



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

- PONTO FOCAL - PIAUÍ

**Constituição química e estudo de atividades anti-inflamatória e antinociceptiva das
vagens de *Samanea tubulosa* Benth.**

Tamnata Ferreira Alixandre

Teresina – PI
2018

TAMNATA FERREIRA ALIXANDRE

**Constituição química e estudo de atividades anti-inflamatória e antinociceptiva das
vagens de *Samanea tubulosa* Benth.**

Exame de Tese em nível de doutorado apresentado à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, ponto focal Piauí - da Universidade Federal do Piauí, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Amilton Paulo Raposo Costa

FICHA CATALOGRÁFICA

Serviço de Processamento Técnico da Universidade Federal do Piauí

Biblioteca Setorial de Floriano

A398c Alixandre, Tamnata Ferreira

Constituição química e estudo de atividades anti-inflamatória e antinociceptiva das vagens de *Samanea tubulosa* Benth./ Tamnata Ferreira Alixandre. - Teresina, PI, 2018.
114f.

Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO), Universidade Federal do Piauí – UFPI, Teresina, Piauí, 2018.

“Orientação: Prof. Dr. Amilton Paulo Raposo Costa.”

1. Antinocicepção. 2. Bordão de velho. 3. Inflamação. 4. *Samanea tubulosa* Benth. 5. Toxicidade aguda. I. Título.

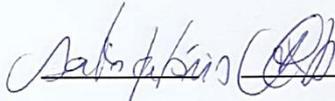
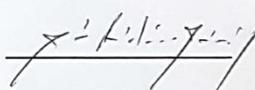
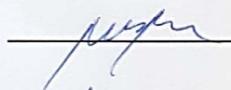
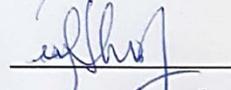
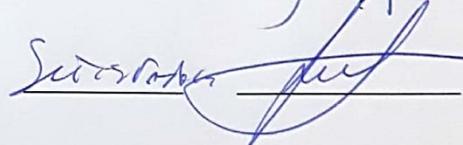
CDD 574.88

FOLHA DE APROVAÇÃO – DEFESA DE TESE

ALUNA: Tamnata Ferreira Alixandre

TÍTULO DO PROJETO: "Constituição química e estudo de atividades anti-inflamatória e antinociceptiva das vagens de *Samanea tubulosa* Benth.."

PROFESSOR ORIENTADOR: Prof. Dr. Amilton Paulo Raposo Costa

BANCA EXAMINADORA:	CONCEITO	ASSINATURA
Prof. Dr. Amilton Paulo Raposo Costa - UFPI (Presidente)		
Prof. Dr. José Ribeiro dos Santos Júnior - UFPI (Examinador)	Satisfatório	
Prof. Dr. José Milton Elias de Matos - UFPI (Examinadora)	Satisfatória	
Profa. Dra. Mariana Helena Chaves – UFPI (Examinadora)	Satisfatória	
Prof. Dr. Francisco das Chagas Araújo Sousa - UESPI (Examinador)	Satisfatório	

DATA DA AVALIAÇÃO: 26 de Outubro de 2018.

HORÁRIO: 09h

LOCAL: Auditório do Núcleo Integrado de Morfologia e Pesquisas com Células-tronco (NUPCell/UFPI)

Dedicatória

A Deus

A sabedoria é dom de Deus

Aos meus pais

Marcínio Alexandre de Sousa & Maria da Guia Ferreira pelo exemplo de amor e carinho.

Ao meu amor

Joaquim Borges Vieira Neto pelo amor e companheirismo.

Agradecimentos

Agradeço a Deus de todo coração por tudo e por todos...

À Universidade Federal do Piauí pela oportunidade de ter realizado o mestrado e agora o doutorado. E ao programa de doutorado em biotecnologia (RENORBIO), pela oportunidade de cursar o doutorado com excelente corpo docente.

Agradeço a Deus pela família que me deste, pelos pais maravilhosos que tenho e por ter nascido nesta família, com meu irmão Levi, tê-los ao meu lado fez com que as adversidades fossem mais leves e as alegrias fossem mais intensas.

À minha família em especial à minha avó Da paz, à minha tia avó Nazaré como carinhosamente gosto de chama-la Madamy, minha tia Joelma e minha Madrinha Joana, por estarem sempre ao meu lado e por suas orações e torcida para que eu alcance meus objetivos.

Agradeço ao meu amor Kim Neto, pelo amor, carinho e compreensão nos momentos em que estive ausente. Seu amor sempre tão sincero e carinhoso me fez ser mais forte sabendo que temos nosso lar para que eu pudesse voltar e ser acolhida.

Agradeço também por todas as pessoas que colocou em meu caminho para que a caminhada acontecesse no tempo certo. Sem elas e sua ajuda não teria chegado até aqui.

Ao meu orientador Amilton Paulo, agradeço por aceitar me orientar, pelo apoio, confiança, paciência, amizade e à alegria durante todos esses anos de convívio. Sou inteiramente grata por essa orientação, bem como o imenso carinho nos momentos de dificuldade.

À prof. ^a Fernanda Regina por gentilmente ter disponibilizado o laboratório de dor para que os experimentos fossem realizados.

À prof. ^a Mariana Helena pela ajuda na partição do extrato e purificação das frações.

Ao prof. Valdir Cechinel pela análise da fração hexânica e por sua ajuda sempre que solicitado.

Às minhas amigas de sempre Marluce e Rejane, pela amizade, por toda ajuda e convívio juntas.

Ao Bruno colega de turma de doutorado, o Benedito, a Celiane e o Everton pela ajuda nos experimentos.

À Silvéria pela presteza em sempre atender minhas solicitações para liberação dos animais.

E também não podia deixar de agradecer a todos os animais usados em cada experimento para que obtivesse esses resultados.

Meu muito obrigada!!!

Um dia você aprende que...

Depois de um tempo você aprende a diferença, a sutil diferença entre dar a mão e acorrentar uma alma.

E você aprende que amar não significa apoiar-se, que companhia nem sempre significa segurança, e começa a aprender que beijos não são contratos, e que presentes não são promessas.

Começa aceitar suas derrotas com a cabeça erquida e olhos adiante, com a graça de um adulto e não com a tristeza de uma criança; aprende a construir todas as suas estradas no hoje, porque o terreno do amanhã é incerto demais para os planos, e o futuro tem o costume de cair em meio ao vão.

Depois de um tempo você aprende que o sol queima se ficar exposto por muito tempo, e aprende que não importa o quanto você se importe, algumas pessoas simplesmente não se importam....

Aceita que não importa quão boa seja uma pessoa, ela vai feri-lo de vez em quando e você precisa perdoá-la por isso.

Aprende como a vida é engraçada e como sonhos são tão facilmente destruídos. Aprendemos que falar pode aliviar dores emocionais, e descobre que se leva anos para construir confiança, e apenas segundos para destruí-la, e que você poderá fazer coisas em um instante, das quais se arrependerá pelo resto da vida.

Aprende que verdadeiras amizades continuam a crescer mesmo a longas distâncias, e o que importa não é o que você tem na vida, mas quem você tem na vida, e que bons amigos são a família que Deus nos permitiu escolher. Aprende que não temos que mudar de amigos se compreendermos que eles mudam, percebe que você e seus amigos podem fazer qualquer coisa, ou nada, e terem bons momentos juntos.

Descobre que as pessoas com quem você mais se importa na vida são tomadas de você muito depressa, por isso sempre devemos deixar as pessoas que amamos com palavras amorosas, pode ser a última vez que a vejamos.

Aprende que as circunstâncias e os ambientes têm influência sobre nós, mas nós somos responsáveis por nós mesmos. Começa a aprender que não se deve comparar-se com os outros, mas com o melhor que pode ser.

Descobre que se leva muito tempo para se tornar a pessoa que quer ser, e que o tempo é curto. Aprende que ou você controla seus atos ou eles te controlarão, e que ser flexível não significa ser fraco ou não ter personalidade, pois não importa quão delicada e frágil seja uma situação, sempre existem dois lados.

Aprende que a paciência requer muita prática. Descobre que algumas vezes a pessoa que você espera o chute quando você cai é uma das poucas que o ajudam a levantar-se.

Aprende que maturidade tem mais a ver com os tipos de experiências que se teve e o que você aprendeu com elas, do que com quantos aniversários você celebrou. Aprende que há mais de seus pais em você do que você suponha.

Aprende que nunca se deve dizer a uma criança que sonhos são bobagens, poucas coisas são tão humilhantes.... e seria uma tragédia se ela acreditasse nisso.

Aprende que quando se está com raiva, se tem o direito de estar com raiva, mas isso não te dá o direito de ser cruel.

Descobre que só porque alguém não te ama do jeito que você quer que ame, não significa que esse alguém não te ame com tudo o que pode, pois existem pessoas que nos amam, mas simplesmente não sabem como demonstrar.

Aprende que nem sempre é suficiente ser perdoado por alguém, algumas vezes você tem que perdoar a você mesmo.

Aprende que com a mesma severidade com que você julga, você será em algum momento condenado.

Aprende que não importa em quantos pedaços seu coração foi partido, o mundo não para que você o conserte.

Aprende que o tempo não volta para trás, portanto plante seu jardim e decore sua alma ao invés de esperar que alguém lhe traga flores, e você aprende que realmente pode suportar; que a vida tem valor e que você tem valor diante da vida!

William Shakespeare

“A imaginação é mais importante que o conhecimento”

Albert Einstein

ALIXANDRE, T. F. Constituição química e estudo de atividades anti-inflamatória e antinociceptiva das vagens de *Samanea tubulosa* Benth. Orientador: Professor Doutor Amilton Paulo Raposo Costa. 2018. 114 p. Tese – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal do Piauí, Teresina, Piauí.

RESUMO

A *Samanea tubulosa* Benth. (Fabaceae), conhecida popularmente por ‘Bordão de Velho’, está distribuída pelos estados do Piauí e Maranhão. É cultivada para fins ornamentais e industriais, e utilizada na medicina tradicional para tratar processos inflamatórios e infecções cutâneas. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade anti-inflamatória e antinociceptiva das frações obtidas do extrato etanólico das vagens de *Samanea tubulosa* Benth., utilizando modelos de inflamação e nocicepção, bem como a identificação dos constituintes químicos responsáveis pelas ações das frações. As frações semipurificadas foram obtidas a partir do extrato etanólico das vagens de *Samanea tubulosa* Benth, e a toxicidade aguda das frações hexânica, acetato de etila e aquosa foi avaliada em dose única durante 14 dias de observação. Foi avaliado o efeito anti-inflamatório das frações hexânica, acetato de etila e aquosa, por meio de agentes indutores de edema: carragenina, dextrana e prostaglandina. A avaliação da atividade antinociceptiva foi feita realizada nos testes de formalina, capsaicina e glutamato. Determinou-se também os possíveis mecanismos de ação envolvidos no efeito antinociceptivo da fração hexânica e acetato de etila a partir do sistema opioide, canais de K^+_{ATP} e via de L-arginina-óxido nítrico. As análises fitoquímicas revelaram na fração hexânica a presença de ácidos graxos e seus ésteres (52,1%) e triterpenos derivados do lupano (28,58%) como a lupenona (16,53%) e lupeol (12,05%), já na fração acetato de etila foram identificados compostos flavonoides e fenólicos como a luteolina. Nos ensaios farmacológicos com a administração das frações hexânica, acetato de etila e aquosa por via oral, foi observado no teste de toxicidade aguda que os animais tratados com as frações não apresentaram sinais de toxicidade, até a dose de 2000 mg kg⁻¹. No teste de edema de pata induzido por carragenina, observou-se maior efeito antiedematogênico apenas na fração hexânica e acetato de etila na dose de 200 mg kg⁻¹ com pico de resposta na 3^a h, em ambas as frações. A fração hexânica na dose de 100 mg kg⁻¹ reduziu o edema induzido por dextrana a partir de uma hora de observação. Os grupos tratados com as frações hexânica e acetato de etila provocaram uma diminuição significativa no edema induzido por prostaglandina nos tempos de 60 a 120 min. No teste da formalina e capsaicina foi observado ação antinociceptiva. No teste do glutamato, as frações hexânica e acetato de etila apresentaram atividade antinociceptiva nas doses de 12,5 e 25 mg kg⁻¹. A antinocicepção produzida pelas frações hexânica e acetato de etila foi significativamente revertida pela naloxona, indicando que as frações atuam pela via opioide. A resposta antinociceptiva da fração acetato de etila foi bloqueada pela glibenclamida, indicando que esta fração atua pela via dos canais de K^+_{ATP} . Contudo, as respostas antinociceptivas das frações hexânica e acetato de etila não foram bloqueadas quando os animais foram pré-tratados com L-arginina indicando que essas frações não atuam por essa via. Nos testes do campo aberto e *rota rod* para as frações hexânica e acetato de etila não houve alteração da atividade locomotora dos animais. Conclui-se, que as frações em estudo exercem atividade anti-inflamatória, assim como atividade antinociceptiva provavelmente relacionada com a via opioide.

Palavras chave: Antinocicepção. Bordão de velho. Inflamação. *Samanea tubulosa* Benth. Toxicidade aguda.

ALIXANDRE, T. F. Chemical constitution and study of anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Samanea tubulosa* Benth. Advisor: doctor teacher Amilton Paulo Raposo Costa. 2018. 114 p. Thesis – Post-Graduate Studies in Biotechnology, Rede Nordeste (Northeast Network) of Biotechnology, Federal University of Piauí (UFPI), Teresina, Piauí.

ABSTRACT

Samanea tubulosa Benth. (Fabaceae), popularly known as 'Bordão de Velho', is distributed throughout the states of Piauí and Maranhão. It is cultivated for ornamental and industrial purposes, and used in traditional medicine to treat inflammatory processes and skin infections. The objective of this study was to evaluate the antiinflammatory and antinociceptive activity of the fractions obtained from the ethanolic extract of the *Samanea tubulosa* Benth. Pods, using inflammation and nociception models, as well as the chemical constituents responsible for the fractions actions. Semipurified fractions were obtained from the ethanolic extract of the *Samanea tubulosa* Benth pods, and the acute toxicity of the hexane, ethyl acetate and aqueous fractions was evaluated in a single dose for 14 days of observation. The anti-inflammatory effect of the hexane, ethyl acetate and aqueous fractions was evaluated by means of edema-inducing agents: carrageenan, dextran and prostaglandin. The evaluation of antinociceptive activity was performed in the formalin, capsaicin and glutamate tests. It was also determined the possible mechanisms of action involved in the antinociceptive effect of the hexane and ethyl acetate fractions from the opioid system, K⁺ATP channels and L-arginine-nitric oxide pathway. The phytochemical analyzes revealed the presence of fatty acids and their esters (52.1%) and triterpenes derived from lupan (28.58%), such as lupenone (16.53%) and lupeol (12.05%), in the ethyl acetate fraction, flavonoid and phenolic compounds such as luteolin were identified. In the pharmacological tests with the oral administration of hexane, ethyl acetate and aqueous acetates, it was observed in the acute toxicity test that the animals treated with the fractions showed no signs of toxicity up to the dose of 2000 mg kg⁻¹. In the carrageenan-induced paw edema test, a higher anti-nematode effect was observed only in hexane and ethyl acetate at a dose of 200 mg kg⁻¹ with a 3 h response peak in both fractions. The hexane fraction at the dose of 100 mg kg⁻¹ reduced edema induced by dextran from one hour of observation. The groups treated with the hexane and ethyl acetate fractions caused a significant decrease in prostaglandin-induced edema at times of 60 to 120 min. In the formalin and capsaicin test antinociceptive action was observed. In the glutamate test, the hexane and ethyl acetate fractions showed antinociceptive activity at doses of 12.5 and 25 mg kg⁻¹. The antinociception produced by the hexane and ethyl acetate fractions was significantly reversed by naloxone, indicating that the fractions act through the opioid pathway. The antinociceptive response of the ethyl acetate fraction was blocked by glibenclamide, indicating that this fraction acts via the K⁺ATP channels. However, the antinociceptive responses of the hexane and ethyl acetate fractions were not blocked when the animals were pretreated with L-arginine indicating that these fractions did not act in this way. In the open field and rotated rod tests for the hexane and ethyl acetate fractions there was no change in the locomotor activity of the animals. It was concluded that the fractions under study exert anti-inflammatory activity, as well as antinociceptive activity probably related to the opioid route.

Keywords: Antinociceptive. Bordão de velho. Inflammation. *Samanea tubulosa* Benth. Acute toxicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Mapa da distribuição das espécies do gênero <i>Samanea</i> nas zonas intertropicais da América do Norte e Sul.....	33
Figura 2. Características morfológicas da planta <i>Samanea tubulosa</i> Benth. flores.....	35
Figura 3. Procedimento de obtenção do extrato etanólico e das frações das vagens de <i>S. tubulosa</i>	36
Figura 4. Cromatoplasmas das frações das vagens de <i>S. tubulosa</i>	45
Figura 5. Cromatograma de íons totais da FHEX.....	47
Figura 6. Espectro de massa do N, N-dietil- <i>p</i> -toluamida.....	48
Figura 7. Espectro de massa hexadecano.....	48
Figura 8. Espectro de massa do ácido palmítico.....	48
Figura 9. Espectro de massa do palmitato de etila.....	48
Figura 10. Espectro de massa do ácido linoleico.....	49
Figura 11. Espectro de massa do Ácido Oleico.....	49
Figura 12. Espectro de massa do éster etílico do ácido linoleico.....	49
Figura 13. Espectro de massa do éster etílico do ácido oleico.....	49
Figura 14. Espectro de massa do éster etílico do ácido esteárico.....	50
Figura 15. Espectro de massa do Lupenona.....	50
Figura 16. Espectro de massa do Lupeol.....	50
Figura 17. Espectro ESI-ITMS da fração acetato de etila das vagens de <i>S. tubulosa</i> avaliado em modo negativo na faixa de íons com m/z de 100-1300 Da.....	51
Figura 18. Espectro MS ² do composto ácido gálico (m/z 169) em modo [M-H] ⁻	52
Figura 19. Espectro MS ² do composto galato de etila (m/z 197) em modo [M-H] ⁻	53
Figura 20. Espectro MS ² do composto luteolina (m/z 285) em modo [M-H] ⁻	53
Figura 21. Espectro MS ² do composto ácido elágico (m/z 301) em modo [M-H] ⁻	53
Figura 22. Espectro MS ² do composto ácido cafeico- <i>O</i> - hexosídeo (m/z 341) em modo [M-H] ⁻	54
Figura 23. Espectro MS ² do composto quercetrina (m/z 447) em modo [M-H] ⁻	54
Figura 24. Espectro MS ² do composto 1,6- digaloil-glucose (m/z 483) em modo [M-H] ⁻	54
Figura 25. Espectro MS ² do composto luteolina-7- <i>O</i> -rutinosídeo (m/z 593) em modo [M-H] ⁻	55
Figura 26. Espectro MS ² do composto quercetrina-3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> -Ramnosil-glucosídeo)	

(Rutina) (m/z 609) em modo [M-H] ⁻	55
Figura 27. Efeito da administração aguda de FHEX e FAcOEt sobre a variação do peso corporal dos animais.....	56
Figura 28: Efeito de FHEX e FAcOEt sobre o edema de pata induzido por carragenina em camundongos.....	60
Figura 29. Efeito de FHEX sobre o edema de pata induzido por dextrana em camundongos.....	64
Figura 30. Efeito das FHEX e FAcOEt sobre o edema de pata induzido por Prostaglandinas E2 em camundongos.....	66
Figura 31. Efeito das FHEX e FAcOEt no teste da capsaicina em camundongos.....	70
Figura 32. Efeito das FHEX e FAcOEt na nocicepção induzida por glutamato em camundongos.....	72
Figura 33. Efeito de FHEX e FAcOEt, contra a ação da naloxona na nocicepção induzida por glutamato em camundongos.....	74
Figura 34. Efeito de FHEX e FAcOEt, contra a ação da glibenclamida na nocicepção induzida por glutamato em camundongos.....	76
Figura 35. Investigação do envolvimento da via L-arginina-óxido nítrico no efeito antinociceptivo de FHEX e FAcOEt.....	78
Figura 36. Efeito de FHEX e FAcOEt sobre a atividade motora no teste do campo aberto em camundongos.....	80
Figura 37. Efeito de FHEX e FAcOEt sobre a atividade motora no teste do <i>Rota Rod</i> em camundongos.....	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Compostos identificados por CG-EM na FHEX.....	46
Tabela 2. Identificação de compostos químicos por ESI(-)ITMS da fração acetato de etila das vagens de <i>S. tubulosa</i>	52
Tabela 3. Parâmetros bioquímicos obtidos do soro de camundongos, tratados com FHEX e FAcOEt.....	57
Tabela 4: Avaliação do peso dos órgãos internos de camundongos, tratados com as FHEX e FAcOEt.....	58
Tabela 5. Efeito das FHEX e FAcOEt sobre o edema de pata induzido por carragenina em camundongos.....	61
Tabela 6. Efeito de FAq sobre o edema de pata induzido por carragenina em ratos.....	63
Tabela 7. Efeito da FHEX sobre o edema de pata induzido por dextrana em camundongos.....	65
Tabela 8. Efeito das FHEX e FAcOEt sobre o edema de pata induzido por Prostaglandinas E2 em camundongos.....	66
Tabela 9. Efeito antinociceptivo de FHEX e FAcOEt na resposta nociceptiva induzida por formalina em camundongos.....	68
Tabela 10. Efeito antinociceptivo de FHEX e FAcOEt na resposta nociceptiva induzida por formalina em camundongos.....	69

LISTA DE ABREVIATURAS

AINES – Anti-inflamatórios não esteroides

ALT – Alanina aminotransferase

AST – Aspartato aminotransferase

ATP – Trifosfato de Adenosina

ANOVA – Análise de variância

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CCA – Centro de Ciências Agrárias

CCD – Cromatografia em Camada Delgada

CCDC - Cromatografia em Camada Delgada Comparativa

CEEA – Comitê de Ética em Experimentação Animal

CG-EM – Cromatografia Gasosa acoplada à espectrometria de massas

COX - Cicloxigenase

COX-1 – Cicloxigenase -1

COX-2 – Cicloxigenase -2

Da – Dalton

DL₅₀ – Dose Letal

EM – Espectrometria de Massas

ESI-ITMS– Espectrometria de massas íon trap com ionização por eletrospray

e.p.m. – Erro padrão da média

EtOH - Etanol

FAcOEt – Fração Acetato de Etila

FAq – Fração Aquosa

FHEX – Fração Hexânica

IASP – Associação Internacional para o Estudo da Dor

K⁺_{ATP} – Canal de potássio ativado por ATP

kg – Quilograma

IL- 1 β – Interleucina 1 Beta

IL-6 – Interleucina 6

IL-8 – Interleucina 8

iNOS – Óxido Nítrico Sintase Indutível

i.p. - Intraperitoneal

i.pl. - Intraplantar

m/z – relação massa/ carga

MeOH – Metanol

mg kg⁻¹ – Miligramas por quilo

MPO - Mieloperoxidase

NF – $\kappa\beta$ – Fator de transcrição nuclear kappa beta

NMDA – N- Metil- D- Aspartato

NO – Óxido nítrico

NOS – Óxido Nítrico Sintase

OMS – Organização Mundial de Saúde

PC- Peso corporal

PGs - Prostaglandinas

PGE2 – Prostaglandina E2

s.c. - subcutânea

SNC – Sistema Nervoso Central

SNP – Sistema Nervoso Periférico

SUS - Sistema Único de Saúde

ROS – Espécies Reativas de Oxigênio

TRP - Receptores de potencial transitório

TRPV1 - Receptores de potencial transitório do tipo valinoide 1

TNF – α – fator de necrose tumoral alfa

v.o. – via oral

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION

μ L - Microlitros

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
2 OBJETIVOS	24
2.1 Objetivo Geral.....	24
2.2 Objetivos Específicos.....	24
3 REVISÃO DE LITERATURA	26
3.1 Inflamação.....	26
3.2 Dor.....	27
3.3 Fármacos utilizados no tratamento da dor e inflamação.....	29
3.4 O uso de plantas medicinais.....	30
3.5 3.5 Família Fabaceae Lindl. e gênero <i>Samanea</i> Merril.....	32
3.6 <i>Samanea tubulosa</i> Benth.....	34
4 MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1 Material vegetal.....	36
4.2 Obtenção do extrato e frações das vagens de <i>S. tubulosa</i>	36
4.3 Análise cromatográfica comparativa das frações de partição do extrato etanólico.....	37
4.4 Análise Cromatográfica da fração hexânica.....	37
4.5 Análise por inserção direta da fração acetato de etila por espectrometria de massas íon trap ionização por eletrospray (ESI-ITMS).....	38
4.6 Animais.....	38
4.7 Drogas e produtos químicos.....	38
4.8 Determinação da toxicidade oral aguda em camundongos.....	39
4.9 Efeito antiedematogênico de FHEX, FAcOEt e FAq.....	39
4.9.1 Efeito de FHEX e FAcOEt sobre o edema de pata induzida por carragenina em camundongos.....	39
4.9.2 Efeito de FAq sobre o edema de pata induzida por carragenina em ratos.....	40
4.9.3 Efeito de FHEX sobre o edema de pata induzida por dextrana em camundongos..	40
4.9.4 Efeito de FHEX e FAcOEt sobre o edema de pata induzida por prostaglandinas E2 (PGE2) em camundongos.....	40
4.10 Efeito antinociceptivo das FHEX, FAcOEt e FAq.....	41
4.10.1 Efeito de FHEX e FAcOEt no teste de formalina em camundongos.....	41
4.10.2 Efeito de FAq no teste de formalina em ratos.....	41

4.10.3 Efeito de FHEX e FAcOEt no teste de capsaicina em camundongos.....	41
4.10.4 Efeito de FHEX e FAcOEt no teste do glutamato em camundongos.....	42
4.11 Avaliação dos possíveis mecanismo de ação envolvidos na atividade antinociceptiva das FHEX e FAcOEt.....	42
4.11.1 Participação do sistema opioide.....	42
4.11.2 Participação dos canais de K^+_{ATP}	42
4.11.3 Participação da via L-arginina-óxido nítrico K^+_{ATP}	43
4.12 Avaliação motora de FHEX e FAcOEt.....	43
4.12.1 Teste do campo aberto.....	43
4.12.2 Teste do Rota-Rod.....	43
4.13 Análise estatística.....	44
5 RESULTADOS	45
5.1 Análise fitoquímica.....	45
5.1.1 Análise cromatográfica comparativa das frações de partição do extrato etanólico..	45
5.1.2 Análise Cromatográfica da fração hexânica.....	46
5.1.3 Identificação dos constituintes da fração AcOEt por ESI-IT-MS.....	51
5.2 Avaliação da toxicidade aguda em camundongos.....	55
5.3 Efeito anti-inflamatório de FHEX, FAcOEt e FAq.....	59
5.3.1 Efeito de FHEX e FAcOEt no edema de pata induzido por carragenina em camundongos.....	59
5.3.2 Efeito de FAq no edema de pata induzido por carragenina em ratos.....	62
5.3.3 Efeito de FHEX sobre o edema de pata induzida por dextrana em camundongos...	64
5.3.4 Efeito de FHEX e FAcOEt sobre o edema de pata induzida por prostaglandinas em camundongos.....	65
5.4 Efeito antinociceptivo de FHEX, FAcOEt e FAq.....	67
5.4.1 Efeito de FHEX e FAcOEt no teste de formalina em camundongos.....	67
5.4.2 Efeito de FAq no teste de formalina em ratos.....	68
5.4.3 Efeito de FHEX e FAcOEt no teste de capsaicina em camundongos.....	69
5.4.4 Efeito de FHEX e FAcOEt no teste de glutamato em camundongos.....	71
5.5 Avaliação dos possíveis mecanismo de ação envolvidos na atividade antinociceptiva das FHEX e FAcOEt.....	73
5.5.1 Participação do sistema opioide.....	73
5.5.2 Participação dos canais de K^+_{ATP}	75

5.5.3 Participação da via L-arginina-óxido nítrico.....	77
6.5 Avaliação da atividade motora espontânea de FHEX e FAcOEt.....	79
6.5.1 Teste do campo aberto.....	79
6.5.2 Teste do <i>rota rod</i>	81
6 DISCUSSÃO	83
7 CONCLUSÕES	94
PERSPECTIVAS	96
REFERÊNCIAS	97
ANEXOS	

1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas para o tratamento e prevenção de doenças é uma das mais antigas práticas medicinais da humanidade. Atualmente a Organização Mundial da Saúde (OMS) considera as plantas utilizadas para fins terapêuticos como importantes ferramentas para a assistência farmacêutica, haja vista que 70% a 95% da população nos países em vias de desenvolvimento fazem uso das mesmas no âmbito da Atenção Primária a Saúde (WHO, 2017).

Estudos com plantas medicinais estão em expansão devido à capacidade dessas espécies de produzirem moléculas com atividade medicamentosa, que podem ser utilizadas para fins terapêuticos (SOUTO-MAIOR *et al.*, 2011). Desse modo, o uso de medicamentos de origem vegetal baseia-se na premissa de que as plantas contêm substâncias naturais que podem promover a saúde e aliviar a doença (ARUMUGAM *et al.*, 2011; ANDRADE; VALENTÃO, 2018).

Houve nos últimos anos um progresso na pesquisa médica, no entanto, o tratamento de algumas doenças permanece um desafio devido aos efeitos colaterais e alto custo dos medicamentos existentes. Um dos grandes desafios na terapêutica atual diz respeito aos processos inflamatórios que surgem como uma resposta local desencadeada por lesões ou traumas, que pode ser definida como um sistema de defesa do organismo para inibir a propagação da infecção ou da lesão (FAUJDAR *et al.*, 2016). No mercado existe uma gama de medicamentos disponíveis para tratar a inflamação tais como imunossuppressores e anti-inflamatórios não esteroides, mas os efeitos colaterais associados a eles limitam seu uso, e, embora altamente eficazes, não podem ser dissociados de efeitos adversos importantes, como osteoporose, lesões gástricas, hipertensão arterial e alergia (MOTTA *et al.*, 2013; FAUJDAR *et al.*, 2016; AMBRIZ-PÉREZ *et al.*, 2016).

Como alternativa a estas drogas, várias plantas medicinais têm sido tradicionalmente utilizadas para o tratamento de diferentes tipos de dor e inflamação desde a antiguidade (ABOTSI *et al.*, 2017). Admite-se, portanto, que produtos naturais com potencial anti-inflamatório e analgésico possam ser usados para reduzir alguns dos efeitos colaterais relacionados a estes medicamentos que já são usados para o tratamento da dor (HISHE *et al.*, 2018).

Neste contexto, existe a necessidade de exploração de fontes alternativas naturais como plantas que apresentem eficácia terapêutica e produzam menos efeitos colaterais, uma vez que seus metabólitos secundários como esteroides, flavonoides, alcaloides, terpenoides e

glicosídeos, foram associados a diversas atividades farmacológicas, como anti-inflamatória, analgésica, antipirética, dentre outras (FAUJDAR *et al.*, 2016).

Entre as inúmeras espécies com atividades biológicas estão as do gênero *Samanea* Merrill, pertencentes à família Fabaceae, que devido ao fácil acesso e ao valioso aspecto medicinal estão sendo usadas em várias partes do mundo (BARBOSA, 2014) e já foram relatadas como tendo atividades anti-inflamatória, antibacteriana, antidiarreica, antioxidante e hepatoprotetora (MUZAMMIL; FARHANA; SALMAN 2013; KIRITHIKA *et al.*, 2013; BARBOSA, 2014). As espécies tropicais do gênero *Samanea* (Merrill) denominados como *Samanea saman* Jacq., *Samanea tubulosa* Benth. e *Samanea inopinata* Harms., têm sido amplamente utilizadas na medicina tradicional para a produção de remédios caseiros, utilizando-se várias partes da árvore em diferentes preparações (BARBOSA, 2014).

Entre as plantas medicinais, a *Samanea tubulosa* Benth., objeto deste estudo, foi relatada para o tratamento de infecções cutâneas, inflamações gástricas e infestações parasitárias e dor nos olhos (CRUZ, 2006; HAJDU; HOHMANN, 2012). A abordagem fitoquímica desta espécie revelou como importantes constituintes do extrato bruto, as seguintes classes de compostos: alcaloides, saponinas, flavonoides, taninos, flavonas, flavanonas, flavonóis e catequinas (SALES, 2015; ARAÚJO *et al.*, 2015).

Estudos anteriores realizados pelo grupo de laboratório com extrato bruto de *S. tubulosa*, demonstraram que esta espécie apresenta atividade antiedematogênica verificada pela redução do edema da pata, bem como uma diminuição da migração de neutrófilos tanto no tecido da pata como na cavidade peritoneal, efeito confirmado pela diminuição da atividade da mieloperoxidase (SALES, 2015). Neste estudo, verificou-se a inibição do edema em 3h (pico de resposta inflamatória induzida por carragenina) com a dose de 100 mg kg⁻¹ apresentando 91,80% de inibição. Estudos realizados com outras plantas da tribo Ingeae à qual pertence *S. tubulosa* demonstraram que as folhas de *Albizia zygia* (DC.) J.F. Macbr. possuem propriedades anti-inflamatória, antipirética e analgésica (ABOTSI *et al.*, 2017). No extrato etanólico de *Archidendron clypearia* Jack. foi demonstrado atividade anti-inflamatória *in vivo*, suprimindo a ativação de NF-k β (SANCHEZ-FIDALGO *et al.*, 2013) além disso, os extratos obtidos da casca de *Abarema cochliacarpus* Gomes., possuem substâncias ativas que exercem efeitos protetores acentuados na colite experimental aguda (SILVA *et al.*, 2010).

Assim, observa-se que foram relatadas várias propriedades farmacológicas atribuídas a espécies da família Fabaceae e a comprovação das atividades farmacológicas dessas plantas medicinais utilizadas popularmente ou a descoberta de seus princípios ativos responsáveis

pelas suas propriedades curativas e/ou toxicológicas são essenciais na busca de alternativas terapêuticas. Embora a planta *S. tubulosa* seja bem conhecida na medicina tradicional, poucos estudos sustentam o uso etnofarmacológico e demonstram, por métodos experimentais, suas atividades farmacológicas. Dessa forma, o estudo das atividades anti-inflamatória e antinociceptiva das frações obtidas a partir das vagens de *S. tubulosa*, poderá subsidiar o desenvolvimento de novas formulações farmacêuticas para o tratamento de processos inflamatórios com perspectiva de desenvolver um novo fitoterápico.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade anti-inflamatória e antinociceptiva das frações obtidas do extrato etanólico das vagens de *S. tubulosa*, utilizando modelos de inflamação e nocicepção, bem como identificar os constituintes químicos responsáveis pelas ações das frações, para subsidiar o desenvolvimento de um fitoterápico.

2.2 Objetivos específicos

Preparar o extrato etanólico das vagens da planta *S. tubulosa* e fracionar o extrato bruto com solventes em ordem crescente de polaridade;

Identificar os constituintes da fração hexânica de *S. tubulosa* por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM) e elucidar a estrutura de seus principais constituintes químicos;

Realizar a caracterização fitoquímica da fração acetato de etila por meio de espectrometria de massas (ESI-ITMS);

Determinar a toxicidade aguda das frações hexânica, acetato de etila e aquosa de *S. tubulosa*;

Determinar o efeito antiedematogênico das frações hexânica e acetato de etila em modelos de edema de pata induzida por carragenina em camundongos e da fração aquosa em modelos de edema de pata induzida por carragenina em ratos;

Avaliar o efeito antiedematogênico da fração hexânica no edema de pata induzido por dextrana em camundongos;

Avaliar o efeito antiedematogênico da fração hexânica e acetato de etila no edema de pata induzido por prostaglandina E2 (PGE2) em camundongos;

Investigar o efeito antinociceptivo das frações hexânica e acetato de etila no modelo de nocicepção induzida por formalina em camundongos e da fração aquosa no modelo de nocicepção induzida por formalina em ratos;

Avaliar o efeito antinociceptivo das frações hexânica e acetato de etila no modelo de nocicepção induzida por capsaicina e glutamato em camundongos;

Avaliar a participação do sistema opioide, dos canais de potássio dependentes de ATP e a participação da via L-arginina-óxido nítrico no mecanismo antinociceptivo das frações hexânica e acetato de etila no modelo de nocicepção induzida por glutamato em camundongos;

Avaliar o efeito das frações hexânica e acetato de etila sobre a coordenação motora e locomoção espontânea nos testes do campo aberto e rota-rod em camundongos.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 Inflamação

A inflamação é um mecanismo de defesa biológico usado para defender e restaurar as funções fisiológicas quando há interrupção da homeostase tecidual. É causada pela presença de agentes biológicos, químicos ou físicos no corpo e é vital para a limpeza de patógenos e detritos do hospedeiro (AMBRIZ-PÉREZ *et al.*, 2016; KOTAS; MEDZHITOV, 2015). No entanto, quando a inflamação se torna excessiva e persiste pode surgir diversos processos patológicos como asma, artrite, aterosclerose, câncer, diabetes tipo 2, doenças neurodegenerativas, obesidade, mal de Alzheimer, entre outras (ROCK; KONO, 2008; KOTAS; MEDZHITOV, 2015; BRADY; MARTINA; PUERTOLLANO, 2018).

A inflamação pode ser dividida em dois tipos aguda ou crônica dependendo do tipo de estímulo e da eficiência da reação para remover tais estímulos ou tecidos lesados. A inflamação aguda inicia rapidamente e dura algumas horas ou alguns dias, caracterizada pela exsudação de proteínas fluidas e plasmáticas e pela migração de leucócitos, entre eles neutrófilos (AMBRIZ-PÉREZ *et al.*, 2016). Já a inflamação crônica é tipicamente caracterizada como um processo inflamatório persistente de baixo grau que pode durar meses ou mesmo anos (RAHTES *et al.*, 2018).

Na inflamação aguda quando o sistema imune elimina com sucesso os agentes prejudiciais ao organismo, a reação desaparece, mas se por um acaso o sistema de defesa falhar, pode ocorrer ativação persistente ou crônica da inflamação e levar à patologia (EDLMANN *et al.*, 2017; RAHTES *et al.*, 2018).

Na inflamação crônica esses processos requerem a interação de células do sistema imune especializadas e não especializadas (por exemplo, macrófagos e linfócitos), mas também células endoteliais e fibroblastos e um amplo espectro de células que atuam na defesa, principalmente macrófagos que promovem a produção de mediadores pró-inflamatórios, entre eles interleucina (IL)-1 β , IL-6, IL-8, entre outros; fator de necrose tumoral (TNF)- α , espécies reativas de oxigênio (ROS), óxido nítrico (NO) e prostaglandinas (PGs), que determinam a resposta celular e orgânica que envolve o recrutamento e ativação de células imunológicas, além de inchaço, febre e dor (AMBRIZ-PÉREZ *et al.*, 2016; KOEBERLE; WERZ, 2018).

Atualmente, a terapia anti-inflamatória baseia-se em três pilares: os anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) que suprimem a biossíntese de eicosanoides e são medicamentos mais utilizados no tratamento da inflamação, febre e dor; os glicocorticoides que agonizam o receptor de glicocorticoide; e os biofármacos, como anticorpos terapêuticos e ligantes de proteínas (KOEBERLE; WERZ, 2014; AMBRIZ-PÉREZ et al., 2016; KOEBERLE; WERZ, 2018).

Alguns dos medicamentos mais usados no mundo para o tratamento de inúmeras condições que envolvem inflamação foram produzidos a partir de produtos naturais que já eram utilizados para o tratamento dessa condição patológica como é o caso do AINE ácido acetilsalicílico sintetizado a partir do ácido salicílico componente ativo da casca do salgueiro (AMANN; PESKAR, 2002; KOEBERLE; WERZ, 2018).

No entanto, pesquisas têm demonstrado que o uso a longo prazo de AINEs implica em efeitos terapêuticos e colaterais adversos, principalmente devido à diminuição da produção de prostaglandina e liberação de COX-1. Os principais efeitos colaterais são distúrbios gastrointestinais, geralmente moderados e reversíveis, embora alguns pacientes possam sofrer de úlcera péptica grave, sangramento intestinal entre outros eventos digestivos (AMBRIZ-PÉREZ et al., 2016). Além dos efeitos gastrintestinais, os AINEs podem causar retenção de sal e água, insuficiência renal, broncoespasmo e reações de hipersensibilidade (HAWKEY; LANGMAN, 2003).

Devido aos efeitos colaterais adversos dos AINEs os produtos naturais utilizados na medicina tradicional em todo o mundo têm sido estudados como alternativas potenciais para a produção de novas drogas.

3.2 Dor

A dor é um dos problemas mais difíceis de tratamento tanto para os profissionais da saúde quanto para os pacientes que vivenciam e tem um papel protetor fundamentalmente importante, alertando-nos para as ameaças e dando um impulso à preservação da integridade do corpo, além de ser considerado o quinto sinal vital juntamente com a função cardiorrespiratória e térmica (KLAUMANN; WOUK; SILLAS, 2008; BELL, 2018).

A Associação Internacional para o Estudo da Dor define a dor como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a dano tecidual real ou potencial ou descrita em termos de tal dano (IASP, 2018). Segundo esta mesma associação a dor é uma experiência subjetiva, uma vez que não pode ser quantificada objetivamente e depende do auto relato da

pessoa. Clinicamente, a experiência da dor pode ser classificada em dois tipos aguda e crônica. A dor aguda, na maior parte, resulta de doença, inflamação ou lesão dos tecidos. Este tipo de dor geralmente surge subitamente, por exemplo, após trauma ou cirurgia. A causa da dor aguda geralmente pode ser diagnosticada e tratada (KENT *et al.*, 2017). No entanto, acredita-se que a dor crônica seja uma condição de doença crônica da mesma maneira que a diabetes e a asma. Por sua natureza, a dor crônica persiste por um longo período de tempo e é resistente a muitos tratamentos médicos (KLAUMANN; WOUK; SILLAS, 2008).

A dor crônica pode ser subdividida segundo sua origem, em nociceptiva e neuropática. A dor nociceptiva resulta da ativação direta das fibras nervosas da dor, seja por mediadores químicos, inflamatórios ou agentes mecânicos. A dor neuropática pode surgir de doenças ou lesão no Sistema Nervoso Central (SNC) e Sistema Nervoso Periférico (SNP); é o resultado direto da ativação de nociceptores da pele e outros tecidos em resposta a uma lesão tecidual, acompanhada de inflamação (KLAUMANN; WOUK; SILLAS, 2008; QUINTANS *et al.*, 2013).

A transmissão da dor da periferia para o Sistema Nervoso Central (SNC) depende da ativação dos nociceptores, que são neurônios aferentes primários que se projetam a partir dos tecidos incluindo pele, músculo, articulações e vísceras para a medula espinhal ou o seu equivalente trigeminal no tronco cerebral (BELL, 2018). Os neurônios aferentes primários são classificados de acordo com seu diâmetro e com o grau de mielinização, ambos determinam velocidade de condução. Existem dois principais tipos de fibras, A δ e C, cujas terminações são receptoras específicos para a dor que, quando ativados, sofrem alterações na sua membrana, permitindo a deflagração de potenciais de ação (LEVINE; TAIWO, 1994; STEEDS, 2009).

As terminações nervosas das fibras nociceptivas A δ e C (nociceptores), são capazes de traduzir um estímulo agressivo de natureza térmica, química ou mecânica, em estímulo elétrico que será transmitido até o sistema nervoso central e interpretado no córtex cerebral como dor. As fibras A δ são mielinizadas e as fibras C não são mielinizadas e possuem a capacidade de transmitir estímulos dolorosos em diferentes velocidades. As fibras A δ , em função da presença da bainha de mielina, transmitem o estímulo doloroso de forma rápida, enquanto as fibras C são responsáveis pela transmissão lenta da dor (MARCHAND, 2008; KHALID; TUBBS, 2017).

Após a recepção de um estímulo nocivo, uma série de eventos elétricos e químicos são desencadeados. A primeira fase é a transdução, onde a energia nociva externa é convertida em atividade eletrofisiológica. Na segunda fase, a de transmissão, esta informação codificada é

transmitida através da medula espinhal e do tronco cerebral para o tálamo. Finalmente, as conexões entre o tálamo e centros corticais superiores controlam a percepção e integram a resposta efetiva da dor (DELUCIA *et al.*, 2014).

De forma simplificada, a transmissão nociceptiva pode ser considerada como uma cadeia de três-neurônios, com o neurônio de primeira ordem originado na periferia e projetando-se para a medula espinhal, o neurônio de segunda ordem ascende pela medula espinhal e o neurônio de terceira ordem projeta-se para o córtex cerebral (MESSLINGER, 1997; TRANQUILLI, 2004). Por outro lado, a informação traduzida pelos receptores num sinal elétrico é modulada por substâncias químicas que são liberadas para o meio extracelular quando ocorre dano tecidual. Elas ativam os receptores de dor irritando terminações nervosas. Estes mediadores químicos incluem histamina, substância P, bradiquinina, acetilcolina e prostaglandinas (HELMS; BARON, 2008). Após lesão tecidual ou inflamação, as fibras nervosas sensitivas têm o seu limiar de ativação alterado, podendo responder a estímulos de baixa intensidade, fenômeno descrito como sensibilização periférica (DELUCIA *et al.*, 2014).

3.3 Fármacos utilizados no tratamento da dor e inflamação

O termo empregado para o alívio da sensação dolorosa ou inflamação sem que ocorra perda de sensibilidade é a analgesia. Já as substâncias capazes de provocar analgesia são denominadas analgésicos, os quais podem ser divididos, em analgésicos periféricos, fármacos adjuvantes e os de ação central (FENG *et al.*, 2012; BHOWMICK *et al.*, 2014; KHENDIR *et al.*, 2016).

Os analgésicos periféricos são representados pelos anti-inflamatórios não esteroides (AINES), também conhecidos por analgésicos não opioides. O mecanismo de ação deles envolve o bloqueio da produção de prostaglandinas por meio da inibição da enzima ciclooxigenase (COX) no local de lesão, diminuindo assim a formação de mediadores da dor no sistema nervoso periférico (GROSSER; THEKEN; FITZGERALD, 2017).

Os AINES reduzem a produção de prostaglandinas que sensibilizam os receptores da dor para a ação de substâncias liberadas durante a lesão. Os vários agentes desta classe diferem entre si quanto à potência anti-inflamatória, cinética e efeitos colaterais que provocam, como alterações gástricas, hepáticas e renais, reações alérgicas e alterações hematológicas (SAKATA; GOZZANI, 1994). Por outro lado, os opioides atuam modificando tanto os aspectos sensitivos da dor quanto o emocional, causando uma sensação de bem-estar

e dependência. Eles se ligam a receptores específicos no sistema nervoso central (SNC) e sistema nervoso periférico (SNP), inibindo a nocicepção. O mecanismo de ação destas substâncias, no processo nocicepção, ocorre pela interação destas com receptores opioides, levando ao fechamento de canais para cálcio voltagem-dependentes nas terminações nervosas pré-sinápticas, o que reduz a liberação de neurotransmissores. Assim como os AINES, os opioides também apresentam efeitos colaterais que incluem: constipação, náuseas, vômitos, tolerância e dependência, que os limitam para aplicação terapêutica (DELUCIA *et al.*, 2014; COSTA; DENDAI-SOUZA; BUSCARIOLO, 2014).

Como alternativas a estas drogas, várias plantas medicinais têm sido tradicionalmente utilizadas para o tratamento de diferentes tipos de dor desde a antiguidade. Admite-se, portanto, que produtos naturais com potencial analgésico possam ser usados para reduzir alguns dos efeitos colaterais relacionados a estes medicamentos, que já são usados para tratar a dor (HISHE *et al.*, 2018).

Tendo em vista esses fatores, a alta toxicidade e os efeitos colaterais associados aos analgésicos, tornam-se necessários estudos que visem à elucidação de substâncias com potencial analgésico e com baixo risco de toxicidade, sendo os produtos naturais, recursos terapêuticos importantes para o desenvolvimento de novas drogas com potencial analgésico.

3.4 O uso de plantas medicinais

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define planta medicinal como sendo qualquer espécie de planta selecionada, silvestre ou cultivada usada popularmente como remédio para o tratamento e/ou a prevenção de doenças, ou seja, toda e qualquer planta que englobe substâncias que possam ser usadas para prevenir, aliviar, curar ou modificar um processo patológico e que possa servir como fonte de fitofármacos e de seus precursores para síntese de princípios ativos (WHO, 2017).

As plantas medicinais podem ser definidas ainda como aquelas capazes de aliviar ou curar enfermidades e têm tradição de uso como remédio em uma população ou comunidade. A partir do momento que sofrem um processo de industrialização, passam a ser consideradas como um fitoterápico. Esse processo de industrialização evita contaminações por micro-organismos e substâncias estranhas, além de padronizar a quantidade e a forma certa que deve ser usada, permitindo uma maior segurança de uso (BRASIL, 2016).

No Brasil o uso de plantas medicinais e fitoterápicos é regulamentado. No ano de 2006 o Ministério da Saúde juntamente com o Sistema Único de Saúde (SUS), instituiu a Política

Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Essa política beneficia cerca de 12.000 mil pessoas todos os anos, destacando-se que, entre os anos de 2013 e 2015, a busca por tratamentos à base de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos pelo Sistema Único de Saúde (SUS) mais que dobrou, atingindo um crescimento de 161%, segundo dados do Ministério da Saúde (BRASIL, 2016).

A comercialização dos fitoterápicos é regularizada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), e a prescrição é orientada por um documento específico, o Memento Fitoterápico, que reúne informações sobre o uso terapêutico e características botânicas de plantas medicinais. Este é um dos Compêndios da Farmacopeia Brasileira e traz as informações que o profissional de saúde precisa para avaliar a necessidade de prescrição para o paciente (ANVISA, 2016).

O SUS oferta doze medicamentos fitoterápicos, que são utilizados pela população para os mais diversos fins, como uso ginecológico, tratamento de queimaduras, auxiliares terapêuticos de gastrite e úlcera, além de medicamentos com indicação para artrite e osteoartrite (BRASIL, 2016).

O mercado de fitoterápicos brasileiro é bastante promissor, só no ano de 2014, foram vendidas aproximadamente 56 milhões de unidades, com um faturamento total de R\$ 1,1 bilhão de reais. Estes números representam 1,9% em unidades e 2,8% em faturamento da participação dos fitoterápicos no mercado total de medicamentos (ANVISA, 2016).

Devido à elevada diversidade de organismos terrestres e marinhos, os produtos naturais (metabólitos secundários) são algumas das fontes mais bem-sucedidas de medicamentos para o tratamento de muitas doenças e enfermidades (DAVID; WOLFENDER; DIAS, 2015). Muitos dos fármacos disponíveis atualmente são resultados da extração de fontes naturais, como por exemplo, a morfina, extraída da papoula (*Papaver somniferum*), o ácido acetilsalicílico, proveniente da síntese a partir do ácido salicílico extraído do salgueiro (*Salix spp.*) (CRAGG; NEWMAN, 2013). Além do fitoterápico Acheflan®, proveniente de pesquisas brasileiras, com o óleo essencial da erva baleeira (*Cordia verbanacea* DC) o qual possui atividade analgésica e anti-inflamatória (BASTING *et al.*, 2016).

Desta forma, afirmam que a utilização de plantas medicinais para alívio da dor e inflamação é uma prática comum na medicina popular, mas os princípios ativos na maioria dos casos são desconhecidos, deste modo, a busca pela avaliação dos efeitos farmacológicos dos extratos e frações ainda pode ser usada como uma estratégia para a pesquisa de novos medicamentos (ALMEIDA *et al.*, 2012)

Portanto, a pesquisa com fitoquímicos ativos, obtidos a partir de pesquisa com plantas utilizadas para fins medicinais, pode permitir o avanço do desenvolvimento de remédios tradicionais à base de plantas, uma vez que muitas dessas plantas são amplamente utilizadas como remédios de forma empírica (KINGHORN *et al.*, 2011).

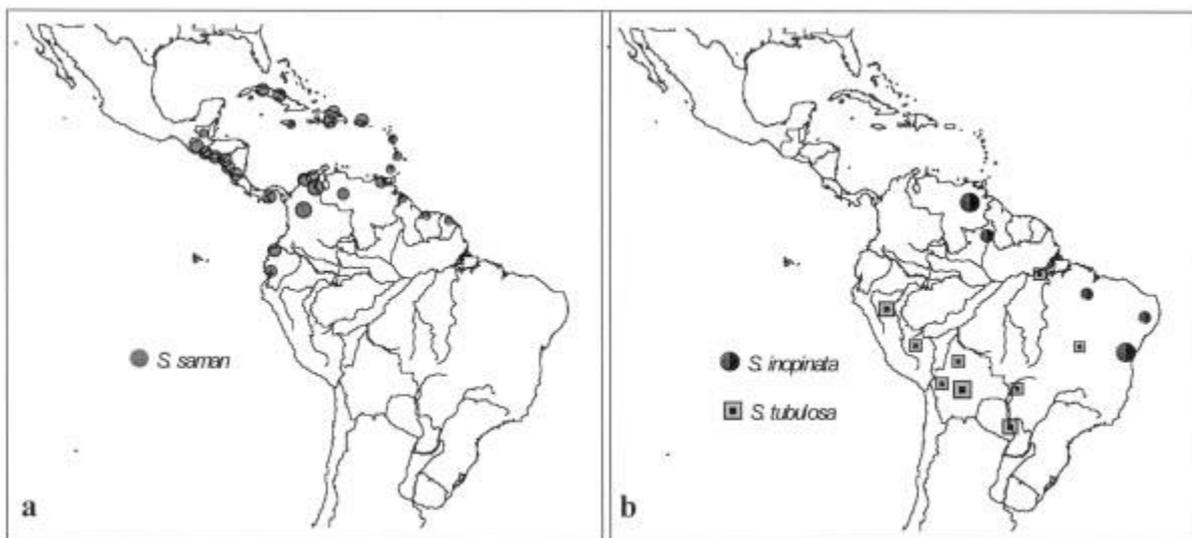
3.5 Família Fabaceae Lindl. e gênero *Samanea* Merril

A família Fabaceae Lindl. é considerada a terceira maior família de plantas, englobando aproximadamente 36 tribos, 750 gêneros e 19.500 espécies e está distribuída em quase todos os continentes, exceto na Antártida (LEWIS; ARCE, 2005; LPWG, 2017). A classificação tradicional dividia a família Fabaceae em três subfamílias: Caesalpinioideae, Mimosoideae e Papilionoideae, as quais podem ser diferenciadas principalmente pela prefloração das pétalas (LEWIS; ARCE, 2005). No entanto uma classificação recente baseada em estudos taxonômicos e moleculares foi endossada pelo Legume Phylogeny Working Group (2017), no qual agrupou a família em seis subfamílias, Caesalpinioideae DC., que engloba a antiga Mimosoideae, Cercidoideae, Detarioideae, Dialioidea, Duparuquetioidea e Paipilionoideae (LPWG, 2017).

Dentre as seis subfamílias, a Caesalpinioideae é a segunda mais diversa em número de gêneros e espécies. Possui aproximadamente 148 gêneros e 4400 espécies que agora inclui o clado Mimosoideae (LPWG, 2017) e está distribuído nas tribos Mimoseae, Mimozygantheae, Acacieae e Ingeae (LEWIS; ARCE, 2005), definidas com base em uma combinação de caracteres morfológicos, como número e fusão de estames, prefloração e fusão das sépalas. Com ampla distribuição nas regiões tropicais e subtropicais, principalmente, em regiões áridas e semiáridas são importantes fontes de forragem e combustível (ELIAS, 1981). Do ponto de vista fitoquímico, são ricos em metabólitos secundários, como compostos fenólicos, flavonoides e terpenos (ALVES *et al.*, 2012; CARVALHO *et al.*, 2011; GHALY; MELEK; ABDELWAHED, 2010; WYREPKOWSKI *et al.*, 2014).

Entre os gêneros da subfamília Caesalpinioideae está o *Samanea* Merril que foi descrito pela primeira vez por Barneby e Grimes (1996) e recentemente por Lewis e Arce (2005), com a existência de 3 espécies: *Samanea tubulosa* Benth., *Samanea inopinata* Harms e *Samanea saman* Jacq., todas endêmicas da área intertropical que vai de Norte a Sul da América, indicando que a distribuição contempla desde El Salvador, Brasil, Bolívia e Paraguai (Figura 1) (ZAPATER; HOC; LOZANO, 2011).

Figura 1. Mapa da distribuição das espécies do gênero *Samanea* nas zonas intertropicais da América do Norte e Sul. (a) Distribuição da *Samanea saman* (Jacq.) e (b) Distribuição da *Samanea inopinata* (Harms) Ducke e *Samanea tubulosa* (Benth.).



Fonte: DURR, 2001.

As árvores do gênero *Samanea* (Merrill), também conhecidas como árvores da chuva, apresentam uma ampla variedade de atividades farmacológicas. Ajam *et al.* (2012) estudando frações obtidas a partir do extrato bruto de *Samanea saman* Jacq. e alcaloides dela isolados, identificaram significativa atividade antimicrobiana contra *Bacillus subtilis*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium oxalicum* e *Cladosporium oxysporum*, com uma zona de inibição variando de $16,67 \pm 0,57$ mm a $46 \pm 1,00$ mm, a uma concentração de 100 mg mL^{-1} , enquanto que o alcaloide isolado Pithecolobina 2, apresentou maior atividade antimicrobiana contra *Bacillus subtilis* com concentração inibitória mínima de $0,019 \text{ mg mL}^{-1}$.

Em outro estudo realizado por Thippeswamy *et al.* (2011), em que testaram a atividade antimicrobiana de extratos brutos e compostos isolados de *Samanea saman* Jacq., também foi possível observar atividade antibacteriana frente a *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* e *Fusarium moniliforme*.

Em um estudo com o extrato de folhas de *Samanea saman* Jacq., avaliando a atividade antinociceptiva no teste de retirada da cauda, Muzammil *et al.* (2013) demonstraram atividade antinociceptiva na dose de 100 mg kg^{-1} quando comparado com petidina. Arumugam *et al.* (2011), avaliaram a atividade antiúlcera do extrato etanólico das cascas de *Samanea saman* Jacq. em modelos de lesões gástricas em ratos albinos e concluíram que o extrato na dose de 400 mg kg^{-1} é efetivo na atividade antiúlcera. Demonstrando assim atividade biológicas para o gênero *Samanea*.

3.6 *Samanea tubulosa* Benth.

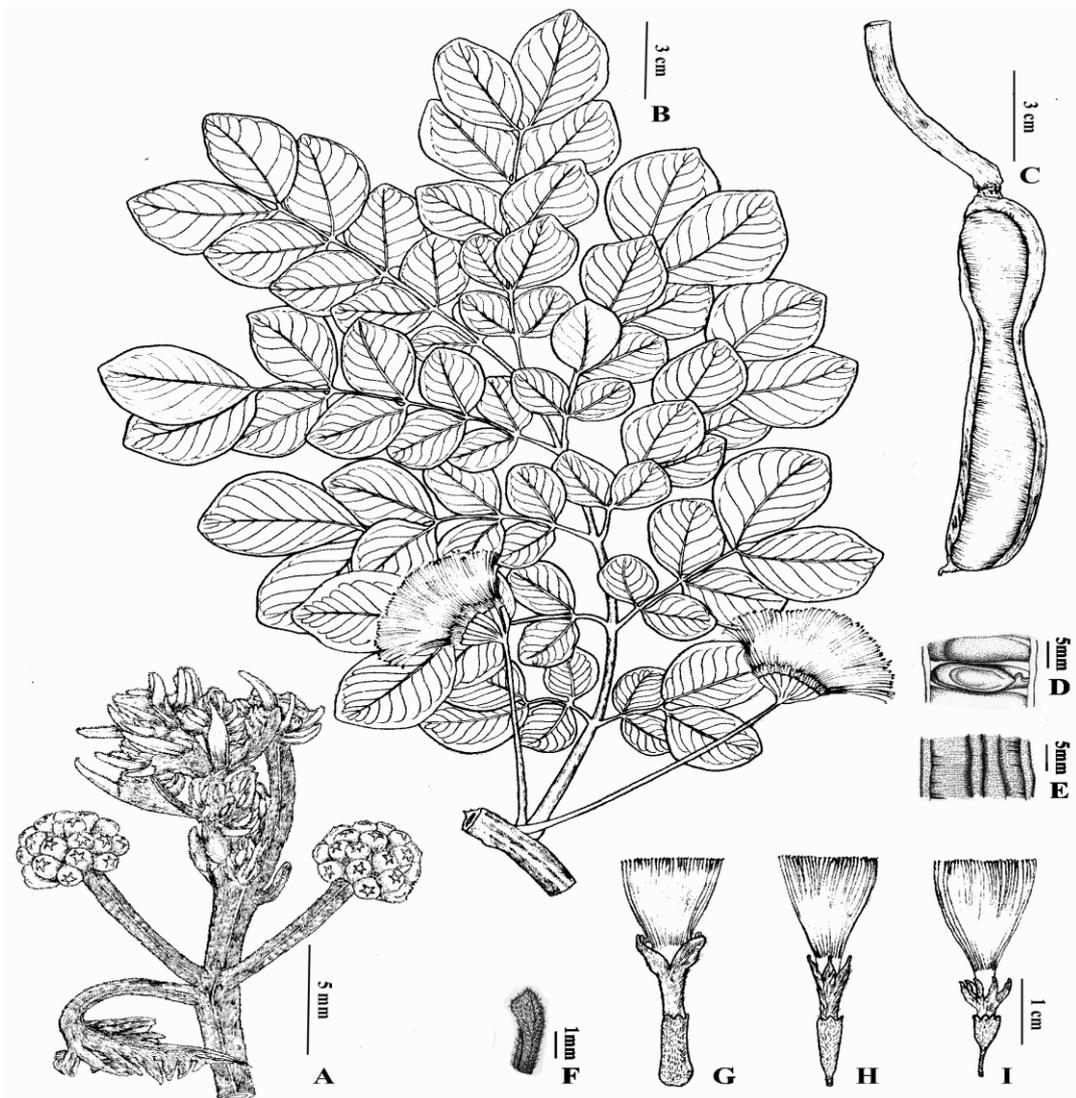
A *Samanea tubulosa* Benth. conhecida popularmente como bordão de velho é uma árvore de pequeno porte medindo de 3-8 m de altura e 20-30 cm de diâmetro, suas folhas são alternadas, compostas bipinadas, medindo de 8-28 cm de comprimento e com dois a cinco pares de pinas, medindo 8 a 20 cm de comprimento; apresentam o pecíolo e raque tomentosos, os folíolos são opostos, discolors e curto-peciolados, dispendo-se aos pares. As flores agrupam-se em capítulos terminais com 12 a 20 flores, exibindo inflorescências com pedúnculos de 4 a 10 cm, são hermafroditas, ou seja, possuem cálice e corola diminutos, sépalas verdes e pétalas creme, com numerosos estames vistosos, metade brancos e metade purpúreos. O florescimento ocorre durante os meses de agosto a novembro e o amadurecimento dos frutos ocorre durante o fim do período chuvoso (maio-julho) (CARVALHO, 2007).

O fruto mostra-se como um legume do tipo séssil indeiscente, normalmente 1 a 2 por capítulo, cilíndrico a plano, medindo de 7 a 18,5 cm de comprimento por 1,2 a 1,8 cm de largura, carnoso, com polpa doce e perfumada com sabor de alcaçuz, contendo de 5 a 31 sementes. Estas são oblongas e castanhas, e medem de 5 a 13 mm de comprimento (Figura 2). Devido à beleza encantadora de suas inflorescências, *Samanea tubulosa* Benth. apresenta alto potencial ornamental (CARVALHO, 2007). Na medicina tradicional é indicada para o tratamento de infecções cutâneas, inflamações gástricas e infestações parasitárias e dor nos olhos (CRUZ, 2006; HAJDU; HOHMANN, 2012). A abordagem fitoquímica desta espécie revelou como importantes constituintes do extrato bruto, as seguintes classes de compostos: alcaloides, saponinas, flavonoides, taninos, flavonas, flavanonas, flavonóis e catequinas (SALES, 2015; ARAÚJO *et al.*, 2015).

O extrato etanólico da espécie *S. tubulosa* foi avaliado contra diversas espécies de *Leishmania* ssp., mostrando atividade leishmanicida promissora, exibindo valores de concentração inibitória de 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ contra uma das espécies de *Leishmania* ssp. (ANTINARELLI *et al.*, 2015).

Em estudos anteriores realizados pelo grupo com extrato bruto das vagens de *S. tubulosa* foi demonstrando que esta espécie apresenta atividade antiedematogênica observada pela redução do edema da pata, na 3ª h (pico de resposta inflamatória induzida por carragenina) com a dose 100 mg kg⁻¹ apresentando 91,80% de inibição, bem como uma diminuição da migração de neutrófilos tanto no tecido da pata como na cavidade peritoneal, efeito confirmado pela diminuição da atividade da mieloperoxidase (MPO) (SALES, 2015)

Figura 2. Características morfológicas da planta *Samanea tubulosa* Benth. **A.** ápice da inflorescência; **B.** folha com capítulos; **C.** fruto. **D.** vista interna do fruto e sementes; **E.** vista parcial do epicarpo. **F.** bráctea; **G.** flor central; **H-I.** flores.



Fonte: ZAPATER; HOC; LOZANO, 2011.

Tendo em vista que *S. tubulosa* é utilizada na medicina tradicional para o tratamento de condições inflamatórias, poucos estudos científicos sustentam o uso etnofarmacológico e demonstram atividade anti-inflamatória e antinociceptiva da planta. Diante do que foi exposto, há uma necessidade de investigar as atividades biológicas relacionadas a atividade anti-inflamatória, antinociceptiva e identificar os componentes químicos da planta, bem como o mecanismo de ação envolvidos. Dessa forma as frações de *S. tubulosa*, poderão subsidiar o desenvolvimento de uma formulação farmacêutica como perspectivas da produção de um fitoterápico.

4 MATERIAL E MÉTODOS

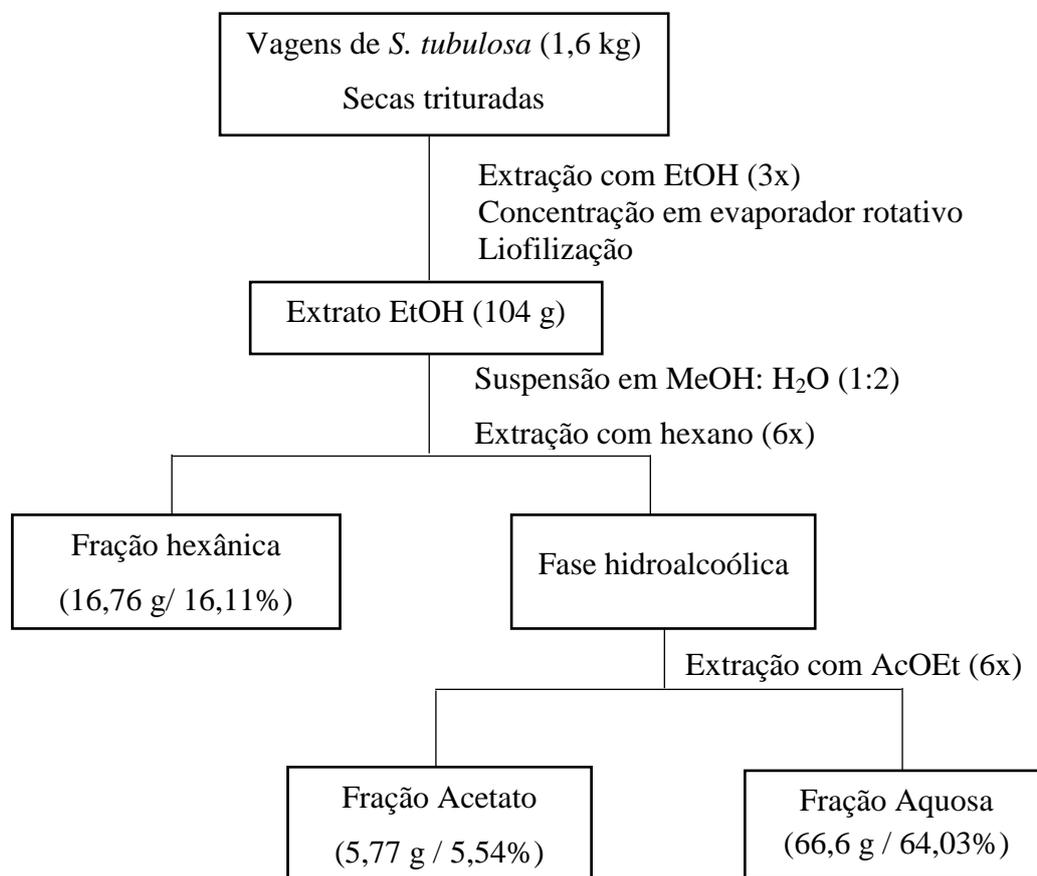
4.1 Material vegetal

As vagens de *S. tubulosa* foram coletadas em julho de 2014, no município de Teresina-PI, no Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Piauí - UFPI. A exsicata da espécie encontra-se depositada no Herbário Graziela Barroso da Universidade Federal do Piauí – UFPI, com o número TEPB 27.261.

4.2 Obtenção do extrato e frações das vagens de *S. tubulosa*

As vagens da espécie *S. tubulosa* (1600 g) foram secas em estufa com circulação forçada de ar à 40 °C, moídas em moinho de facas até a obtenção de um pó fino e submetidas a maceração com etanol P.A. por sete dias, 3 vezes consecutivas. O solvente foi filtrado e concentrado em evaporador rotativo (Quimis 344B2) a 40 °C sob pressão reduzida, e em seguida liofilizado, obtendo-se 104 g de extrato etanólico (EtOH).

Figura 3. Procedimento de obtenção do extrato etanólico e de frações das vagens de *S. tubulosa*



O extrato etanólico foi suspenso em MeOH-H₂O (1:2) e em seguida submetido a partição líquido-líquido utilizando os solventes hexano e acetato de etila (AcOEt) sucessivamente, obtendo-se as frações correspondentes a cada solvente. As fases obtidas foram concentradas por eliminação dos solventes sob pressão reduzida, obtendo-se a fração hexânica (FHEX), fração acetato de etila (FAcOEt) e a fração aquosa (FAq).

4.3 Análise cromatográfica comparativa das frações de partição do extrato etanólico

As frações obtidas da partição do extrato EtOH das vagens de *S. tubulosa* foram analisadas por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) de gel de sílica usando como eluentes: hexano-AcOEt (8:2); CHCl₃-MeOH (9:1); CHCl₃-MeOH-H₂O (65:30:5) e solução de sulfato cério (Ce(SO₄)₂) como revelador. Preparou-se soluções de 10 mg mL⁻¹ das frações de partição, solubilizando as frações FAcOEt e FAq em metanol e a fração FHEX em clorofórmio, em seguida com o auxílio de um tubo capilar de vidro aplicou-se cada amostra em placas cromatográficas. Após análise do perfil em CCDC e ultravioleta (UV), estas foram submetidas a fracionamento cromatográfico com posterior identificação estrutural de seus constituintes químicos.

4.4 Análise Cromatográfica da fração hexânica

A análise da fração hexânica (FHEX) foi realizada por meio de cromatografia gasosa e espectrometria de massas (CG-EM), feita nas seguintes condições: a) utilizou-se cromatógrafo gasoso Agilent série 7890A USA com detector de massa modelo 5975C apresentando interface acoplada a um computador para controle e aquisição de dados com sistema de amostragem automatizada; b) coluna da marca HP-HP-5:0,25 mm (di) x 30 m comprimento, espessura do filme 0,25 µm de 5% de fenil e 95% de dimetil polisiloxano; c) a programação de temperatura do forno iniciou com 50 °C (2 min) até 220 °C a 20 °C min⁻¹, em seguida até 250 °C a 5 °C min⁻¹, após 10 °C min⁻¹ até 290 °C por 3 min e 20 °C min⁻¹ até 300 °C permanecendo por 15 min; d) volume de injeção de 1,0 µL. Foi utilizado um detector: EM-razão *m/z* com scan 30 a 450 *UMA* e o gás de arraste: He, 1,0 mL min⁻¹ (50 °C), no injetor: Split pulled = 30 psi a 5 min; razão do Split 70, 0:1 a 280 °C.

Na tentativa de elucidar as estruturas químicas de alguns destes compostos foram processados seus respectivos espectros de massas e comparados com dados da literatura bem

como confrontados com biblioteca NIST 8.0 em relação ao íon molecular formado e respectivos tempos de retenção.

4.5 Análise por inserção direta da fração acetato de etila por espectrometria de massas íon trap com ionização por eletrospray (ESI-ITMS)

A análise da composição da fração acetato de etila foi realizada por espectrometria de massas íon trap com ionização por eletrospray (ESI-IT-MS), uma alíquota de 10 mg da fração AcOEt foi dissolvida em MeOH (°HPLC), filtrada em membrana de nylon de 0,2 µm e dissolvida a 50 mg L⁻¹. Uma alíquota de 500 µL foi injetada por inserção direta no espectrômetro de massas (Amazon X, Bruker Daltonics), nos seguintes parâmetros: fonte de ionização ESI em modo íon negativo ([M-H]⁻), faixa de *m/z* 100-1300 Da, voltagem do capilar 4,5 kV, gás nebulização (N₂) a 8,0 L min⁻¹, com fluxo de amostra 3,0 µL min⁻¹ e temperatura de fonte = 220 °C.

4.6 Animais

Foram utilizados camundongos albinos (*Mus musculus*, linhagem Swiss) machos adultos pesando entre 25-30 g e ratos albinos (*Rattus norvegicus*, linhagem Wistar) machos adultos pesando entre 180-220 g, provenientes do Biotério Central da UFPI. Foram selecionados apenas animais do sexo masculino por causa das suas características fisiológicas e hormonais. Os animais foram alojados em gaiolas-padrão, mantidos a 24 ± 1 °C e ciclo claro-escuro de 12 h com água e ração à vontade. Para a execução dos protocolos experimentais, os animais foram mantidos em jejum de sólidos por 12 horas e separados por grupos de seis animais. Após os procedimentos experimentais, os animais foram eutanasiados com sobre dose de tiopental sódico (100 mg kg⁻¹, i.p.). Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética em Experimentação com Animais da Universidade Federal do Piauí (protocolos 053/2015 e 146/2016).

4.7 Drogas e produtos químicos

As seguintes drogas e frações do extrato etanólico foram usadas: FHEX, FAcOEt, FAq, ketamina, xilazina, tiopental sódico, carragenina, indometacina, formaldeído, capsaicina, morfina, naloxona, glibenclamida, L-arginina, L-NOARG, diazepam e cloreto

de sódio, os produtos químicos foram de grau analítico. Para os estudos farmacológicos, as FHEX, FAcOEt e FAq foram dissolvidas em Tween 80 a 2% em NaCl a 0,9% (10 mL kg⁻¹, v.o.). As doses foram determinadas como miligramas de FHEX, FAcOEt e FAq, por grama de peso corporal (mg kg⁻¹). O intervalo de doses foi de 3,125 a 200 mg kg⁻¹. As FHEX, FAcOEt e FAq foram administradas oralmente (v.o.) em diferentes doses a fim de construir uma curva dose-resposta.

4.8 Determinação da toxicidade oral aguda em camundongos

Para o estudo da toxicidade aguda, foram adotadas metodologias preconizadas pelo Guia OECD 423 (OECD, 2001). Foram utilizados camundongos Swiss machos (25 a 30 g), mantidos em jejum de sólidos durante 12 h. Os animais foram divididos em grupos de 6 animais e tratados por via oral com dose única de 300 mg kg⁻¹ das frações (FHEX, FAcOEt e FAq). Como não foram observadas mortes ou alterações comportamentais, a dose utilizada foi aumentada não ultrapassando 2000 mg kg⁻¹. O grupo controle recebeu água destilada, em dose única, por via oral, no volume de 10 mL kg⁻¹. Os animais foram avaliados clinicamente e comportamentalmente a cada 30 minutos durante as primeiras quatro horas e diariamente até o 14º dia.

Após a investigação toxicológica, os animais foram anestesiados (associação de 60 mg de ketamina + 6 mg de xilazina por kg de PC, via intraperitoneal), colocadas em decúbito dorsal e submetidos à punção intracardíaca para coleta do sangue destinado à realização de exames bioquímicos (AST, ALT, ureia e creatinina). Foram eutanasiados com tiopental sódico (100 mg kg⁻¹, i.p.), para determinar o peso relativo dos órgãos internos.

4.9 Efeito antiedematogênico de FHEX, FAcOEt e FAq

4.9.1 Efeito de FHEX e FAcOEt sobre o edema de pata induzida por carragenina em camundongos

Os experimentos de edema de pata foram adaptados e realizados como descrito por (WINTER; RISLEY; NUSS, 1962). Camundongos foram divididos em grupos (n=6 animais) e receberam uma injeção intraplantar de 0,1 mL de carragenina 1% dissolvida em salina 0,9%. Os animais foram tratados, via oral, com veículo (10 mL kg⁻¹, v.o.), FHEX (50; 100; 200 mg kg⁻¹), FAcOEt (50; 100; 200 mg kg⁻¹), ou indometacina (10 mg kg⁻¹) e após 1 h, receberam a carragenina. O volume da pata posterior direita foi medido com um paquímetro digital em

diferentes tempos (0, 1, 2, 3, 4 e 5 h) após administração intraplantar de carragenina. Após o teste de edema de pata, os animais foram eutanasiados. O edema foi expresso pela diferença, em milímetros (mm), entre o diâmetro final e o diâmetro inicial da pata (WINTER; RISLEY; NUSS, 1962).

4.9.2 Efeito de FAq sobre o edema de pata induzida por carragenina em ratos

Os experimentos de edema de pata foram adaptados e realizados como descrito por (WINTER; RISLEY; NUSS, 1962). Ratos foram divididos em grupos (n=6 animais) e receberam uma injeção intraplantar de 0,1 mL de carragenina 1% dissolvida em salina 0,9%. Os animais foram tratados, via oral, com veículo (10 mL kg⁻¹, v.o.), FAq (50; 100; 200 mg kg⁻¹) ou indometacina (10 mg kg⁻¹) e após 1 h, receberam a carragenina. O volume da pata posterior direita foi medido com um paquímetro digital em diferentes tempos (0, 1, 2, 3, 4 e 5 h) após administração intraplantar de carragenina. Após o teste de edema de pata, os animais foram eutanasiados. O edema foi expresso pela diferença, em milímetros (mm), entre o diâmetro final e o diâmetro inicial da pata (WINTER; RISLEY; NUSS, 1962).

4.9.3 Efeito de FHEX sobre o edema de pata induzida por dextrana em camundongos

Camundongos machos Swiss (n=6) foram pré-tratados com veículo (10 mL kg⁻¹, v.o.), FHEX (100 mg kg⁻¹) ou indometacina (10 mg kg⁻¹). Após 30 min, foi administrado 50 µL de dextrana (1 mg mL⁻¹, i.pl.) na pata traseira direita, na região subplantar. A espessura das patas foi registrada com um paquímetro digital (Pantec ®), imediatamente antes da administração da dextrana e a cada 30 min por um intervalo de até 2 horas. O edema foi expresso pela diferença, em milímetros (mm), entre a espessura final e a espessura inicial da pata (WINTER; RISLEY; NUSS, 1962).

4.9.4 Efeito de FHEX e FAcOEt sobre o edema de pata induzida por prostaglandina E2 (PGE2) em camundongos

Camundongos machos Swiss (n=6) foram pré-tratados com veículo (10 mL kg⁻¹, v.o.), FHEX (200 mg kg⁻¹), FAcOEt (200 mg kg⁻¹) ou indometacina (10 mg kg⁻¹). Após 30 min, foi administrado 50 µL de prostaglandina E2 (1 mg mL⁻¹, i.pl.) na pata traseira direita, na região subplantar. A espessura das patas foi registrada com um paquímetro digital (Pantec ®),

imediatamente antes da administração dos agentes de indução de edema e a cada 30 min por um intervalo de até 2 horas. O edema foi expresso pela diferença, em milímetros (mm), entre a espessura final e a espessura inicial da pata (WINTER; RISLEY; NUSS, 1962).

4.10 Efeito antinociceptivo das FHEX, FAcOEt e FAq

4.10.1 Efeito de FHEX e FAcOEt no teste de formalina em camundongos

Camundongos Swiss, machos, com peso de 25-30 g, divididos em grupos de seis animais, foram tratados por via oral com veículo (10 mL kg⁻¹, v.o.), FHEX (3,125; 6,25; 12,5; 25 mg kg⁻¹, v.o.), FAcOEt (3,125; 6,25; 12,5; 25 mg kg⁻¹, v.o.) 45 minutos antes e morfina (5 mg kg⁻¹, s.c.) 30 minutos antes da injeção intraplantar (i.pl.), na pata direita traseira, de formalina 1% (20 µL pata⁻¹). O tempo de lambedura da pata foi registrado, em segundos, de 0-5 min (1ª. Fase) e 15-30 min (2ª. Fase) após a administração da formalina (HUNSKAAR; HOLE, 1987).

4.10.2 Efeito de FAq no teste de formalina em ratos

Ratos Wistar, machos, com peso de 180-220 g, divididos em grupos de seis animais, foram tratados por via oral com veículo (10 mL kg⁻¹, v.o.), FAq (6,25; 12,5; 25 mg kg⁻¹, v.o.) 45 minutos antes e morfina (5 mg kg⁻¹, s.c.) 30 minutos antes da injeção intraplantar (i.pl.), na pata direita traseira, de formalina 1% (20 µL pata⁻¹). O tempo de lambedura da pata foi registrado, em segundos, de 0-5 min (1ª. Fase) e 15-30 min (2ª. Fase) após a administração da formalina (HUNSKAAR; HOLE, 1987).

4.10.3 Efeito de FHEX e FAcOEt no teste de capsaicina em camundongos

Camundongos Swiss, machos, com peso de 25-30 g, divididos em grupos de seis animais, foram tratados com FHEX (6,25; 12,5; 25 mg kg⁻¹, v.o.), FAcOEt (3,125; 6,25; 12,5; 25 mg kg⁻¹, v.o.), veículo (10 mL kg⁻¹, v.o.), 45 minutos e morfina (5 mg kg⁻¹, s.c.) 30 minutos antes da injeção intraplantar, na pata direita traseira, de capsaicina (2 µg 20 µL⁻¹ pata). O tempo de lambedura da pata foi registrado, em segundos, durante um período de 5 minutos após a injeção da capsaicina (SANTOS *et al.*, 2003).

4.10.4 Efeito de FHEX e FAcOEt no teste do glutamato em camundongos

Camundongos Swiss, machos, com peso de 25-30 g, divididos em grupos de seis animais, foram tratados com FHEX (6,25; 12,5; 25 mg kg⁻¹), FAcOEt (6,25; 12,5; 25 mg kg⁻¹), veículo (10 mL kg⁻¹, v.o.) 45 minutos e morfina (5 mg kg⁻¹, s.c.) 30 minutos antes da injeção intraplantar, na pata direita traseira, de glutamato (20 µL pata⁻¹) na região dorsal da pata traseira direita. O tempo que o animal lambe ou morde a pata durante (15 min) foi quantificado e comparado entre os grupos (BEIRITH *et al.*, 2002).

4.11 Avaliação dos possíveis mecanismo de ação envolvidos na atividade antinociceptiva de FHEX e FAcOEt

Com o objetivo de esclarecer os possíveis mecanismo de ação envolvidos nas antinocicepção de FHEX e FAcOEt, foi escolhido o teste do glutamato e a dose de 12,5 mg kg⁻¹ (v.o.), por ser a dose que demonstrou efeito mais evidente no modelo selecionado. As vias de neuromodulação escolhidas foram a opioide, dos canais de K⁺ sensíveis ao ATP (K⁺_{ATP}) e L-arginina.

4.11.1 Participação do sistema opioide

A fim de avaliar a participação do sistema opioide sobre o efeito antinociceptivo de FHEX e FAcOEt, foi utilizado naloxona, uma antagonista opioide não- seletivo. Administrou-se naloxona (5 mg kg⁻¹, s.c.) quinze minutos antes dos grupos serem tratados com as FHEX e FAcOEt (12,5 mg kg⁻¹, v.o.), como veículo (10 mL kg⁻¹, v.o.) ou com padrão morfina (10 mg kg⁻¹, i.p.). Dois grupos foram tratados apenas com as FHEX e FAcOEt (12,5 mg kg⁻¹, v.o.), respectivamente. Trinta minutos após estes tratamentos, os animais foram submetidos ao teste do glutamato (BEIRITH *et al.*, 2002).

4.11.2 Participação dos canais de K⁺_{ATP}

Como o objetivo de verificar o envolvimento dos canais de K⁺_{ATP} na atividade antinociceptiva das FHEX e FAcOEt, foi utilizada a glibenclamida, uma sulfoniluréia que bloqueia especificamente estes canais.

Os animais receberam um pré-tratamento com glibenclamida (10 mg kg⁻¹, i.p.) quinze minutos antes da administração das FHEX e FAcOEt (12,5 mg kg⁻¹, v.o.) ou veículo. Dois grupos foram tratados apenas com as FHEX e FAcOEt (12,5 mg kg⁻¹, v.o.), respectivamente. Após trinta minutos destes tratamentos foi verificado o tempo de lambida da pata no teste do glutamato (BEIRITH; SANTOS; CALIXTO, 2002).

4.11.3 Participação da via L-arginina-óxido nítrico

Para avaliar a participação da via L-arginina-óxido nítrico no efeito antinociceptivo induzido pelas FHEX e FAcOEt (12,5 mg kg⁻¹, v.o.), os animais foram previamente tratados com L-arginina (600 mg kg⁻¹, i.p., um precursor de óxido nítrico) e depois de 20 minutos, receberam FHEX e FAcOEt (12,5 mg kg⁻¹, v.o.), N^ω-nitro-L-arginina (L-NOARG, 75 mg kg⁻¹, i.p., um inibidor de óxido nítrico) ou veículo. Decorrida 1 h após a administração das FHEX, FAcOEt e 30 min após o tratamento com L-NOARG, os animais foram avaliados quanto à nocicepção induzida pela injeção intraplantar de 20 µL de solução de glutamato (20 µmol pata⁻¹) (BEIRITH; SANTOS; CALIXTO, 2002; PIETROVSKI *et al.*, 2006).

4.12 Avaliação motora de FHEX e FAcOEt

4.12.1 Teste do campo aberto

Os camundongos foram divididos em grupos (n = 6) e tratados com veículo (10 mL kg⁻¹, v.o.), FHEX (6,25; 12,5; 25 mg kg⁻¹, v.o.), FAcOEt (6,25; 12,5; 25 mg kg⁻¹, v.o.) ou diazepam (4 mg kg⁻¹, i.p.). Após 60 minutos para as administrações v.o. ou 30 minutos para administração i.p., os animais foram levados individualmente ao campo aberto, que consiste em uma arena quadrada (30 x 30 x 15 cm), confeccionada em acrílico, com piso preto dividido em nove partes iguais, paredes transparentes e iluminada com luz vermelha. O animal foi posto na arena e deixado para explorar o ambiente por um minuto. Após esse período, foi avaliado o número de quadrantes atravessados com as quatro patas pelo animal, durante um tempo de 5 minutos (BROADHURST, 1957).

4.12.2 Teste do Rota-Rod

Por este método é possível detectar a ocorrência de incoordenação motora, permitindo uma interpretação mais precisa dos testes de nocicepção e inflamação. Camundongos machos

foram selecionados 24 h antes do experimento, através de uma triagem em sessões de 1 minuto de duração, a fim de eliminar os animais que não permaneceram na barra por três períodos consecutivos de 60 segundos. Os animais foram divididos em grupos ($n = 6$) e tratados com veículo (10 mL kg^{-1} , v.o.), FHEX e FAcOEt (6,25; 12,5; 25 mg kg^{-1} , v.o.) ou diazepam (4 mg kg^{-1} i.p.) como controle positivo e após uma hora de administração do veículo e das frações e 30 minutos do diazepam, os resultados foram expressos como o tempo (s) que os animais permaneceram no *Rota rod* e os animais foram submetidos novamente à barra giratória (DUNHAM; MIYA, 1957).

4.13 Análise estatística

Os dados foram apresentados como a média \pm erro padrão da média (E.P.M.). A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni ou Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram considerados como diferenças significativas entre as médias. Para análise dos dados e confecção dos gráficos foi utilizado o programa estatístico Software GraphPad Prism® 6.0.

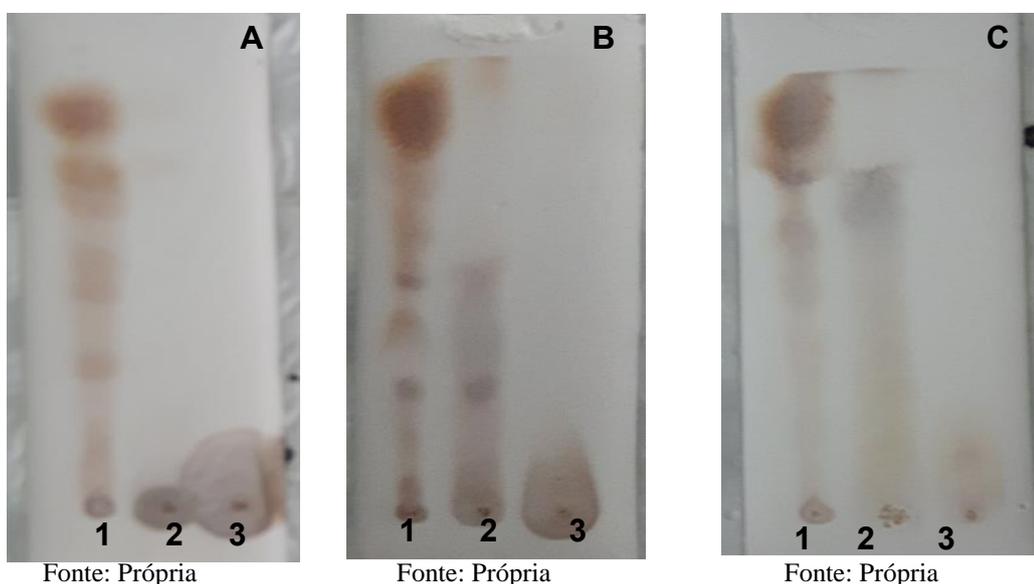
5 RESULTADOS

5.1 Análise fitoquímica

5.1.1 Análise cromatográfica comparativa das frações de partição do extrato etanólico

A análise por cromatografia em camada delgada (CCD) da fração FHEX utilizando o sistema de solventes hexano-AcOEt (8:2), mostrou a presença de manchas marrom e roxo características de material de natureza graxos e terpenoides respectivamente (Figura 4A). A FAcOEt quando eluída em CHCl_3 -MeOH (9:1) apresentou manchas marrons, indicativo de compostos de natureza graxos e manchas na cor azul o que sugere que sejam compostos pertencentes a classe dos terpenoides (Figura 4B). No sistema de solventes CHCl_3 -MeOH- H_2O (65:30:5), a FAcOEt apresentou também manchas em tons de roxo, azul e amarelo que pode sugerir a presença de terpenoides e flavonoides (CHAVES, 1997) (Figura 4C).

Figura 4. Cromatoplasmas das frações das vagens de *S. tubulosa*. **1:** FHEX; **2:** FAcOEt; **3:** FAq. Eluentes- **A:** hexano-AcOEt (8:2); **B:** CHCl_3 -MeOH (9:1); **C:** CHCl_3 -MeOH- H_2O (65:30:5).



5.1.2 Análise Cromatográfica da fração hexânica

A análise por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de massa (CG-EM) da FHEX mostrou 32 bandas no cromatograma de íons totais (Figura 5) com tempos de retenção, área relativa, razão massa/carga (m/z) de alguns fragmentos observados no espectro e os composto identificados na Tabela 1. A comparação dos espectros de massa obtidos (Figuras 6-16) com dados da biblioteca NIST 8.0 permitiu a identificação e confirmou a presença de 11 compostos.

Tabela 1. Compostos identificados por CG-EM na FHEX.

Nº Pico	Área %	Composto	T _R (min)	EM (m/z)
4	1,53	N, N-dietil- <i>p</i> -toluamida	6,055	119, 91, 190, 191
5	1,36	Hexadecano	6,272	57, 53, 71
11	12,26	Ácido Palmítico	7,773	73, 43, 60, 256
12	6,62	Palmitato de etila	7,917	88, 101, 43, 284
13	5,34	Ácido Linoleico	8,450	82, 67, 54, 280
14	6,15	Ácido Oleico	8,461	55, 41, 69
15	7,67	Éster etílico do ácido linoleico	8, 557	81, 67, 41, 308
16	8,84	Éster etílico do ácido oleico	8, 582	55, 41, 69, 310
17	1,56	Éster etílico do ácido esteárico	8, 676	88, 101, 43, 312
31	16,53	Lupenona	15,012	109, 205, 95, 424
32	12,05	Lupeol	15,268	409, 203, 191, 426

Fonte: Própria

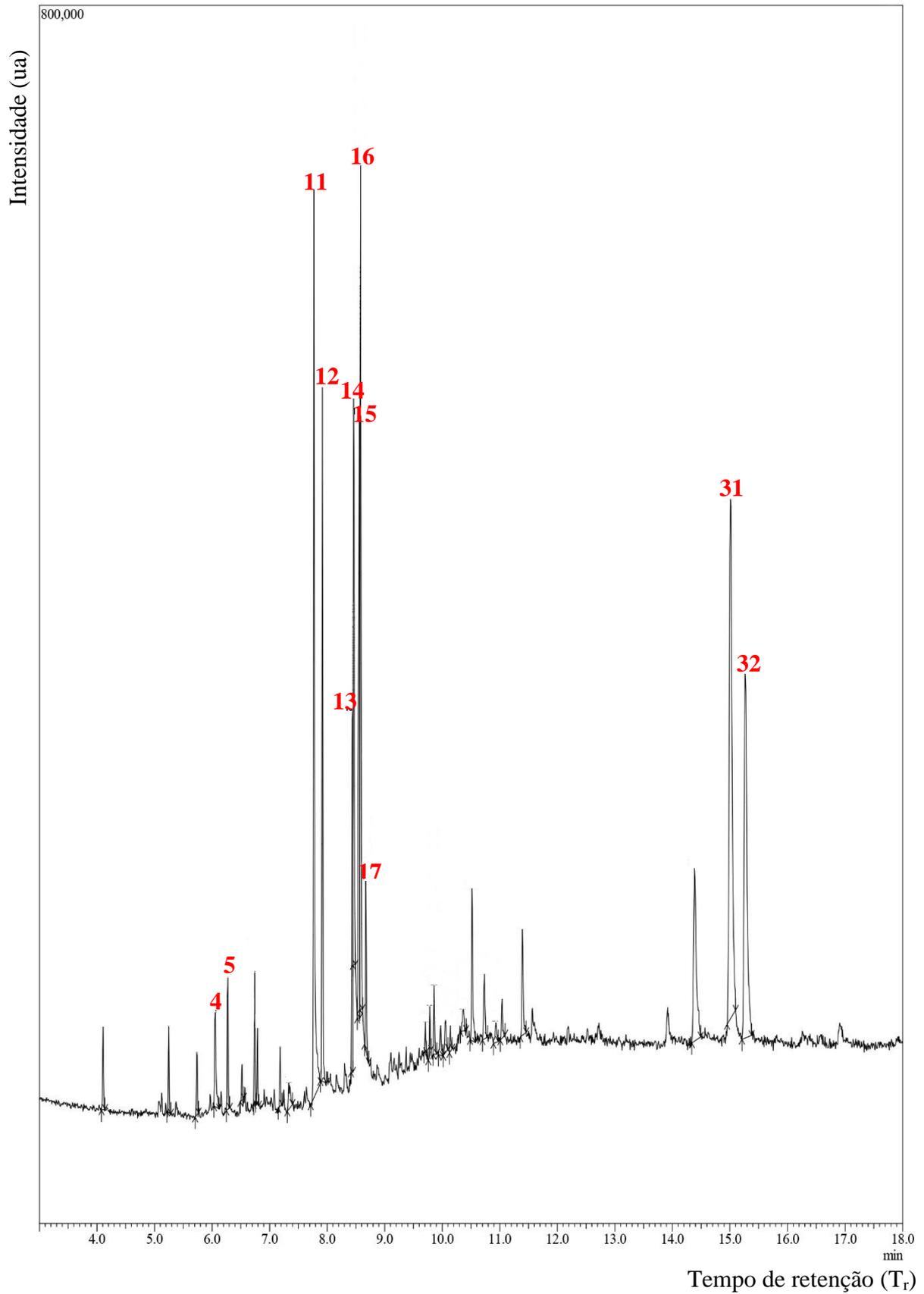
Figura 5. Cromatograma de íons totais da FHEX.

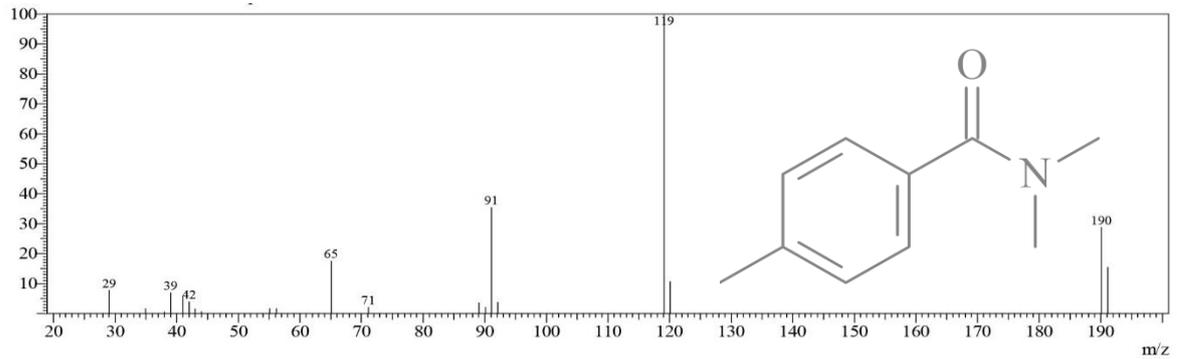
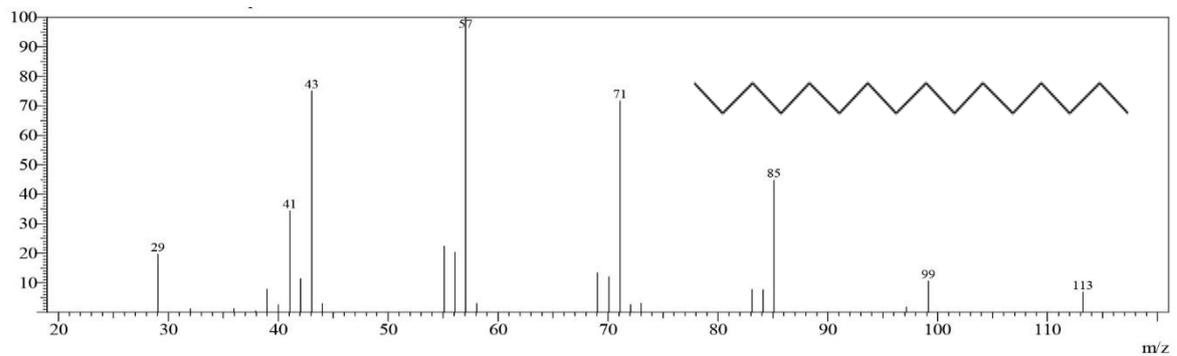
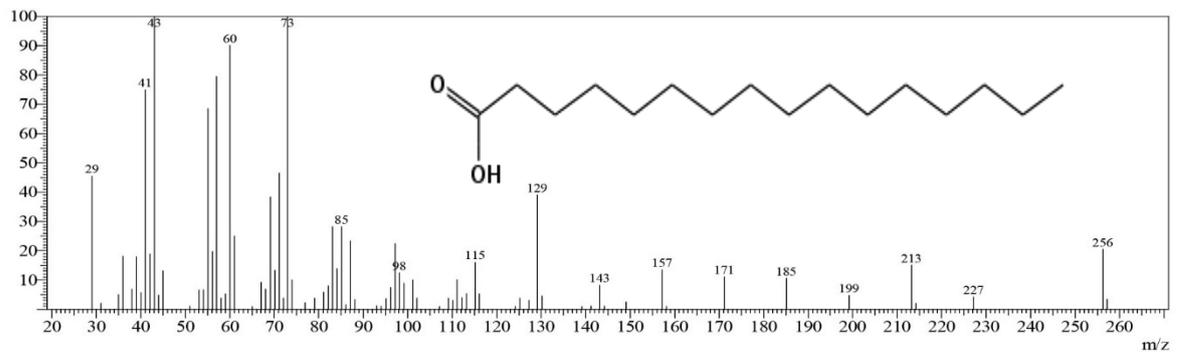
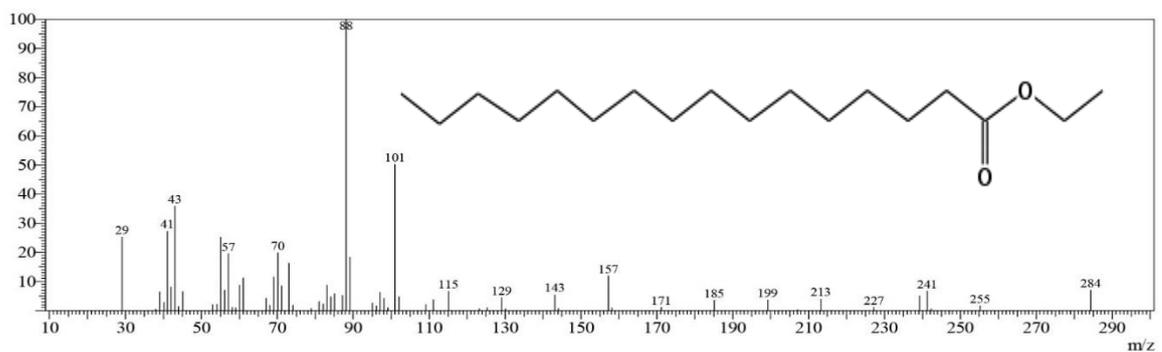
Figura 6. Espectro de massa do N, N-dietil-*p*-toluamida**Figura 7.** Espectro de massa hexadecano**Figura 8.** Espectro de massa do ácido palmítico**Figura 9.** Espectro de massa do palmitato de etila

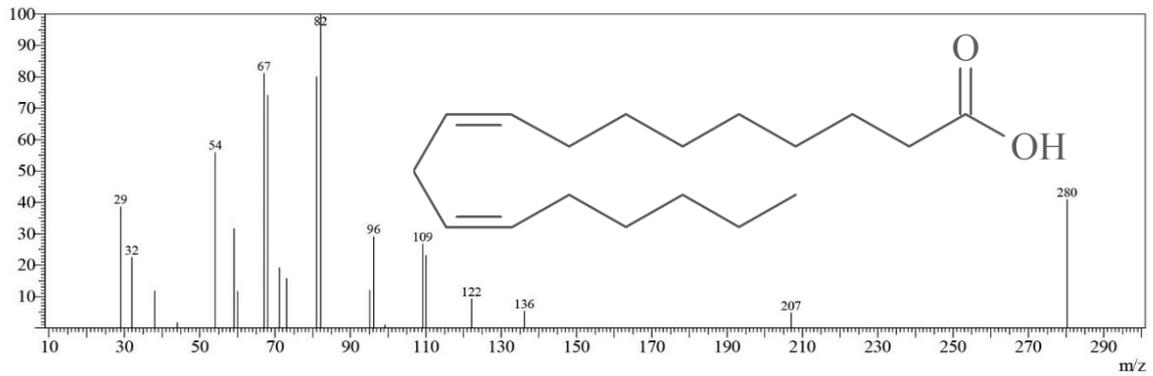
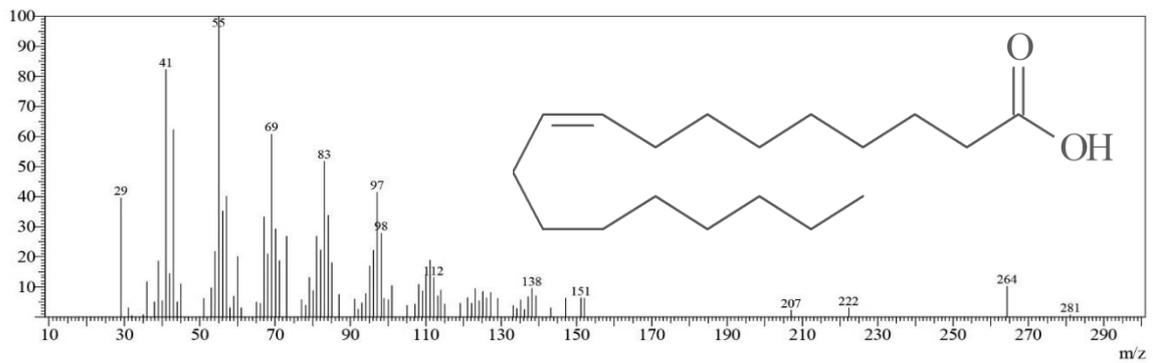
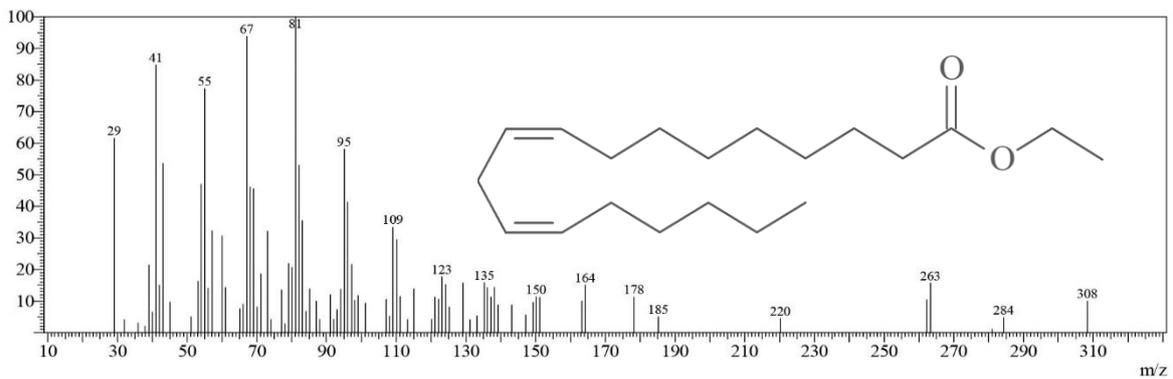
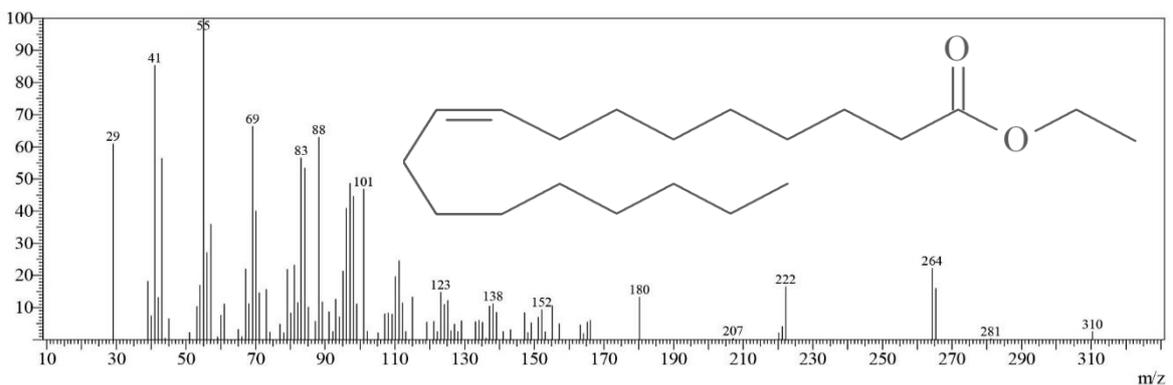
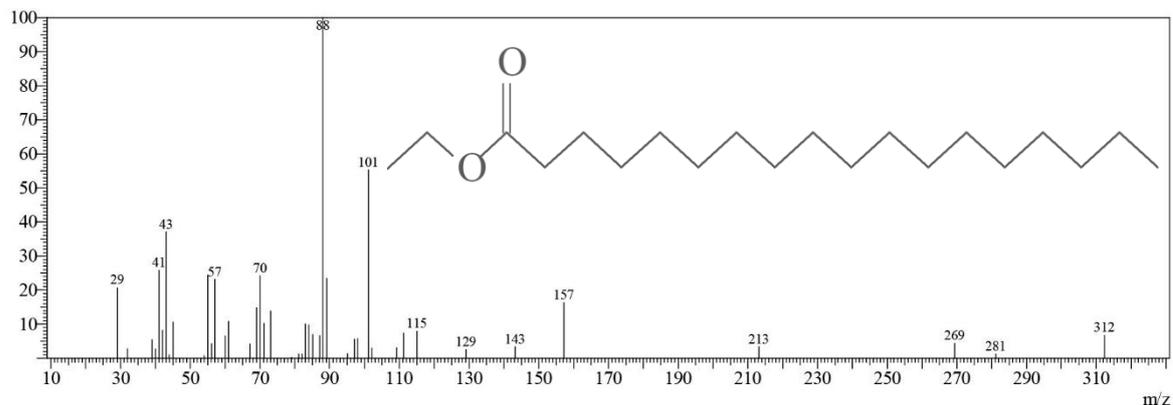
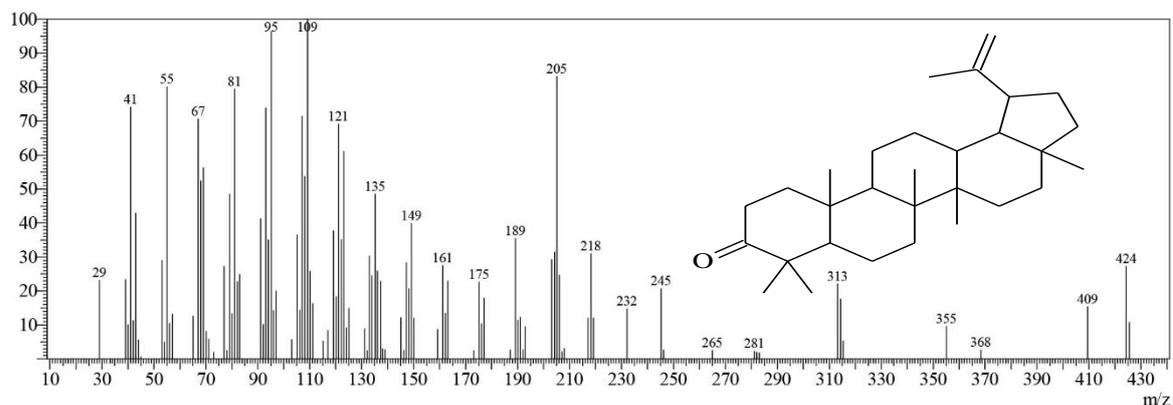
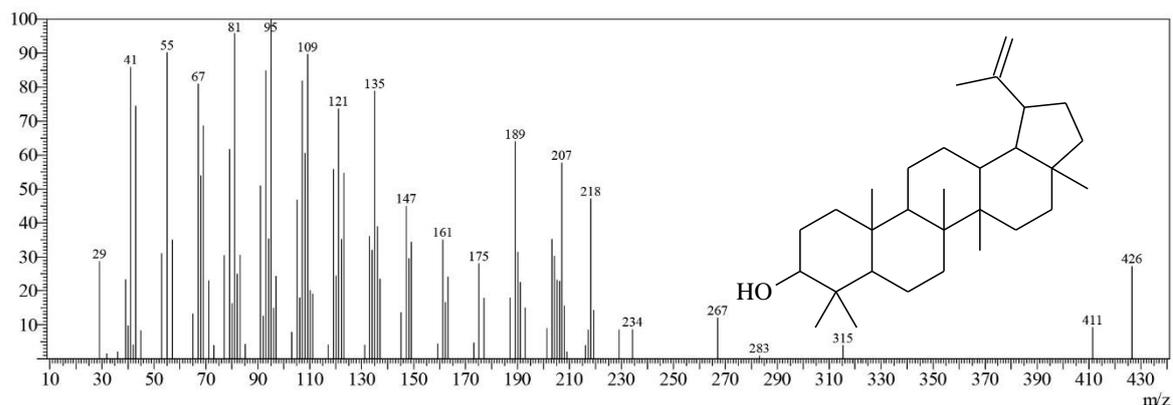
Figura 10. Espectro de massa do ácido linoleico**Figura 11.** Espectro de massa do Ácido Oleico**Figura 12.** Espectro de massa do éster etílico do ácido linoleico**Figura 13.** Espectro de massa do éster etílico do ácido oleico

Figura 14. Espectro de massa do éster etílico do ácido esteárico**Figura 15.** Espectro de massa do Lupenona**Figura 16.** Espectro de massa do Lupeol

Esses constituintes e suas composições de área de pico calculadas incluem, em sua maioria, ácidos graxos e seus ésteres (52,1%) e triterpenos derivados do lupano (28,58%) como a lupenona (16,53%) e lupeol (12,05%).

5.1.3 Identificação dos constituintes da fração AcOEt por ESI(-)-ITMS

Na investigação dos constituintes químicos da fração acetato de etila das vagens de *S. tubulosa* por espectrometria de massas íon trap com ionização por eletrospray no modo negativo (ESI(-)-ITMS), apresentam picos percussores das moléculas desprotonadas ($[M-H]^-$) presentes na fração (faixa de m/z de 100-1300 Da), onde foi possível a identificação de dez constituintes químicos, entre compostos fenólicos e flavonoides como a luteolina.

Os espectros ESI(-)-ITMS, MS^2 e as fragmentações dos compostos identificados são apresentados nas Figuras 18 a 26 e na Tabela 2. As substâncias detectadas e conhecidas foram comparadas seu perfil de fragmentação com os já existentes na literatura, no qual apresentaram estruturas químicas características de substâncias fenólicas, tais como pirogalol m/z 125, ácido gálico m/z 169 (Figura 18), galato de etila m/z 197 (Figura 19), luteolina m/z 285 (Figura 20), ácido elágico m/z 301 (Figura 21), ácido cafeico-*O*-hexosídeo m/z 341 (Figura 22), quercetrina m/z 447 (Figura 23), 1,6- digaloiil-glucose m/z 483 (Figura 24). Assim como, flavonoides: luteolina-7-*O*-rutinosídeo m/z 593 (Figura 25) e quercetrina 3-*O*-(6-*O*-Ramnosil-glicosídeo) (rutina) m/z 609 (Figura 26). No espectro (Figura 17) observa-se os alguns picos com intensidade relativa superior aos demais, como por exemplo: m/z 125 (93%); 169 (100%); 197 (92%), que em princípio caracteriza fragmentos da classe dos taninos e m/z 301 (51%) de flavonoides.

Figura 17. Espectro ESI-ITMS da fração acetato de etila das vagens de *S. tubulosa* avaliado em modo negativo na faixa de íons com m/z de 100-1300 Da.

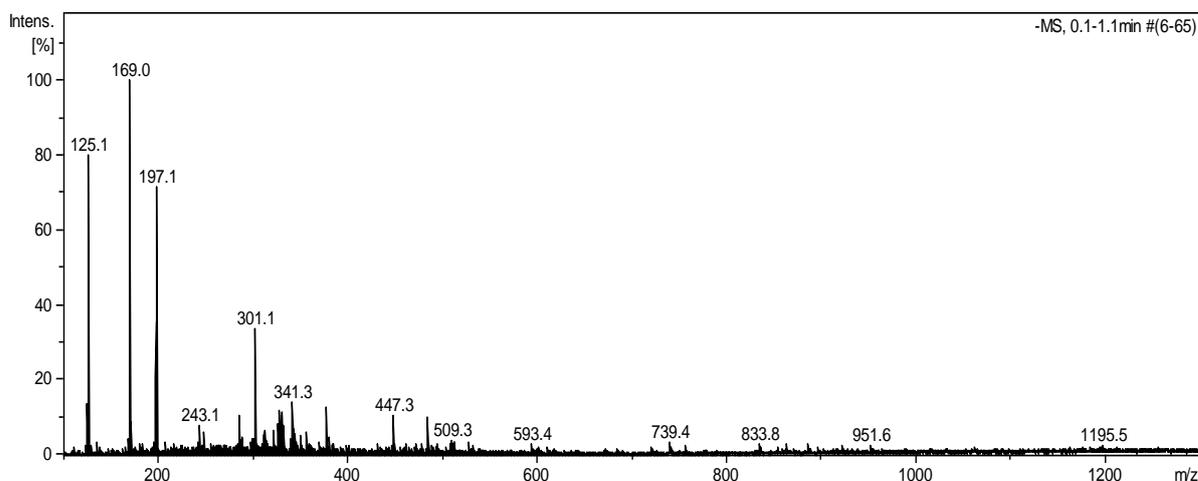


Tabela 2. Identificação de compostos químicos por ESI(-)-ITMS da fração acetato de etila das vagens de *S. tubulosa*.

Compostos identificados	[M-H] ⁻ (m/z)	MS ² (m/z)	Referências
Pirogalol	125	---	KULKARNI et al., 2008
Ácido gálico	169	139, 125	FATHONI et al., 2017
Galato de etila	197	169, 159, 151, 125	SUN et al., 2007; WYREPKOWSKI et al., 2014
n.i.	243	225, 197, 181, 169, 151, 139, 125, 109	---
Luteolina	285	265, 241, 221, 199, 175, 155, 141, 125	FATHONI et al., 2017; BRITO et al., 2014
Ácido elágico	301	284, 257, 229, 221, 201, 185, 169, 153, 139, 125, 109	SANTOS et al., 2013; MULLEN et al., 2003; SEERAM et al., 2008
Ácido cafeico- <i>O</i> -hexosídeo	341	323, 297, 279, 251, 227, 197, 183, 179, 169, 161, 143, 131, 119	KOOLEN et al., 2013; SAID et al., 2017
n.i.	377	357, 341, 215, 179	---
Quercetrina	447	401, 370, 341, 301, 255, 179, 151	TIBERTI et al., 2007
1,6- Digaloil-glucose	483	447, 331, 313, 301, 271, 255, 211, 193, 169	SANTOS et al., 2013; NUENGCHAMNONG et al., 2011; WYREPKOWSKI et al., 2014
Luteolina-7- <i>O</i> -Rutinosídeo	593	588, 555, 499, 447, 341, 285, 255, 169	CHEN; INBARAJ; CHEN, 2012
Quercetrina-3- <i>O</i> -(6- <i>O</i> -Ramnosil-glucosídeo) (Rutina)	609	531, 513, 445, 314, 301, 263	KARAR et al., 2013

Fonte: Própria

Figura 18. Espectro MS² do composto ácido gálico (m/z 169) em modo [M-H]⁻.

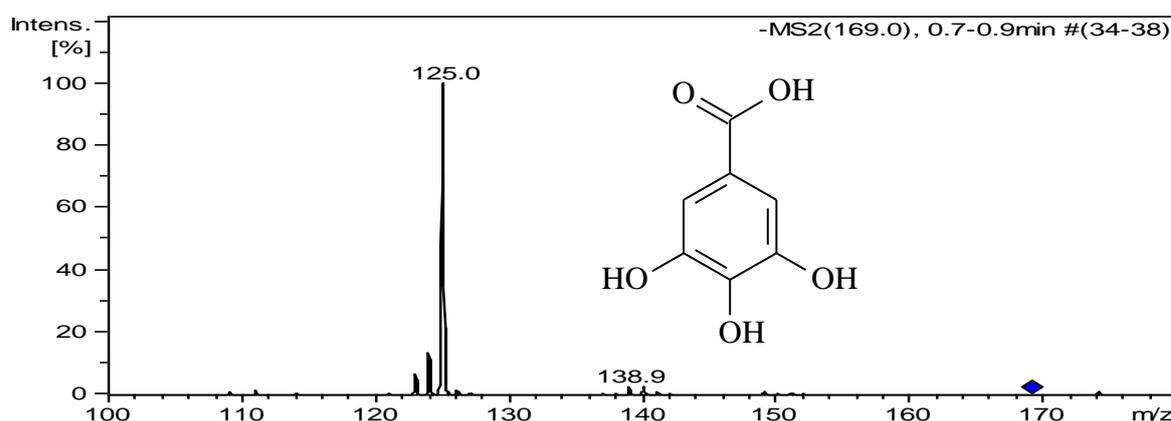


Figura 19. Espectro MS² do composto galato de etila (m/z 197) em modo [M-H]⁻.

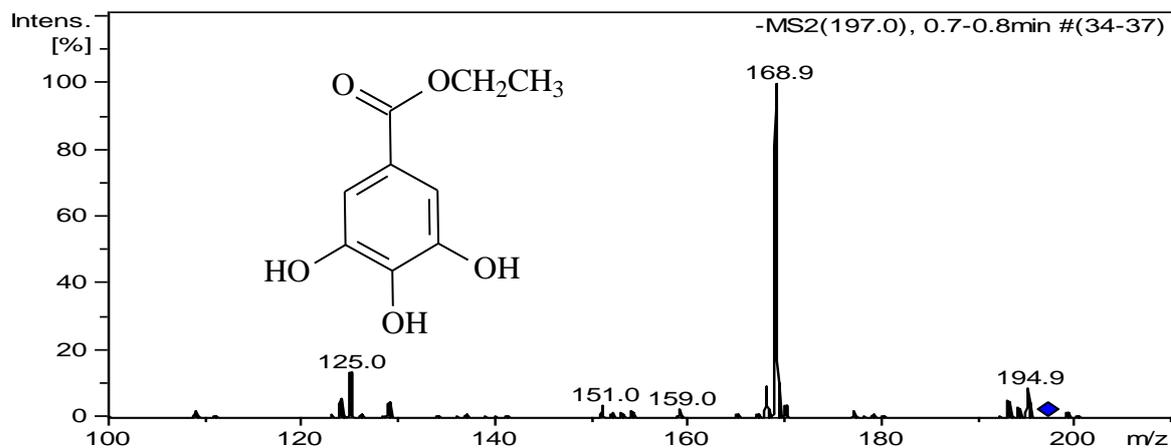


Figura 20. Espectro MS² do composto luteolina (m/z 285) em modo [M-H]⁻.

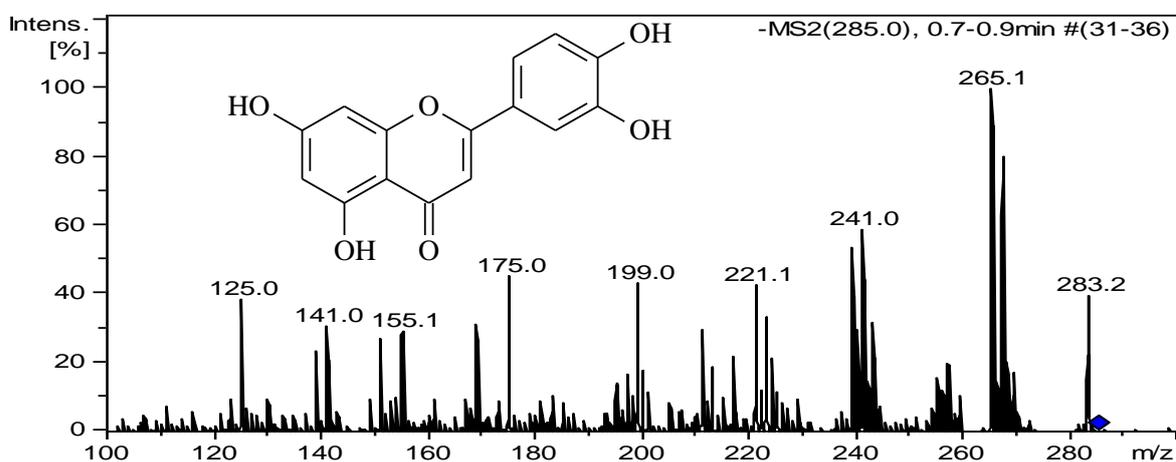


Figura 21. Espectro MS² do composto ácido elágico (m/z 301) em modo [M-H]⁻.

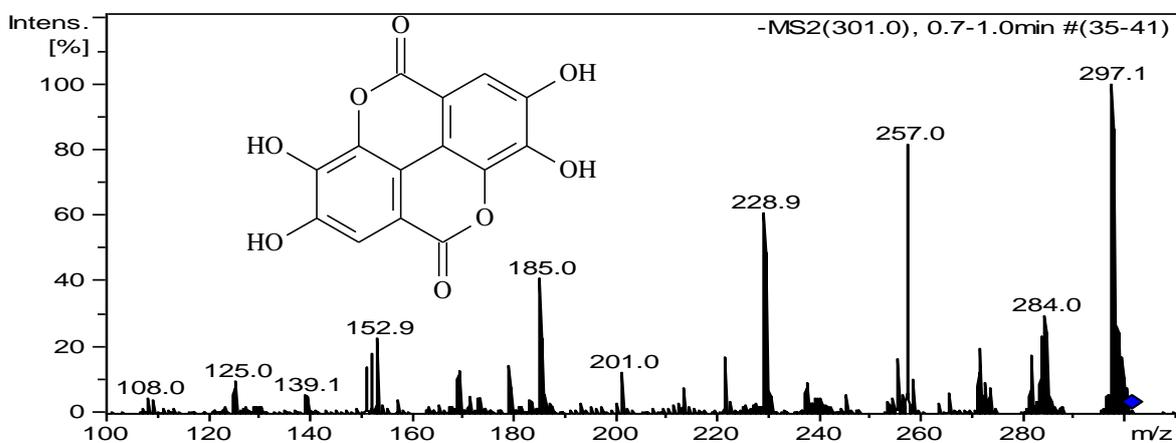


Figura 22. Espectro MS² do composto ácido cafeico-*O*-hexosídeo (m/z 341) em modo [M-H]⁻.

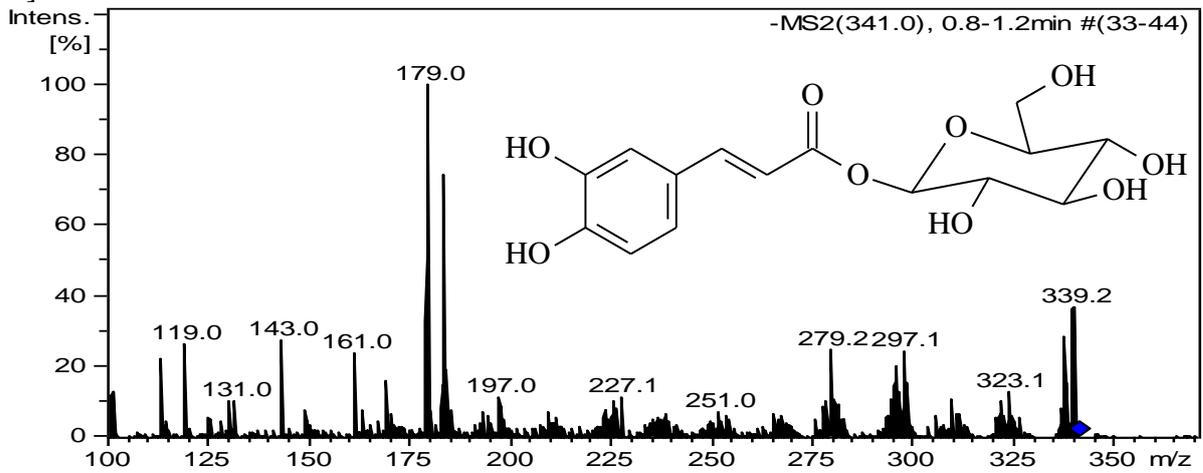


Figura 23. Espectro MS² do composto quercetrina (m/z 447) em modo [M-H]⁻.

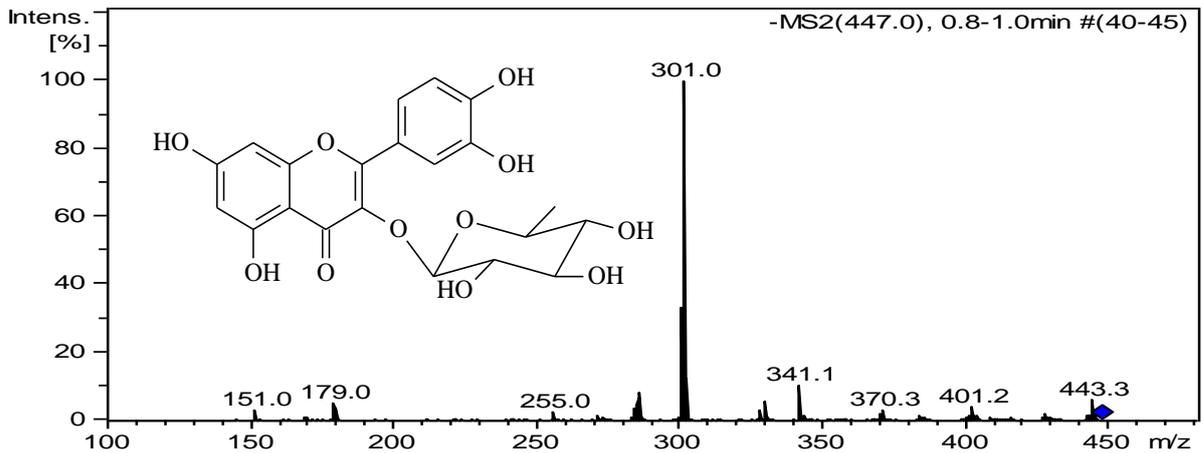


Figura 24. Espectro MS² do composto 1,6-digaloil-glucose (m/z 483) em modo [M-H]⁻.

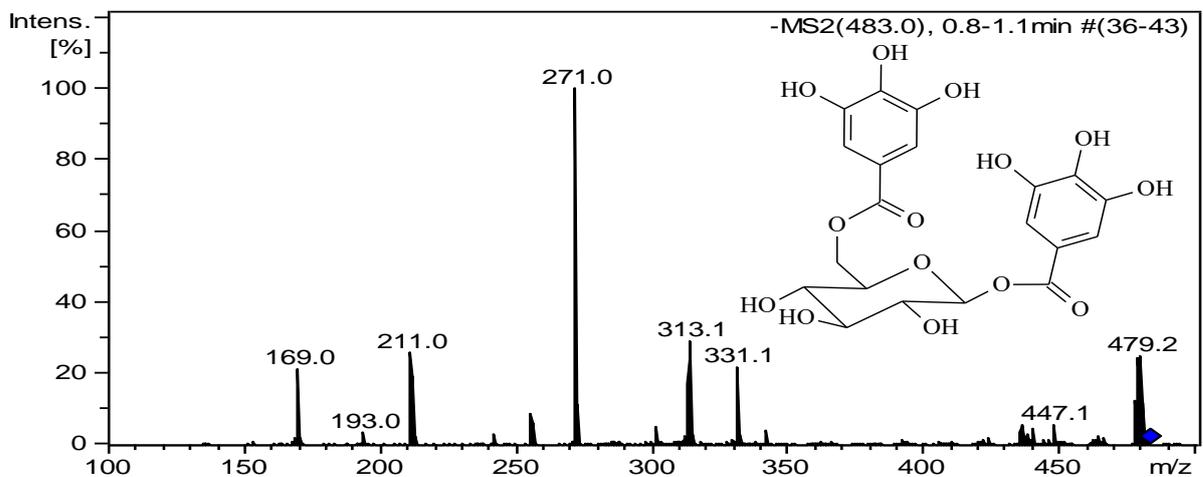


Figura 25. Espectro MS² do composto luteolina-7-*O*-rutinosídeo (*m/z* 593) em modo [M-H]⁻.

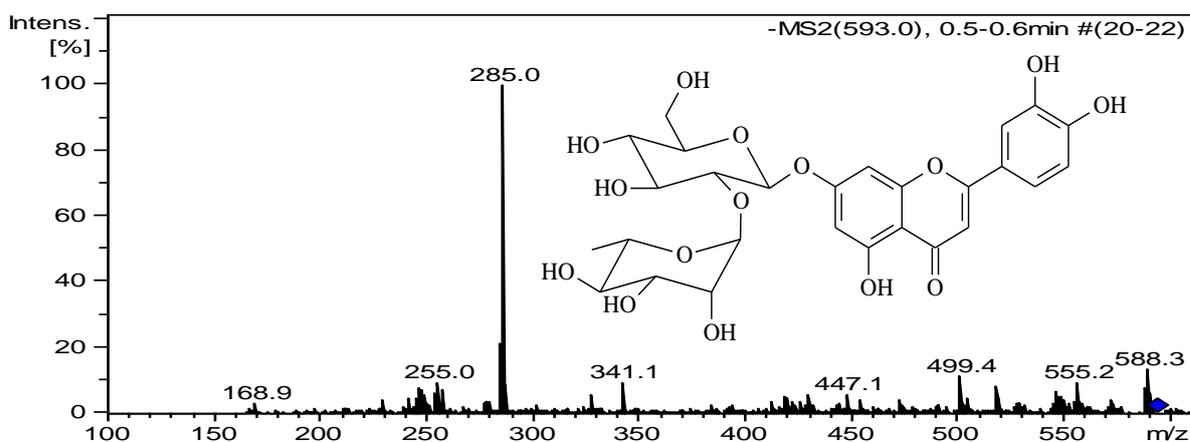
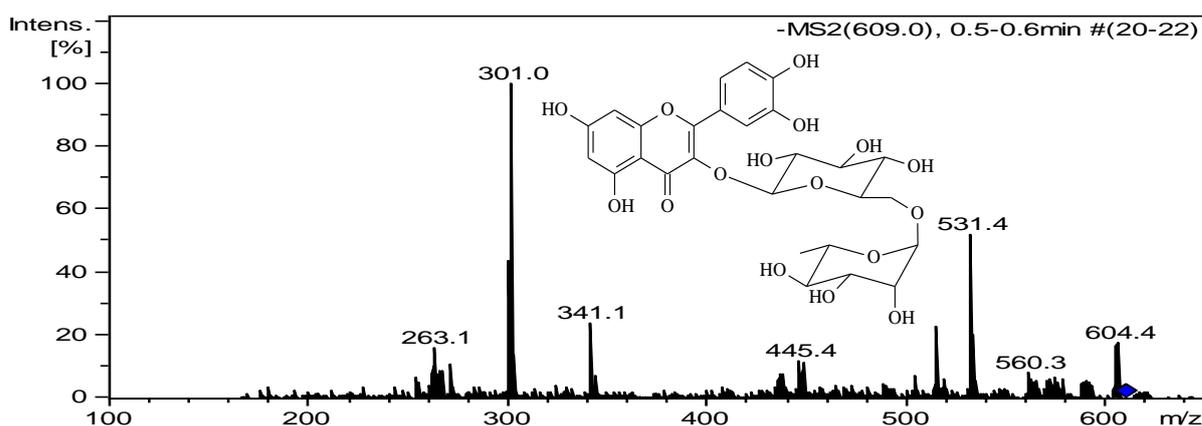


Figura 26. Espectro MS² do composto quercetina-3-*O*-(6-*O*-Ramnosil-glucosídeo) (Rutina) (*m/z* 609) em modo [M-H]⁻.



5.2 Avaliação da toxicidade aguda em camundongos

As FHEX, FAcOEt e FAq nas doses de 300 e 2000 mg kg⁻¹, v.o., não demonstraram nenhum sinal de toxicidade durante os 14 dias de observação, como também não foi observado morte e, conseqüentemente, não foi possível determinar a DL₅₀ das FHEX, FAcOEt e FAq. Além disso, não foram observadas alterações comportamentais ou clínicas após a administração das FHEX, FAcOEt e FAq. Neste ensaio foi observado progresso normal do peso dos animais tratados com as FHEX, FAcOEt e FAq (Figura 27) e não foram observadas alterações dos parâmetros bioquímicos (Tabela 3). Não se observou alteração macroscópica e também não houve diferença significativa quanto ao peso relativo dos órgãos: fígado, rins, baço, pulmão e coração entre os grupos tratados com as frações quando comparados com o grupo veículo (Tabela 4).

Figura 27. Efeito da administração aguda de FHEX, FAcOEt e FAq (300 e 2000 mg kg⁻¹, v.o.), sobre a variação da massa corporal dos animais. Os dados expressam a média ± E.P.M. de 6 camundongos. A análise estatística foi determinada pelo ANOVA, seguido pelo teste de Tukey, p<0,05.

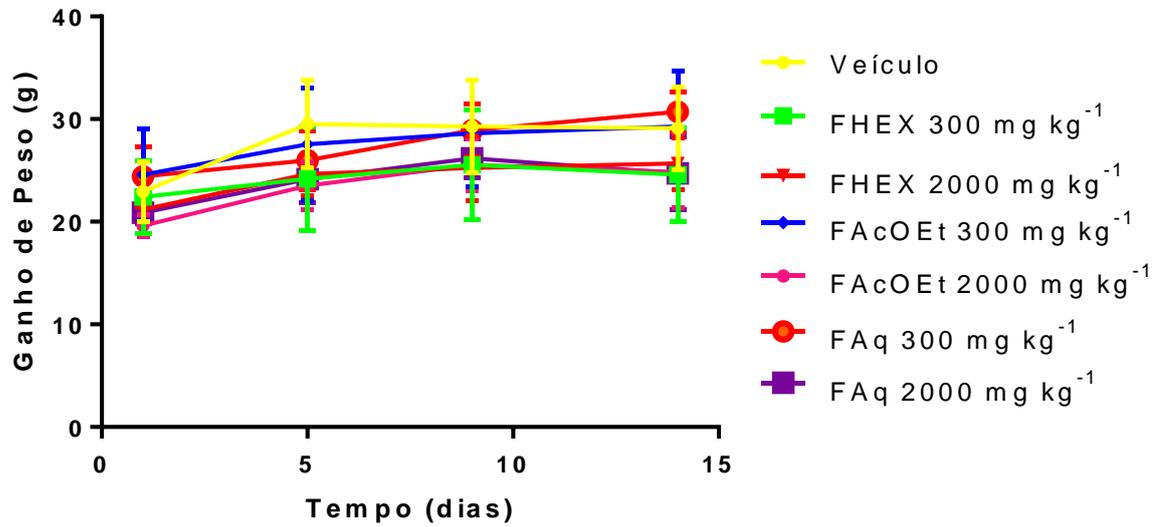


Tabela 3. Parâmetros bioquímicos obtidos do soro de camundongos, tratados com FHEX, FAcOEt e FAq (300 e 2000 mg kg⁻¹, v.o.) administradas por via oral (v.o.) em dose única.

Parâmetros bioquímicos	Controle	FHEX		FAcOEt		FAq	
		300 (mg kg ⁻¹ , v.o.)	2000 (mg kg ⁻¹ , v.o.)	300 (mg kg ⁻¹ , v.o.)	2000 (mg kg ⁻¹ , v.o.)	300 (mg kg ⁻¹ , v.o.)	2000 (mg kg ⁻¹ , v.o.)
Ureia (mg dL⁻¹)	47,5 ± 1,50	45 ± 2,46	57,5 ± 4,91	47,5 ± 1,50	52,0 ± 4,02	42,75 ± 4,42	52,75 ± 2,65
Creatina (mg dL⁻¹)	0,28 ± 0,04	0,25 ± 0,01	0,26 ± 0,01	0,28 ± 0,04	0,25 ± 0,01	0,26 ± 0,01	0,25 ± 0,01
AST (U mL⁻¹)	266 ± 4,70	286 ± 2,04	271 ± 1,44	266 ± 4,02	250 ± 5,08	279 ± 2,15	252 ± 2,14
ALT (U mL⁻¹)	63,0 ± 1,99	78 ± 6,66	77,5 ± 6,66	79,33 ± 1,99	66,75 ± 11,40	77,00 ± 4,27	64,00 ± 4,84

A análise estatística foi determinada pelo ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni, p<0,05. Os números representam a média e o erro padrão da média de 6 camundongos. ALT- alanina transferase; AST- aspartato aminotransferase; mg dL⁻¹: miligrama por decilitro, U L⁻¹: Unidades internacionais por litro.

Fonte: Própria

Tabela 4: Avaliação do peso dos órgãos internos de camundongos Swiss, em $g\ 100^{-1}$ de peso corporal, tratados com as FHEX, FAcOEt e FAq (300 e 2000 $mg\ kg^{-1}$) administrados por via oral (v.o.) em dose única.

Órgão	Veículo	FHEX		FAcOEt		FAq	
		300 ($mg\ kg^{-1}$, v.o.)	2000 ($mg\ kg^{-1}$, v.o.)	300 ($mg\ kg^{-1}$, v.o.)	2000 ($mg\ kg^{-1}$, v.o.)	300 ($mg\ kg^{-1}$, v.o.)	2000 ($mg\ kg^{-1}$, v.o.)
Fígado	5,69 ± 0,54	5,10 ± 0,14	4,86 ± 0,22	4,89 ± 0,20	5,74 ± 0,22	5,12 ± 0,20	4,82±0,24
Rins	1,52 ± 0,17	1,54 ± 0,04	1,35 ± 0,09	1,48 ± 0,08	1,64 ± 0,07	1,44±0,04	1,30±0,04
Baço	0,62 ± 0,51	0,55 ± 0,03	0,54 ± 0,03	0,56 ± 0,05	0,76 ± 0,05	0,51±0,02	0,59±0,04
Pulmão	1,28 ± 0,09	1,20 ± 0,05	1,17 ± 0,03	1,18 ± 0,03	1,20 ± 0,10	1,25±0,12	1,12±0,02
Coração	0,78 ± 0,09	0,78 ± 0,03	0,77 ± 0,03	0,76 ± 0,04	0,79 ± 0,07	0,775±0,03	0,73±0,02

Os valores foram expressos em $g\ 100^{-1}$ gramas de peso corporal. Os dados representam a média ± E.P.M. de seis camundongos. A análise estatística foi determinada pelo ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni, $p < 0,05$.

Fonte: Própria

5.3 Efeito anti-inflamatório de FHEX, FAcOEt e FAq

5.3.1 Efeito de FHEX e FAcOEt no edema de pata induzido por carragenina em camundongos

Os resultados obtidos durante o teste do edema de pata induzido por carragenina, em camundongos, estão apresentados nas Figuras 28 (A) e (B). A carragenina (1%) promoveu intenso edema com efeito máximo na 3ª hora após a injeção intraplantar. A administração da FHEX (50, 100 e 200 mg kg⁻¹, v.o.), 45 minutos antes da injeção intraplantar de 0,1 mL de carragenina, reduziu significativamente o edema de pata na segunda hora de observação, nas doses de 50 (0,40 ± 0,06 mm), 100 (0,34 ± 0,02 mm) e 200 (0,28 ± 0,03 mm) mg kg⁻¹, em 45,20%, 53,42% e 61,64%, respectivamente, quando comparadas ao grupo veículo que recebeu apenas carragenina (0,73 ± 0,06 mm).

Na terceira hora após tratamento, também foi observado uma diminuição na espessura da pata (** p < 0,001) nas doses da FHEX (50, 100, 200 mg kg⁻¹) sendo que a dose de 200 mg kg⁻¹ teve inibição semelhante à da indometacina. Na quarta hora, a dose de 200 mg kg⁻¹, continuou a reduzir o parâmetro analisado em 56,79% (0,35 ± 0,04 mm) em relação ao veículo (0,81 ± 0,06 mm). Na quinta hora, houve redução de 56,60% (0,17 ± 0,03 mm), nas doses de 50 e 100 mg kg⁻¹ e 86,78% (0,05 ± 0,02 mm) na dose de 200 mg kg⁻¹, quando comparadas com o grupo veículo (0,40 ± 0,01 mm).

A FAcOEt, somente na dose de 200 mg kg⁻¹, mostrou-se capaz de inibir significativamente (p < 0,05) o edema causado por carragenina na 3ª, 4ª e 5ª hora em 71,67% (0,24 ± 0,05 mm), 88,76% (0,09 ± 0,04 mm) e 86,03 % (0,05 ± 0,02 mm), respectivamente, quando comparados ao grupo veículo (Figura 28 B). A indometacina (10 mg kg⁻¹) usada como padrão foi capaz de reduzir o edema em todos os tempos observados (**** p < 0,0001) (Tabela 5).

Figura 28: Efeito de FHEX (A) e FAcOEt (B) (50, 100 e 200 mg kg⁻¹, v.o.), veículo (10 mL kg⁻¹, v.o.) e indometacina (Indo, 10 mg kg⁻¹, v.o.) sobre o edema de pata induzido por carragenina (1%; 0,1 mL, i.pl.) em camundongos (n= 6). Os valores estão expressos como média ± E.P.M. *p< 0,05; **p< 0,01; ***p< 0,001; ****p< 0,0001 vs veículo (ANOVA two way e Teste de Tukey).

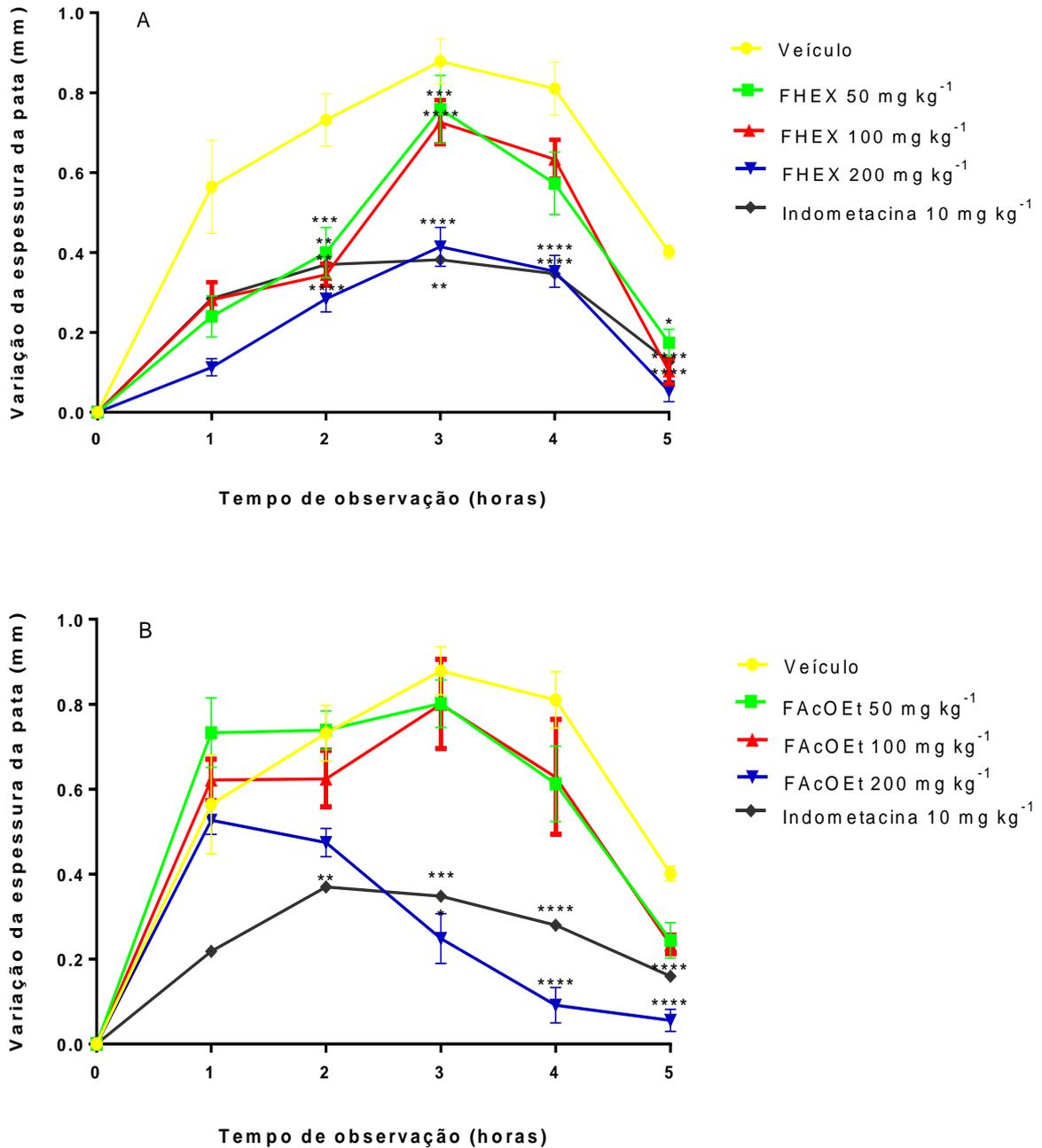


Tabela 5. Efeito de FHEX e FAcOEt (50, 100 e 200 mg kg⁻¹, v.o.), veículo (10 mL kg⁻¹, v.o.) e indometacina (10 mg kg⁻¹, v.o.) sobre o edema de pata induzido por carragenina (1%; 0,1 mL, i.pl.) em camundongos (n= 6). Os valores estão expressos como média ± E.P.M. * p< 0,05; ** p< 0,01; *** p< 0,001; **** p< 0,0001 vs veículo (ANOVA two way e Teste de Tukey).

Edema de pata (mm)					
Intervalo de tempo					
Tratamento (mg kg ⁻¹ , v.o.)	1h	2h	3h	4h	5h
Veículo	0,56 ± 0,11	0,73 ± 0,06	0,87 ± 0,05	0,81 ± 0,06	0,40 ± 0,01
FHEX (50)	0,24 ± 0,05	0,40 ± 0,06 ^{***}	0,75 ± 0,08 ^{***}	0,57 ± 0,07	0,17 ± 0,03 [*]
FHEX (100)	0,28 ± 0,04	0,34 ± 0,02 ^{**}	0,72 ± 0,05 ^{****}	0,63 ± 0,04	0,10 ± 0,03
FHEX (200)	0,11 ± 0,02	0,28 ± 0,03 ^{****}	0,41 ± 0,04 ^{****}	0,35 ± 0,04 ^{****}	0,05 ± 0,02 ^{****}
Indometacina (10)	0,28 ± 0,09	0,37 ± 0,05 ^{**}	0,38 ± 0,08 ^{****}	0,34 ± 0,09 ^{****}	0,12 ± 0,03 ^{****}
Veículo	0,56 ± 0,11	0,73 ± 0,06	0,87 ± 0,05	0,81 ± 0,06	0,40 ± 0,01
FAcOEt (50)	0,73 ± 0,08	0,73 ± 0,04	0,80 ± 0,05	0,61 ± 0,08	0,24 ± 0,04
FAcOEt (100)	0,62 ± 0,04	0,62 ± 0,06	0,80 ± 0,10	0,62 ± 0,13	0,23 ± 0,02
FAcOEt (200)	0,52 ± 0,03	0,47 ± 0,03	0,24 ± 0,05 [*]	0,09 ± 0,04 ^{****}	0,05 ± 0,02 ^{****}
Indometacina (10)	0,21 ± 0,05	0,37 ± 0,05 ^{**}	0,34 ± 0,06 ^{***}	0,28 ± 0,07 ^{****}	0,16 ± 0,02 ^{****}

Fonte: Própria

5.3.2 Efeito de FAq no edema de pata induzido por carragenina em ratos

O pré-tratamento dos animais com a FAq nas doses de (50, 100 e 200 mg kg⁻¹, v.o.) não inibiram significativamente (*p<0,05) o edema de pata induzido por carragenina nas horas avaliadas (1 a 5 h), comparado ao grupo controle (Tabela 6). Apenas os animais tratados com indometacina (10 mg kg⁻¹) inibiram de forma significativa (****p< 0,0001) a formação do edema a partir da segunda hora e perdurou até a quinta hora (****p< 0,0001) comparativamente ao grupo veículo.

Como a FAq não foi capaz de diminuir o edema, não foi dado continuidade com os estudos de atividade antiedematogênica da FAq.

Tabela 6. Efeito de FAq (50, 100 e 200 mg kg⁻¹, v.o.), veículo (10 mL kg⁻¹, v.o.) e indometacina (10 mg kg⁻¹, v.o.) sobre o edema de pata induzido por carragenina (1%; 0,1 mL, i.pl.) em ratos (n= 6). Os valores estão expressos como média ± E.P.M. * p< 0,05; **** p< 0,0001 vs veículo (ANOVA two way e Teste de Tukey).

Tratamento (mg kg ⁻¹ , v.o.)	Edema de pata (mm)				
	Intervalo de tempo				
	1h	2h	3h	4h	5h
Veículo	2,14 ± 0,05	3,08 ± 0,16	3,31 ± 0,11	3,11 ± 0,08	3,33 ± 0,07
FAq (50)	1,86 ± 0,09	2,98 ± 0,10	3,00 ± 0,18	3,05 ± 0,18	2,86 ± 0,14
FAq (100)	1,89 ± 0,17	2,57 ± 0,10	3,42 ± 0,15	2,83 ± 0,03	2,16 ± 0,08
FAq (200)	1,63 ± 0,13	2,81 ± 0,24	2,99 ± 0,14	2,97 ± 0,17	2,65 ± 0,22
Indometacina (10)	0,61 ± 0,11	0,87 ± 0,14****	1,24 ± 0,15****	1,17 ± 0,17****	0,89 ± 0,18****

Fonte: Própria

5.3.3 Efeito de FHEX sobre o edema de pata induzida por dextrana em camundongos

A FHEX na dose de 100 mg kg^{-1} diminuiu o edema induzido por dextrana a 1% na pata traseira direita dos camundongos a partir de uma hora até o fim do período de observação. Sendo $**p < 0,01$, para o tempo de 90 minutos e $*p < 0,05$, para 60 e 120 minutos em relação aos animais do grupo veículo (Figura 29). Observou-se também inibição significativa ($*p < 0,05$) do edema nos animais tratados com indometacina (10 mg kg^{-1}) durante os tempos de 60, 90 e 120 minutos de observação, comparado ao grupo veículo (Tabela 7).

Figura 29. Efeito de FHEX (100 mg kg^{-1} , v.o.), veículo (10 mL kg^{-1} , v.o.) e indometacina (10 mg kg^{-1} , v.o.) sobre o edema de pata induzido por dextrana (1%; $0,05 \text{ mL pata}^{-1}$, i.pl.) em camundongos ($n = 6$). Os valores estão expressos como média \pm E.P.M. $*p < 0,05$; $**p < 0,01$ vs veículo (ANOVA two way seguida de pós-teste de Bonferroni).

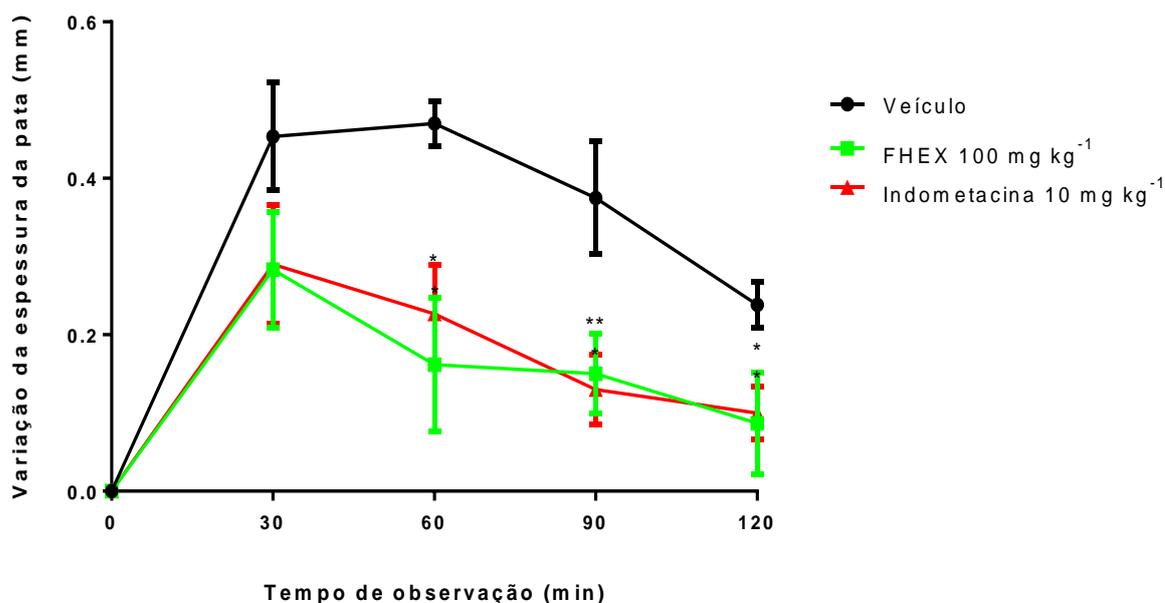


Tabela 7. Efeito da FHEX (100 mg kg⁻¹, v.o.), veículo (10 mL kg⁻¹, v.o.) e da indometacina (10 mg kg⁻¹, v.o.) sobre o edema de pata induzido por dextrana (1%; 0,05 mL pata⁻¹, i.pl.) em camundongos. Os valores estão expressos como média ± E.P.M. *p< 0,05; **p< 0,01 vs veículo (ANOVA two way seguida de pós-teste de Bonferroni).

Edema de pata (mm)				
Intervalo de tempo				
Tratamento (mg kg ⁻¹ , v.o.)	30	60	90	120
FHEX (100)	0,39 ± 0,07	0,19 ± 0,08*	0,15 ± 0,03**	0,13 ± 0,05*
Veículo	0,54 ± 0,11	0,48 ± 0,01	0,55 ± 0,10	0,42 ± 0,03
Indometacina	0,29 ± 0,06	0,13 ± 0,02	0,16 ± 0,06	0,18 ± 0,06

Fonte: Própria

5.3.4 Efeito de FHEX e FAcOEt sobre o edema de pata induzida por prostaglandinas em camundongos

Os resultados obtidos durante o teste do edema de pata induzido por PGE₂, em camundongos, estão apresentados na Figura 30. Ambas as frações (FHEX e FAcOEt, na dose de 200 mg kg⁻¹, v.o.) foram capazes de reduzir o edema induzido por PGE₂ (50 ng 50µL⁻¹, i.pl.) nos tempos de 60 a 120 minutos (**p<0,001), em relação ao grupo veículo. Observou-se redução significativa também (**p<0,001) do edema nos animais tratados com indometacina (10 mg kg⁻¹, v.o.) durante todo o tempo de observação (Figura 30) (Tabela 8).

Figura 30. Efeito das FHEX e FAcOEt (200 mg kg⁻¹, v.o.), veículo (10 mL kg⁻¹, v.o.) e indometacina (10 mg kg⁻¹, v.o.) sobre o edema de pata induzido por Prostaglandinas E2 (50 ng 0,05 mL⁻¹, i.pl.) em camundongos (n= 6). Os valores estão expressos como média ± E.P.M. * p< 0,05; ** p< 0,01; *** p< 0,001; **** p< 0,0001 vs veículo (ANOVA two way e Teste de Tukey).

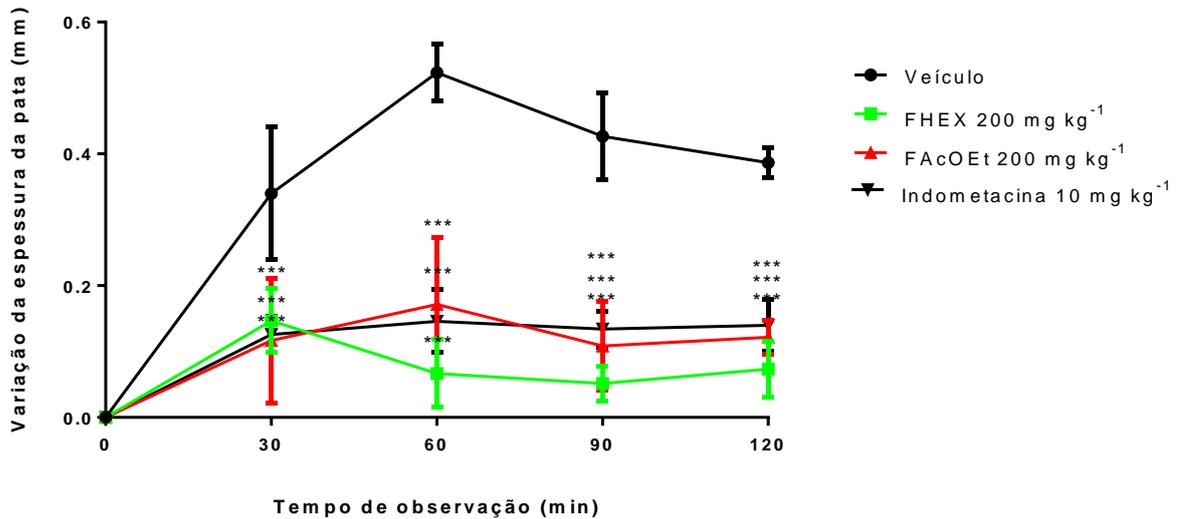


Tabela 8. Efeito das FHEX e FAcOEt (200 mg kg⁻¹, v.o.), veículo (10 mL kg⁻¹, v.o.) e indometacina (10 mg kg⁻¹, v.o.) sobre o edema de pata induzido por Prostaglandinas E2 (50 ng 0,05 mL⁻¹, i.pl.) em camundongos (n= 6). Os valores estão expressos como média ± E.P.M. * p< 0,05; ** p< 0,01; *** p< 0,001; **** p< 0,0001 vs veículo (ANOVA two way e Teste de Tukey).

Edema de pata (mm)				
Intervalo de tempo				
Tratamento (mg kg ⁻¹ , v.o.)	30	60	90	120
FHEX (200)	0,14 ± 0,02 ****	0,06 ± 0,02 ****	0,05 ± 0,01 ****	0,07 ± 0,01 ****
FAcOEt (200)	0,11 ± 0,03 ****	0,17 ± 0,04 ****	0,10 ± 0,02 ****	0,12 ± 0,01 ****
Veículo	0,52 ± 0,01	0,42 ± 0,02	0,34 ± 0,01	0,38 ± 0,01
Indometacina	0,11 ± 0,01 ****	0,14 ± 0,02 ****	0,13 ± 0,06 ****	0,14 ± 0,01 ****

Fonte: Própria

5.4 Efeito antinociceptivo de FHEX, FAcOEt e FAq

5.4.1 Efeito de FHEX e FAcOEt no teste de formalina em camundongos

Os resultados mostrados na Tabela 9, evidenciam uma redução significativa no tempo de lambida da pata dos animais tratados com a FHEX nas doses de 6,25 ($43,76 \pm 8,8$ s), 12,5 ($60,23 \pm 4,27$ s) e 25 ($53,62 \pm 4,89$ s) mg kg^{-1} , em 63,20%, 49,36% e 54,91%, respectivamente, na primeira fase quando comparado ao grupo veículo que recebeu apenas formalina ($118,94 \pm 11,22$ s). A FHEX nas doses de (6,25 e 12,5 mg kg^{-1}), promoveram uma inibição de 53,72% ($55,62 \pm 6,66$ s) e 41,95% ($69,77 \pm 14,64$ s), respectivamente na segunda fase. Conforme mostrado na Tabela 9, a FAcOEt foi capaz de inibir significativamente ($**** p < 0,0001$) o tempo de lambida em 52,02% ($57,06 \pm 2,25$ s), 51,08% ($58,18 \pm 5,68$ s) e 57,84% ($50,14 \pm 2,96$ s), nas doses de 6,25, 12,5 e 25 mg kg^{-1} , respectivamente na primeira fase do teste da formalina. Essas mesmas doses também foram capazes de reduzir o tempo de resposta, na segunda fase correspondendo a uma inibição de 69,83%, 45,44% e 58,43%, quando comparado ao grupo veículo ($120,19 \pm 6,05$ s). O grupo tratado com a droga padrão a morfina (5 mg kg^{-1}) diminuiu o parâmetro analisado em 79,95% ($23,84 \pm 8,66$ s) e 92,22% ($9,35 \pm 0,97$ s), na primeira e segunda fase do teste, respectivamente.

Tabela 9. Efeito antinociceptivo de FHEX e FAcOEt na resposta nociceptiva induzida por formalina em camundongos.

Tratamento	Dose (mg kg ⁻¹)	Tempo de lambadura (s)			
		0 – 5 min	Inibição (%)	15 – 30 min	Inibição (%)
Veículo	-	118,94 ± 11,22	-	120,19 ± 6,18	-
	3,125	94,35 ± 4,58	-	101,55 ± 6,66	-
FHEX	6,25	43,76 ± 8,88****	63,20	55,62 ± 9,51****	53,72
	12,5	56,23 ± 6,29****	52,72	59,24 ± 12,71****	50,71
	25	53,62 ± 4,89****	54,91	94,42 ± 6,05	-
	3,125	91,90 ± 8,66	-	99,67 ± 8,29	-
FAcOEt	6,25	47,26 ± 5,12****	60,59	29,44 ± 9,16****	75,50
	12,5	58,18 ± 5,68****	51,08	65,57 ± 11,15****	45,44
	25	50,14 ± 2,96****	57,84	49,96 ± 7,88****	58,43
Morfina	5	13,30 ± 3,02****	88,81	13,26 ± 2,58****	88,96

Os camundongos foram tratados com FHEX e FAcOEt 60 min (v.o.) antes do teste de formalina. Os dados representam a média ± E.P.M. de 6 camundongos. A análise estatística foi determinada pela ANOVA one way, seguido pelo teste de Tukey. ****p<0,0001 comparado com o veículo.

Fonte: Própria

5.4.1 Efeito de FAq no teste de formalina em ratos

Os resultados mostrados na Tabela 10, evidenciam que não houve uma redução no tempo de lambida da pata dos animais tratados com a FAq (Tabela 10) nas doses de 6,25, 12,5 e 25 mg kg⁻¹, nem na primeira e nem na segunda fase quando comparado ao grupo veículo que recebeu apenas formalina. Apenas o grupo tratado com a droga padrão a morfina (5 mg kg⁻¹) diminuiu o parâmetro analisado em 86,57% (10,56 ± 1,52 s) e 87,17% (10,09 ± 1,73 s), na primeira e segunda fase do teste, respectivamente.

Como não foi observado efeito significativo no teste da formalina com a FAq e a mesma também não apresentou atividade antiedematogênica, não prosseguiu com os demais testes com essa fração, nem tão pouco foi avaliado sua constituição química, já que a mesma não apresenta atividade antinociceptiva nem antiedematogênica.

Tabela 10. Efeito antinociceptivo de FAq na resposta nociceptiva induzida por formalina em ratos.

Tratamento	Dose (mg kg ⁻¹)	Tempo de lambadura (s)			
		0 – 5 min	Inibição (%)	15 – 30 min	Inibição (%)
Veículo	-	78,67 ± 7,72	-	61,30 ± 8,91	-
	6,25	62,77 ± 3,88	-	69,30 ± 2,99	-
FAq	12,5	56,23 ± 7,86	-	64,91 ± 4,78	-
	25	56,23 ± 3,44	-	63,37 ± 6,04	-
Morfina	5	10,56 ± 1,52 ^{****}	-	10,09 ± 1,73 ^{****}	-

Os ratos foram tratados com FAq 60 min (v.o.) antes do teste de formalina. Os dados representam a média ± E.P.M. de 6 ratos. A análise estatística foi determinada pela ANOVA one way, seguido pelo teste de Tukey. *p<0,05 comparado com o veículo.

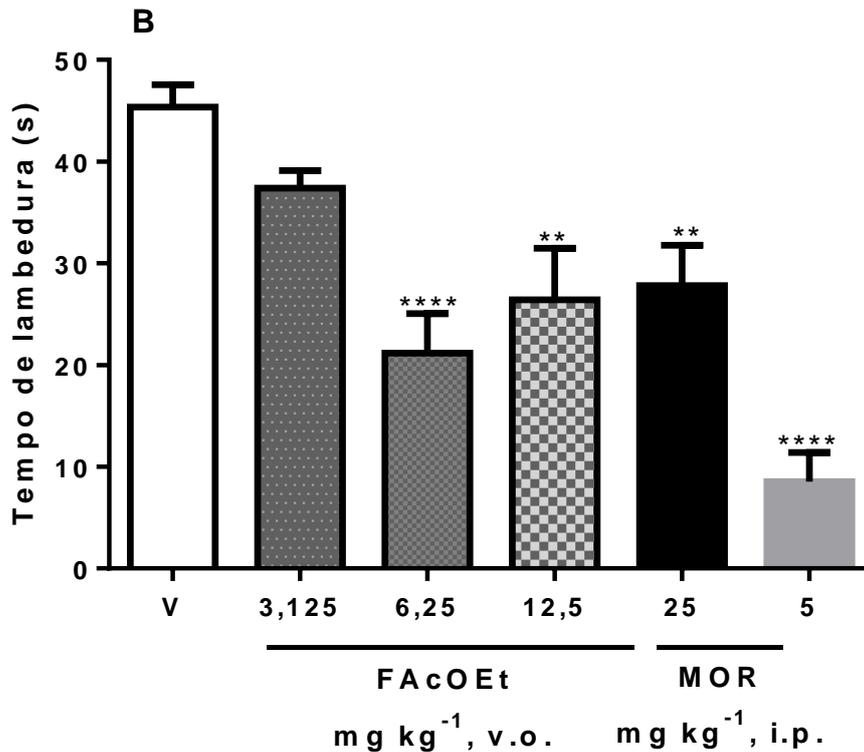
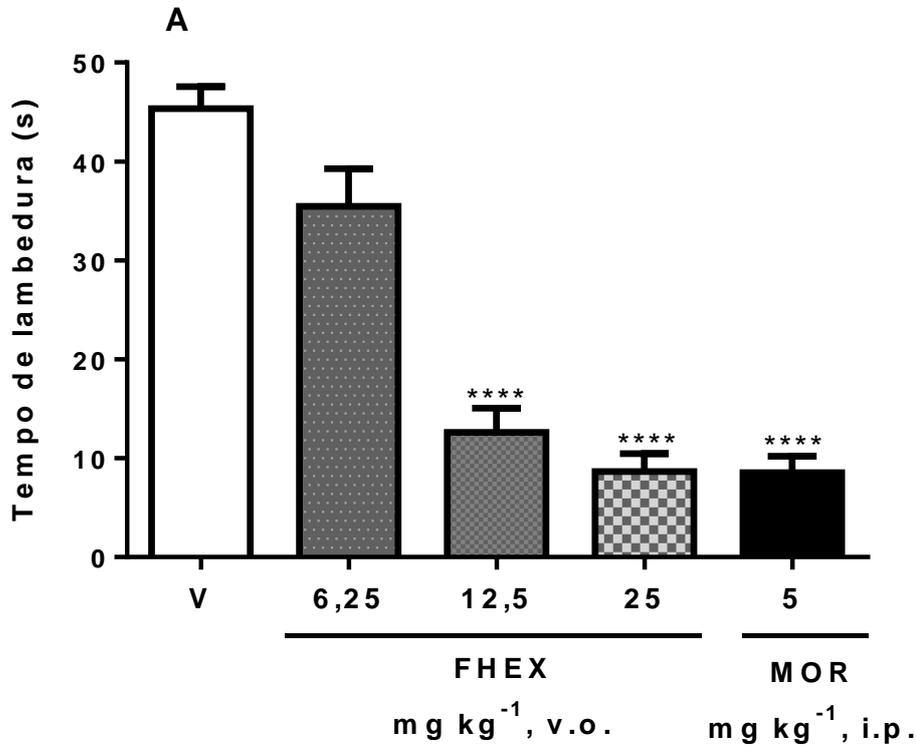
Fonte: Própria

5.4.2 Efeito de FHEX e FAcOEt no teste de capsaicina em camundongos

As Figura 31 (A) e (B), mostram o efeito das FHEX e FAcOEt na nocicepção induzida por capsaicina em camundongos. Uma redução significativa no tempo de lambadura da pata (^{****} p< 0,0001) foi observada em camundongos administrados com FHEX (Figura 31 A) nas doses (12,5 e 25 mg kg⁻¹, v.o.), promovendo uma inibição de 72,86% (14,33 ± 2,15 s) e 81,41% (9,44 ± 1,98 s), quando comparados ao grupo veículo (46,50 ± 3,07 s) indicando um efeito antinociceptivo.

Conforme mostrado na Figura 31 B, a FAcOEt foi capaz de inibir significativamente (^{****} p< 0,0001) o tempo de lambida em 48,10% (24,13 ± 3,21 s), 33,16% (31,08 ± 2,79 s) e 47,03% (24,63 ± 3,05 s), nas doses de 6,25, 12,5 e 25 mg kg⁻¹, respectivamente. Morfina (5 mg kg⁻¹, s.c.) foi usada como controle positivo e mostrou uma redução da resposta em 81,63% quando comparado com o veículo (^{****} p< 0,0001).

Figura 31. Efeito das FHEX (A) (6,25; 12,5 e 25 mg kg⁻¹, v.o.) e FAcOEt (B) (3,125; 6,25; 12,5 e 25 mg kg⁻¹, v.o.) no teste da capsaicina em camundongos (n=6). Os valores foram expressos como média ± E.P.M. **p< 0,01; ****p< 0,0001 vs controle veículo (ANOVA one way e Teste de Tukey).

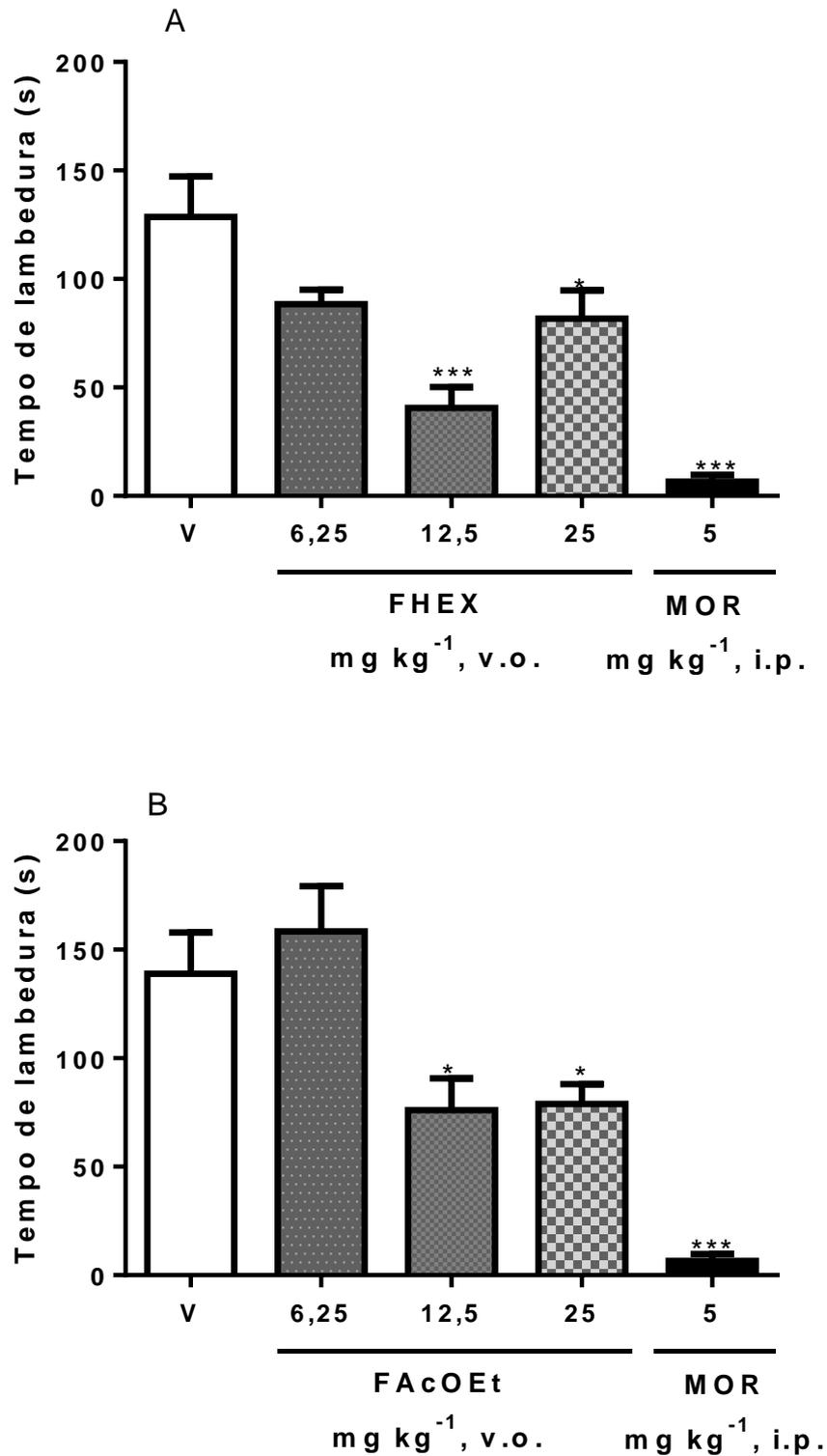


5.4.3 Efeito de FHEX e FAcOEt no teste de glutamato em camundongos

Os resultados obtidos durante o teste do glutamato mostram que a FHEX (Figura 32 A) administrada (v.o.) (6,25, 12,5 e 25 mg kg⁻¹), causou uma inibição significativa (***p*<0,001 e **p*<0,05) apenas nas doses de 12,5 e 25 mg kg⁻¹, exibindo uma inibição de 68,39% (40,61 ± 9,64 s) e 36,40% (81,72 ± 13,03 s), da nocicepção por glutamato, respectivamente, quando comparado ao grupo veículo (128,5 ± 18,78 s).

A FAcOEt (Figura 32 B) administrada (v.o.) (6,25, 12,5 e 25 mg kg⁻¹), causou uma inibição significativa (**p*<0,05) apenas nas doses de 12,5 e 25 mg kg⁻¹, exibindo uma inibição de 45,26% (76,02 ± 14,81 s) e 43,21% (478,87 ± 9,22 s), da nocicepção por glutamato, respectivamente, quando comparado ao grupo veículo (138,9 ± 18,95 s). O grupo tratado com morfina (5 mg kg⁻¹), droga padrão, também reduziu significativamente este parâmetro apresentando 95,24% (6,61 ± 3,16 s) de inibição.

Figura 32. Efeito das FHEX (A) (6,25, 12,5 e 25 mg kg⁻¹, v.o.) e FAcOEt (B) (6,25, 12,5 e 25 mg kg⁻¹, v.o.) na nocicepção induzida por glutamato em camundongos (n=6). Os valores foram expressos como média ± E.P.M. *p< 0,05; ***p< 0,001; vs controle veículo (ANOVA one way e Teste de Tukey).

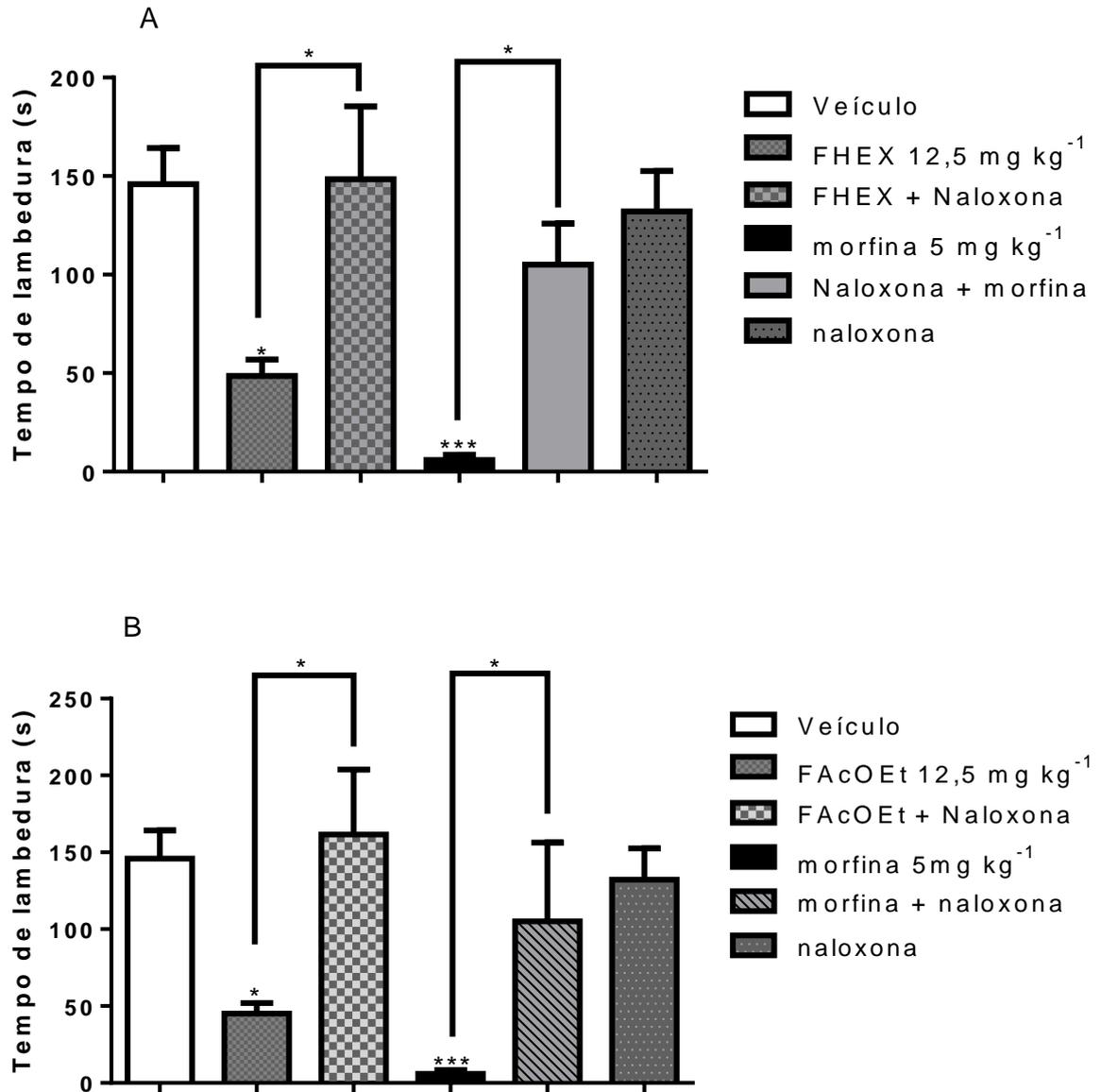


5.5 Avaliação dos possíveis mecanismo de ação envolvidos na atividade antinociceptiva de FHEX e FAcOEt

5.5.1 Participação do sistema opioide

Como podemos observar nas Figura 33 (A) a FHEX na dose de $12,5 \text{ mg kg}^{-1}$ ($48,56 \pm 8,35 \text{ s}$) e a FAcOEt Figura 33 (B) na dose de $12,5 \text{ mg kg}^{-1}$ ($45 \pm 6,95 \text{ s}$), assim como a morfina ($5,90 \pm 2,56 \text{ s}$) reduziram significativamente o tempo de lambida no teste do glutamato em 66,72%, 69,16% e 95,95% respectivamente, quando comparados ao grupo veículo ($145,94 \pm 18,31 \text{ s}$). O grupo tratado apenas com naloxona ($132,17 \pm 20,44 \text{ s}$) não alterou o tempo de reação provocado pelo estímulo doloroso. O tratamento prévio da naloxona, administrado quinze minutos antes das FHEX e FAcOEt ou morfina, modificou a antinocicepção provocada tanto pela FHEX ($148,45 \pm 28,81 \text{ s}$), FAcOEt ($161,54 \pm 30,05 \text{ s}$), como o efeito produzido pela morfina ($105,00 \pm 20,92 \text{ s}$) foram significativamente revertidos.

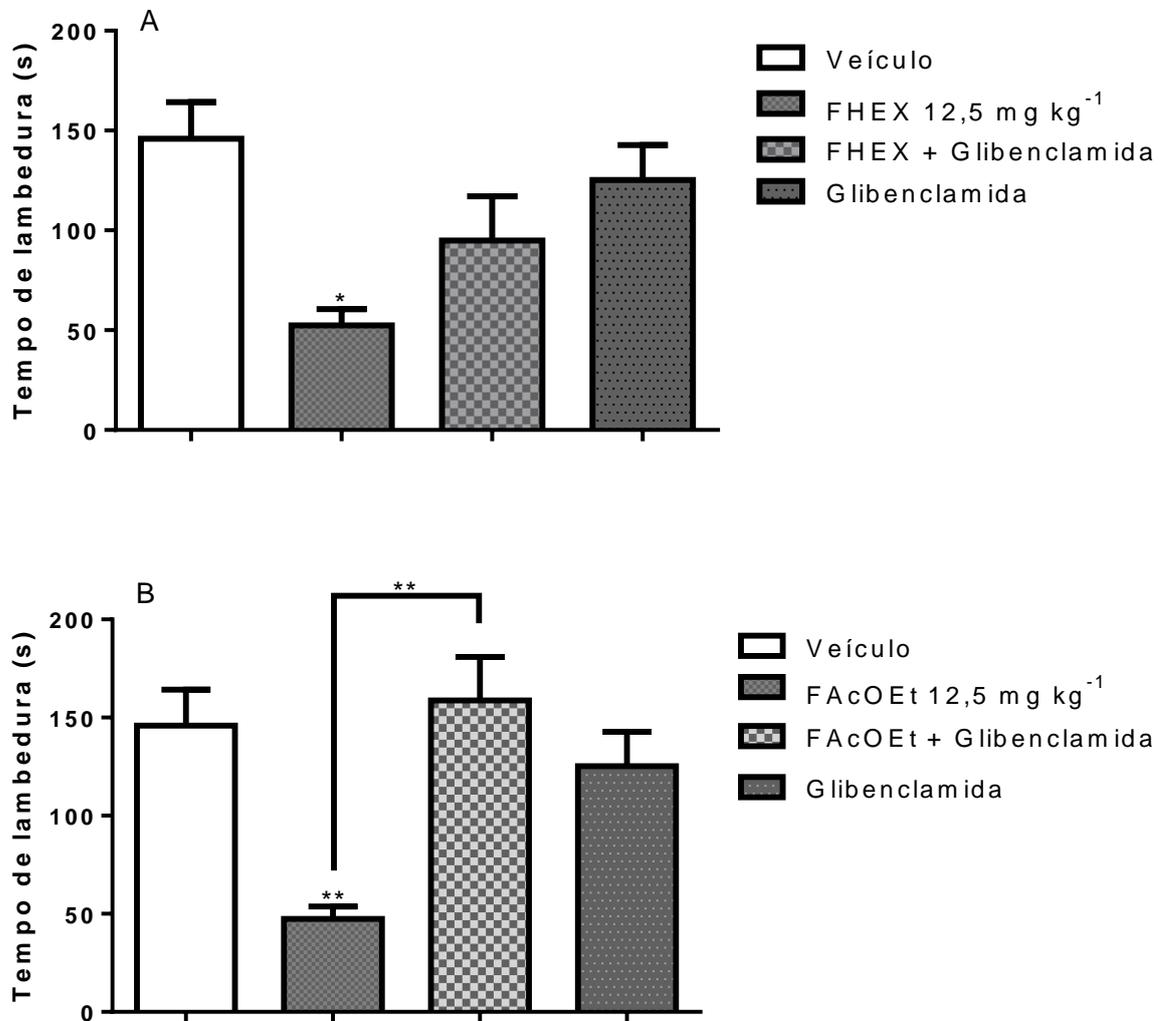
Figura 33. Efeito de FHEX (A) ($12,5 \text{ mg kg}^{-1}$, v.o.) e FAcOEt (B) ($12,5 \text{ mg kg}^{-1}$, v.o.), contra a ação da naloxona (2 mg kg^{-1} , i.p.) na nocicepção induzida por glutamato ($20 \mu\text{L } 20 \mu\text{mol}^{-1}$ pata) em camundongos ($n=6$). Os valores foram expressos como média \pm E.P.M. * (ANOVA one way seguido pelo Teste de Bonferroni). * $p < 0,05$; vs veículo, *** $p < 0,001$ vs morfina



5.5.2 Participação dos canais de K^+_{ATP}

As figuras 34 (A) e (B) representam o efeito das FHEX e FAcOEt sobre os canais de K^+_{ATP} no teste do glutamato. O tratamento dos animais com a FHEX na dose de $12,5 \text{ mg kg}^{-1}$, v.o., promoveu redução de 64,04% ($52,48 \pm 8,07 \text{ s}$) e a FAcOEt na dose de $12,5 \text{ mg kg}^{-1}$, v.o., reduziu 67,45% ($47,49 \pm 6,20 \text{ s}$) o tempo de lambida em relação ao veículo ($145,94 \pm 18,31 \text{ s}$). O pré-tratamento dos animais com glibenclamida (10 mg kg^{-1}), não foi capaz de inibir o efeito da FHEX ($94,93 \pm 22,15 \text{ s}$) na nocicepção induzida pelo glutamato. Já para a FAcOEt o para o tratamento com glibenclamida foi capaz de inibir significativamente o efeito antinociceptivo.

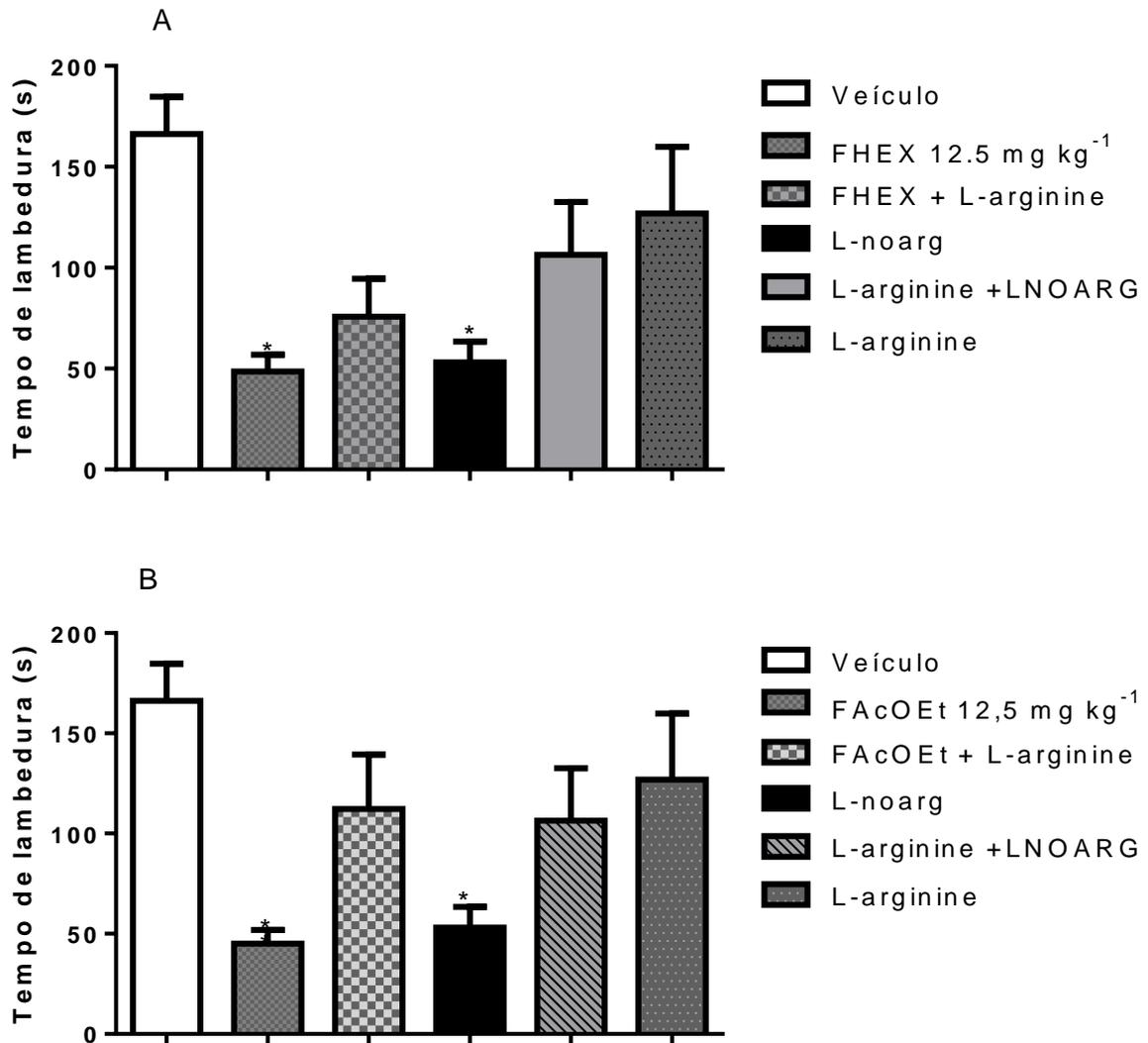
Figura 34. Efeito de FHEX (A) e FAcOEt (B) ($12,5 \text{ mg kg}^{-1}$, v.o.), contra a ação da glibenclamida (3 mg kg^{-1} , i.p.) na nocicepção induzida por glutamato ($20 \mu\text{L } 20^{-1} \mu\text{mol pata}^{-1}$) em camundongos ($n=6$). Os valores foram expressos como média \pm E.P.M. * (ANOVA one way seguido pelo Teste de Bonferroni). * $p < 0,05$; vs veículo, ** $p < 0,01$ vs morfina



5.5.3 Participação da via L-arginina-óxido nítrico

Os resultados apresentados nas figuras 35 (A) e (B) mostram que o grupo tratado apenas com L-arginina ($127,0 \pm 32,91$) apresentou valores próximos aos do controle ($166,3 \pm 18,50$), descartando a existência de efeitos antinociceptivo do precursor do óxido nítrico. A L-arginina associada ao L-NOARG ($106,4 \pm 26,25$ s) reverteu o efeito do L-NOARG sozinho ($53,05 \pm 10,38$ s). A associação da L-arginina com a FHEX ($12,5 \text{ mg kg}^{-1}$) ($75,78 \pm 18,85$ s) não alterou de forma significativa o tempo de lambertura dos animais, quando comparado com FHEX ($48,57 \pm 8,35$ s) sozinho, o mesmo foi observado para a FAcOEt ($45,00 \pm 6,95$ s) evidenciando assim que o efeito antinociceptivo de FHEX e FAcOEt não está relacionado com a via do óxido nítrico.

Figura 35. Investigação do envolvimento da via L-arginina-óxido nítrico no efeito antinociceptivo de FHEX (A) ($12,5 \text{ mg kg}^{-1}$, v.o.) e FAcOEt (B) ($12,5 \text{ mg kg}^{-1}$, v.o.), L-NOARG (75 mg kg^{-1} , i.p.), L-arginina (600 mg kg^{-1} , i. p.) e veículo, na nocicepção induzida por glutamato ($20 \mu\text{L } 20^{-1} \mu\text{mol pata}^{-1}$) em camundongos ($n=6$). Os valores foram expressos como média \pm E.P.M. ($n=6$) (* $p < 0,05$; vs veículo; * $p < 0,05$ vs L-arginina) (ANOVA one way seguido pelo Teste de Tukey).

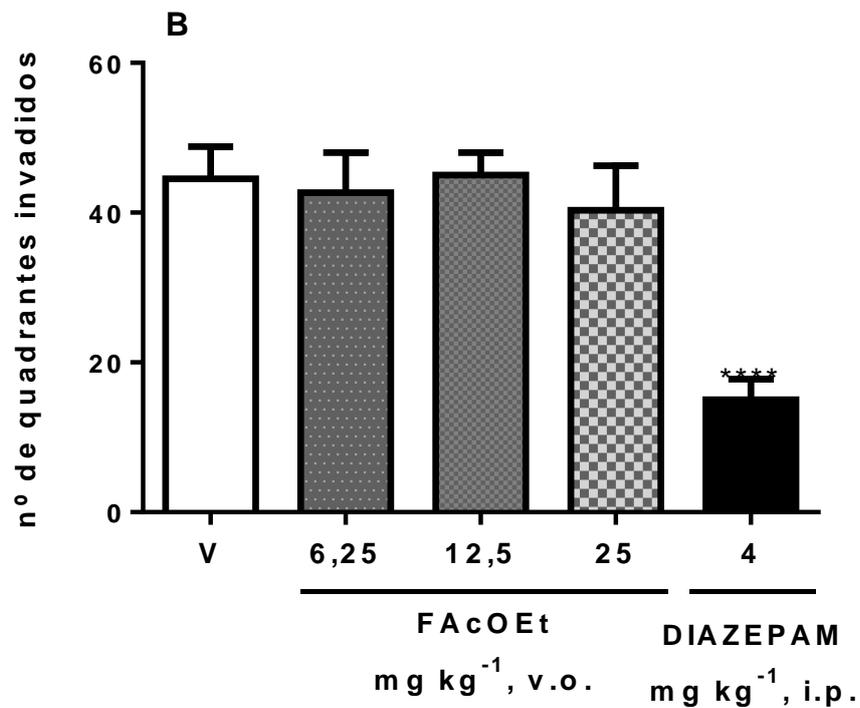
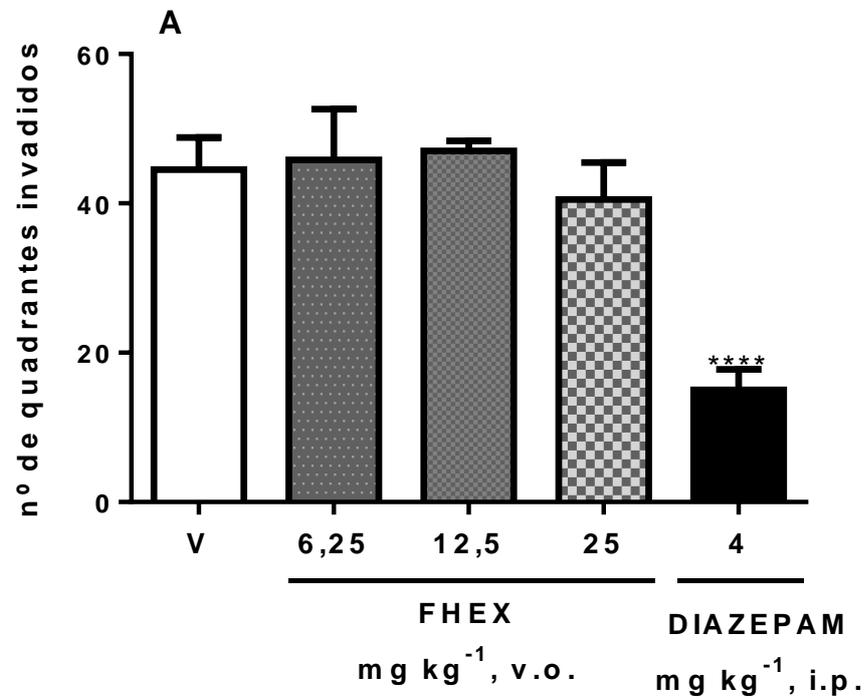


6.5 Avaliação da atividade motora espontânea de FHEX e FAcOEt

6.5.1 Teste do campo aberto

A fim de avaliar efeito locomotor das FHEX (Figura 36 A) e FAcOEt (Figura 36 B), os camundongos foram submetidos ao teste do campo aberto. Os dados indicam que as FHEX e FAcOEt nas doses de (6,25, 12,5 e 25 mg kg⁻¹, v.o.), não interferem com o número de invasões dos animais, quando comparados ao grupo veículo. O diazepam (4 mg kg⁻¹, i.p.) alterou o parâmetro avaliado de maneira significativa em relação ao controle (***) p<0,001).

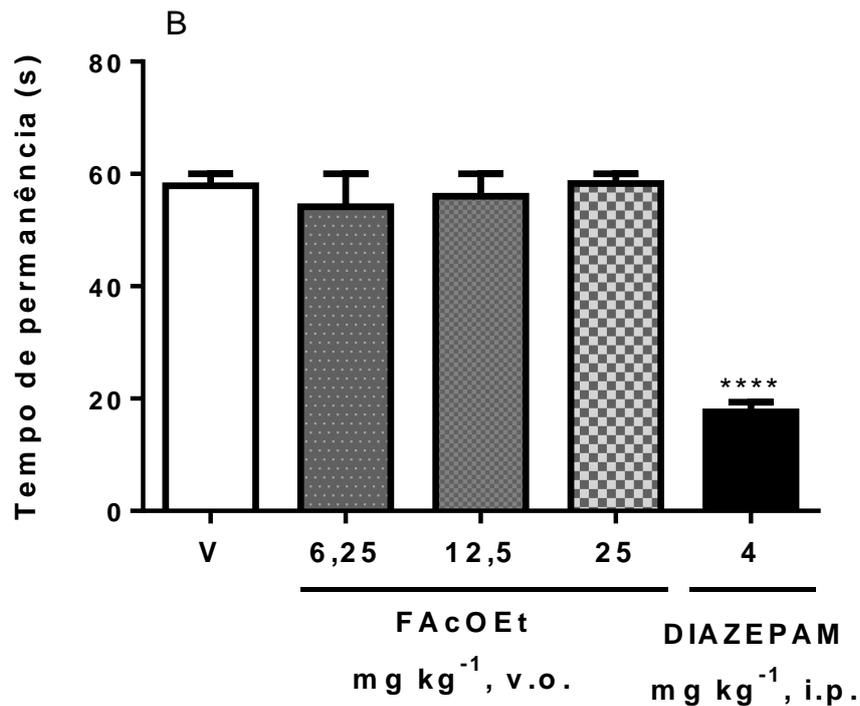
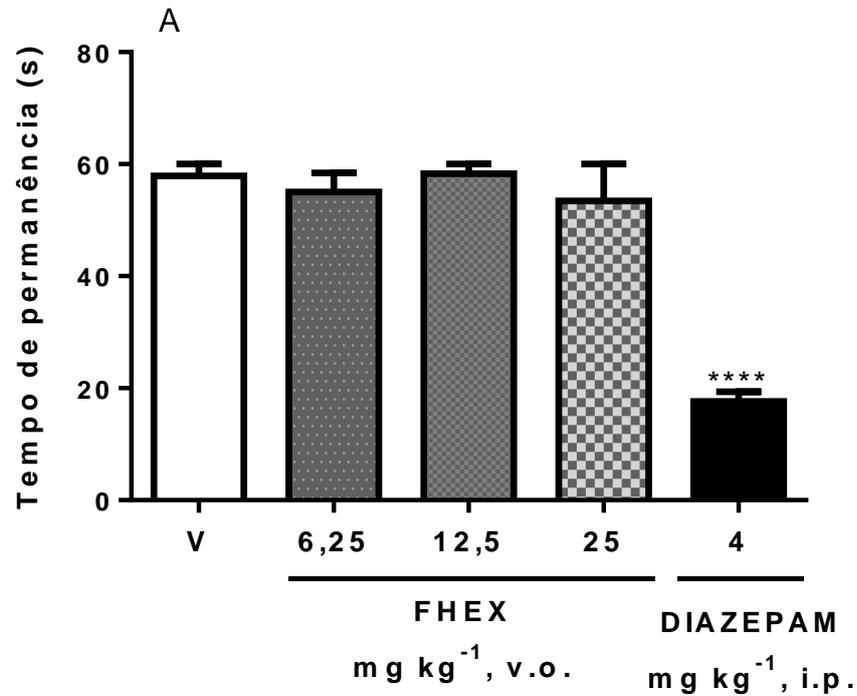
Figura 36. Efeito de FHEX (A) (6,25, 12,5 e 25 mg kg⁻¹, v.o.) e FAcOEt (B) (6,25, 12,5 e 25 mg kg⁻¹, v.o.) sobre a atividade motora no teste do campo aberto em camundongos (n=6). Os valores foram expressos como média ± E.P.M. do número de quadrantes invadidos em 5 min. *** p < 0,001 vs veículo (ANOVA one way, seguido do Teste de Tukey).



6.5.2 Teste do *rota rod*

Os dados indicam que os tratamentos com as FHEX (Figura 37 A) e FAcOEt (Figura 37 B) nas doses de 6,25, 12,5 e 25 mg kg⁻¹, v.o., não interferem no tempo que os animais permanecem na barra giratória no teste do *rota rod*, quando comparados ao grupo controle. O diazepam (4 mg kg⁻¹, i.p.) droga padrão altera o parâmetro avaliado de maneira significativa em relação ao controle (***) p<0,001).

Figura 37. Efeito de FHEX (A) (6,25, 12,5 e 25 mg kg⁻¹, v.o.) e FAcOEt (B) (6,25, 12,5 e 25 mg kg⁻¹, v.o.) sobre a atividade motora no teste do *Rota Rod* em camundongos (n=6). Os valores foram expressos como média ± E.P.M. de permanência em segundos na barra giratória. ***p < 0,001 vs veículo (ANOVA one way, seguido do Teste de Tukey).



6 DISCUSSÃO

As plantas são capazes de produzir e sintetizar uma ampla diversidade de compostos de baixa massa molecular, denominados metabólitos secundários, que evoluíram como compostos de defesa contra herbívoros e micro-organismos (SOBEH *et al.*, 2016). A maioria dos metabólitos secundários exibe atividade farmacológica relevante, como anti-inflamatório, anticancerígeno entre outros (ISLAM *et al.*, 2016). Os metabólitos secundários encontram-se divididos em três classes principais de acordo com a via metabólica, que são eles terpenoides, compostos fenólicos e alcaloides, que devido ao seu mecanismo de ação complementar servem, como fontes de muitas drogas potentes (SIMÕES *et al.*, 2017; LAKSHMI; NAIR, 2017).

A análise preliminar da presença de metabólitos nas frações hexânica e acetato de etila feita por cromatografia em camada delgada (CCD) evidenciou a presença de manchas com coloração roxa, o que pode ser um indicativo de compostos da classe dos terpenoides em ambas as amostras. Verificou-se também na cromatoplaça das amostras analisadas a presença de manchas amarelas na fração acetato de etila caracterizando os compostos pertencentes à classe dos flavonoides (CHAVES, 1997). Resultados semelhantes também foram encontrados na análise fitoquímica das vagens de *S. tubulosa* realizados por Araújo *et al.* (2015), que revelaram a presença de taninos, flavonoides e saponinas. Com base nisso foi realizada a análise por meio de cromatografia gasosa e espectrometria de massas (CG-EM) da fração hexânica. A espectrometria de massa é uma técnica padrão para a investigação analítica de moléculas e misturas complexas, que é importante na determinação da composição elementar de uma molécula e na percepção de estruturas parciais usando fragmentações como característicos nos espectros de massas (KIND; FIEHN, 2010).

Os resultados relativos à análise da fração hexânica por CG-EM conduziram a identificação de uma série de compostos, entre eles alguns ácidos graxos como ácido palmítico e ácido oleico, e dois triterpenos lupenona e lupeol. Esse estudo corrobora com os dados obtidos por Ragasa *et al.* (2014), que identificaram no extrato etanólico de *S. saman* os mesmos ácidos graxos e o triterpeno lupeol. O lupeol e a lupenona também foram encontrados nas folhas de *Mimosa pudica* L. e *Senna obtusifolia* L. e ambos da família Fabaceae (LUZ *et al.*, 2010). Nas raízes de *Piptadenia rigida* (Benth.) foi identificado o triterpeno lupeol (CARVALHO *et al.*, 2011). O lupeol é classificado como triterpeno, sendo encontrado em várias plantas, como repolho branco, pimenta, pepino, manga, morango e uva vermelha e em plantas medicinais, como ginseng americano (KHAN *et al.*, 2018). No entanto, ganhou mais

importância por exibir várias atividades farmacológicas sob condições *in vitro* e *in vivo*. Estas incluem a sua atividade benéfica contra a inflamação, artrite, diabetes, doenças cardíacas, toxicidade renal e toxicidade hepática (FERNÁNDEZ *et al.*, 2001; KALLUBAI *et al.*, 2015). Na tentativa de identificação dos componentes da fração acetato de etila foi utilizado a espectrometria de massas (MS) que tem sido adotado por ser um caminho rápido e seguro para a obtenção de princípios ativos de plantas guiado por bioensaios.

A espectrometria de massas (MS) utilizando como fonte de ionização eletrospray (ESI), permite a análise direta e rápida de misturas complexas. Estruturas de diferentes tamanhos e tipos de moléculas polares tais como os ácidos fenólicos, flavonoides glicosilados ramificados e taninos (SIMIRGIOTIS *et al.*, 2012). Os dados obtidos a partir da técnica ESI-IT-MS possibilitaram identificar os constituintes químicos majoritários da fração acetato de etila das vagens de *S. tubulosa*. Considerando seus padrões de fragmentação e espectros comparando-os com os dados existentes na literatura.

Ao analisar o espectro de massas, destaca-se que o pico obtido por ESI(-)-ITMS em modo negativo m/z 169 $[M-H]^-$ é característico do ácido gálico, um metabólito secundário de ampla ocorrência natural, formado pela via do ácido chiquímico (FATHONI *et al.*, 2017). O íon da molécula desprotonada em m/z 169 confirma a presença desta substância, que também foi encontrada no extrato aquoso de folhas verdes de *Myrtus communis* L. e identificada por Romani, Campo e Pinelli (2012), como sendo apenas um galatanino. Esta substância foi isolada da casca do caule e das folhas de *Cenostigma macrophyllum* Tul. (ALVES *et al.*, 2012), como também dos frutos de *Punica granatum* L. e *Caesalpinia ferrea* Mart (BENSAAD *et al.*, 2017; NAKAMURA *et al.*, 2002) e nas folhas de *Schotia brachypetala* Sond. (SOBEH *et al.*, 2016). Dentre as atividades biológicas deste composto está a anti-inflamatória com inibição da produção de NO, PGE-2 e IL-6 e hepatoproteção contra danos hepáticos induzidos por tetracloreto de carbono em ratos, além de atividade antioxidante com inibição da peroxidação lipídica (BENSAAD *et al.*, 2017; TUNG *et al.*, 2009).

O íon em $[M-H]^-$ em m/z 197 sugere a presença de um constituinte da classe dos compostos fenólicos, o galato de etila, que foi identificado em comparação com a literatura, apresentando fragmentos de íons MS^2 em m/z 169 e 125 (CHERNONOSOVA; KARPOVA; LYAKH, 2017). Os espectros MS^2 desse íon levaram à formação do íon produto em m/z 169, que está relacionado com a perda de $CH_2=CH_2$ $[M-28-H]^-$ e o fragmento iônico em m/z 125 $[M-28-44-H]^-$, bem como a perda de $CH_2=CH_2$ e CO_2 , confirmando assim o composto galato de etila (SUN *et al.*, 2007; WYREPKOWSKI *et al.*, 2014).

A análise do íon da molécula desprotonada em m/z 285 indicam o composto luteolina da classe dos flavonoides. A fragmentação deste íon produziu m/z 265 no MS² (FATHONI *et al.*, 2017). Os principais fragmentos de íons para luteolina são m/z 241 e m/z 175 (BRITO *et al.*, 2014). Esse composto também foi identificado nas folhas de *Albizia chinensis* Osb., e isolado da casca do caule de *Albizia julibrissin* Durazz (GHALY; MELEK; ABDELWAHED, 2010; JUNG *et al.*, 2004).

Uma das atividades biológicas da luteolina está relacionada com a redução da inflamação pela inibição da secreção de citocinas inflamatórias, como a interleucina1 β (IL-1 β) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) de mastócitos humanos (HMC-1) (JEON *et al.*, 2014). A luteolina também inibe a angiogênese, induz a apoptose e atua na prevenção da carcinogênese em modelos animais, reduzindo o crescimento tumoral *in vivo* e o potencial quimioterápico (LÓPEZ-LÁZARO, 2009).

O ácido elágico apresenta o íon da molécula desprotonada em m/z 301. O padrão de fragmentação do ácido elágico constitui-se basicamente das perdas no espectro MS², originando os íons m/z 257, 229 e 185 (MULLEN *et al.*, 2003; SEERAM *et al.*, 2008; SANTOS *et al.*, 2013). É um composto fenólico muito importante, encontrado em plantas medicinais como quebra-pedra (*Phyllanthus amarus* Schum.) (DHOOGHE *et al.*, 2011). E a literatura descreve algumas atividades biológicas tais como antioxidante não enzimática, com a eliminação de radicais livres e a atividade antioxidante enzimática como o aumento do nível proteico de enzimas antioxidantes (OMUR; COYAN, 2016; OLIVEIRA, 2016; YOUSEF; MASYR; MOHSEN, 2016; CHEN; CHEN; ZHOU, 2018). Além de controlar o índice glicêmico e o metabolismo lipídico em camundongos (CHAO; HSU; YIN, 2009). Possui atividade anti-inflamatória com inibição da enzima COX-1 e COX-2 e redução da produção da PGE-2 (BENSAAD *et al.*, 2017; CORBETT *et al.*, 2010; FAVARIN *et al.*, 2013). Segundo Marin e seus colaboradores (2013), no modelo de colite ulcerativa, o ácido elágico inibiu significativamente a progressão da doença, reduzindo a inflamação intestinal com a redução de mediadores como a COX-2 e iNOS e a via de sinalização NF- κ B foi bloqueada.

A análise do espectro evidenciou ainda íon da molécula desprotonada em m/z 341, onde sua fragmentação produziu o íon m/z 179, devido à divisão da porção hexose (162 Da), bem como íons m/z 161 [M-H-hexose-H₂O]⁻, m/z 143 [M-H-hexose-2 \times H₂O]⁻. Com base nos argumentos acima, o composto foi atribuído como sendo o ácido cafeico-O- β -hexosídeo (KOOLEN *et al.*, 2013; SAID *et al.*, 2017).

Outra classe de substâncias identificadas na fração acetato de etila das vagens de *S. tubulosa* são os flavonoides, comum também em outras espécies da família Fabaceae como

Albizia chinensis Merr., *Albizia lebbeck* L., *Albizia julibrissin* Durazz. (GHALY; MELEK; ABDELWAHED, 2010; EL-MOUSALLAMY, 1998; LAU *et al.*, 2007).

A verificação dessas evidências foi realizada com base na interpretação dos espectros de massas dos principais íons precursores observados. Por exemplo, a quercetrina foi identificada pela presença do íon precursores de m/z 447 que foi atribuído ao íon da molécula desprotonada $[M-H]^-$ (TIBERTI *et al.*, 2007). A quercetrina é um flavonol pertencente à classe dos flavonoides sendo considerado um potente antioxidante, pois protege contra lesão tecidual induzida por várias toxicidades de drogas. Além de atividades biológicas como antiviral, anticâncer, hepatoprotetora, antimicrobiana e anti-inflamatória (MAALIK *et al.*, 2014; DAVID *et al.*, 2016; DAJAS, 2012; BAGHEL *et al.*, 2012; LIN *et al.*, 2012; ANHE *et al.*, 2012; YING *et al.*, 2013; LEKIC *et al.*, 2013; LIU *et al.*, 2012). É encontrado principalmente em cebolas, uvas, frutas vermelhas, cerejas, brócolis e frutas cítricas (DAVID *et al.*, 2016).

A análise criteriosa dos íons evidenciou a presença de uma molécula de digaloil-glucose (m/z 483). No MS^2 o íon m/z 331 e os principais fragmentos foram determinados pela perda de água a m/z 313 $[M-H-18]^-$, remoção de um e dois grupos formaldeído (CH_2O) da glicose em m/z 271 $[M-H-60]^-$ e m/z 211 $[M-H-60-60]^-$, respectivamente, também pela perda de outra molécula de água a m/z 193 $[M-H-2 \times 60-18]^-$ e a perda de glicose $[M-H-162]^-$. O composto foi identificado como 1,6- digaloil-glucose (SANTOS *et al.*, 2013; NUENGCHAMNONG *et al.*, 2011; WYREPKOWSKI *et al.*, 2014). Esta mesma substância também foi identificada em *Punica granatum* L. e *Caesalpinia ferrea* Stem Bark (MENA *et al.*, 2012; WYREPKOWSKI *et al.*, 2014).

O conjunto de dados fornecidos pelo espectro de massas correspondente ao íon m/z 593 corroboram para sugerir a presença da luteolina-7-*O*-rutinosídeo ou kaempferol-3-*O*-rutinosídeo (CHEN; INBARAJ; CHEN, 2012). Esses mesmo compostos também foram isolado das folhas de *Albizia chinensis* Merr., (GHALY; MELEK; ABDELWAHED, 2010).

A análise do espectro evidenciou também o íon da molécula desprotonada em m/z 609, com base na literatura sugeriu-se a substância quercetrina-3-*O*-(6-*O*-ramnosil-glicosídeo) (KARAR *et al.*, 2013). Esse mesmo composto também foi isolado das folhas de *Albizia lebbeck* L. e *Albizia chinensis* Merr., (EL-MOUSALLAMY, 1998; GHALY; MELEK; ABDELWAHED, 2010).

O uso de plantas no tratamento de várias doenças é feito na maioria das vezes de forma meramente intuitiva, destituído de qualquer informação sobre os efeitos colaterais e biológicos associados a essas terapias (CRAGG; NEWMAN, 2013). Com base nisso,

inicialmente avaliou-se o perfil toxicológico das frações hexânica, acetato de etila e aquosa na dose de até 2000 mg kg⁻¹. Os resultados observados não revelaram sinais de toxicidade sistêmica após a administração das frações hexânica, acetato de etila e aquosa na dose de 2000 mg kg⁻¹ via oral (v.o.). Não foram observadas mortes nem alterações de comportamento durante o tempo de observação de 14 dias, durante o estudo não foram observadas alterações nos sistemas respiratório, locomotor e nervoso. Foi observado também sobrevivência de 100% dos animais tratados com a dose de 2000 mg kg⁻¹, assim não foi possível estabelecer a DL₅₀.

A literatura mostra que várias plantas utilizadas na medicinal tradicional não apresentam toxicidade expressiva, por exemplo, o extrato hidro alcoólico da casca de *Albizia glaberrima* Benth. e o extrato etanólico de *S. tubulosa* não apresentaram sinais de toxicidade e mortalidade nos animais quando monitorados por 14 dias após o tratamento até a dose de 2000 mg kg⁻¹ (OGBIT; AKINDELE; ADEYEMI, 2017; SALES, 2015). Da mesma forma que o extrato bruto de *Faidherbia albida* Del, não produziu nenhuma morte até a dose 5000 mg kg⁻¹ (TIJANI; UGURU; SALAWU, 2008).

De acordo com a OCDE 423, uma vez que todos os animais sobreviveram até sua eutanásia, as frações podem ser consideradas como de baixa toxicidade (OECD, 2001). Na avaliação da toxicidade aguda, também não houve alteração do peso corporal dos animais. Esse parâmetro é relevante em avaliações de toxicidade dos animais tratados, pois indica o aparecimento, muitas vezes precoce, de efeitos tóxicos de uma determinada substância no organismo animal (PIRES-JÚNIOR *et al.*, 2012). Resultados semelhantes foram encontrados em experimento para avaliar a ingestão direta das vagens de *S. tubulosa* numa dieta contendo 5% de vagens associadas a ração, no qual verificou-se que a incorporação das vagens de *S. tubulosa* na dieta ao nível de 5% não afetou o ganho de peso dos animais (ARAÚJO *et al.*, 2015). Esses resultados corroboram com nosso trabalho que mostra que a administração das doses estudadas não interfere no ganho de peso dos animais avaliados.

Neste trabalho foi observado que o tratamento agudo com as frações hexânica e acetato de etila não alteraram os níveis de AST e ALT quando comparadas ao controle. Além disso, a análise macroscópica dos órgãos internos mostrou que as frações não causaram danos aos órgãos analisados, o que confirma a baixa toxicidade. Um dos órgãos mais afetados por substâncias tóxicas é o fígado que é o principal órgão responsável pela biotransformação de substâncias químicas no organismo e, portanto, é um dos envolvidos diretamente nos efeitos adversos causados por substâncias tóxicas, assim as enzimas séricas AST e ALT são

consideradas marcadores sensíveis de toxicidade hepática e seu aumento na atividade indica danos ao fígado (RAMAIAH, 2011).

Quanto a toxicidade reprodutiva não foi avaliada neste trabalho, uma vez que esse parâmetro já tinha sido avaliado por Sales (2015), que concluiu que as frações hexânica, acetato de etila e aquosa na dose de 240 mg kg⁻¹ apresentaram toxicidade sobre a gestação de ratas Wistar com a diminuição do índice de gestação apenas na fração hexânica. Dessa forma, as frações não devem ser utilizadas durante o período gestacional, por serem responsáveis por alterações na gestação e sobre o sistema reprodutor. Mas este fato não é impedimento para que as frações sejam usadas como um possível fitoterápico, apenas pode ser limitado seu uso, além do uso racional durante a gestação, assim como acontece com outros fitoterápicos a exemplo da *Gikgo biloba* L., *Peumus boldos* Molina (ANVISA, 2016; BRUNO *et al.*, 2018). Entretanto faz-se assim necessária a realização de estudos toxicológicos mais detalhados para garantir a segurança na sua utilização.

No presente estudo, avaliou-se o efeito anti-inflamatório das frações de *S. tubulosa* em roedores utilizando edema induzido por diferentes agentes. A injeção de carragenina produziu um evento bifásico no mecanismo de inflamação. A fração hexânica inibiu o edema em todas as doses analisadas, na segunda e terceira hora, sendo que na maior dose (200 mg kg⁻¹) manteve esse efeito da segunda até a quinta hora. Já a fração acetato de etila, produziu inibição significativa, somente na dose de 200 mg kg⁻¹, da terceira à quinta hora. A fração aquosa não produziu efeito antiedematogênico em nenhuma das fases do processo inflamatório. O que sugere que seus constituintes bioativos não são capazes de reduzir o edema induzido por carragenina.

O edema de pata induzida por carragenina é um modelo animal experimental geralmente usado para avaliar a contribuição de produtos naturais por resistir às alterações bioquímicas associadas à inflamação aguda e adequado para investigação de efeito e anti-inflamatório de produtos naturais (KHEDIR *et al.*, 2016).

Segundo Vinegar *et al.* (1969), a resposta inflamatória induzida pela carragenina é bifásica, a primeira fase (1-3 h) vascular é caracterizada por formação marcada de edema resultante da rápida produção de vários mediadores inflamatórios incluindo histamina, serotonina e bradicinina (DI ROSA *et al.*, 1971). A segunda fase celular (3-5 h) é marcada pela liberação de prostaglandinas, produzido pela enzima cicloxigenase (COX-1) e (COX-2) (SEIBERT *et al.*, 1994; SALVEMINI *et al.*, 1996).

De acordo com o resultado obtido, pode ser sugerido que FHEX pode inibir a fase de edema induzido por carragenina e, a atividade antiedematogênica da fração, pode estar

relacionada com a inibição de mediadores inflamatórios endógenos como histamina, serotonina e bradicinina e também mediadores tardios como, por exemplo, a inibição da biossíntese da cicloxigenase e consequente, diminuição da expressão de prostaglandinas, já a FAcOEt pode estar relacionada com a diminuição de prostaglandinas.

Resultados semelhantes aos aqui encontrados foram relatados para outras espécies da mesma tribo de *S. tubulosa*, como na *Albizia glaberrima* Benth. em que o extrato hidroalcoólico reduziu o edema a partir da terceira hora de observação, possivelmente por meio da inibição da produção de prostaglandinas e diminuição da cicloxigenase (OGBITI; AKINDELE; ADEYEMI, 2017). Bao *et al.* (2009) avaliaram o extrato etanólico de *Pithecellobium clypearia* Benth. rico em composto fenólicos e verificaram que diminuiu significativamente o edema induzido por carragenina, com efeitos inibitórios máximos às 4 h após injeção de carragenina.

Vários modelos experimentais podem ser empregados para investigar o potencial antiedematogênico de uma substância com potencialidade terapêutica, entre os mais comuns podemos citar o edema de pata induzido por dextrana e carragenina, utilizadas neste experimento. Foi analisado o efeito de FHEX sobre o edema induzido por dextrana, uma vez que essa fração produziu efeito nas duas fases de observação do edema.

Está bem estabelecido que a carragenina e a dextrana induzem o edema da pata por diferentes mecanismos. O edema induzido pela injeção intraplantar de dextrana ocorre por um mecanismo diferente daquele ocorrido pela carragenina. Dextrana é um polissacarídeo de alta massa molecular que induz reação após injeção em camundongos e ratos, caracterizada por extravasamento e formação de edema, como consequência da liberação de histamina e serotonina dos mastócitos, sem o envolvimento de leucócitos polimorfonucleares no tecido inflamado (NDEBIA *et al.*, 2011; CARVALHO *et al.*, 2013). No presente trabalho, a FHEX diminuiu a formação de edema induzido por dextrana nas patas de camundongo, sugerindo que os efeitos de FHEX poderiam envolver o bloqueio dos receptores de histamina e/ou serotonina ou a inibição da sua liberação dos mastócitos (CARVALHO *et al.*, 2013).

Foi investigado a atividade antiedematogênica das FHEX e FAcOEt no edema de pata induzido pela prostaglandina E2 (PGE2). As prostaglandinas são formadas quando o ácido araquidônico é liberado na membrana plasmática por fosfolipases e metabolizado pelas ações das cicloxigenases, elas desempenham um papel fundamental na geração da resposta inflamatória. Sua biossíntese é significativamente aumentada no tecido inflamado e contribui para o desenvolvimento dos sinais cardinais de inflamação aguda (GROSSER; RICCIOTTI; FITZGERALD, 2017; FIRDOUS; KUTTAN; KUTTAN, 2015). Os resultados obtidos no

edema de pata induzido pela injeção de PGE2 em camundongos mostram que as frações inibiram o edema de maneira semelhante à indometacina. Esses dados revelam que as FHEX e FAcOEt inibiram a ação da PGE2 e que esse efeito inibitório pode ser devido à ligação direta das FHEX e FAcOEt ao receptor da PGE2 ou ainda por bloquear pontos na via de sinalização induzida pela PGE2 (KALE *et al.*, 2007).

A atividade antiedematogênica das FHEX e FAcOEt podem estar relacionados a seus compostos fitoquímicos, como ácidos graxos e triterpenos presentes na FHEX. Foi descrito que ácidos graxos poli-insaturados funcionam como mediadores e reguladores da inflamação (KHEDIR *et al.*, 2016). O triterpeno lupeol identificado na FHEX exibe propriedades anti-inflamatórias tópicas em diferentes modelos animais de inflamação, reduzindo os níveis de citocinas inflamatórias e a expressão proteica pró-inflamatória via inibição da via do fator nuclear kB (NF-kB) (FERNANDES *et al.*, 2007; PASSOS *et al.*, 2007). Além do ácido gálico presente na FAcOEt que já foi relatado na literatura como redutor de inflamação associado a inibição da produção de PGE2 (BENSAAD *et al.*, 2017).

A supressão da inflamação está entre as ações farmacológicas mais comuns relatadas para produtos naturais, particularmente para aqueles de origem vegetal. Para muitos destes compostos, a interferência com a biossíntese de PGs pró-inflamatórios é proposta como potencial modo subjacente de ação (KOEBERLE; WERZ, 2014; KOEBERLE; WERZ, 2018). Entre esses compostos está o lupeol que reduz significativamente a produção de prostaglandina E2 (PGE2) e os polifenóis que já foram reconhecidos como inibidores potentes de cicloxigenase (FERNÁNDES *et al.*, 2001; CHEN *et al.*, 2012; PANCHE; DIWAN; CHANDRA, 2016).

No presente estudo, também foi avaliada a atividade antinociceptiva das frações FHEX, FAcOEt e FAq, em modelos experimentais de nocicepção, contribuindo assim, para o conhecimento farmacológico desta planta. Os resultados deste estudo mostram pela primeira vez que as FHEX e FAcOEt obtidas a partir do extrato etanólico das vagens de *S. tubulosa*, possuem atividade antinociceptiva quando administrados por via oral em diferentes modelos de nocicepção química em camundongos.

As frações (FHEX e FAcOEt) produziram antinocicepção em ambas as fases do teste da formalina. No entanto a FAq não produziu efeito antinociceptivo em nenhuma das fases do teste. A injeção intraplantar de formalina evidencia duas fases distintas de sensibilidade dolorosa. A primeira fase, quando a dor neurogênica é causada pelo efeito direto da formalina nas fibras C sensoriais, liberando neuropeptídios como a substância P, entre outros. A segunda fase é caracterizada como dor inflamatória, relacionada à liberação de mediadores

nociceptivos, como histamina, serotonina, bradicinina, prostaglandinas e aminoácidos excitatórios, que podem ser inibidos por analgésicos e anti-inflamatórios (HUNSKAAR; HOLE, 1987; SHIBATA *et al.*, 1989).

O teste de formalina é sensível a várias classes de analgésicos, os resultados mostraram que o tempo gasto em lambe a pata lesada foi significativamente reduzido pela administração oral das FHEX e FAcOEt em ambas as fases, sugerindo um efeito central e periférico por meio de uma resposta bifásica do tempo da lambida da pata induzida por formalina (HUNSKAAR; HOLE, 1987).

Além disso, FHEX e FAcOEt foram capazes de inibir a nocicepção neurogênica causada pela capsaicina, um alcaloide extraído de pimentas picantes, que estimula as terminações nervosas nociceptivas e térmicas causando dor intensa. A capsaicina atua ativando os receptores de potencial transitório (TRP) (GEES *et al.*, 2013; HWANG *et al.*, 2000). A injeção de capsaicina na pata traseira de camundongos produz padrões de comportamento de nocicepção característicos, tais como lambe e morder a pata afetada, produzindo alterações significativas nos limiares de nocicepção térmica e mecânica. Tais fatos acontecem pela indução da estimulação direta de fibras do tipo C não mielinizadas e pobre em fibras A δ mielinizadas e finas através do receptor de potencial transitório do tipo valinoide 1 (TRPV1) localizados nos neurônios nociceptivos, abrindo um canal não seletivo de cátions, permitindo o influxo de cátions, principalmente Ca²⁺ e Na⁺, causando despolarização e iniciação de potenciais de ação e a liberação de vários neuropeptídeos envolvidos na transmissão dolorosa, dentre estes a substância P (NAH *et al.*, 2000; SAWYNOK *et al.*, 2006; PALAZZO; ROSSI; MAIONE, 2008).

Com a finalidade de avaliar o envolvimento dos aminoácidos excitatórios no efeito antinociceptivo de FHEX e FAcOEt, foi realizado o teste da nocicepção induzida pelo glutamato. O glutamato é um importante neurotransmissor excitatório que transmite sinais nociceptivos promovendo a ativação direta de receptores em fibras nociceptivas (RUGGIERO *et al.*, 2011). Está ligado à mediação da nocicepção, na coluna dorsal e na periferia do sistema nervoso, uma vez que é liberado em resposta à estimulação nociceptiva e lesão tecidual ou de nervo (BEIRITH; SANTOS; CALIXTO, 2002). Substâncias que diminuem a nocicepção induzida por glutamato podem estar atuando em seus receptores como antagonistas ou inibindo a síntese de NO pelo bloqueio da NOS (BEIRITH *et al.*, 2002).

Os resultados mostraram que as FHEX e FAcOEt foram capazes de reduzir a nocicepção induzida pelo glutamato nos camundongos tratados com a dose de 12,5 e 25 mg kg⁻¹. Esse resultado por ser devido a presença do composto lupeol encontrado na fração

hexânica. Sua propriedade já foi demonstrada ao analisar seu efeito antinociceptivo administrando o composto extraído da fração hexânica de *Zanthoxylum rhoifolium* Lam. em modelos de dor aguda em roedores, sugerindo que o lupeol pode interferir na ativação dos receptores glutamatérgicos, o que limitaria a produção de óxido nítrico e outros mediadores (PEREIRA *et al.*, 2010). A ação antinociceptiva da FHEX na nocicepção causada pelo glutamato pode estar associada, pelo menos em parte, a sua interação com o sistema glutamatérgico ou com a produção do NO.

Na perspectiva de esclarecer se o mecanismo de ação envolvido na resposta antinociceptiva de FHEX e FAcOEt estaria relacionado com a participação do sistema opioide no efeito antinociceptivo de FHEX e FAcOEt, os animais foram previamente tratados com a naloxona. Observou-se que a naloxona na dose avaliada produziu efeito significativo sobre a nocicepção do glutamato e reverteu completamente a antinocicepção induzida pela morfina e pelas FHEX e FAcOEt, sugerindo que o sistema opioide provavelmente está envolvido na antinocicepção das FHEX e FAcOEt.

A antinocicepção da FAcOEt também foi antagonizada pelo pré-tratamento com glibenclamida (um bloqueador dos canais de K^+_{ATP}), os canais K^+_{ATP} estão amplamente presentes em neurônios periféricos e centrais, além de células gliais onde desempenham um papel importante na regulação da excitabilidade da membrana e liberação de neurotransmissores (GHORBANZADEH, 2014).

Os resultados apresentados neste trabalho corroboram com COELHO (2014), o qual avaliou o galato de etila, um dos constituintes presentes na FAcOEt, no pré-tratamento dos animais com glibenclamida, a substância foi capaz de prevenir parcialmente e também demonstrou que à ativação de canais de potássio sensíveis ao ATP está envolvida na antinocicepção causada pelo galato de etila, sugerindo que a via canais K^+_{ATP} provavelmente está envolvido na antinocicepção da FAcOEt.

Pela via do glutamato está bem descrito que o sistema óxido nítrico, também exerce um papel importante na modulação da nocicepção. A ativação de receptores glutamatérgicos, especialmente o NMDA, pode estimular a atividade de enzimas intracelulares como a NOS através do aumento de cálcio intracelular e a produção de uma variedade de segundos mensageiros, como o NO, relacionados com a transmissão da condução da dor (BEIRITH *et al.*, 2002). No presente estudo, ficou demonstrado que a via L-arginina óxido nítrico reverteu de forma parcial o efeito antinociceptivo causada pelas FHEX e FAcOEt. Foi possível observar que quando tratados com a L-NOARG, os animais exibiram um comportamento antinociceptivo, em relação ao grupo controle, diferente da ausência de efeito evidenciado

quando apenas L-arginina foi administrada. Estas evidências corroboram com os resultados encontrados no teste da nocicepção induzida pelo glutamato, visto que a via glutamatérgica pode estar envolvida na participação do NO.

Sabe-se que drogas com atividade sedativa também podem inibir o comportamento de lambar e coçar a pata do animal e também influenciar na resposta motora (WATANABLE *et al.*, 1999). No entanto, o presente trabalho mostrou que as FHEX e FAcOEt não alteraram a atividade locomotora dos animais. A atividade locomotora é um resultado da ativação cerebral, que se manifesta como uma excitação dos neurônios centrais e um aumento no metabolismo cerebral (CALABRESI *et al.*, 2000). O teste de campo aberto e do rota rod foram utilizados para excluir a possibilidade de que a ação antinociceptiva das frações pudessem estar relacionadas a distúrbios inespecíficos na atividade locomotora dos animais (GONÇALVES *et al.*, 2013).

O presente estudo mostrou que o tratamento com as FHEX e FAcOEt não tiveram nenhum efeito na coordenação motora e nem locomotora, como refletido pelo teste de campo aberto e rota rod. Portanto, a supressão da resposta da lambida induzida pela capsaicina, formalina e glutamato, causada pelo tratamento com FHEX e FAcOEt, são indicações complementares da ação antinociceptiva dessa planta.

7 CONCLUSÕES

1. A análise fitoquímica por meio da cromatografia em camada delgada permitiu inferir que as frações apresentam em sua constituição compostos da classe dos terpenoides, flavonoides e outros fenólicos;
2. O estudo por CG-EM da fração hexânica levou a identificação de 11 substâncias, em sua maioria ácidos graxos e dois compostos triterpênicos, a lupenona e o lupeol, sendo todos relatados pela primeira vez na espécie, fortalecendo assim o perfil fitoquímico do gênero *Samanea*;
3. A análise por ESI-ITMS da fração acetato de etila permitiu a identificação de 10 constituintes químicos, entre compostos fenólicos, incluindo flavonoides, todos relatados pela primeira vez na espécie;
4. As frações hexânica, acetato de etila e aquosa podem ser consideradas como de baixa toxicidade, pois não provocam mortes, nem alterações nos parâmetros químicos;
5. As frações hexânica e acetato de etila, administrado por via oral, reduziram significativamente o edema induzido por carragenina, a partir da terceira hora, pela dextrana a partir de uma hora, e pela PGE₂, em todas as horas indicando atividade anti-inflamatória;
6. Observou-se efeito antinociceptivo das frações hexânica e acetato de etila, nos modelos de nocicepção química induzida por capsaicina, formalina e glutamato;
7. O mecanismo de ação das frações hexânica e acetato de etila pode estar relacionado com a via opioide. Na fração acetato de etila pode também está relacionado a via dos canais de K^+_{ATP} ;
8. A atividade antinociceptiva foi complementada pelos testes do campo aberto e rotarod. As frações não foram capazes de alterar a capacidade exploratória e locomotora dos animais, excluindo assim a possibilidade de atividade antinociceptiva relacionada a sedação dos animais;

9. O efeito anti-inflamatório e antinociceptivo evidenciado nas frações hexânica e acetato de etila pode estar relacionado a presença de compostos como o lupeol, ácido gálico, luteolina e ácido elágico;

10. Diante do exposto os resultados indicam efeitos anti-inflamatórios e antinociceptivo, com grande potencial para subsidiar o desenvolvimento de um fitoterápico, porém, outras investigações farmacológicas e celulares são necessárias para esclarecer melhor o mecanismo de ação envolvidos

PERSPECTIVAS

As frações derivadas do extrato etanólico das vagens de *S. tubulosa* são apresentadas como um produto com baixa toxicidade e mostram ainda efeitos anti-inflamatório e antinociceptivo.

Uma perspectiva é produzir um fitoterápico utilizando as frações hexânica e acetato de etila, e realizar outros estudos mais detalhados para garantir a segurança na sua utilização. E posteriormente regulamentar seu uso e distribuição junto a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) com a subsequente comercialização, principalmente se seu custo for menor do que os produtos já disponíveis no mercado, facilitando a aquisição pela população que dele precisar.

Quanto aos estudos experimentais, é almejada a continuidade de testes com as frações hexânica e acetato de etila, tanto por vias de administração não utilizadas neste trabalho como em modelos animais diferentes, objetivando encontrar outras atividades destas frações, assim como elucidar melhor seus mecanismos de ação.

REFERÊNCIAS

ABOTSI, W. K. M. *et al.* *Albizia zygia* (DC.) J.F. Macbr. (Leguminosae-Mimosoideae) root extract exhibits anti-nociceptive and antipyretic activities in murine models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 199, p. 183–193, 2017.

Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/fitoterapicos> Acesso em: 10/07/2018.

AJAM, S. M. S. *et al.* Antimicrobial Activity of Spermine Alkaloids From *Samanea saman* (Jacq.) against Microbes Associated with Sick Buildings. **International Conference on Environment, Chemistry and Biology**, v. 49, n. 30, 2012.

ALMEIDA, J. R. G. S. *et al.* Antinociceptive Activity of Ethanol Extract from *Duguetia chrysocharpa* Maas (Annonaceae). **The Scientific World Journal**, p. 1-6, 2012.

ALVES, C. Q. *et al.* Flavonoids and other bioactive phenolics isolated from *Cenostigma macrophyllum* (Leguminosae). **Química Nova**, v. 35, n. 6, 2012.

AMANN, R.; PESKAR, B. A. Anti-inflammatory effects of aspirin and sodium salicylate. **European Journal of Pharmacology**, v. 447, n. 1, p. 1–9. 2002.

AMBRIZ-PÉREZ, D. L. *et al.*, Phenolic compounds: Natural alternative in inflammation treatment. A Review. **Cogent Food & Agriculture**, v. 2, 2016.

ANDRADE, P. B.; VALENTÃO P. Insights into Natural Products in Inflammation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 3, p. 644, 2018.

ANHE, G. F. *et al.* Quercetin decreases inflammatory response and increases insulin action in skeletal muscle of ob/ob mice and in L6 myotubes. **European Journal of Pharmacology**, v. 689, p. 285-293, 2012.

ANTINARELLI, L. M. *et al.* Antileishmanial activity of some Brazilian plants, with particular reference to *Casearia sylvestris*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 87, n. 2, p. 733-42, 2015.

ARAÚJO, M. R. L. *et al.* Reproductive toxicity of *Samanea tubulosa* on rats Toxicidade reprodutiva de *Samanea tubulosa* em ratos. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 52, n. 4, p. 342-349, 2015.

ARUMUGAM, S. *et al.* Evaluation of anti-ulcer activity of *Samanea saman* (Jacq) merr bark on ethanol and stress induced gastric lesions in albino rats. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 43, n. 5, p. 586-90, 2011.

BAGHEL, S. S. *et al.* A review of quercetin: antioxidant and anticancer properties. **World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 1, n. 1, p. 146-160, 2012.

BAO, W. *et al.* Curcumin alleviates ethanol-induced hepatocytes oxidative damage involving heme oxygenase-1 induction. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, n. 2, p. 549-553.

- BARBOSA, A. P. Ethnopharmacological aspects of the genus *Samanea* Merrill (Fabaceae). **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 8, n. 26, p. 924-927, 2014.
- BARNEBY, R. C.; GRIMES, J. W. **Silk Tree, Guanacaste, Monkey's Earring. A Generic System for the Synandrous Mimosaceae of the Americas**. Part I. Abarema, Albizia and Allies. *Memories of The New York Botanical Garden*, v. 74, Part 1. 292 p. 1996.
- BASTING, R. T. *et al.* Composição e formulação a base de extratos/óleos essenciais de *Pterodon pubescens* Benth. e *Cordia verbenácea* DC, e usos. Procurador: Ciro De La Cerda. BR 102015012438-4 A2. Depósito: 28 maio 2015. Concessão: 29 nov. 2016.
- BEIRITH, A.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. Mechanisms underlying the nociception and paw edema caused by injection of glutamate into the mouse paw. **Brain Research**, v. 924, p. 219-228, 2002.
- BELL, A. Review The neurobiology of acute pain. **The Veterinary Journal**, v. 237, p. 55–62, 2018.
- BENSAAD, L.A. *et al.* Anti-inflammatory potential of ellagic acid, gallic acid and punicalagin A&B isolated from *Punica granatum*. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 17, p. 47. 2017.
- BHOWMICK, R. *et al.* In vivo analgesic, antipyretic, and anti-inflammatory potential in Swiss albino mice and *in vitro* thrombolytic activity of hydroalcoholic extract from *Litsea glutinosa* leaves. **Biological Research**, v. 47, p.56, 2014
- BRADY, O. A.; MARTINA, J. A.; PUERTOLLANO, R. Emerging roles for TFEB in the immune response and inflammation. **Journal Autophagy**, v. 14, p. 181-189, 2018.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Fitoterapia no SUS**. Disponível em: < <http://portal.saude.gov.br> >. Acesso em: 17 nov. 2016.
- BRITO, A. *et al.* HPLC-UV-MS Profiles of Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Fruits from Three Citrus Species Consumed in Northern Chile. **Molecules**, v. 19, p. 17400-17421, 2014.
- BROADHURST, P. L. Determinants of emotionality in the rat: I situation factors. **British Journal of Psychology**, v. 48, p. 1-12, 1957.
- BRUNO, L. O. *et al.* Pregnancy and herbal medicines: An unnecessary risk for women's health—A narrative review. **Phytotherapy Research**, v. 32, p. 796–810, 2018.
- CALABRESI, P. *et al.* Acetylcholine-mediated modulation of striatal function. **Trends Neurosci**, v. 23, n. 3, p. 120-126, 2000.
- CARVALHO, A. M. R. *et al.* Evaluation of the anti-inflammatory activity of riparin II (O-methyl-N-2-hidroxi-benzoyl tyramine) in animal models. **Chemico-Biological Interactions**, v. 205, p. 165–172, 2013.
- CARVALHO, P.E.R. Circular Técnica 132-Bordão-de-Velho, *Samanea tubulosa*. *Embrapa*.

v. 132, p. 1-6, 2007.

CARVALHO, M. G. *et al.* Chemical constituents from *Piptadenia rigida* Benth., Fabaceae, "angico". **Revista brasileira de farmacognosia**, v. 21, n. 3, 2011.

CHAO, P.; HSU, C.; YIN, M. Anti-inflammatory and anti-coagulatory activities of caffeic acid and ellagic acid in cardiac tissue of diabetic mice. **Nutrition & Metabolism**, v. 6, n. 33, 2009.

CHAVES, M. H. Análise de extratos de plantas por CCD: uma metodologia aplicada á disciplina química orgânica. **Química Nova**, v. 20, n. 5, p. 560–562, 1997.

CHEN, B. T. *et al.* Anti-Inflammatory Effects of a Polyphenols-Rich Extract from Tea (*Camellia sinensis*) Flowers in Acute and Chronic Mice Models. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**. 2012.

CHEN, H. J.; INBARAJ, B. S.; CHEN, B. H. Determination of phenolic acids and flavonoids in *Taraxacum formosanum* Kitam by liquid chromatography-tandem mass spectrometry coupled with a post-column derivatization technique. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, p. 260-285, 2012.

CHEN, P.; CHEN, F.; ZHOU, B. Antioxidative, anti-inflammatory and anti-apoptotic effects of ellagic acid in liver and brain of rats treated by D-galactose. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1465, 2018.

CHERNONOSOVA, A. A.; KARPOVAB, E. A.; LYAKHB, E. M. Identification of phenolic compounds in *Myricaria bracteata* leaves by high-performance liquid chromatography with a diode array detector and liquid chromatography with tandem mass spectrometry. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, p. 576–579, 2017.

COELHO, I. S. Efeito terapêutico do galato de etila na nocicepção neuropática e induzida por algógenos em camundongos. 91 f. Dissertação (Mestrado) em Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina, 2014.

CORBETT, S. *et al.* Evaluation of the Anti-inflammatory Effects of Ellagic Acid. **Journal of PeriAnesthesia Nursing**, v. 25, n. 4, p. 214-220, 2010.

COSTA, S. K.; DENDAI-SOUZA, A.; BUSCARIOLO, I. A. **Analgésicos-Antipiréticos e Anti-Inflamatórios**. In: _____ DELUCIA (Org.). *Farmacologia Integrada: uso racional de medicamentos*. São Paulo, 2014. 2 v. p. 486-502.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. **Biochimica Biophys Acta**, v. 1830, n. 6, p. 3670-3695, 2013.

CRUZ, R. B. Caracterização Estrutural e Atividade Biológica de Constituintes Isolados de *Samanea tubulosa*. In: XXVII Jornada Giulio Massarani de Iniciação Científica, Artística e Cultural, UFRJ, 2006.

DAJAS, F. Life or death: Neuroprotective and anticancer effects of quercetin. **Journal Ethnopharmacology**, v. 143, n. 2, p. 383-396, 2012.

DAVID, A. V. A.; ARULMOLI, R.; PARASURAMAN, S. Overviews of Biological Importance of Quercetin: A Bioactive Flavonoid. **Pharmacognosy Reviews**, v. 10, n. 20, p. 84-89, 2016.

DAVID, B.; WOLFENDER, J. L.; DIAS, D.A.; The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. **Phytochemistry Reviews**, v. 14, n. 2, p. 299-315, 2015.

DELUCIA, R. *et al.* Opioides: Ciclo de Dependência. *In*: DELUCIA, R. (Org.). **Farmacologia Integrada: uso racional de medicamentos**. 2014. São Paulo, 2014. v. 1, p. 399-417.

DHOOGHE, L. *et al.* The quantification of ellagic acid in the crude extract of *Phyllanthus amarus* Schum. & Thonn. (Euphorbiaceae). **Phytochemical Analysis**, v. 22, p. 361-366, 2011.

DI ROSA, M.; GIROUD, J. P.; WILLOUGHBY, D. A. Studies on the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **Journal of Pathology**, v. 104, p.15-29, 1971.

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

DURR, P. A. The biology, ecology and agroforestry potential of the raintree, *Samanea saman* (Jacq.) Merr. **Agroforestry Systems**, v. 51, p. 223-237, 2001.

EDLMANN, E. *et al.* Pathophysiology of chronic subdural haematoma: inflammation, angiogenesis and implications for pharmacotherapy. **Journal of Neuroinflammation**, v. 14, p. 108, 2017.

ELIAS, T. *Mimosoideae*. *In*: Polhill, R.M. & Raven, P.H. (editors). **Advances in Legume Systematics**, Royal Botanic Gardens, Kew, part 1 pp. 143-151. 1981.

EL-MOUSALLAMY, A. M. D. Leaf flavonoids of *Albizia lebbek*. **Phytochemistry**, v. 48, n. 4, p. 759-761, 1998.

FATHONI, A.; SAEPUDIN, E.; CAHYANA, A. H.; RAHAYU, D. U. C.; AND HAIB J. Identification of nonvolatile compounds in clove (*Syzygium aromaticum*) from Manado. **AIP Conference Proceedings**, v. 1862, 2017.

FAUJDAR, S. *et al.* Comparative analysis of analgesic and antiinflammatory activity of bark and leaves of *Acacia ferruginea* DC. **Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 5, p. 70-78, 2016.

FAVARIN, D. C. *et al.* Anti-inflammatory effects of ellagic acid on acute lung injury induced by acid in mice. **Mediators of Inflammation**, 2013.

FENG, Y. *et al.* Current Research on Opioid Receptor Function. **Curr Drug Targets**, v. 13, n. 2, p. 230-246, 2012.

FERNANDES, E. S. *et al.* Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-*trans*-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. **European Journal of Pharmacology**, v. 569, n. 3, p. 228–236, 2007.

FERNÁNDEZ, A. *et al.* New insights into the mechanism of action of the anti-inflammatory triterpene lupeol. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 53, p. 1533–1539, 2001.

FIRDOUS, A. P.; KUTTAN, G.; KUTTAN R. Anti-inflammatory potential of carotenoid *mesozeaxanthin* and its mode of action. *Pharmaceutical Biology*, v. 53, n. 7, p. 961-967, 2015.

GEES, M. *et al.* Mechanisms of transient receptor potential vanilloid 1 activation and sensitization by allyl isothiocyanate. **Molecular Pharmacology**, v. 84, v. 3, p. 325-34, 2013.

GHALY, N. S.; MELEK, F. R.; ABDELWAHED, N. A. M. Flavonoids from *Albizia chinensis* of Egypt. **Revista latino-americana de química**, v. 38, n. 3, 2010.

GONÇALVES, G. M. *et al.* Antinociceptive and anti-oedematogenic properties of the hydroethanolic extract of *Sidastrum micranthum* leaves in mice. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, p. 836–843, 2013.

GHORBANZADEH, B. *et al.* Involvement of L-arginine/NO/cGMP/K(ATP) channel pathway in the peripheral antinociceptive actions of ellagic acid in the rat formalin test. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 126, p. 116-21, 2014.

GROSSER, T.; THEKEN, K. N.; FITZGERALD, G. A. Cyclooxygenase Inhibition: Pain, Inflammation, and the Cardiovascular System. **Clinical Pharmacology & Therapeutics**, v. 102, n. 4, 2017.

HAJDU, Z.; HOHMANN, J. An ethnopharmacological survey of the traditional medicine utilized in the community of Porvenir, Bajo Paragua Indian Reservation, Bolivia. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, n. 3, p. 838-857, 2012.

HAWKEY, C. J.; LANGMAN, M. J. S. Non-steroidal anti-inflammatory drugs: overall risks and management. Complementary roles for COX-2 inhibitors and proton pump inhibitors. **Gut**, v. 52, n. 4, p. 600-608, 2003.

HELMS, J. E.; BARON, C. P. Physiology and Treatment of Pain. **Critical Care Nurse**, v. 28, p. 38-49, 2008.

HISHE, H. Z. *et al.* Anti-nociceptive Effect of Methanol Extract of Leaves of *Senna singueana* in Mice. **Journal Ethnopharmacology**, v. 217, p. 49-53, 2018.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and noninflammatory pain. **Pain**, v.30, p.103-104, 1987.

HWANG, S.W. *et al.* Direct activation of capsaicin receptors by products of lipoxygenases: Endogenous capsaicin-like substance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 11, p. 6155–6160, 2000.

IASP. **IASP Terminology - IASP**. Disponível em: <<https://www.iasp->

pain.org/Education/Content.aspx?ItemNumber=1698#Neuropathicpain>. Acesso em: 2 fev. 2018.

ISLAM, Md. T. *et al.* Diterpenes: Advances in Neurobiological Drug Research. **Phytotherapy Research**, v. 30, p. 915–928, 2016.

JEON, H. *et al.* Anti-Inflammatory and Antipruritic Effects of Luteolin from Perilla (*P. frutescens* L.) Leaves. **Molecules**, v. 19, p. 6941-6951, 2014.

JUNG, M. J. *et al.* Isolation of flavonoids and a cerebroside from the stem bark of *Albizia julibrissin*. **Archives of Pharmacal Research**, v. 27, n. 6, p. 593-599, 2004.

KALE, M. *et al.* Antiinflammatory activity of *Dalbergia lanceolaria* bark ethanol extract in mice and rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 112, p. 300-304, 2007.

KALLUBAI, M. *et al.* Comparative binding mechanism of lupeol compounds with plasma proteins and its pharmacological importance. **Molecular BioSystems**, v. 11, n. 4, p. 1172-1183, 2015.

KARAR, M. G. E. *et al.* Identification, characterization, isolation and activity against *Escherichia coli* of quince (*Cydonia oblonga*) fruit polyphenols. **Food Research International**, v. 65, p. 121-129, 2013.

KENT, M. L. *et al.* The ACTION–APS–AAPM Pain Taxonomy (AAAPT) Multidimensional Approach to Classifying Acute Pain Conditions. **Pain Medicine**, v. 18, n. 5, p. 947–958, 2017.

KHALID, S. TUBBS, R. Neuroanatomy and Neuropsychology of Pain. **Cureus**, v. 9, n. 10, 2017.

KHAN, M. M. R. *et al.* Lupeol supplementation improves the developmental competence of bovine embryos in vitro. **Theriogenology**, v. 107, p. 203-210, 2018.

KHEDIR, S. B. *et al.* In Vivo Evaluation of the Anti-Inflammatory Effect of *Pistacia lentiscus* Fruit Oil and Its Effects on Oxidative Stress. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, 2016.

KIND, T.; FIEHN, O. Advances in structure elucidation of small molecules using mass spectrometry. **Bioanalytical Review**, v. 2, n. 1-4, p. 23-60, 2010.

KINGHORN, A. D. *et al.* The classical drug Discovery approach to defining bioactive constituents of botanicals. **Fitoterapia**, v. 82, ed.1, p. 71-79. 2011.

KIRITHIKA, T.; THOUDAM, B.; USHA, K. Preliminary phytochemical screening and antioxidant property of various extracts of *Albizia saman* leaves. **Journal of Pharm and Bio-science**, v. 2, p. 315-323, 2013.

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

KOEBERLE, A., WERZ, O. Multi-target approach for natural products in inflammation. **Drug Discov**, v.19, n. 12, p. 1871–1882, 2014.

KOEBERLE, A.; WERZ, O. Natural products as inhibitors of prostaglandin E2 and pro-inflammatory 5- lipoxygenase-derived lipid mediator biosynthesis. **Biotechnology Advances**, 2018.

KOOLEN, H. H. F. *et al.* Antioxidant, antimicrobial activities and characterization of phenolic compounds from buriti (*Mauritia flexuosa*) by UPLC-ESI-MS/MS. **Food Research International**, v. 51, p. 467–473, 2013.

KOTAS, M. E.; MEDZHITOV, R. Homeostasis, Inflammation, and Disease Susceptibility. **Cell**, v. 160, 2015.

KULKARNI, A.; SUZUKI, S.; ETOH, H. Antioxidant compounds from *Eucalyptus grandis* biomass by subcritical liquid water extraction. **Journal of Wood Science**, v. 54, n. 2, p. 153–157, 2008.

LAKSHMI, M.; NAIR, B. R. GC-MS analysis of the chloroform extract of bark of *Terminalia travancorensis* wight. and arn. (Combretaceae). **International Journal of pharmaceutical sciences and research**, v. 8, n. 2, p. 794-98, 2017.

LAU, C. S. *et al.* Identification and quantification of glycoside flavonoids in the energy crop *Albizia julibrissin*. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 429-435, 2007.

LEKIC, N. *et al.* The involvement of heme oxygenase 1 but not nitric oxide synthase 2 in a hepatoprotective action of quercetin in lipopolysaccharide-induced hepatotoxicity of Dgalactosamine sensitized rats. **Fitoterapia**, v. 87, p. 20-26, 2013.

LEVINE, J.; TAIWO, Y. Inflammatory pain. *In*: WALL, P.D.; MELZACK, R. Textbook of pain. New York: **Chrchill Livingston**. p. 45–56, 1994.

LEWIS, G. P.; RICO ARCE, M. L. Tribe Ingeae. *In*: LEWIS, G.P.; SCHRIRE, B.; MACKINDER, B.; LOCK, M. (eds.). **Legumes of the world**. The Royal Botanic Gardens, Kew. p. 193-213, 2005.

LIN, C. F. *et al.* Anti-inflammatory activity and percutaneous absorption of quercetin and its polymethoxylated compound and glycosides: the relationships to chemical structures. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 47, p. 857- 864, 2012.

LIU, S. *et al.* Heme oxygenase-1 mediates the protective role of quercetin against ethanol-induced rat hepatocytes oxidative damage. **Toxicology in Vitro**, v. 26, p. 74-80, 2012.

LÓPEZ-LÁZARO, M. Distribution and Biological Activities of the Flavonoid Luteolin. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 9, p. 31-59, 2009.

LPWG (Legume Phylogeny Working Group). A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. **Taxon**, v. 66, p. 44-77, 2017.

LUZ, S. M. *et al.* Atividade alelopática de substâncias químicas isoladas da acacia mangium e suas variações em função do pH. **Planta Daninha**, v. 28, n. 3, p. 479-487, 2010.

MAALIK, A. *et al.* Pharmacological Applications of Quercetin and its Derivatives: A Short Review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research September**, v. 13, n. 9, p. 1561-1566, 2014.

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

MARIN, M. *et al.* Intestinal anti-inflammatory activity of ellagic acid in the acute and chronic dextrane sulfate sodium models of mice colitis. **Journal of ethnopharmacology**, v. 150, p. 925-934, 2013.

MENA, P. *et al.* Rapid and comprehensive evaluation of (Poly) phenolic compounds in pomegranate (*Punica granatum* L.) juice by UHPLC-MSn. **Molecules**, v. 17, p.14821– 40, 2012.

MESSLINGER, K. What is a nociceptor? **Anaesthesist**, v. 46, n. 2, p. 142-53, 1997.

MOTTA, E.V.S. *et al.* Atividades antioxidante, antinociceptiva e anti-inflamatória das folhas de *Mucuna pruriens* (L.) DC. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 2, p. 264-272, 2013.

MULLEN, W. *et al.* Analysis of ellagitannins and conjugates of ellagic acid and quercetin in raspberry fruits by LC–MSn. **Phytochemistry**, v. 64, p. 617–624, 2003.

MUZAMMIL, A. S.; FARHANA, T.; SALMAN, A. Analgesic activity of leaves extracts of *Samanea saman* (Jacq.) Merr., and *Prosopis cineraria* Druce. **International research journal of pharmacy**, v. 4, n. 1, 2013.

NAH, J. J. *et al.* Effect of ginsenosides, active components of ginseng, on capsaicin-induced pain-related behavior. **Neuropharmacology**, v. 39, n. 11, p. 2180-2184, 2000.

NAKAMURA, E. S. *et al.* Cancer chemopreventive effects of a Brazilian folk medicine, Juca, on in vivo two-stage skin carcinogenesis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, n.1, p. 135-137, 2002.

NDEBIA, E. *et al.* Iputo. Anti-inflammatory properties of *Albuca setosa* and its possible mechanism of action. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n. 18, p. 4658-4664, 2011.

NUENGCHAMNONG, N. *et al.* Rapid Screening of Antioxidant Compounds in Homemade Fruit Fermented Juice Using an On Line LC-ESI-MS/MS and DPPH Assay. **Chiang Mai Journal of Science**, v. 38, p. 430–438, 2011.

OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). Guidelines for the Testing of Chemicals. OECD 423. Acute Oral Toxicity—Modified Up and Down Procedure. Organisation for Economic Cooperation and Development, Paris. 2001.

OGBITI, V. M.; AKINDELE, A. J.; ADEYEMI, O. O. Analgesic, Anti-inflammatory, and Antipyretic Activities of Hydroethanolic Stem Bark Extract of *Albizia glaberrima*. **Journal of Herbs, Spices & Medicinal Plants**, 2017.

OLIVEIRA, M. R. D. The Effects of Ellagic Acid upon Brain Cells: A Mechanistic View and Future Directions. **Neurochemical Research**, v. 41, p. 1 – 10, 2016.

OMUR, A. D.; COYAN, K. Protective effects of the antioxidants curcumin, ellagic acid and methionine on motility, mitochondrial transmembrane potential, plasma membrane and acrosome integrity in freeze-thawed Merino ram sperm. **Veterinarni Medicina**, v. 61, p. 10 - 16, 2016.

PALAZZO, E.; ROSSI, F.; MAIONE, S. Role of TRPV1 receptors in descending modulation of pain. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 286, n. 1-2, p. S79–S83, 2008.

PANCHE, A. N.; DIWAN, A. D.; CHANDRA, S.R. Flavonoids: an overview. **Journal of Nutritional Science**, v. 5, n. 47, 2016.

PASSOS, G. F. *et al.* Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, n. 2, p. 323–333, 2007.

PIRES JÚNIOR, H. B. *et al.* Avaliação da toxicidade aguda do extrato hexânico de frutos de *Melia azedarach* (MELIACEAE) em camundongos. **Ciência Animal Brasileira.**, v. 13, n. 4, p. 512-519, 2012.

QUINTANS, J. S. S. *et al.* Host–guest inclusion complexation of cyclodextrin and hecogeninacetate to enhance anti-hyperalgesic effect in an animal model of musculoskeletal pain. **Process Biochemistry**, v. 59, p. 123–131, 2017.

RAGASA, C. Y. *et al.* Triterpenes and Sterols from *Samanea saman*. **Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences**, v. 5, n. 4, p. 1501, 2014.

RAHTES, A. *et al.* Cellular and molecular mechanisms involved in the resolution of innate leukocyte inflammation. **Journal of Leukocyte Biology**, p. 1–7, 2018.

RAMAIAH, S. K. Preclinical safety assessment: current gaps, challenges, and approaches in identifying translatable biomarkers of drug-induced liver injury. **Clinics in Laboratory Medicine**, v. 31, n. 1, p. 161-172, 2011.

ROCK, K. L.; KONO, H. The inflammatory response to cell death. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 3, p. 99–126, 2008.

ROMANI, A.; CAMPO, M.; PINELLI, P. HPLC/DAD/ESI-MS analyses and anti-radical activity of hydrolyzable tannins from different vegetal species. **Food and Chemical Toxicology**, v. 130, p. 214–221, 2012.

RUGGIERO, R. N. *et al.* Neurotransmissão glutamatérgica e a plasticidade sináptica. **Medicina**, v. 44, n. 2, p. 143-56, 2011.

- SAID, R.B. *et al.* Tentative Characterization of Polyphenolic Compounds in the Male Flowers of *Phoenix dactylifera* by Liquid Chromatography Coupled with Mass Spectrometry and DFT. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, p. 512, 2017.
- SAKATA, R. K.; GOZZANI, J. L. Fisiopatologia da dor. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 51, p. 3-11, 1994.
- SALES, P. A. B. **Avaliação toxicológica e estudo das atividades anti-inflamatória e antioxidante do extrato etanólico das vagens da *Samanea tubulosa* (Benth.)**. 74 f. Tese (Doutorado) em Ciência Animal da Universidade Federal do Piauí, 2015.
- SALVEMINI, D. *et al.* Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. **British Journal of Pharmacol**, v. 118, p. 829–838, 1996.
- SANCHEZ-FIDALGO, S. *Abarema cochliacarpos* reduces LPS-induced inflammatory response in murine peritoneal macrophages regulating ROS-MAPK signal pathway. **Journal of Ethnopharmacology**, v.149, p. 140–147, 2013.
- SANTOS, A.R.S. *et al.* Mechanisms involved in the antinociceptions caused by compound MV8612 isolated from *Mandevilla velutina* in mice. **Brain Research**, v. 961, p. 269-276, 2003.
- SANTOS, S.A.O. *et al.* Ultra-high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry applied to the identification of valuable phenolic compounds from Eucalyptus wood. **Journal of Chromatography**, v. 938, p. 65–74. 2013
- SAWYNOK, J.; REID, A.; MEISNER, J. Pain Behaviors Produced by Capsaicin: Influence of Inflammatory Mediators and Nerve Injury. **The Journal of Pain**, v. 7, n. 2, p. 134-141, 2006.
- SEERAM, N. *et al.* Comparison of antioxidant potency of commonly consumed polyphenol-rich beverages in the United States. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 1415–1422, 2008.
- SEIBERT, K. *et al.* Pharmacological and biochemical demonstration of the role of cyclooxygenase 2 in inflammation and pain. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 91, p.12013–12017, 1994.
- SHIBATA, M. *et al.* Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. **Pain**, v. 38, p. 347–352, 1989.
- SILVA, M. S. *et al.* Anti-inflammatory intestinal activity of *Abarema cochliacarpos* (Gomes) Barneby & Grimes in TNBS colitis model. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, p. 467–475, 2010.
- SIMIRGIOTIS, M. J. *et al.* Direct characterisation of phenolic antioxidants in infusions from four mapuche medicinal plants by liquid chromatography with diode array detection (HPLC-DAD) and electrospray ionisation tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS). **Food Chemistry**, v. 131, p. 318-327, 2012.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. 1. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; Florianópolis: Editora UFSC, p. 502, 2017.

SOBEH, M. *et al.* Identification of phenolic secondary metabolites from *Schotia brachypetala* Sond. (Fabaceae) and demonstration of their antioxidant activities in *Caenorhabditis elegans*. **Peer Journal**, 2016.

SOUTO-MAIOR, F. N. *et al.* Anxiolytic-like effects of inhaled linalool oxide in experimental mouse anxiety models. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 100, n. 2, p. 259-63, 2011.

STEEDS, C. E. The anatomy and physiology of pain. **Basic Science**, v. 27, n. 12, p. 507-511, 2009.

SUN, J. *et al.* Screening Non-colored Phenolics in Red Wines using Liquid Chromatography/Ultraviolet and Mass Spectrometry/Mass Spectrometry Libraries. **Molecules**, v. 12, p. 679 – 693. 2007.

THIPPESWAMY, S. *et al.* Antimicrobial evaluation and phytochemical analysis of a known medicinal plant *Samanea saman* (Jacq.) Merr. against some human and plant pathogenic bacteria and fungi. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, v. 2, n. 2, 2011.

TIBERTI, L. A. *et al.* On-Line LC/UV/MS Analysis of Flavonols in the Three Apple Varieties Most Widely Cultivated in Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v.18, p. 100-105, 2007.

TIJANI, A. Y.; UGURU, M. O.; SALAWU, O. A. Anti-pyretic, anti-inflammatory and anti-diarrhoeal properties of *Faidherbia albida* in rats. **African Journal of Biotechnology**, v. 7, n. 6, p. 696-700, 2008.

TRANQUILLI, W. J. **Fisiologia da dor aguda**. In: GREENE, S.A. Segredos em anestesia veterinária e manejo da dor. Porto Alegre: Artmed, p. 399-402. 2004.

TUNG, Y.T. *et al.* Protective effect of Acacia confusa bark extract and its active compound gallic acid against carbon tetrachloride-induced chronic liver injury in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 6, p. 1385-1392, 2009.

VINEGAR, R.; SCHREIBER, W.; HUGO, R. Biphasic development of carrageenin edema in rats. **Journal Pharmacology Experimental**, v. 166, p. 96–103, 1969.

WATANABLE, C. *et al.* Inhibitory mechanism of glyco protein fraction derived from *Miscanthus sinensis* for them mediate phase response of na IgE-mediated cutaneous reaction. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 22, p. 26–30, 1999.

WINTER, C. A.; RISLEY, E. A.; NUSS, G. W. "Carrageenin-induced oedema in hind paw of the rats as an assay for anti-inflammatory drugs". **Proceeding of the Society Experimental Biological**, v. 111, p. 544-7, 1962.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). WHO (2017). Traditional, complementary and integrative medicine: Definitions. World Health Organization. Geneva: WHO, 2017. 78

p. Disponível em: <http://www.who.int/traditional-complementary-integrative-medicine/about/en/>. Acesso em: 22/02/2018

WYREPKOWSKI, C. C. *et al.* Characterization and Quantification of the Compounds of the Ethanolic Extract from *Caesalpinia ferrea* Stem Bark and Evaluation of Their Mutagenic Activity. **Molecules**, v. 19, p. 16039-16057, 2014.

YING, H.Z. *et al.* Dietary quercetin ameliorates nonalcoholic steatohepatitis induced by a high-fat diet in gerbils. **Food and Chemical Toxicology**, v. 52, p. 53-60, 2013.

YOUSEF, A. I.; EL-MASRY, O. S.; MOHSEN, A. M. A. Impact of Cellular Genetic Make-up on Colorectal Cancer Cell Lines Response to Ellagic Acid: Implications of Small Interfering RNA. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 17, p. 743-748, 2016.

ZAPATER, M. A.; HOC, O. S.; LOZANO, E. C. El género *Samanea* Leguminosae, Ingeae, novedad para la flora argentina. **Darwiniana**, v. 49, p. 7-15, 2011.

Anexo A – Carta de aprovação da Comissão de Ética e Experimentação no uso de animais em Pesquisa.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
 Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550
 Telefone (86) 3215-5734 _e-mail: ceeapi@ufpi.edu.br



CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “**Estudo das ações farmacológicas das frações de extrato das vagens de *Samanea tubulosa* Benth.**”, protocolo nº **053/15**, sob a responsabilidade de **AMILTON PAULO RAPOSO COSTA**- que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de Pesquisa Científica- encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **Aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, em Reunião na presente data 18/09/2015.

Vigência do Projeto	Outubro/ 2015 à Março/ 2016
Espécie/ linhagem	1. Camundongo heterogênico/ <i>Swiss</i> ; 2. Rato heterogênico/ <i>Wistar</i> .
Nº de Animais	280
Peso/ Idade	1. 25-30 g; 2. 180-200 g.
Sexo	1. 126 machos; 2. 154 machos.
Origem	Biotério Central da UFPI.

Teresina, 18 de Setembro de 2015.

Prof.ª Ivete L. de Mendonça
 Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI
 Coordenadora

Anexo B – Carta de aprovação da Comissão de Ética e Experimentação no uso de animais em Pesquisa.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL
 Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bairro Ininga, Teresina, Piauí, Brasil; CEP: 64049-550
 Telefone (86) 3215-5734 _e-mail: ceeapi@ufpi.edu.br

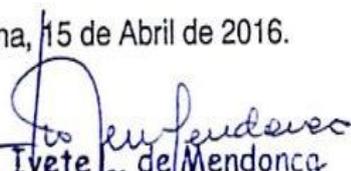


CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado “Estudo das ações farmacológicas das frações de extrato das vagens de *Samanea tubulosa* Benth.”, protocolo nº 146/16, sob a responsabilidade do Prof. Dr. AMILTON PAULO RAPOSO COSTA –Morfofisiologia Veterinária/CCA/UFPI que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de Pesquisa Científica- encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **Aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFPI) da Universidade Federal do Piauí, em Reunião na presente data 15/04/2016.

Vigência do Projeto	Junho/ 2016 à Dezembro/ 2017
Espécie/Linhagem	Camundongo heterogênico/swiss
Nº de Animais	364
Peso/ Idade	25-30 g/ --
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central da UFPI.

Teresina, 15 de Abril de 2016.


 Prof.^a Ivete L. de Mendonça
 Comitê de Ética em Experimentação Animal-UFPI
 Coordenadora

Anexo C – Declaração do depósito de pedido de patente submetido ao Instituto Nacional de Propriedade Industrial por meio do Núcleo de Inovação e Transferência de Tecnologia na Universidade Federal do Piauí.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
NÚCLEO DE INOVAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE TECNOLOGIA
Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Setor de Convivência L09 e L10
Bairro Ininga CEP: 64049-550 - Teresina-PI Fone/Fax (86)3237-1638

DECLARAÇÃO

Requerente: TAMNATA FERREIRA ALIXANDRE. CPF: 026.588.783-62.

Título do Projeto: "PROCESSO DE OBTENÇÃO DE EXTRATO, FRAÇÕES E COMPOSTOS ISOLADO PARA ELABORAÇÃO DE COMPOSIÇÃO FARMACÊUTICA DA ESPÉCIE *Samanea tubulosa Benth.*, FABACEAE PARA TRATAMENTO DE DOR E INFLAMAÇÃO"

Data de Entrada no NINTEC: 22/05/2017.

O Núcleo de Inovação e Transferência de Tecnologia – NINTEC, órgão da Universidade Federal do Piauí, através deste instrumento, declara para as finalidades de direito, a pedido do interessado, que se encontra em nosso poder solicitação para depósito de pedido de PATENTE de autoria do(a) Requerente supra nominado(a) e seu respectivo título, também cima descrito, o(a) qual está em fase de análise dos requisitos necessários à sua formalização junto ao INPI – Instituto Nacional de Propriedade Industrial.

Informamos ainda que para a consecução da postulação pretendida, o objeto deste pleito deve necessariamente atender às seguintes fases:

- a) pré-análise à patenteabilidade da criação;
- b) busca de anterioridade para verificação do estado da técnica;
- c) envio do resultado da busca de anterioridade, juntamente com cópias de pedido já requerido no Brasil e em outros países, bem como orientações para a redação do pedido de patente (AN 127/1997 – INPI);
- d) solicitação de pagamento das taxas de depósito e abertura de processo no Protocolo Geral para depósito de pedido;
- e) apreciação e assinatura da Reitoria da UFPI.
- f) encaminhamento da documentação ao INPI para depósito.

Salientamos ainda que, para cada fase acima descrita, é necessário tempo hábil para as respostas, a fim de cumprir com fidelidade e segurança a pretensão perquerida.

Por ser verdade, firmo a presente.

Teresina (PI), 06 de junho de 2017.

Prof.^a Dr.^a Maria Rita de Moraes Chaves Santos
Coordenadora do Núcleo de Inovação e Transferência de Tecnologia da UFPI

Anexo D – Comprovante de Cadastro no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado.



**Ministério do Meio Ambiente
CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

Comprovante de Cadastro de Acesso

Cadastro nº A2EBB03

A atividade de acesso ao Conhecimento Tradicional Associado, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **A2EBB03**
 Usuário: **Universidade Federal do Piauí**
 CPF/CNPJ: **06.517.387/0001-34**
 Objeto do Acesso: **Conhecimento Tradicional Associado**
 Finalidade do Acesso: **Pesquisa e Desenvolvimento Tecnológico**

Espécie

não

Fonte do CTA

CTA de origem não identificável

Título da Atividade: **Estudo das ações farmacológicas das frações do extrato das vagens de Samanea tubulosa Benth.**

Equipe

Amilton Paulo Raposo Costa	Universidade Federal do Piauí
Tamnata Ferreira Aليandre	Universidade Federal do Piauí
Paulo Alex Bezerra Sales	Universidade Federal do Piauí
Mariana Helena Chaves	Universidade Federal do Piauí
Marluce Pereira Damasceno Lima	Universidade Federal do Piauí
Lucas Antonio Duarte Nicolau	Universidade Federal do Piauí

**ANEXO E – Submissão de artigo para revista “BIOMEDICINE & PHARMACOTHERAPY”
QUALIS B1-BIOTECNOLOGIA**

**Chemical characterization and anti-inflammatory activity of *Samanea tubulosa* (Benth.)
in vivo experimental models**

Successfully received: submission Chemical characterization and anti-inflammatory activity of Sa...

BP Biomedicine & Pharmacotherapy <Evisesupport@elsevier.com> ↩ ↶ → ∨
 ier.com >
 Qua 26/09/2018, 10:46
 Você ✓

This message was sent automatically. Please do not reply.

Ref: BIOPHA_2018_6840
 Title: Chemical characterization and anti-inflammatory activity of *Samanea tubulosa* (Benth.) in vivo experimental models
 Journal: Biomedicine & Pharmacotherapy

Dear Dr. Ferreira Alixandre,

Thank you for submitting your manuscript for consideration for publication in Biomedicine & Pharmacotherapy . Your submission was received in good order.

To track the status of your manuscript, please log into EVISE® at: http://www.evise.com/evise/faces/pages/navigation/NavController.jspx?_afcr=BIOPHA and locate your submission under the header 'My Submissions with Journal' on your 'My Author Tasks' view.

Thank you for submitting your work to this journal.

Kind regards,

Biomedicine & Pharmacotherapy

Have questions or need assistance?
 For further assistance, please visit our [Customer Support](#) site. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions, and learn more about EVISE® via interactive tutorials. You can also talk 24/5 to our customer support team by phone and 24/7 by live chat and email.

Copyright © 2018 Elsevier B.V. | [Privacy Policy](#)

Elsevier B.V., Radarweg 29, 1043 NX Amsterdam, The Netherlands, Reg. No. 33156677.

**ANEXO F – Submissão de artigo para revista “PHYTOMEDICINE”
QUALIS A2-BIOTECNOLOGIA**

Submission Confirmation

IM	<p>Ingrid Maier" < <eesserver@eesmail.elsevier.com > Seg 24/09/2018, 20:06 Você; tamnata.alixandre@ifpi.edu.br ✉</p> <p>*** Automated email sent by the system ***</p> <p>Dear Tamnata,</p> <p>We have received your article "Antinociceptive effect of Samanea tubulosa Benth. (Fabaceae) in models of acute pain in mice" for consideration for publication in Phytomedicine asOriginal Article</p> <p>Your manuscript will be given a reference number once an editor has been assigned.</p> <p>To track the status of your paper, please do the following:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Go to this URL: https://ees.elsevier.com/phymed/ 2. Enter these login details: Your username is: tamnata.alixandre@hotmail.com If you need to retrieve password details, please go to: http://ees.elsevier.com/PHYMED/automail_query.asp 3. Click [Author Login] This takes you to the Author Main Menu. 4. Click [Submissions Being Processed] <p>Thank you for submitting your work to this journal.</p> <p>Kind regards,</p> <p>Ingrid Maier Managing Editor Phytomedicine</p> <p>*****</p> <p>Please note that the editorial process varies considerably from journal to journal. To view a sample editorial process, please click here: http://ees.elsevier.com/eeshelp/sample_editorial_process.pdf</p> <p>For further assistance, please visit our customer support site at http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923. Here you can search for solutions on a range of topics, find answers to frequently asked questions and learn more about EES via interactive tutorials. You will also find our 24/7 support contact details should you need any further assistance from one of our customer support representatives.</p>	
----	---	--