinas e quimiocinas de macerado articular (KEYSTONE et al., 1977; ROCHA et al., 2003; GUERRERO et al., 2012).

A administração oral de EFBV (1 g/kg) 1 hora após a injeção de zimosan na cavidade articular da articulação fêmur-tibial foi capaz de reduzir o edema articular e a migração de leucócitos em 6 horas para a cavidade afetada. De forma semelhante, os compostos rutina e ácido clorogênico inibiram de forma dose-dependente a formação do edema articular e a migração leucocitária.

Estes resultados evidenciam o potencial terapêutico do EFBV na artrite, uma doença inflamatória crônica de alta relevância clínica. Além disso, estes resultados reforçam os indicativos de efeito anti-inflamatório do EFBV, sugerindo que o flavonóide rutina e o

composto fenólico ácido clorogênico são importantes compostos ativos que participam dos efeitos biológicos do EFBV.

Em seguida, investigamos se o efeito anti-artrite do EFBV, da rutina e do ácido clorogênico cursavam com a inibição da síntese de TNF- $\alpha$  na articulação inflamada. O TNF- $\alpha$  é uma citocina pró-inflamatória precoce, que inicia sua síntese nas primeiras duas horas (2 h) após o estímulo com zimosa, por isso a avaliação da concentração desta citocina foi realizada após duas horas do estímulo. Esta citocina é responsável por orquestrar respostas inflamatórias aguda e crônica, promovendo a síntese de outras citocinas e quimiocinas, tais como a IL-1 $\beta$ , IL-6 e IL-8, a síntese de NO, assim como ativando a cascata do ácido araquidônico, resultando na síntese dos eicosanoides, responsáveis pela caracterização dos sinais cardinais da inflamação, tais como o edema, a hiperemia, a hipernocicepção inflamatória e a migração de leucócitos (KUMAR et al., 2010; LAVETI et al., 2013; TURNER et al., 2014). A relevância do TNF- $\alpha$  para a progressão da artrite é bem descrita na literatura e levou ao desenvolvimento do infliximab, um anticorpo monoclonal anti-TNF- $\alpha$  utilizado clinicamente para o tratamento da artrite em humanos (THOMPSON et al., 2016).

Os resultados apontaram que o EFBV, a rutina e o ácido clorogênico nas maiores doses administradas por via oral, foram capazes de reduzir a concentração articular de TNF- $\alpha$ , sugerindo que os efeitos anti-inflamatório, antinociceptivo e anti-artrite obtidos envolvem a inibição do TNF- $\alpha$ , justificando os efeitos biológicos do EFBV, da rutina e do ácido clorogênico.

É importante ressaltar que mais estudos precisam ser realizados para elucidar os mecanismos de ação, descrevendo assim, de forma mais precisa os mecanismos envolvidos na antinocicepção e também nos mecanismos anti-inflamatórios envolvidos, de forma a comprovarmos as ações terapêuticas desta espécie e alicerçar esse entendimento ao uso popular da espécie pela população.

## 7. CONCLUSÕES

A presença dos compostos extraídos do extrato aquoso da folha de *Borreria verticillata* (L.) G. Mey indicam marcadores químicos para este gênero e família, aumentando os recursos para a classificação quimiotaxonômica desta espécie.

O uso de plantas medicinais como fonte de compostos bioativos se mantém como uma estratégia promissora que pode contribuir para o desenvolvimento de novas terapias.

Diante dos resultados obtidos, concluímos que:

- O EFBV possui atividade anti-inflamatória, evidenciado pela inibição da formação do edema e pela inibição da migração leucocitária, nos modelos de edema induzido por óleo de cróton, pleurisia induzida por carragenina e artrite por zimosan.
- O EFBV possui atividade antinociceptiva, provavelmente decorrente de seus efeitos anti-inflamatórios, evidenciados nos modelos de contorção induzida por ácido acético e no modelo de imersão da cauda.
- O EFBV não alterou a performance motora dos animais no modelo de *rota-rod*.
- As frações Flav, BuOH e AcOEt retiveram os compostos bioativos evidenciado pela inibição da migração de leucócitos no modelo de pleurisia induzida por carragenina.
- O EFBV e os compostos isolados do extrato, a rutina (Ru) e o ácido clorogênico (AC), mostraram atividade anti-artrite evidenciado pela inibição do edema articular e da migração de leucócitos para a articulação no modelo de artrite articular por zimosan.
- O EFBV, a Ru e o AC, reduziram a concentração articular de TNF- $\alpha$  na artrite articular por zimosan, justificando os efeitos antinociceptivo, anti-inflamatório e anti-artrite do extrato da folha de *Borreria verticillata* (L.) G. Mey e destes compostos isolados.

A inibição da migração leucocitária do extrato, frações e compostos, em conjunto com as atividades antiedematogênicas e antinociceptivas de EFBV são efeitos característicos de fármacos anti-inflamatórios como o anti-inflamatório esteroide dexametasona.

Estes resultados revelam o potencial terapêutico de *B. verticillata* (L.) G. Mey contra doenças inflamatórias, criando perspectivas para o tratamento de doenças inflamatórias

crônicas como a artrite reumatoide.

Os efeitos anti-inflamatórios e antinociceptivos observados nos modelos realizados com a *B. verticillata* (L.) G. Mey envolvem a presença de compostos flavonoides e fenólicos de bioatividade, como a rutina e o ácido clorogênico, podendo explicar o uso popular da espécie em doenças que envolvem a dor e a inflamação.

## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDULLAHI-GERO, H. S., AHMED, A., HUSSAINI, I. M. Preliminary evaluation of ethanol leaf extract of *Borreria verticillata* Linn (Rubiaceae) for analgesic and anti-inflammatory effects. **Journal of Medicinal Plants Research.**, Nigeria, v.8, n.20, p. 736-747, mai, 2014.

AFONSO P.V.; JANKA-JUNTTILA M.; LEE Y.J.; MCCANN C.P.; OLIVER C.M.; AAMER K.A.; LOSERT W.; CICERONE M.T.; PARENT C.A. LTB 4 is a signal-relay molecule during neutrophil chemotaxis. **Developmental cell**, v. 22, n. 5, p. 1079-1091, 2012.

AGRA, M de F., FREITAS, P. F., BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Brazilian Journal Pharmacognosy**, v. 17, n. 1, jan-mar, 2007.

AGUIAR, L. S., ANDRADE, F. F. R., SILVA, L. A. C., SILVA, M. C. P., RODRIGUES, K. A. F., AMARAL, F. M. M., COUTINHO-MORAES, D. F. Estudo farmacobotânico das folhas de *Borreria verticillata* (L.) g. Mey. (Rubiaceae). **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, São Luíz, v. 12, n. 2, p.84-90, 2010.

ASHLEY, N. T.; WEIL, Z. M.; NELSON, R. J. Inflammation: Mechanisms, Costs, and Natural Variation. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v. 43, p. 385–406, 2012.

BALDÉ A. M., PIETERS L. A., TRAORE M. S., CAMARA A., BALDÉ M. A, OULARE K., BARRY M. S., DIALLO M. S. T., BALDÉ E. S., DIANE S., VLIETINCK A. J. Chemotherapeutical evaluation of *Borreria verticillata* extracts. **Journal of Plant Sciences**, Nova York, v.3, n.1-2 p.28-31, dez, 2015.

BRAHMACHARI, G. **Bioactive Natural Products: Opportunities and Challenges in Medicinal Chemistry**. 1<sup>st</sup> ed. Singapura: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd., 2011, p.1-199.

BRASIL. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Brasília: Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, 2006, 136p.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) N° 10, de 9 de março de 2010. Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Ministério da saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) N° 26, de 13 de maio de 2010. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. Brasília: Ministério da saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2014.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B. C. **Goodman & Gilman: As Bases Farmacológicas da Terapêutica**. 12 ed. Porto Alegre: AMGH Editora, 2012.

BRZUSTEWICZ, E.; BRYL, E. The role of cytokines in the pathogenesis of rheumatoid arthritis – Practical and potential application of cytokines as biomarkers and targets of personalized therapy. **Cytokine**, v. 76, p. 527–536, 2015.

CALIXTO J. B, BERRITTO A., FERREIRA, J., SANTOS A. R., VAIDIN F., YUNES R. A. Naturally Occurring Anti-nociceptive Plants. **Phytotherapy Research**. v. 14, p. 401-418, 2000.

CALIXTO J. B. Twenty-five of research on medicinal plants in Latin America. **Journal of Ethnopharmacology**, n, v. 100, p. 131-134, 2005.

CAZAROLLI, L.H., ZANATTA, L., ALBERTON, E.H., FIGUEIREDO, M.S.R.B., FOLADORI, P., DAMAZIO, R.G., PIZZOLATTI, M.G., SILVA, F.R.M.B. Flavonoids: Prospective Drug Candidates. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v.8, n.13, p. 1429-1440, 2008.

CHAUHAN, P. S.; SATTI, N. K.; SHARMA, P.; SHARMA, V. K.; SURI, K. A.; BANI, S. Differential Effects of Chlorogenic Acid on Various Immunological Parameters Relevant to Rheumatoid Arthritis. **Phytotherapy Research**, v. 26, n. 8, p. 1156-1165, aug., 2012.

CHEN, W-P.; TANG, J-L.; BAO, J-P., HU, P-F.; SHI, Z-L.; WU, L-D. Anti-arthritis effects of chlorogenic acid in interleukin-1 $\beta$ -induced rabbit chondrocytes and a rabbit osteoarthritis model. **International Immunopharmacology**, v. 11, n. 1, p. 23–28, jan., 2011.

CHEN, W-Y.; HUANG, Y-C.; YANG, M-L., LEE, C-Y.; CHEN, C-J.; YEH, C-H.; PAN, P-H.; HORNG, C-T.; KUO, W-H.; KUAN, Y-H. Protective effect of rutin on LPS-induced acute lung injury via down-regulation of MIP-2 expression and MMP-9 activation through inhibition of Akt phosphorylation. **International Immunopharmacology**, v. 22, n. 2, p. 409–413, oct., 2014.

CHERIGO, L.; LEZCANO, J.; SPADAFORA, C.; MARTÍNEZ-LUIS, S. Evaluation of phytotoxic, cytotoxic and antiparasitic *in vitro* activities of *Borreria verticillata*, a weed of Panamanian coffee crops. **Bioscience Research**, v. 9, n. 2, p. 82-86, 2012.

CHUA, L. S. A review on plant-based rutin extraction methods and its pharmacological activities. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, n. 3, p. 805–817, dec., 2013.

CONSERVA, L. M., FERREIRA, J. C. *Borreria* and *Spermacoce* species (*Rubiaceae*): A review of their ethnomedicinal properties, chemical constituents, and biological activities. **Pharmacognosy Reviews**, v. 6, n. 11, p.46-55, 2012.

CONTE F. P.; MENEZES-DE-LIMA O. J. R.; VERRI W.A. J. R.; CUNHA F. Q.; PENIDO C.; HENRIQUES M. G. Lipoxin A (4) attenuates zymosan-induced arthritis by modulating endothelin-1 and its effects. **British Journal of Pharmacology**, v.161, n.4, p.11-24, 2010.

CORNEJO-GARCÍA, J. A.; PERKINS, J.; JURADO-ESCOBAR, R.; GARCÍA-MARTÍN, E.; AGÚNDEZ, J. A.; VIGUERA, E.; PÉREZ-SÁNCHEZ, N.; BLANCA-LÓPEZ, N. Pharmacogenomics of Prostaglandin and Leukotriene Receptors. **Frontiers Pharmacology**, v. 7, n. 316, p. 1-9, 2016.

CRAIG, A.P., FIELDS, C., LIANG, N., KITTS, D., ERICKSON, A. Performance review of a fast HPLC-UV method for the quantification of chlorogenic acids in green coffee bean extracts. **Talanta**, v. 154, p. 481–485, 2016.

D' AMOUR, F.; SMITH, D. A method for determining loss of pain sensation. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics.**, v.72, p.74-79, 1941.

D'MELLO, R.; DICKENSON, A. H. Spinal cord mechanisms of pain. **British Journal of Anaesthesia**, v. 101, n. 1, p. 8–16, 2008.

DINAKAR, P.; STILLMAN, A. M. Pathogenesis of Pain. In: *Seminars in Pediatric Neurology*. **WB Saunders**, v. 23, n. 3, p. 201-208, 2016.

DOMICIANO, T. P.; DALALIO, M. M.; SILVA, E. L.; RITTER, A. M.; ESTEVÃO-SILVA, C. F.; RAMOS, F. S.; CAPARROZ-ASSEF, S. M.; CUMAN, R. K.; BERSANI-AMADO, C. A. Inhibitory effect of anethole in nonimmune acute inflammation. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, n.386, p.331-338, 2013.

DUHAM, N. W.; MYIA, T. S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **Journal of the American Pharmacists Association**. v.46, p.208-209, 1957.

EFFERTH, T., ZACCHINO, S., GEORGIEV, M. I., LIU L., WAGNER, H., PANOSSIAN A. Editorial: Nobel Prize for artemisinin brings phytotherapy into the spotlight. **Phytomedicine**. v.22, p. A1-A3, dez, 2015.

FALCÃO, H de S.; LIMA, I. O.; SANTOS, V. L.; DANTAS, H. de F.; DINIZ, M de F. F. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; BATISTA, L. M. Review of the plants with the anti-inflammatory activity studied in Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v.15, n.4, p. 381-391, out-dez, 2005.

FERREIRA-JUNIOR, C. J., LEMOS, R. P. L., CONSERVA, L. M. Chemical constituents from *Spermacoce verticillata* (*Rubiaceae*). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 44, p. 208–211, 2012.

FRIAS, B.; MERIGHI, A. Capsaicin, nociception and pain. **Molecules**, v. 21, n. 6, p. 797, 2016.

FRODE T.S.; SOUZA G.E.; CALIXTO J.B. 2001. The modulatory role played by TNF-alpha and IL-1 beta in the inflammatory responses induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. **Cytokine**, v. 13, n. 3, p. 162-168, 2001.

FURTADO, A. A; TORRES-RÊGO, M.; LIMA, M. C. J. S., BITENCOURT, M. A. O.; ESTRELA, A. B.; SILVA, N. S.; SIQUEIRA, E. M. DA S.; TOMAZ, J. C.; LOPES, N. P.; SILVA-JÚNIOR, A. A.; ZUCOLOTTO, S. M.; FERNANDES-PEDROSA, M. F. Aqueous extract from *Ipomoea asarifolia* (*Convolvulaceae*) leaves and its phenolic compounds have anti-inflammatory activity in murine models of edema, peritonitis and air-pouch inflammation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 192, p. 225–235, nov., 2016.

GANESHPURKAR, A.; SALUJA, A. K. Review: The Pharmacological Potential of Rutin. **Saudi Pharmaceutical Journal**, 2016.

GHASEMIAN, M.; OWLIA, S.; OWLIA, M. B. Review of Anti-Inflammatory Herbal Medicines. **Hindawi Publishing Corporation**, v. 2016, 2016.

GUARDIA, T.; ROTELLI, A. E.; JUAREZ, A. O.; PELZER, L. E. Protective effect of rutin on LPS-induced acute lung injury via down-regulation of MIP-2 expression and MMP-9 activation through inhibition of Akt phosphorylation. **Farmaco**, v. 56, n. 9, p. 683–687, 2001.

GUERRERO, A. T. G.; CUNHA, T. M.; VERRI-JUNIOR, W.A.; GAZZINELLI, R. T.; TEIXEIRA, M. M.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. Toll-like receptor 2/MyD88 signaling mediates zymosan-induced joint hypernociception in mice: Participation of TNF-alpha, IL-1 beta and CXCL1/KC. **European Journal of Pharmacology**, v. 674, n. 1, p. 51-57, 2012.

HAN, J.; ULEVITCH, R. J. Limiting inflammatory responses during activation of innate immunity. **Nature Immunology**, v. 6, n. 12, 2005.

HAN, Y. Rutin has therapeutic effect on septic arthritis caused by *Candida albicans*. **International Immunopharmacology**, v. 9, n. 2, p. 207-211, feb., 2009.

HARIZI, H.; CORCUFF, J. B.; GUALDE, N. Arachidonic-acid-derived eicosanoids: roles in biology and immunopathology. **Trends in Molecular Medicine**, v. 14, n.10, p. 461-469, 2008.

HENSON, P. M. Dampening inflammation. **Nature Immunology**, v. 6, n. 12, p. 1179-1181, 2005.

HOLL, E. K.; ALLEN, I. C.; MARTINEZ, J. Holding the Inflammatory System in Check: TLRs and NLRs. **Hindawi Publishing Corporation**, v. 2016, 2016.

INOUE, A.; MATSUMOTO, I.; TANAKA, Y.; UMEDA, N.; TAKAI, C.; KAWAGUCHI, H.; TAKAHASHI, S. TIARP attenuates autoantibody-mediated arthritis via the suppression of neutrophil migration by reducing CXCL2/CXCR2 and IL-6 expression. **Scientific Reports**, v. 6, 2016.

JANSSEN, P. A.; NIEMEGEREERS, C. J.; DONY, J. G. The inhibitory effect of fentanyl and other morphine-like analgesics on the warm water induced tail withdrawal reflex in rats. **Arzneimittel-forschung**, v. 13, p. 502-507, 1963.

JI, H-F., LI, X-J., ZHANG, H-Y. Natural products and drug discovery. **EMBO reports**, Germany, v. 10, n. 3, p. 194-200, 2009.

JOHNSON, Craig. Research Tools for the Measurement of Pain and Nociception. **Animals**, v. 6, n. 11, p. 71, 2016.

KAEWPUT W.; DISORN P.; SATIRAPOJ B. Selective cyclooxygenase-2 inhibitor use and progression of renal function in patients with chronic kidney disease: a single-center retrospective cohort study. **International Journal of Nephrology and Renovascular Disease**, v. 9, p. 273-278, 2016.

KALA, S. C. A short review on *Rubiaceae* species. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 5, n. 2, abr-jun, p. 179-181, 2015.

KANDEL, E.; SCHWARTZ, J.; JESSELL, T.; SIEGELBAUM, S.; HUDSPETH, A.J. **Princípios de neurociências**. 5 ed, Porto Alegre: AMGH Editora, 2014.

KEYSTONE E. C., SCHORLEMMER H. U., POPE C., ALLISON C. Zymosan-Induced Arthritis. **Arthritis Rheumatology**, v. 20, n.7, p. 1396-1401, 1977.

KLAUMANN, P. R.; WOUK, A. F. P. F.; SILLAS, T. Patofisiologia da dor (Pathophysiology of pain). **Archives of Veterinary Science**, v. 13, n.1, p.1-12, 2008.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; DE BEER, E. J. Acetic acid for analgesic screening. **Federation Proceedings**, v.18, p.412, 1959.

KROGEL C. & ANTONY V.B. 1997. Immunobiology of pleural inflammation: potential implications for pathogenesis, diagnosis and therapy. **European Respiratory Journal**, v. 10, n. 10, p. 2411-2418, 1997.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N.; ASTER, J. C. **Robbins & Cotran: Patologia Bases patológicas das doenças**. 8º ed., 2010, Elsevier.

KUNER, R. Central mechanisms of pathological pain. **Nature Medicine**, v. 16, n. 11, p. 1258-1266, 2010.

LAHLOU, M. The Success of Natural Products in Drug Discovery. **Pharmacology & Pharmacy**, v. 4, p. 17-31, 2013.

LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; CASTRO, M. S. DE A.; LIMA, T. C. M. **Plantas Mediciniais: Métodos de avaliação da atividade farmacológica**. 5ª ed., 2007, São Paulo: SBPC.

LAVETI, D.; KUMAR, M.; HEMALATHA, R.; SISTLA, R.; NAIDE, V. G. M.; TALLA, V.; VERMA, V.; KAUR, N.; NAGPAL, R. Anti-Inflammatory Treatments for Chronic Diseases: A Review. **Inflammation Allergy Drug Targets**, v. 12, n. 5, p. 349-361, 2013.

LAWRENCE, T.; WILLOUGHBY, D. A.; GILROY, D. W. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. **Nature. Reviews Immunology**, v. 2, n. 10, p. 787-795, 2002.

LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S.W. Animal models of nociception. **Pharmacology Reviews**, v.53, p.597-652, 2001.

LEE H.N.; CHO H.J.; LIM DO Y.; KANG Y.H.; LEE K.W.; PARK J.H. 2013. Mechanisms by which licochalcone e exhibits potent anti-inflammatory properties: studies with phorbol ester-treated mouse skin and lipopolysaccharide-stimulated murine macrophages. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 14, n. 6, p. 10926-10943, 2013.

LI, J. L.; LIM, C. H.; TAY, F. W.; GOH C. C., DEVI S.; MALLERET, B.; ... TANIZAKI, H. Neutrophils self-regulate immune complex-mediated cutaneous inflammation through CXCL2. **Journal of Investigate Dermatology**, v. 136, n. 2, p. 416-424, 2016.

LIANG, N., KITTS, D.D. Role of Chlorogenic Acids in Controlling Oxidative and Inflammatory Stress Conditions. **Nutrients**, v. 8, n. 16, p. 1-20, 2016.

LIMA, I. C. **Avaliação do Perfil Fitoquímico e atividade anti-inflamatória da espécie *Spermacoce verticillata* L. (Rubiaceae).** Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro; 2016 p. 29-31.

LIMA, I. C., NORA, R., CARVALHO, M. G., CHAVES, D. S. A. Distribution and chemotaxonomic significance of phenolic compounds in *Spermacoce verticillata* (L.) G. Mey. **Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research**, v. 2, n. 1, p. 14-18, 2014.

LIMA, J. J. F. As Plantas na História da Dor. **Revista da Sociedade Portuguesa de Anestesiologia**, v. 22, n. 4, p. 126- 133, 2013.

LOU, L.; ZHOU, J.; LIU, Y.; WEI, Y.; ZHAO, J.; DENG, J.; DONG, B., ZHU, L.; WU, A.; YANG, Y.; CHAI, L. Chlorogenic acid induces apoptosis to inhibit inflammatory proliferation of IL-6-induced fibroblast-like synoviocytes through modulating the activation of JAK/STAT and NF- $\kappa$ B signaling pathways. **Experimental and Therapeutic Medicine.**, v. 11, n. 5, p. 2054-2060, mai., 2016.

MARCHAND, S. The Physiology of Pain Mechanisms: From the Periphery to the Brain. **Rheumatic Disease Clinics of North America** v. 34, n. 2, p. 285–309, 2008.

MITSI, V.; ZACHARIOU, V. Modulation of pain, nociception, and analgesia by the brain reward center. **Neuroscience**, v. 338, p. 81-92, 2016.

MOREIRA, V. F., OLIVEIRA, R. R., MATHIAS, L., BRAZ-FILHO, R., VIEIRA, I. J. C. New Chemical Constituents from *Borreria verticillata* (Rubiaceae). **Helvetica Chimica Acta**, v. 93, p. 1751-1757, 2010.

MURTALA, Y., BABANDI, A., SUNUSI, M. M., SHEHU, D., BABAGANA, K., ALHASSAN, A. J. Effect of Aqueous Leaf Extract of *Borreria verticillata* Species of Sudano-Sahelian Savanna on CCl<sub>4</sub> Induced Hepatotoxicity. **Journal of Natural Sciences Research**, v. 5, n.24, p. 73-78, 2015.

NA, J-Y.; SONG, K.; KIM, S.; KWON, J. Rutin protects rat articular chondrocytes against oxidative stress induced by hydrogen peroxide through SIRT1 activation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 473, n. 4, p. 1301-1308, mai., 2016.

NEWMAN D. J., CRAGG G. M. Natural Products As Sources of New Drugs over the 30 Years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, Washington D.C., v. 75, p. 311–335, 2012.

OGUNWANDE, I. A., WALKER, T. M., BANSAL, A., SETZER, W. N., ESSIEN, E. E. Essential oil constituents and biological activities of *Peristrophe bicalyculata* and *Borreria verticillata*. **Natural Product Communications.**, v. 5, n. 11, p. 1815-1818, 2010.

PARVEEN, Z.; DENG, Y.; SAEED, M.K.; DAI, R.; AHAMAD, W.; YU, Y.H. Antiinflammatory and analgesic activities of *Thesium chinese* Turcz extracts and its major flavonoids, kaempferol and kaempferol-3-O-glucoside. **Yakugaku Zasshi**, v.127, p.1275-1279, 2007.

PEIXOTO-NETO, P. A. de S.; SILVA, M. V.; CAMPOS, N. V. C.; PORFÍRIO, Z.; CAETANO, L. C. Antibacterial activity of *Borreria verticillata* roots. **Fitoterapia**, v. 73, n. 6, p. 529–531, 2002.

PERINI, J. A.; ANGELI-GAMBA, T.; ALESSANDRA-PERINI, J.; FERREIRA, L. C.; NASCIUTTI, L. E.; MACHADO, D. E. Topical application of Acheflan on rat skin injury accelerates wound healing: a histopathological, immunohistochemical and biochemical study. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 15, n. 1, p. 203, 2015.

PETERSON, K.; ANDERSON, J.; FERGUSON, L.; MACKEY, K. Evidence Brief: The Comparative Effectiveness of Selected Complementary and Integrative Health (CIH) Interventions for Preventing or Reducing Opioid Use in Adults with Chronic Neck, Low Back, and Large Joint Pain. Abr. 2016.

PETROVSKA, B. B. Historical review of medicinal plants' usage. **Pharmacognosy Reviews**, v. 6, n. 11, p. 1-5, 2012.

PORTER, D. G. Ethical scores for animal experiments. **Nature**. v.356, n.6365, p.101-102. 1992.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M.; FLOWER, R.J.; HENDERSON, G. **Rang & Dale: Farmacologia**. 7 ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

RASOULI, H., FARZAEI, M.H., MANSOURI, K., MOHAMMADZADEH, S., KHODARAHMI, R. Plant Cell Cancer: May Natural Phenolic Compounds Prevent Onset and Development of Plant Cell Malignancy? A Literature Review. **Molecules**, v. 21, n.9, p. 1104-1130, 2016.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, Amsterdam, v.39, p.603-613, 2001.

ROCHA, F. A.C. et al. Efeito de inibidores da sintase de óxido nítrico na dor inflamatória articular e influxo celular da artrite induzida por zymosan em ratos. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 43, n. 4, p. 206-17, 2003.

RUFINO, M. do S. M., ALVES, R. E., BRITO, E. S., PÉREZ-JIMÉNEZ, J., SAURA-CALIXTO F., MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, V. 121, P. 996–1002, 2010.

SAHOO, N., MANCHIKANTI, P., DEY, S. Review: Herbal drugs: Standards and regulation. **Fitoterapia**, v. 81, p. 462–471, 2010.

SANTOS, M. D.; ALMEIDA, M. C.; LOPES, N. P.; DE SOUZA, G. E. P. Evaluation of the anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the natural polyphenol chlorogenic acid. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, n. 11, p. 2236-2240, 2006.

SANZ M.J & KUBES P. 2012. Neutrophil-active chemokines in in vivo imaging of neutrophil trafficking. **European Journal of Immunology**, v. 42, n. 2, p. 278-283, 2012.

SALVAMANI, S., GUNASEKARAN, B., SHAHARUDDIN, N.A., AHMAD, S.A., SHUKOR, M.Y. Antiatherosclerotic Effects of Plant Flavonoids. **BioMed Research International**, p. 1-11, 2014.

SMOLEN, J. S.; ALETAHA, D.; MCLNNES, I. B. Rheumatoid arthritis. **Lancet**, v. 388, p. 2023–2038, 2016.

SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. Biometry: The principles and Practice of Statistics. New York: **W. H. Freeman**, p. 859, 1981.

THOM, E. The Effect of Chlorogenic Acid Enriched Coffee on Glucose Absorption in Healthy Volunteers and Its Effect on Body Mass When Used Long-term in Overweight and Obese People. **Journal of International Medical Research**, v. 35, n.6, p. 900 – 908, 2007.

THOMPSON, C.; DAVIES, R.; CHOY, E. Review article Anti cytokine therapy in chronic inflammatory arthritis. **Cytokine**, v. 86, p. 92–99, 2016.

TORRES-RÊGO, M., FURTADO, A. A.; BITENCOURT, M. A. O.; LIMA, M. C. J. DE S.; RAFAEL CAETANO ANDRADE, R. C. L. C.; AZEVEDO, E. P.; SOARES, T. DA C.; TOMAZ, J. C.; LOPES, N. P.; SILVA-JÚNIOR, A. A.; ZUCOLOTTI, S. M.; FERNANDES-PEDROSA, M. DE F. Anti-inflammatory activity of aqueous extract and bioactive compounds identified from the fruits of *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae), **BMC complementary and alternative medicine**, v. 16, n. 1, p. 275, aug., 2016.

TUBARO, A.; DRI, P.; MELANO, M.; MULAS, G.; BIANCHI, P.; DEL NEGRO, P.; DELLA LOGGIA, R. 1986. In the Croton Oil Ear Test the Effects of non-Steroidal Anti-inflammatory Drug (NSAIDs) are Dependent on the Dose of the Irritant. **Agents Actions** 19: 371-373.

TURNER, M. D.; NEDJAI, B.; HURST, T.; PENNINGTON, D. J. Review - Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1843, n. 11, p. 2563–2582, 2014.

UPADHYAY, R., RAO, J.M. An outlook on chlorogenic acids – Occurrence, chemistry, technology, and biological activities. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 53, n. 9, p. 968-984, 2013.

USHIE, O. A., ADAMU, H. M., OGAR, D. A., GUNDA, H. J. Phytochemistry of *Borreria verticillata* Stem Bark. **International Journal of Traditional and Natural medicines.**, v. 2, n. 2, p. 97-103, 2013.

VEENA, N. Sundara et al. Skeletal muscle relaxant property of diazepam by using rotarod on albino mice. **International Journal of Applied and Basic Medical Research.**, v. 4, p. 714-721, 2015.

VERMA, P. R.; JOHARAPURKAR, A. A.; CHATPALLIWAR, V. A.; ASNANI, A. J. Antinociceptive activity of alcoholic extract of *Hemidesmus indicus* R. Br. in mice. **Journal of Ethnopharmacology.**, v. 102, n. 2, p. 298-301, 2005.

VERRI JR., W.A.; CUNHA, T. M.; PARADA, C. A.; POOLE, S.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: Targets for analgesic drug development? **Pharmacology & Therapeutics**, v. 112, n.1, p. 116–138, 2006.

VINEGAR, R.; TRUAX, JF.; SELPH, J. L. Some quantitative temporal characteristics of carrageenin induced pleurisy in the rat. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 3, p.711-714, 1973.

WHO. Traditional Medicine Strategy 2002–2005. World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2002.

WHO. Traditional Medicine Strategy 2014–2023. World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2013.

YUAN, H., MA, Q., YE, L., PIAO, G. The Traditional Medicine and Modern Medicine from Natural Products. **Molecules**, Switzerland, v. 21, p. 559-577, 2016.

YUNES, R. A., PEDROSA, R. C., CECHINEL-FILHO, V. Fármacos e Fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p. 147-152, 2001.

ZHAO, Y., WANG, J., BALLEVRE, O., LUO, H., ZHANG, W. Antihypertensive effects and mechanisms of chlorogenic acids. **Hypertension Research**, v. 35, n.4, p. 370-374, 2011.

ZIMMERMANN, M. Ethical considerations in relation to pain in animal experimentation. **Acta Physiologica Scandinavica Supplement**. v. 554, p. 221-233. 1986.

ZIMMERMANN, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. **Pain**. v. 16, n. 2, p. 109-110. 1983.