



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO
CAMPUS MINISTRO REIS VELLOSO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

STEFANY GUIMARÃES SOUSA

**EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTINOCICEPTIVO DA FRAÇÃO
POLISSACARÍDICA SULFATADA EXTRAÍDA DE *Morinda citrifolia* (NONI)**

**PARNAÍBA
2017**

STEFANY GUIMARÃES SOUSA

**EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTINOCICEPTIVO DA FRAÇÃO
POLISSACARÍDICA SULFATADA EXTRAÍDA DE *Morinda citrifolia* (NONI)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Piauí - UFPI, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Área de concentração: Farmacologia Molecular aplicada à Biotecnologia.

Orientador: Dr. André Luiz dos Reis Barbosa.

PARNAÍBA – PI

2017

FICHA CATALOGRÁFICA
Universidade Federal do Piauí
Biblioteca Setorial Prof. Cândido Athayde – Campus Parnaíba
Serviço de Processamento Técnico

S725e Sousa, Stefany Guimarães.
Efeito anti-inflamatório e antinociceptivo da fração polissacarídica sulfatada extraída de *Morinda citrifolia* (NONI) / Stefany Guimarães Sousa. – 2017.
95f. : il. color.
Impresso por computador (printout).
Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Piauí, 2017.
Orientação: Prof. Dr. André Luiz dos Reis Barbosa.
Área de concentração: Farmacologia Molecular aplicada à Biotecnologia.

1. Biotecnologia. 2. Inflamação. 3. Plantas Medicinais. 4. Dor. 5. Antioxidante. I.Titulo.

CDD: 660.6

STEFANY GUIMARÃES SOUSA

EFEITO ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTINOCICEPTIVO DA FRAÇÃO
POLISSACARÍDICA SULFATADA EXTRAÍDA DE *Morinda citrifolia* (NONI)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Piauí - UFPI, como requisito para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Aprovada em: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA:

Dr. André Luiz dos Reis Barbosa (Orientador)
Universidade Federal do Piauí - UFPI

Dr. Baldomero Antonio Kato da Silva
Universidade Federal do Piauí – UFPI

Dr. Marcelo de Carvalho Filgueiras
Universidade Federal do Piauí - UFPI

PARNAÍBA – PI

2017

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu namorado Paulo Júnior pelo seu amor e paciência e a minha amiga e companheira de luta Diva Magalhães por sua amizade.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus por me fazer temente e crédula na sua grandiosidade e bondade, por me dar forças e a capacidade de perseverança nos meus objetivos.

Aos meus pais Bento e Aldenira por sempre me apoiarem e sonharem junto comigo a conquista dessa vitória. A vocês, meus maiores exemplos todo o meu Amor e minha Gratidão.

Ao meu namorado Paulo Júnior por todo incentivo e Amor, agradeço por ser minha companhia constante e por me fazer tão bem.

Aos meus amados irmãos Bentinho, Stellinha e Jaqueline por torcerem sempre por mim e por todo companheirismo mesmo que à distância.

À grande amiga Diva (Diva mesmo!) pela amizade e toda contribuição neste trabalho. Bem mais que o título de mestre, sua amizade foi e é minha maior conquista nesses 2 anos de mestrado.

Ao parceiro Jalles por toda contribuição e companheirismo. Sabemos do quanto foi difícil, mas isso dá um gosto melhor a essa nossa conquista.

À Nayonara por ser a pessoa calma que diminuía nosso ritmo louco.

Ao Tarcízio pelo apoio constante e pelo dom de passar o que sabe e assim permitir que conseguíssemos executar este trabalho.

Aos alunos de iniciação científica que de alguma forma contribuíram nos experimentos. Vocês foram essenciais!

À Prefeitura Municipal de Parnaíba na sua gestão 2012-2016 na pessoa do ex-prefeito Florentino Neto e da Dra. Maria do Amparo Coêlho dos Santos por proporcionarem apoio financeiro e logístico para que seus funcionários se aperfeiçoem cada vez mais e continuem os estudos.

À farmacêutica Elaine por ser sempre amiga e grande incentivadora desde o momento em que eu estudava para a seleção.

À amiga Bruna Brito por ser inigualável e alegre e por ter topado encarar comigo este desafio. Agradeço também por dividir comigo a sua família.

À amiga Myrlla Alves por ser sempre amiga e até pela saudade que me faz sentir agora. Gostaria muito que você estivesse presente, mas quem sou eu para não te entender a sua busca por seus sonhos.

Aos companheiros de trabalho do Hospital Estadual Dirceu Arcoverde em especial ao Arnaldo, Alexandra, Thiago, Israel e Charles por sempre me ajudarem e compreenderem algumas ausências necessárias.

À amiga, técnica do LAFFEX e colega de turma Bia por sempre contribuir com todos que precisam sem distinção, antes mesmo de assumir a função se mostrava grande pessoa ajudando a todos.

Aos colegas do LAFFEX que contribuíram para a realização deste trabalho: Meu muito Obrigada!

Ao companheiro José Júnior, colega de profissão e amigo leal pelo carinho e felicidade transmitida.

Aos companheiros de turma do mestrado pelos bons momentos vividos e pelo aprendizado compartilhado.

Aos parentes e amigos de Açailândia pelo apoio e incentivo nas minhas realizações.

Aos amigos de Parnaíba pela acolhida nesta terra distante da minha, pela compreensão com minhas ocupações constantes e pela sincera torcida.

Aos Eternos Calouros, em especial às grandes amigas/irmãs que a Farmácia me deu Juliana, Jéssica, Annalu, Kamila, Fernanda e Tássia pela grande amizade e por todo Amor.

Ao Prof. Marcelo e Prof. Baldomero pela solicitude com nosso grupo e pela disponibilidade.

Ao meu orientador Prof. André pela oportunidade, por todos os ensinamentos. Eternos agradecimentos de todo o meu coração por me aceitar no seu grupo e me dar liberdade para pensar, aprender e agir.

A Universidade Federal do Piauí pela oportunidade de realização de mais um objetivo e a todo corpo docente da UFPI pelos conhecimentos transmitidos.

Gratidão sempre!

Se o teu sonho foi sonhado por Deus e não apenas por você, não se preocupe. Os sonhos de Deus jamais podem ser frustrados. (Jó 42:2)

RESUMO

Introdução: A inflamação é um fenômeno multimediado envolvido em muitas doenças complexas. A busca por anti-inflamatórios é constante devido aos diversos efeitos colaterais dos medicamentos usados atualmente. Os polissacarídeos de fontes naturais estão figurando como potenciais fontes de fármacos anti-inflamatórios, e entre esses, está a fração polissacarídica dos frutos do arbusto *Morindacitrifolia* (Noni). **Objetivo:** O presente trabalho tem como objetivo avaliar as atividades anti-inflamatória e antinociceptiva da fração polissacarídica sulfatada extraída da planta *Morindacitrifolia*, utilizando modelos farmacológicos clássicos de inflamação aguda e nocicepção em camundongos. **Métodos:** Os frutos do Noni foram coletados e o teor polissacarídico destes foi extraído. Para os estudos farmacológicos foram usados camundongos swiss (20-25 g), sendo divididos em grupo de 6 animais. Os animais inicialmente foram tratados com o polissacarídeo sulfatado de *M. citrifolia* nas doses de 0,1; 1,0 ou 10mg/kg e foram submetidos a edema de carragenina para assim ser escolhida a melhor dose com efeito anti-inflamatório que seria usada nos demais testes. Segmentos da região sub-plantar dos animais foram usados na avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase e microscopia histológica da lesão inflamatória. Os animais foram submetidos também a edema de pata por diferentes agentes inflamatórios, teste de formalina e de contorções abdominais. Foi induzida também peritonite nos camundongos e o líquido peritoneal foi avaliado quanto à migração de leucócitos e níveis de Glutathione. **Resultados:** O tratamento dos animais com o polissacarídeo sulfatado de *M. citrifolia* na dose de 10 mg/kg apresentou um padrão satisfatório e estatisticamente significativo de redução do edema de pata induzido por carragenina, bem como dos agentes inflamatórios dextrana, histamina, serotonina e bradicinina. Além disso, o polissacarídeo em questão apresentou capacidade de reduzir de maneira relevante os níveis de MPO, as lesões inflamatórias a nível microscópico no tecido da pata, migração de leucócitos e níveis de GSH no fluido peritoneal de animais que sofreram peritonite. O PLS do noni também mostrou efeito antinociceptivo através dos testes de contorções abdominais e na segunda fase do teste da formalina. **Conclusões:** Os resultados alcançados permitem inferir que o polissacarídeo de *Morindacitrifolia* possui efeito anti-inflamatório e antinociceptivo em camundongos quando usado na dose de 10mg/kg.

Palavra-chave: Inflamação. Plantas medicinais. Dor. Antioxidante.

ABSTRACT

Anti-inflammatory and antinociceptive effect of the sulfated polysaccharide fraction extracted from *Morinda citrifolia* (Noni)

Introduction: Inflammation is a multi-mediated phenomenon involved in many complex diseases. The search for anti-inflammatories is constant due to the various side effects of the drugs currently used. Polysaccharides from natural sources are listed as potential sources of anti-inflammatory drugs. Among them, is the polysaccharide fraction of the *Morinda citrifolia* (Noni). **Objective:** the present study aims evaluate the anti- inflammatory and antinociceptive activity of the sulfated polysaccharide fraction extracted from the *Morinda citrifolia* plant, using classical pharmacological models of acute inflammation and nociception in mice. **Methods:** Noni fruits were collected and the polysaccharide content was extracted. For the pharmacological studies, swissmice (25-30g) were used, divided into groups of 6 animals. Initially, the animals were treated with the sulfated polysaccharide of *M. citrifolia* at the doses of 0.1; 1.0 or 10 mg/kg. Then, carrageenan-induced edema was performed in order to choose dose that displays the best anti-inflammatory effect to be used in the following tests. Segments of the sub-plantar region of the animals were used to evaluate the activity of the myeloperoxidase enzyme and histology of the microscopic inflammatory lesion. The animals were also undergo paw edema induced by different inflammatory agents, formalin test and abdominal writhing. Peritonitis was induced in animals and the peritoneal fluid was evaluated for leukocyte migration, and levels of glutathione. **Results:** Treatment with 10mg/kg of sulfated polysaccharide of *M. citrifolia* showed a satisfactory pattern and statistically significant reduction of carrageenan-induced paw edema as well as edema induced by the inflammatory agents dextran, histamine, bradykinin and serotonin. In addition, the polysaccharide in question showed the ability to significantly reduce MPO levels, inflammatory lesions at microscopic level in paw tissue and also leukocyte migration and GSH levels in the peritoneal fluid of animals that had undergone peritonitis. The PLS noni also showed antinociceptive effect through the abdominal writhing tests and in the second phase of the formalin test. **Conclusions:** The results obtained allow us to infer that the polysaccharide of *Morindacitrifolia* has an anti-inflammatory and antinociceptive effect in mice when used at the dose of 10mg/kg.

Keywords: Inflammation. Medicinal plants. Pain. Antioxidant

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- 5 – HT** – Serotonina;
- AINE-** Anti-inflamatório não-esteroidal;
- AMPc-** Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico;
- ANOVA** – Análise de variância estatística;
- BK** – Bradicinina;
- Cg** – Carragenina;
- CGRP** – Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina;
- COBEA** – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal;
- COX** – Cicloxigenase;
- DTNB** – 2,4-Dinitrobenzeno;
- Dxt** – Dextrana;
- EDTA** – Ácido Etilenomino-tetracético;
- ELISA** – Ensaio Imunoenzimático;
- eNOS** – Óxido Nítrico Sintase endotelial;
- EPM** - Erro Padrão da Média;
- GC** – Glicocorticoide;
- GSH** – Glutathiona;
- H₂O₂** – Peróxido de hidrogênio;
- H₃PO₄**– Ácido fosfórico;
- HPLC** - cromatografia líquida de alto desempenho;
- HTAB** – Tampão de Hexadeciltrimetilamônio;
- i.p.** – Intraperitoneal;
- i.pl.** – intraplantar;
- IASP** – Associação Internacional para Estudo da Dor;
- ICAM1** – Interleucina de adesão molecular 1;
- IFN** – Interferon;
- IL** – Interleucina;
- Indo** – Indometacina;
- KH₂PO₄** – Fosfato de potássio monobásico;
- LOX** – Lipoxigenases;
- LT** – Leucotrieno;

MDA – Malondialdeído;

MPO – Mieloperoxidase;

NF-kB – Fator de ativação nuclear K;

NK – Célula Natural Killer;

NO – Óxido Nítrico;

NO₂ – Nitrito;

NO₃– Nitrato;

NPSH- Grupos sulfidrílicos não-proteicos;

OPD - o-fenilenodiamina;

PAF – Fator de ativação plaquetária;

PBS – Tampão Fosfato de Sódio;

PCAM-1 – Molécula de adesão celular endotelial plaquetária;

PG – Prostaglandina;

PLS – Polissacarídeo sulfatado;

PLSn – Polissacarídeo sulfatado de *Morinda citrifolia*;

RG – receptor de glicose;

RNA_m – RNA mensageiro;

ROS – Espécies reativas de oxigênio;

rpm – Rotações por minuto;

SAL – Solução salina;

SLPI – Protease secretada por leucócitos;

SNC – Sistema Nervoso Central;

SPM- mediadores pró-resolução;

TCA – Ácido Tricloroacético;

TNBS – Ácido Trinitrobenzeno sulfônico;

TNF-α – Fator de Necrose Tumoral alpha;

TXA – Tromboxano A;

VCAM-1 – molécula de adesão celular vascular;

Vo – Volume basal da pata;

Vt - Volume da pata após tratamento;

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Etapas do recrutamento leucocitário.....	23
Figura 2	Vias de resolução da inflamação aguda.....	25
Figura 3	Mecanismo de transdução da dor inflamatória.....	29
Figura 4	Arbusto de <i>Morinda Citrifolia</i> – Noni.....	33
Figura 5	Planta do Noni no Estado do Ceará apresentando frutos em diferentes estágios de maturação.....	34
Figura 6	Efeito do PLSn sobre a atividade da enzima mieloperoxidase na pata.....	51
Figura 7	Figura 8 Ação do PLSn sobre o edema de pata induzido por Dextrana.....	52
Figura 8	Ação do PLSn sobre o edema de pata induzido por Histamina.....	53
Figura 9	Ação do PLSn sobre o edema de pata induzido por Serotonina.....	54
Figura 10	Ação do PLSn sobre o edema de pata induzido por bradicinina.....	55
Figura 11	Efeito do PLSn na Contagem total de células na peritonite induzida por carragenina.....	56
Figura 12	Efeito do PLSn na Contagem diferencial de neutrófilos na peritonite induzida por carragenina.....	57
Figura 13	Ação do PLSn sobre os níveis de GSH no exsudato peritoneal.....	58
Figura 14	Efeito do PLSn sobre os Escores de lesão microscópica histológica da pata.....	59

Figura 15	Microfotografia (200x, escala 50 μm) representando o efeito do PLSn sobre os danos microscópicos da lesão tecidual provocado pelo edema de pata induzido por Carragenina.....	60
Figura 16	Ação do PLSn sobre as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético.....	61
Figura 17	Efeito do PLSn na Reatividade dos animais nas fases do Teste da formalina.....	62

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Avaliação dos escores microscópicos das lesões inflamatórias de animais com edema de pata induzido por Carragenina (500µg/pata).....	45
Tabela 2	Efeito do PLS extraído de <i>M. citrifolia</i> (Noni) sobre o edema de pata induzido por carragenina.....	50

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REFERENCIAL TEÓRICO	20
	2.1 Inflamação	20
	2.1.1 Alterações Vasculares e Eventos Celulares na inflamação.....	21
	2.1.2 Resolução da Inflamação.....	24
	2.1.3 Terapia Anti-inflamatória Atual.....	26
	2.3 Dor Inflamatória	27
	2.4 Polissacarídeos naturais	30
	2.5 A espécie <i>Morinda citrifolia</i>	33
	2.5.1 Toxicidade de <i>Morinda citrifolia</i>	35
	2.5.2 Atividades Farmacológicas de <i>Morinda citrifolia</i> (Noni).....	35
	2.5.2.1 Efeito antimicrobiano.....	36
	2.5.2.2 Efeito antioxidante.....	37
	2.5.2.3 Efeito anticancerígeno.....	37
	2.5.2.4 Efeito analgésico.....	38
	2.5.2.5 Efeito anti-inflamatório.....	39
3	OBJETIVOS	41
	3.1 Objetivo Geral	41
	3.2 Objetivos específicos	41
4	METODOLOGIA	42
	4.1 Animais experimentais	42
	4.2 Coleta do material e extração do polissacarídeo de <i>Morinda citrifolia</i>	42
	4.3 Ensaio para avaliação do efeito anti-inflamatório	42
	4.3.1 Edema de pata induzido por carragenina.....	42
	4.3.2 Determinação da atividade da Mieloperoxidase.....	43

4.3.3	Avaliação Histológica dos escores microscópicos de lesão inflamatória.....	44
4.3.4	Edema de pata induzido por diferentes agentes inflamatórios.....	45
4.3.5	Indução da peritonite.....	46
4.3.6	Determinação da Migração de leucócitos.....	46
4.3.6.1	Contagem total de leucócitos.....	46
4.3.6.2	Contagem diferencial de leucócitos.....	47
4.3.9	Análise dos níveis de Glutathione	47
4.4	Ensaio para avaliação do efeito antinociceptivo.....	47
4.4.1	Contorções abdominais induzidas por ácido acético.....	47
4.4.2	Teste da Formalina.....	48
4.5	Análise Estatística.....	48
4.6	Questões Éticas.....	49
5	RESULTADOS	50
5.1	Efeito do PLS extraído de <i>M. citrifolia</i> (Noni) sobre o edema de pata induzido por carragenina.....	50
5.2	Efeito do PLSn sobre a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) na pata.....	51
5.3	Ação do PLSn sobre o edema de pata induzido por Dextrana.....	52
5.4	Ação do PLSn sobre o edema de pata induzido por Histamina	52
5.5	Ação do PLSn sobre o edema de pata induzido por Serotonina...	53
5.5	Ação do PLSn sobre o edema de pata induzido por Bradicinina...	54
5.6	Efeito do PLSn na Contagem total de células na peritonite induzida por carragenina.....	55
5.7	Efeito do PLSn na Contagem diferencial de neutrófilos na peritonite induzida por carragenina em camundongos.....	56
5.8	Ação do PLSn sobre os níveis de GSH no exsudato peritoneal....	57
5.9	Efeito do PLSn sobre os critérios microscópicos de lesão do tecido da pata no edema induzido por Carragenina.....	58

5.10 Ação do PLSn sobre as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético.....	60
5.11 Efeito do PLSn na Reatividade dos animais nas fases do Teste da formalina.....	61
6 DISCUSSÃO.....	63
7 CONCLUSÕES.....	76
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	77
9 ANEXO I.....	95

1 INTRODUÇÃO

A inflamação é um processo crítico para o desenvolvimento de muitas doenças e desordens complexas, como síndrome metabólica, doenças auto-imunes, doenças neurodegenerativas, cânceres e doenças cardiovasculares (BOULOGNE et al., 2016; MURAKAMI, 2012; SUGIMOTO et al., 2016). Trata-se de um fenômeno dinâmico e multimediado, podendo manifestar-se como resposta a qualquer agente lesivo, tanto físico, biológico ou químico. É caracterizada pela coordenada ativação de várias vias de sinalização que regulam a expressão de mediadores tanto pró como anti-inflamatórios (MARNETT, 2012).

O processo inflamatório provoca alterações morfofuncionais da microcirculação na área lesada (GABAY, 2006) resultando em uma complexa cascata de eventos bioquímicos envolvendo células, tecidos, vasos sanguíneos e linfáticos. As alterações estereotipadas podem ser determinadas pela intensidade ou persistência da injúria, característica do órgão ou tecido atingido e pela capacidade de reação do organismo (BELLÓ et al., 2015; MARNETT, 2012).

Com a lesão tecidual no processo de inflamação, inicialmente ocorrem medidas relativamente imediatas, sucedendo respostas tais como mudanças no tônus vascular (vasoconstrição/vasodilatação) e coagulação, na tentativa de promoção da hemostasia; na sequência acontece o recrutamento e a atividade subsequente de uma variedade de células inflamatórias e liberação de mediadores inflamatórios no sítio da lesão (BONECCHI e GRAHAM, 2016; HART, 2002). Exemplos de mediadores inflamatórios incluem: óxido nítrico (NO), prostaglandinas (PG), leucotrienos (LT), aminas vasoativas, citocinas (fator de necrose tumoral alfa-TNF α - e interleucinas-IL-1, 12); em contraste, outras citocinas (IL-3, -4, -5, -6, -10, -13) são anti-inflamatórias (IWALEWA et al., 2007).

Uma vez liberados os mediadores, ocorre uma modificação na sensibilidade dos nociceptores provocando uma diminuição do limiar doloroso; esta dor induzida por nocicepção ou "dor nociceptiva fisiológica", especialmente a aguda, é fundamental para a preservação da integridade do indivíduo, porque é um sintoma que alerta para a ocorrência de lesões no organismo, desencadeando adequadas reações de finalização ou prevenção ao agravamento do quadro (SCHAIBLE et al., 2011; VERRI et al., 2006).

Apesar do recente progresso no desenvolvimento de novas drogas com fins terapêuticos, ainda existe uma busca exaustiva por anti-inflamatórios que sejam potentes e efetivos, particularmente com menos efeitos colaterais que os usados na atualidade, representados basicamente pelos corticoides e pelos AINES (anti-inflamatórios não esteroidais) (VARALDA e MOTA, 2009; CASTRO, 2005).

Sabe-se que as plantas têm sido a base de medicamentos em todo o mundo e continuam a fornecer novos fármacos para a humanidade; em consequência, os produtos naturais e derivados representam mais de 50% de todas as drogas em uso clínico no mundo (KRISHNAIAH et al., 2011; FAKIM, 2006), figurando como fonte de diversidade de moléculas para a descoberta de drogas com eficácia anti-inflamatória e antinociceptiva (CALIXTO et al., 2003). O conhecimento popular sobre plantas medicinais em muitas comunidades continua a ser explorado, e tal dependência das plantas como fonte de medicamentos dá impulso aos estudos para assim investigar eficácia, segurança e potenciais de uma nova droga vegetal (NINGTHOUJAM et al., 2012; FAKIM, 2006).

Dessa forma, muita atenção tem sido focada nos polissacarídeos isolados de fontes naturais nas últimas décadas; estes compreendem um grupo de macromoléculas heterogêneas e complexas encontrados em concentrações elevadas na matriz extracelular e que estão envolvidas nas funções iônicas, mecânicas e osmóticas em plantas, algas marinhas, fungos e bactérias (VASCONCELOS et al., 2015; PATEL, 2012; RODRIGUES et al., 2012).

Polissacarídeos de várias fontes já possuem uma ampla gama de aplicações bem estabelecidas nas áreas alimentícia, biomédica, farmacêutica e de cosméticos (CUNHA et al., 2009). Em especial os polissacarídeos isolados de plantas superiores vêm sendo estudados por causa de seu amplo espectro de atividades, frente a vários ensaios “*in vitro*” e “*in vivo*”, além de apresentarem uma toxicidade relativamente baixa (INNGJERDINGEN et al., 2005).

Alguns polissacarídeos de plantas medicinais apresentam comprovada atividade imunomoduladora via ativação do sistema complemento, ativação de macrófagos e indução da quimiotaxia de leucócitos, contribuindo para as respostas inflamatórias e para as reações de defesa do organismo (PEREIRA et al., 2012). Além disso, são também capazes de modular outras atividades biológicas como, por exemplo, antioxidante, antitumoral, anticoagulante e antilipidêmica (RODRIGUES et al., 2012; PATEL, 2012).

Entre os exemplos de fração polissacarídica que vem despertando interesse tem-se a fração do fruto do noni. A planta de nome científico *Morinda citrifolia*L. apresenta uma boa rentabilidade no teor de polissacarídeos, com uma taxa em torno de 16% (BUI et al., 2006). É uma pequena árvore da família das Rubiaceae, com emprego tradicional há mais de 2000 anos pelo povo polinésio atribuído às atividades antibacteriana, antiviral, antifúngica, antitumoral, anti-helmíntica, analgésica, anti-inflamatória, hipotensora e imunestimulante (WANG et al., 2002; BUI et al., 2006). A literatura científica sobre o Noni pode ser considerada limitada ao se analisar a ampla gama de atividades biológicas apontadas para a planta, com apenas cerca de 100 trabalhos publicados até 2013, sendo a maioria destas publicações do Sudeste Asiático (WANG et al., 2013). No que se trata da atividade anti-inflamatória muito já foi comprovado para o Noni, suas partes e diferentes tipos de extratos (SINGH, 2012).

Posto que os polissacarídeos de plantas são agentes potencialmente terapêuticos, percebe-se que o estudo para aplicabilidade, em relação a alguns aspectos, como a atividade anti-inflamatória, por exemplo, ainda é modesto. Considerando que o Noni (*Morinda citrifolia*) já foi relatado várias vezes por possuir propriedades anti-inflamatórias, vê-se que é interessante investir nos estudos de aplicação dos polissacarídeos desse vegetal na busca de novas drogas anti-inflamatórias e antinociceptivas visto que há poucos relatos na literatura científica de pesquisas com essa fração. O desenvolvimento do trabalho proposto pode mostrar o potencial farmacológico do polissacarídeo sulfatado (PLS) de *Morinda citrifolia* servindo também como ferramenta para o estudo da inflamação e nocicepção bem como para sua aplicação biotecnológica.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Inflamação

A inflamação é uma resposta imune inespecífica a qualquer lesão tecidual (MILIANI et al., 2006) em que ocorre um complexo de alterações teciduais em resposta a bactérias, traumas, agentes químicos, calor ou qualquer outro fenômeno. Diversas substâncias são liberadas pelos tecidos danificados para atuar contribuindo com a reparação e regeneração do tecido lesionado de forma autolimitada. (GLASS et al., 2010; LIBBY, 2007) É um evento intrinsecamente benéfico do tecido vascularizado que leva à prevenção de mais eventos que causam danos às células com a remoção de fatores ofensivos e ao restabelecimento da estrutura do tecido e sua função fisiológica (RICCIOTTI e FITZGERALD, 2011; FLOWER e PERRETTI, 2005).

Apesar de ser um processo conservado evolutivamente, variáveis externas e internas podem modificar o processo inflamatório básico, como a natureza e a intensidade da lesão, tempo de exposição ao agente, local e o tecido afetado, uso de substâncias modificadoras da resposta inflamatória e a responsividade inerente do indivíduo (GILROY et al., 2004; GRIVENNIKOV, et al., 2010).

Geralmente a inflamação aguda evolui para um destes três resultados finais: resolução completa, estado ideal; cicatrização pela substituição de tecido conjuntivo (fibrose); progressão da resposta tecidual com cronicidade do processo (GILROY et al., 2004). Todas as alternativas à resolução não são ideais (SPITE e SERHAN, 2010), à medida que persiste no organismo, o processo agudo age agravando as lesões e se torna prejudicial, contribuindo para a cronificação do processo (inflamação crônica) ou da própria doença (GLASS et al., 2010; ESSER et al., 2012).

Assim, pode-se dividir a resposta inflamatória em dois tipos, aguda e crônica, divisão essa, baseada na duração e características patológicas da reação inflamatória (MURI et al., 2009; SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004). A inflamação crônica pode ser definida como uma forma desregulada da inflamação, caracterizando um fenômeno de duração mais prolongada e manifestada histologicamente pela presença de linfócitos e macrófagos, com proliferação

fibroblástica e formação de vasos sanguíneos resultando em fibrose e necrose tecidual; já a inflamação aguda pode ser definida como uma forma regulada e autolimitada (GABAY, 2006; IWALEWA et al., 2007; PEREIRA et al., 2012).

O desempenho do agente indutor da inflamação se baseia na sua capacidade de promover a síntese dos vários tipos de mediadores pró-inflamatórios (MEDZHITOV, 2008). Sabe-se que as características moleculares do processo inflamatório são iniciadas e controladas pelos mediadores inflamatórios solúveis como: a histamina e serotonina, as proteases plasmáticas (sistema do complemento, cininas e proteínas fibrinolíticas e de coagulação), os mediadores lipídicos (prostaglandinas (PGs), fatores ativados de plaquetas (PAF) e leucotrienos), as citocinas e o óxido nítrico (NO), entre outros (NOURSHARGH e MARELLI-BERG, 2005; BONECCHI e GRAHAM, 2016).

A evolução do processo provoca os sinais cardinais da inflamação aguda: rubor, calor, edema e dor (RICCIOTTI e FITZGERALD, 2011). Com os estudos microscópicos tornou-se possível afirmar que os sinais clínicos da inflamação são na verdade, resultado da vasodilatação, do acúmulo de leucócitos, do aumento do fluido intersticial e da estimulação dos terminais nervosos por mediadores (ALLER et al., 2007).

2.1.1 Alterações Vasculares e Eventos Celulares na inflamação

Em um estado inflamatório, os vasos sanguíneos sofrem alterações, vários mediadores inflamatórios rapidamente aumentam a permeabilidade microvascular de macromoléculas através do endotélio venular, o que facilita a passagem de proteínas plasmáticas e leucócitos da circulação para o sítio da lesão ou da infecção (NOURSHARGH e MARELLI-BERG, 2005; DURAN et al., 2010).

Os mediadores inflamatórios promovem o aumento da permeabilidade vascular a partir da retração das células endoteliais que revestem as vênulas pós-capilares, fazendo com que essas células se contraíam e, as junções intercelulares se desfaçam, possibilitando o extravasamento plasmático (MEHTA e MALIK, 2006). Além disso, ocorre também, mudança no calibre e fluxo da microcirculação caracterizando a etapa de vasodilatação (PETHO e REEH, 2012).

É interessante notar que a vasodilatação segue um processo de vasoconstrição inicial, que ocorre na tentativa de reestabelecer a homeostase como

em lesões endoteliais pequenas, mas que é revertida 10 a 15 minutos após o estímulo inflamatório (ALLER et al., 2007). A vasodilatação no processo inflamatório é mediada primariamente por óxido nítrico (NO) e prostaglandinas vasodilatadoras (PGI₂, PGD₂, PGE₂, PGF₂α) (TABERNERO et al., 2003), bem como por produtos endoteliais e fatores derivados de mastócitos como leucotrienos e, particularmente, histamina (ALLER et al., 2007). O processo de vasodilatação ocasiona o sinal clínico de rubor na inflamação.

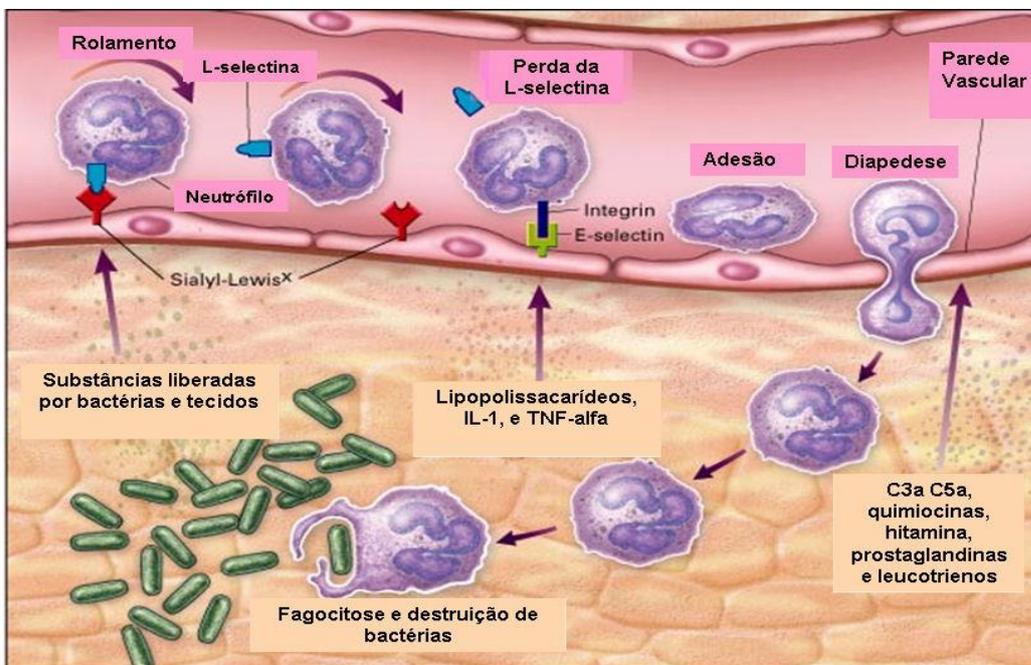
Os mediadores causam aumento do fluxo sanguíneo e da permeabilidade microvascular, o que provoca uma redução da velocidade do fluxo sanguíneo e em consequência, a exsudação de plasma rico em proteínas para o espaço extravascular (LICHTMAN e WILLIAMS, 2006; MITCHELL e WARNER 2006). O extravasamento de proteínas e líquidos é normal durante o transcurso inflamatório, ocorre predominantemente em vênulas pós-capilares, sendo importante também para a formação da linfa e para a ação do sistema imune. (DURAN et al., 2010). A redução da pressão osmótica intravascular e aumento da pressão osmótica extravascular decorrente do extravasamento plasmático, somado a pressão hidrostática aumentada devido à vasodilatação, induz a saída e acúmulo de fluido rico em proteínas no interstício, o que justifica o desenvolvimento do edema durante a inflamação aguda (HART, 2002; LICHTMAN e WILLIAMS, 2006).

Na reação inflamatória, as principais e primeiras células efetoras são os leucócitos polimorfonucleares, sua migração até o foco inicial da inflamação é importante para uma adequada resposta inflamatória (ULBRICH et al., 2003; SÔNEGO et al., 2016). A chegada dessas células acompanha a vasodilatação e a exsudação plasmática, ocorre por uma série de etapas adesivas específicas que permitem todos os movimentos necessários ao êxito, sendo este um evento crucial para as funções destas células tanto na imunidade inata quanto na adaptativa (MULLER, 2011; VAN MIERT, 2002). A migração de neutrófilos para o local da lesão no tecido é importante para a cicatrização de feridas e para a proteção contra a invasão de microrganismos (BROCHER e TOFT, 2009).

A sequência de eventos na ocorrência de migração leucocitária (Figura 1) ocorre por uma série de alterações cinéticas provocadas por eventos quimiotáxicos (KUMAR et al., 2009), envolvendo marginação e captura dos leucócitos livres circulantes do lúmen vascular; rolamento, ativação, adesão firme e extensão na superfície do endotélio; passagem através da barreira das células endoteliais ou

diapedese e transmigração (NOURSHARG e MARELLI-BERG, 2005). O endotélio vascular quando ativado permite o extravasamento seletivo dos leucócitos polimorfonucleares, seletividade promovida pela ligação dessas células ao endotélio através de moléculas singulares (MEDZHITOV, 2008). O início do recrutamento leucocitário ocorre com a ativação da monocamada de células endoteliais por sinais teciduais, que induzem a expressão de moléculas de adesão, tanto nos leucócitos como no endotélio, e a secreção de mediadores inflamatórios pelo endotélio (WAGNER e ROTH, 2000).

Figura 1. Etapas do recrutamento leucocitário



Fonte: PEREIRA, 2011- Adaptado de WALZOG e GAEHTGENS, 2000.

Os principais grupos de moléculas de adesão são as selectinas (E, P e L-selectinas) que medeiam a adesão entre os leucócitos e o endotélio, (WAGNER e ROTH, 2000); apesar de forte, essa ligação é de curta duração fazendo com que a célula ligue-se rapidamente a outra selectina provocando o fenômeno de rolamento (MILES et al., 2008). As β -2-integrinas e as imunoglobulinas, molécula de adesão intracelular (ICAM-1) e molécula de adesão celular vascular 1 (VCAM-1) medeiam a adesão estável célula-célula e célula matriz extracelular (WEBER et al., 2007; SANDBORN e YEDNOCK, 2003; LUSTER et al., 2005).

A contribuição ao processo de migração leucocitária realizada pelas enzimas de digestão de proteínas (proteínases) é muito importante. As

proteínasesagem fazendo uma limpeza na rota das células migratórias (HART, 2002).As metaloproteínases, por exemplo, em recentes estudos realizados *in vitro* demonstraram que podem clivar uma grande quantidade de substratos na matriz extracelular permitindo assim passagem das células infiltrantes (SOROKIN, 2010).

2.1.2 Resolução da Inflamação

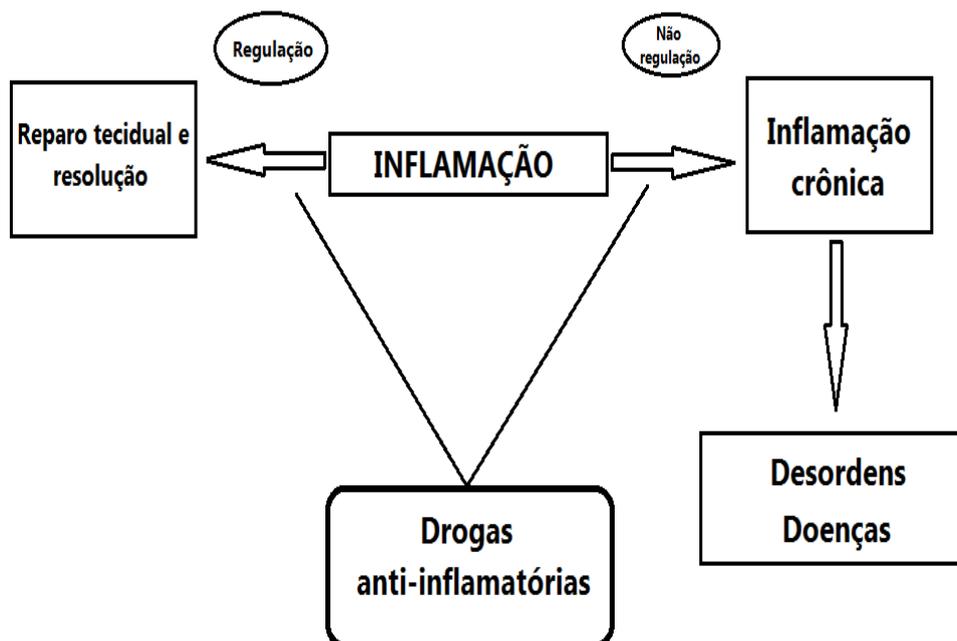
O desfecho da inflamação deve ser destacado como uma faceta crítica da resposta inflamatória, e é uma etapa muito importante do processo (LENTSCH e WARD, 2000), assim como seu início é regulada por uma série de mediadores como citocinas, quimiocinas e seus receptores, sendo descrito como um processo dinâmico com ativação de programas endógenos de vias de sinalização que vão induzir o término da sequência de eventos (SERHAN e SAVILL, 2005; SERHAN, 2007).A maioria dos mediadores locais pró-inflamatórios possui uma meia-vida curta (BROCHER e TOFT, 2009), dependendo da duração da lesão, são estes mediadores que determinam a gravidade da inflamação (IWALEWA et al., 2007).

O resultado usual do programa inflamatório agudo é a resolução bem sucedida e reparação de danos nos tecidos (RICCIOTTI e FITZGERALD, 2011). Para isso, o processo de resolução envolve normalização da permeabilidade vascular, a limitação da infiltração de leucócitos polimorfonucleares e aumento das respostas de macrófagos seletivos de uma forma não-flogística, remoção dos corpos apoptóticos, corpos estranhos e debris celulares (SERHAN, 2010; WEIGERT et al., 2009).

Nos eventos de resolução da inflamação é de grande importância o papel dos macrófagos, estes reconhecem e fagocitam os neutrófilos apoptóticos de maneira não flogística (WEIGERT et al., 2009). De fato, os processos de apoptose e fagocitose são importantes durante a fase resolutiva do processo inflamatório, pois há evidências sugerindo que falhas nos processos de apoptose podem ser fator de destaque na patogênese e progressão de diversas doenças (GILROY et al., 2004).Os fibroblastos também contribuem para a resolução da inflamação pela retirada de sinais de sobrevivência e normalização de gradientes de quimiocinas, deste modo induzem a infiltração de células para apoptose ou a abandonarem o tecido através da drenagem linfática (SUGIMOTO et al., 2016).

Os mediadores pró-inflamatórios do sítio são removidos, além disso, alguns “sinais de parada” identificados como um gênero de mediadores pró-resolução (SPM) (SERHAN, 2010) tentam também impedir a continuação do processo inflamatório, e incluem as lipoxinas, resolvinas, protectinas e prostaglandinas (PGs) da série D (RICCIOTTI e FITZGERALD, 2011; STABLES e GILROY, 2011). Mediadores anti-inflamatórios potentes incluem as citocinas IL-10 e IL-13, e a enzima inibidora de protease secretada por leucócito (SLPI) (LENTSCH e WARD, 2000). Substâncias baseadas em mediadores endógenos que exercem efeitos pró-resolutivos podem representar uma nova estratégia para a terapia anti-inflamatória.

Figura 2. Vias de resolução da inflamação aguda



Fonte: adaptado de ILAWEWA, 2007.

Por outro lado, a exacerbação da resposta inflamatória pode causar descompensação fisiológica, disfunção em órgãos e até mesmo a morte (NATHAN, 2002). Não obstante, o processo de acentuação da inflamação tem sido implicado em inúmeras doenças como artrite, doença inflamatória intestinal, e síndrome de disfunção múltipla dos órgãos, bem como ao aumento da morbidade e mortalidade nessas doenças (LIBBY, 2007; VAN MIERT, 2002).

2.1.3 Terapia Anti-inflamatória Atual

Os anti-inflamatórios não esteroides (AINEs) são uma grande classe heterogênea de fármacos, estão entre os medicamentos mais prescritos no mundo devido aos seus efeitos anti-inflamatório, antipirético e analgésico (MARNETT, 2009), calcula-se inclusive, que no mundo diariamente cerca de 30 milhões de pessoas no ano 2000 consumiam algum dos representantes da classe (STEINMEYER, 2000).

Os AINEs exercem seus efeitos farmacológicos basicamente devido à inibição da enzima chamada cicloxigenase (COX) (ABDEL-AZIZ et al., 2011). A partir dos vários efeitos adversos dos AINES não seletivos às isoformas da COX (-1 ou -2), foram sintetizados AINEs seletivos, cuja inibição é seletiva da COX-2 com eficácia semelhante (MITCHELL e WARNER, 2006).

As consequências do bloqueio da COX-1 no trato gastrointestinal são a inibição da proteção da mucosa e o aumento da secreção ácida, o que pode levar à erosão, ulceração, perfuração e hemorragia. Por outro lado, a inibição seletiva da COX-2 pode induzir a diminuição relativa da produção endotelial de prostaciclina, enquanto que a produção plaquetária de TXA₂ é não alterada, o que pode aumentar o risco de trombose e eventos vasculares (BATLOUNI, 2010). Além dessas ações decorrentes de seu mecanismo de ação direto, existem muitos outros efeitos adversos atribuídos aos AINES.

Os corticoides/glicocorticoides (GC) têm sido largamente utilizados na prática clínica desde os princípios de 1950 (CALDAS e SCHRANK, 2001). Os glicocorticoides possuem um amplo espectro de indicações terapêuticas, porém têm seu papel central no tratamento de doenças nas quais estejam envolvidos mecanismos imunes e inflamatórios (LONGUI, 2007). A ação dos glicocorticoides (GC) é mediada por um receptor proteico intracelular, o receptor de GC (GR), que pertence à superfamília dos receptores nucleares e age como um fator de transcrição ativado pelo hormônio, regulando a expressão dos genes responsivos aos GC (CASTRO, 2005). Evidências sugerem que o GR suprime a inflamação por três mecanismos: efeitos genômicos diretos e indiretos e não genômicos (RHEN e CIDLOWSKI, 2005).

A ampla gama de efeitos secundários dos corticosteroides causa uma série de problemas tais como hipertensão, inibição da cicatrização, obesidade,

retardo do crescimento em crianças, distúrbios metabólicos e osteoporose entre outras. Dessa forma, o uso prolongado dos corticosteroides é limitado devido à lista de efeitos adversos muito extensa (RHEN e CIDLOWSKI, 2005; LONGUI, 2007).

2.3 Dor Inflamatória

A dor é uma resposta subjetiva do organismo quando é submetido a algum estímulo potencialmente nocivo. Em tecidos normais, esse estímulo ativa reações fisiológicas adequadas para evitar uma possível lesão. Em tecidos ou órgãos que sofreram lesão ocorre sensibilização de nociceptores que passam a responder a estímulos que são inócuos ou que não provocam sensação dolorosa normalmente (SCHAIBLE et al., 2011). É interessante enfatizar que a dor é mais que uma sensação, é uma experiência individual influenciada por eventos de dor anteriores, crenças, tradições, componentes ambientais e inclusive é contextual (VICKERS, 2010). A definição de dor como resposta a um estímulo somado ao componente emocional é bem aceita pela Associação Internacional para Estudo da Dor (IASP).

Classifica-se a dor basicamente em dois tipos de acordo com sua durabilidade: aguda ou crônica (SALLUM et al., 2012). A dor aguda é considerada normal e com função protetora (MARCHAND et al., 2005) e se dá pela ativação local de nociceptores em resposta a um dano tecidual, podendo a dor desaparecer até mesmo antes do restabelecimento do tecido lesado, é uma 'dor de início recente' e duração limitada provável(VICKERS, 2010; KUNER, 2010). A dor crônica é aquela que persiste mesmo quando passado a fase de cura de uma lesão ou injúria, passando a se repetir ou sustentar-se por período prolongado e não tem aparentemente nenhuma função fisiológica ou protetora (APKARIAN et al., 2009, MACINTYRE et al., 2010).

A capacidade do sistema somatossensorial para detectar estímulos potencialmente nocivos de danificar o tecido é um mecanismo importante de proteção que envolve a interação de múltiplos mecanismos periféricos e centrais (LOESER e TREEDE, 2008). Os processos neurais subjacentes à codificação e processamento de estímulos nocivos são definidos como "nocicepção", trata-se de mecanismos tão importante que está presente em todos os animais (MACINTYRE et al., 2010;OAKLANDER, 2011). De fato essa "dor nociceptiva fisiológica" é uma

sensação de advertência absolutamente essencial para a sobrevivência porque provoca reações de esquiva adequadas (SCHAIBLE et al., 2011).

O termo nociceção se refere em suma ao estímulo doloroso propriamente dito, não levando em consideração o componente emocional, englobando a transmissão de informações periféricas dos nociceptores nos tecidos para estruturas centrais pelas vias neuroanatômicas, bem como os mecanismos neurológicos e os receptores específicos que detectam o estímulo lesivo (WU E RAJA, 2011; CUMMINS et al., 2007). Os nociceptores são terminações nervosas livres com a função básica de transmitir informações aos neurônios de ordem superior sobre a lesão tecidual ocasionada por estímulos nocivos que podem ser mecânicos, térmicos ou químicos (MILLAN, 2002; WU e RAJA, 2011). Estes se encontram dispersos por todo o corpo, inervando a pele, músculos, articulações e órgãos internos (JULIUS e BASBAUM, 2001).

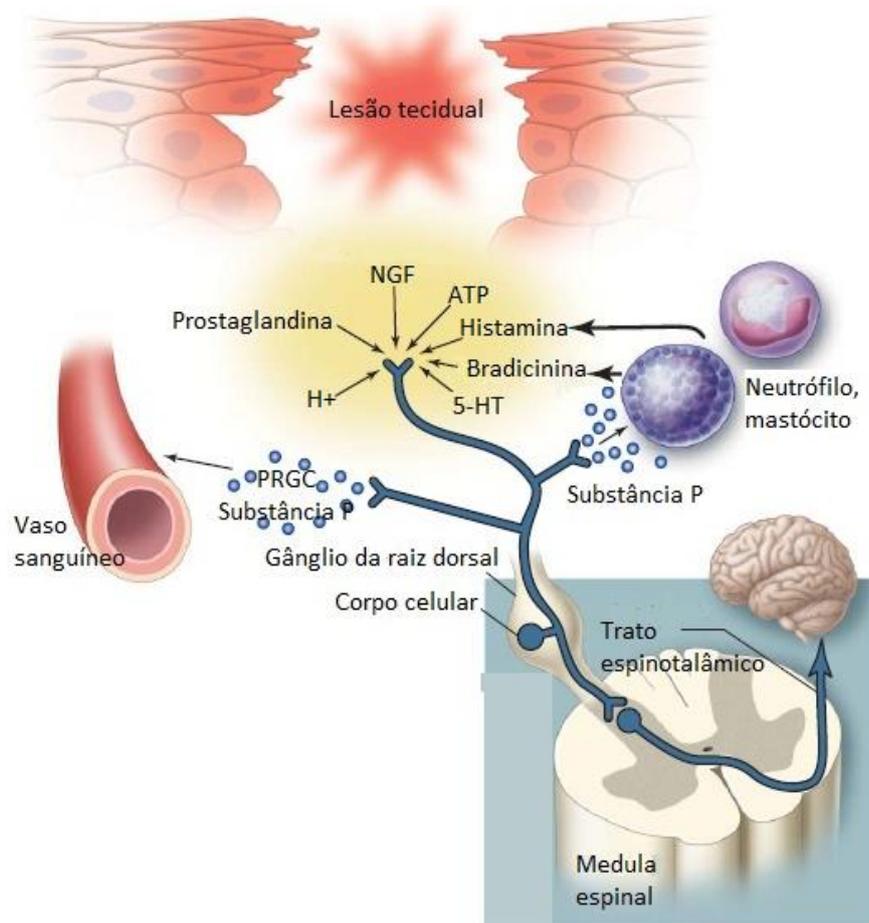
Pode-se considerar que o mecanismo da dor (Figura 3) compreende basicamente três fases básicas: transdução, que é a ativação dos nociceptores por transformação de um estímulo nocivo em potencial de ação; transmissão, que é o conjunto de eventos que permitem que o impulso nervoso, gerado no nociceptor, seja conduzido para o SNC; e modulação, que são os mecanismos e vias responsáveis pela supressão ou facilitação da dor e que podem ser ativados pelas próprias vias nociceptivas (WU e RAJA, 2011; PINHO-RIBEIRO et al., 2016; MARCHAND et al., 2005).

A estimulação dos nociceptores promove uma liberação local de mediadores químicos, ocorrendo alteração na permeabilidade da membrana da fibra nervosa o que gera potenciais de ação para assim serem conduzidos pelas fibras dos neurônios sensoriais primários aos neurônios de segunda ordem no corno dorsal da medula espinhal, ascendendo para o córtex (CHENG e JI, 2008; GRIFFIS et al., 2006).

A conexão sináptica entre as fibras aferentes primárias e os neurônios do corno dorsal envolve neurotransmissores como o glutamato (principal neurotransmissor excitatório da dor) e a substância P, responsáveis pela produção de potenciais pós-sinápticos excitatórios rápidos e lentos, respectivamente (KUNER, 2010; ZEILHOFER e BRUNE, 2006), além deles também está presente em menor escala neurocinina A e o PRGC (peptídeo relacionado ao gene da calcitonina) (SCHAIBLE e RICHTER, 2004).

Assim os neurônios do corno dorsal projetam seus axônios e transmitem a informação para os centros encefálicos, incluindo a formação reticular, hipotálamo e tálamo que através de neurônios terciários, enviam o sinal ao córtex cerebral (ALMEIDA et al., 2004). Nos centros encefálicos o estímulo nocivo passa pelo processo de somatização, informando que existe uma sensação nociceptiva, já no córtex há o componente emocional que discrimina o tipo de sensação (ROY et al., 2009).

Figura 3. Mecanismo de transdução da dor inflamatória.



Fonte: adaptado de OAKLANDER, 2011.

A dor é um dos sinais cardinais da inflamação (MARNETT, 2012), porém nem sempre está presente no curso do processo inflamatório, geralmente é causada pela pressão exercida pelo edema formado na área inflamada, pela liberação de mediadores endógenos, podendo resultar também de lesão das fibras nervosas e da irritação provocada por substâncias químicas provenientes de patógenos (SEPODES, 2004; PINHO-RIBEIRO et al., 2016).

O quadro inflamatório acompanhado pela sensação de dor advém da sensibilização dos nociceptores (MARCHAND et al., 2005). A lesão tecidual induz a liberação celular local de uma "sopa inflamatória", consistindo de bradicinina, histamina, PGE₂ e adenosina monofosfato cíclico (AMPc) que atua nos canais mediados pelo sódio presentes nas fibras nervosas (DUCHARME, 2000). Este processo envolve uma redução do limiar de ativação dos nociceptores, aumento da excitabilidade neuronal facilitando a geração dos potenciais de ação e dessa forma ao surgimento de atividade espontânea nos nociceptores (BURIAN e GEISLINGER, 2005; SCHAIBLE e RICHTER 2004). Na inflamação, os nociceptores são sensibilizados de tal maneira, que a aplicação de um estímulo que inicialmente era leve ou mesmo inofensivo, passa a ser capaz de ativar a fibra nociceptiva, tornando-se assim doloroso (VERRI et al., 2006; CUNHA et al. 2005).

2.4 Polissacarídeos naturais

Polissacarídeos são macromoléculas naturais encontradas nos organismos vivos, estão entre os grupos de compostos mais abundantes e importantes da biosfera (FREITAS et al., 2009). São formados por unidades monossacarídicas, representando um grupo estruturalmente heterogêneo de compostos e possuem geralmente elevado peso molecular (VORWERK et al., 2004). Nas plantas desempenham um papel crítico na comunicação célula-célula, adesão celular e reconhecimento molecular no sistema imunológico e em tais são essenciais biomacromoléculas das paredes celulares (YANG e ZHANG, 2009).

Estes polímeros podem ter diversas origens naturais: de plantas, algas, líquens, animais, fungos e bactérias (LIU et al., 2015; DORE et al., 2014; RINAUDO, 2008). Os polissacarídeos aparecem em muitas diferentes formas e em diferentes locais nas plantas. Eles estão presentes em todo o organismo, tanto dentro das células como nos espaços intercelulares, são importantes como substâncias fortalecedoras, ou seja, como material formador da matriz extracelular (HEINZE, 2005). Basicamente, nos vegetais são divididos em três grupos distintos: polissacarídeos de reserva, polissacarídeos de parede celular e exsudatos (FERREIRA, 2012).

Os polissacarídeos têm sido usados ao longo de décadas em várias aplicações industriais, por exemplo, produtos farmacêuticos, biomateriais, material

de alimento e nutrição, e como biocombustíveis (LIU et al., 2009). Esse amplo uso é ocasionado pelas excelentes condições de aplicabilidade dos polissacarídeos na indústria conferido a estes, devido às suas propriedades de serem inertes, seguros, não tóxicos, biocompatíveis, biodegradáveis, de baixo custo e abundância na natureza (VASCONCELOS et al., 2015). Nesse sentido, os polissacarídeos também ganham destaque por suas reconhecidas atividades biológicas (JIAO et al., 2011), de grande interesse também para a indústria farmacêutica o potencial dessas macromoléculas por serem promissoras na entrega da drogas e aplicações no controle de liberação de fármacos (LIU et al., 2015).

É interessante e importante elucidar a relação entre estruturas químicas, conformações de cadeia de polissacarídeos e suas atividades biológicas (YANG e ZHANG, 2009), uma vez que estas possuem estreita relação com sua massa molecular, posição dos grupos substituintes, açúcares constituintes, grau de sulfatação, carga da molécula, grau de ramificação, açúcar presente na posição do terminal não-redutor (LIU et al., 2015). Porém, devido às dificuldades para caracterizar as estruturas químicas e as conformações de cadeia de polissacarídeos, torna-se difícil estabelecer as relações entre estrutura e atividades biológicas (KACZKOWSKI, 2003, YANG e ZHANG, 2009).

Polissacarídeos de origem natural têm diversas atividades imunomoduladoras tanto *in vivo* como *in vitro*. São conhecidos por modularem a imunidade celular e humoral. Alguns polissacarídeos isolados de fungos são conhecidos pelas propriedades antitumorais e antioxidantes, como por exemplo, crestina, lentinano e esquizofilano (JOSEPH et al., 2011). Polissacarídeos sulfatados originados de algas já são reconhecidos por possuírem muitas atividades biológicas, incluindo anticoagulante, antiviral, anti-inflamatória (JIAO et al., 2011; PEREIRA et al., 2012, BRITO et al., 2013) e hipolipidêmica (INOUE et al., 2009). Os polissacarídeos de originários de vegetais superiores já tem sido relatados também com atividades antiviral, anticoagulante, anti-inflamatória (CUNHA et al., 2009; ; INNGJERDINGEN et al., 2005), antitumoral (FURUSAWA et al., 2003), antioxidante (WANG et al., 2008), antibacteriana, anti-úlcero-gênica, antinociceptiva (WANG et al., 2011) entre outras.

Como exemplo para a atividade anti-inflamatória há os estudos feitos por Joseph et al. (2011) que relatam atividade anti-inflamatória dos polissacarídeos isolados de *Ganoderma lucidum* através da diminuição da inflamação aguda

induzida por carragenina e na inflamação crônica induzida por formalina de uma maneira dose-dependente. Nestes estudos a atividade da fração foi comparável à ação do medicamento anti-inflamatório clássico diclofenaco.

Nos experimentos conduzidos por Dore et al. (2014) viu-se inclusive que o tratamento com polissacarídeos de *P. dermoporus* diminuiu a infiltração pleural leucocitária em até 92,5% quando comparado ao grupo de animais não-tratados, refletindo o fato de que estas substâncias parecem estar relacionados com a inibição de diapedese após a migração celular para o local da lesão. Estes achados condizem com os estudos de Cumashi et al. (2007) em que foi verificado que um dos mecanismos avaliados na atividade anti-inflamatória de polissacarídeos é a inibição da migração celular; no estudo diferentes fucanas sulfatadas mostraram atividade anti-inflamatória relacionada à redução do extravasamento de leucócitos polimorfonucleares.

Já nos estudos de Pereira et al. (2012) os polissacarídeos da planta *Azadirachta indica* exibiram potente atividade anti-inflamatória, interferindo não somente nos eventos vasculares, mas também nos eventos celulares inflamatórios envolvendo serotonina, PGE₂ e NO. Resultados semelhantes quanto à atividade multifatorial de polissacarídeos naturais foram encontrados por Brito et al. (2013), em que o polissacarídeo de *Hypnea musciformis* inibiu significativamente os edema induzido por dextrana e por carragenina, provocou diminuição dos níveis de IL-1, e o aumentou dos níveis de NO₃ / NO₂ na cavidade peritoneal.

O amplo espectro de propriedades terapêuticas que os polissacarídeos vêm apresentando, aliado ao fato de que nos vegetais a maioria dos polissacarídeos encontrados, é relativamente não tóxica apresentando poucos efeitos colaterais (SCHEPETKIN e QUINN, 2006), coloca os polissacarídeos como candidatos ideais com potencial terapêutico e fonte para a descoberta e desenvolvimento de novos compostos de valor medicinal (MOURÃO, 2015). Dessa forma se destaca a atividade anti-inflamatória já comprovada para algumas destas frações de polímeros, já que estes mostraram diferentes mecanismos de ação, fato que pode ser muito benéfico para tratar o processo inflamatório, já que este é multifatorial pois envolve diversos mediadores e eventos.

2.5 A espécie *Morinda citrifolia*

A planta popularmente conhecida como noni, *Morinda citrifolia* L. é uma planta pertence à família Rubiaceae, sendo uma das espécies mais conhecidas e estudadas dentro da família. É uma árvore de pequeno porte (Figura 4) nativa da região do sudeste asiático e que, frequentemente, cresce em regiões costeiras, ao nível do mar e em áreas florestais com cerca de 400 metros acima do nível do mar (LÜBERCK & HANNES, 2001; RAZAFIMANDIMBISO et al., 2010). Atualmente, encontra-se distribuída em muitas áreas tropicais, tais como Ásia, Hawaii e ilhas do Taiti além de seu cultivo nas regiões norte e central da América do Sul (WANG et al., 2002).

Figura 4. Arbusto de *Morinda Citrifolia*– Noni.



Fonte: adaptado de CORREIA, 2010.

Segundo Brito (2008), a planta apresenta flores e frutos (Figura 5) durante todo o ano, sendo as flores pequenas e brancas. Após se iniciar a produção de frutos, a planta produz frutos o ano inteiro. Este chega a atingir cerca de 4 a 7 cm, sendo inicialmente verde, mudando para amarelo e por fim, quase branco na época em que o fruto é colhido. Estes apresentam-se ovais, carnosos, ligeiramente enrugados, apresentam odor forte e desagradável além de conterem muitas

sementes, geralmente em torno de 260. Já o arbusto pode chegar de 3 a 6 metros de altura. (CHAN-BLANCO et al., 2006). Tanto na medicina popular como nas comprovações científicas todas as suas partes (frutos, folhas, cascas, tronco e raízes) podem ser destinadas a fins terapêuticos.

Figura 5. Planta do Noni no Estado do Ceará apresentando frutos em diferentes estágios de maturação.



Fonte: BARROS, 2009.

Existem diversas pesquisas relacionadas às atividades biológicas com *Morinda citrifolia* (noni), sejam através de ensaios *in vitro* ou *in vivo*, nos quais foram analisados extratos ou substâncias isoladas da mesma (SAMPAIO, 2010). Aproximadamente 200 compostos fitoquímicos já tinham sido identificados da planta do Noni até 2011, incluindo ácidos orgânicos antraquinonas, flavonoides, polissacarídeos, glicosídeos, iridoides, lignanas, triterpenos, alcaloides entre outros (LISHUANG, 2011; CHAN-BLANCO et al., 2006). Contudo, a composição química difere grandemente de acordo com a parte da planta analisada (CHAN-BLANCO et al., 2006).

2.5.1 Toxicidade de *Morinda citrifolia*

Ao passo dos inúmeros benefícios de *Morinda citrifolia*, existem casos que evidenciam possíveis propriedades tóxicas do noni, que não podem ser negligenciados; portanto, o uso deve ser racional a fim de evitar eventos indesejáveis (SILVEIRA et al., 2011; WEST et al., 2009).

O laboratório Eurofins Scientific Inc. patrocinado pela empresa TAHITIAN NONI® International, avaliou a toxicidade aguda do suco do fruto do Noni em ratos, todos os animais sobreviveram e não foi observado nenhum sinal adverso clínico, bem como nenhum sinal macroscópico de toxicidade em órgãos após necropsia. Em 2001 o Laboratório Scantox Biologisk A/S realizou um estudo de toxicidade crônica de 13 semanas do suco do fruto via gavagem, utilizando 80 ratos. Também neste estudo todos os grupos não mostraram diferenças entre as variáveis avaliadas comparados com o grupo controle (WANG et al., 2002).

Um estudo recente de Serafini et al. (2011) avaliou os efeitos do extrato das folhas de *M. citrifolia* na citotoxicidade, dano oxidativo e toxicidade aguda e concluíram que nas doses consumidas na medicina tradicional o extrato pode ser considerado seguro, uma vez que não causou qualquer letalidade ou alterações do comportamento geral de roedores. Porém, em sua própria conclusão, ressalta que os resultados apresentados não implicam a mesma premissa sobre a toxicidade em seres humanos, afirmando inclusive que mais estudos são necessários.

Ao se discutir as características do Noni, suas indicações, contra-indicações e efeitos colaterais, fica evidente que o mesmo realmente possui atividades benéficas, porém, deve ser utilizado criteriosamente devido os poucos estudos realmente conclusivos difundidos pela comunidade científica quanto a sua toxicidade (MATOSO, 2013).

2.5.2 Atividades Farmacológicas de *Morinda citrifolia* (Noni)

Segundo Pinheiro (2006) existe um grande interesse na utilização do noni na medicina popular devido às “supostas propriedades farmacológicas” que possui; chega-se a afirmar que alcance mais de 120 problemas de saúde que podem ser tratados, e até curados, com a planta e seus extratos. Não obstante o consumo do

sumo da fruta do noni fora dos trópicos aumentou dramaticamente durante a década dos anos 2000 (WEST et al., 2011).

De acordo com Lavaut e Lavaut (2003) muitos dos efeitos benéficos não são comprovados cientificamente, alguns estudos citam que entre os problemas tratadas com mais efetividade estão: a alergia, artrites, asma, câncer, depressão, diabetes, digestão, fadiga e cansaço, doenças do coração, rins, ciclo menstrual, doenças mentais, musculares, obesidade, dores de cabeça, apetite sexual, insônia e stress. O uso na medicina popular é vasto e além dos problemas de saúde citados inclui também: hipertensão, úlceras gástricas, problemas respiratórios, AIDS, problemas de circulação sanguínea, esclerose múltipla e dependência de drogas (McCLATCHEY, 2002; WANG et al., 2002; LAVAUT e LAVAUT, 2003; SINGH, 2012)

2.5.2.1 Efeito antimicrobiano

Desde meados dos anos 50 que a atividade antibacteriana de *M. citrifolia* é cientificamente reconhecida contra várias cepas de bactérias. Atkinson (1956) já relatou na época que o efeito antimicrobiano observado deveria ser pela presença de compostos fenólicos como acubina, L-aspersulodieo e alizarina no fruto, bem como compostos antraquinônicos das raízes. Entre as espécies que apresentaram susceptibilidade *in vitro* estão *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus morgaii*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Salmonella* e *Shigella* (SILVEIRA et al., 2011). Os extratos hexânico e etanólico de *M. citrifolia* demonstraram inibição de 89-95% contra o crescimento de *Mycobacterium tuberculosis* (SALUDES et al., 2002).

Estudos diversos mostraram atividade antifúngica considerável do noni e de seus extratos. Usha et al. (2010), por exemplo, demonstraram que a fruta contém um componente que interfere na conversão morfológica de *Candida albicans*, sendo assim promissora esta atividade nos casos de candidíase. Atividades contra fungos dermatófitos de difícil controle como *Tricophyton mentagrophytes* foram comprovadas em estudos *in vivo*, além disto, também foram comprovadas inibição de espécies dos gêneros *Penicillium*, *Fusarium* e *Rhizopus*. (JAYARAMAN et al., 2008; JAINKITTIVONG et al., 2009).

2.5.2.2 Efeito antioxidante

O suco do fruto Noni mostrou possuir um grande potencial para combater radicais livres de oxigênio reativos comprovados através de estudos de Wang et al. (2001). A capacidade de combater radicais ânions superóxido foi superior à vitamina C, picnogenol e semente de uva. Esta alta atividade antioxidante foi atribuída, inclusive, como sendo um dos mecanismos do efeito preventivo deste suco no estágio inicial da carcinogênese (WANG e SU, 2001).

Extratos polares de raízes, folhas e frutos de *M. citrifolia* possuem alta atividade antioxidante comprovada, sendo que tanto os extratos polares como apolares das raízes se mostraram mais potentes na atividade que qualquer tipo de extrato das folhas e frutos (ZIN et al., 2002).

Diante da popularidade do suco fermentado do Noni comercializado em escala industrial, é de grande relevância o estudo feito por Yang et al. (2012). Na comparação da atividade antioxidante dos sucos fermentados e não fermentados, foi constatado que após o processo fermentativo, o suco apresentou uma redução de 90% da capacidade antioxidante, o que valoriza o potencial do suco *in natura* sem passar pelo processo de fermentação.

2.5.2.3 Efeito anticarcinogênico

O suco do fruto do noni tem efeito preventivo no estágio inicial da carcinogênese foi comprovado através de estudos científicos que a prevenção da formação de adutos de DNA carcinogênicos e a atividade antioxidante propriamente dita podem contribuir para tal efeito (WANG e SU, 2001).

Nos estudos de Furusawa et al. (2003), a fração polissacarídica extraída do suco do fruto do noni mostrou atividade antitumorigênica em tumor ascístico de Sarcoma 180 em camundongos. No estudo foi alcançada uma taxa de cura entre 25% a 45% e foi proposto que a supressão do crescimento do tumor ocorreu por estimulação do sistema imune.

Pawlus et al. (2005) identificaram e isolaram uma quinona extremamente potente indutora de redutase, 2-metoxi-1,3,6-trihidroxiantraquinona, com uma potência 40 vezes maior que o melhor indutor conhecido, sulforafano. A molécula reportada fornece atividade mediada por indução de quinona redutase protetora

contra carcinogênese química. Embora a concentração seja muito baixa no fruto do noni, as propriedades biológicas mostram como uma promissora biomolécula para prevenir a fase de iniciação do câncer.

Diversas antraquinonas isoladas do Noni possuem potencial anticarcinogênico. Kamiya et al. (2010) estudaram o potencial de diversas antraquinonas isoladas da raiz de *Morinda citrifolia* L. e foram encontradas 10 antraquinonas, e entre estas os compostos 1,3-diidroxi-2-etoximetilantraquinona, 3-hidroxi-1-metoxi-2-metoximetilantraquinona, nordamnacantal, damnacantal e morindona que exibiram notável inibição contra o câncer ativo de animal. Destacou-se o composto morindona que foi o mais forte inibidor de todas as antraquinonas investigadas. Segundo os autores, estes resultados sugerem que as raízes de noni podem ser utilizadas como um alimento funcional com potencial anticancerígeno.

Recentemente, pesquisadores norte-americanos também trabalhando com raízes do noni, isolaram compostos com alta atividade inibitória contra células cancerosas de cólon e pulmão (LISHUANG et al., 2011). Uma das substâncias encontradas foi a antraquinona damnacanthal, sendo inclusive a maior constituinte das raízes, esta já foi relatada como sendo um potente e seletivo inibidor de tirosina quinase p56 (Lck) em uma variedade de tecidos. É também um inibidor da função do gene ras e mostra um efeito inibidor intensivo contra a topoisomerase II; além disso, atua como um agente imunomodulador.

2.5.2.4 Efeito analgésico

Um dos primeiros estudos conclusivos sobre a atividade analgésica do Noni foi o de Younos et al. (1990), sendo utilizado para isso o extrato aquoso liofilizado das raízes da *M. citrifolia* em camundongos. Usando para confirmação do efeito, a droga naloxona; o extrato apresentou uma significativa atividade analgésica central de maneira dose-dependente. Durante tal estudo o extrato da raiz a uma dose de 1600mg/kg mostrou-se não-tóxico. Também podem ser encontrados na literatura relatos sobre a atividade analgésica dos extratos alcoólicos das frutas de *M. citrifolia*, sendo encontradas até mesmo ações contra artrite (BASAR et al., 2010)

A atividade analgésica de *M. citrifolia* também foi investigada por Wang et al. (2002). O suco do fruto do noni (tipo comercial) nos estudos provocou analgesia, comprovada através do modelo de contorções produzidas com tartarato

de amônio em ratos. Quando o suco foi adicionado à água de beber dos roedores; a resposta analgésica encontrada foi dose dependente aumentando em 212% a tolerância à dor do grupo tratado na concentração de 20% quando comparado ao grupo placebo.

2.5.2.5 Efeito anti-inflamatório

Em estudos sobre as propriedades terapêuticas do extrato aquoso de *Morinda citrifolia*, McKoy et al. (2002) constataram atividade anti-inflamatória através da administração intraperitoneal do extrato da fruta, o que resultou na inibição do volume da pata no edema induzido por carragenina. No mesmo estudo, através da administração oral do extrato do Noni foi conseguida satisfatória inibição da resposta inflamatória induzida por bradicinina. Este efeito do sumo da fruta pode refletir uma ação mais ampla contra vários mediadores inflamatórios, os quais são referidos como sendo envolvidos no edema de pata induzido por carragenina.

No ano de 2011, Dussosoy et al. mostraram que o suco do fruto do Noni demonstrou uma capacidade de redução do edema da pata induzido por carragenina através da inibição direta das atividades da ciclooxigenase COX-1 e COX-2 e a produção de óxido nítrico (NO) e prostaglandinas E₂ (PGE₂) de uma forma dependente da dose.

Mais recentemente Huang et al. (2015) demonstraram experimentalmente que o extrato acetato etílico da fruta de *Morinda citrifolia* marcadamente reduziu IL-1 β que induz a expressão de COX-2 e diminuiu significativamente a secreção de IL-8. No estudo, doses altas do extrato etil-acetato do fruto do noni (100 e 200 μ g/ml) reduziram marcadamente a expressão de COX-2 induzida por IL-1 β ; o que mostrou alto potencial como substituto de drogas inflamatórias. Provavelmente o extrato etil-acetato pode inibir a expressão de COX-2 e IL-8 através da supressão da ativação de NF κ B. Com relação à IL-8, o extrato etil-acetato reduziu significativamente a secreção desta também em altas doses quando induzida por LPS, mostrando o seu potencial para interromper a excessiva quimiotaxia de neutrófilos durante a infecção bacteriana. No experimento ficou subentendido que a quercetina presente no extrato etil-acetato pode ser o maior contribuinte da inibição de COX-2 e IL-8. Também foi constatado que o extrato etil-acetato do noni pode impedir o circuito da resposta

inflamatória induzida por espécies reativas de oxigênio aliviando a produção de moléculas pró-inflamatórias.

Diante do uso altamente difundido de extratos, chás, sucos e fitopreparados em geral de *Morinda citrifolia*, das bioatividades de seus polissacarídeos já comprovadas, como por exemplo, a atividade antitumoral, da escassez de estudos estruturais e de aplicação biológica do seu PLS, percebe-se que o estudo da propriedade anti-inflamatória poderá abrir um novo campo de utilização deste vegetal. Além disso, este estudo pode sinalizar uma nova alternativa terapêutica ao tratamento da inflamação, visto que os medicamentos convencionais possuem muitos efeitos colaterais e toxicidade além de possibilitar uma possível diminuição de custos propiciando uso de recursos naturais.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade anti-inflamatória e antinociceptiva da fração polissacarídica sulfatada extraída da planta *Morinda citrifolia*(PLSn) através de modelos farmacológicos clássicos de inflamação aguda e nocicepção em camundongos.

3.2 Objetivos específicos

-Analisar o efeito do PLSn sobre o edema de pata induzido por carragenina, dextrana, histamina, serotonina e bradicinina;

-Avaliar o efeito do PLSn sobre a atividade da enzima mieloperoxidase no tecido da pata inflamado após edema de carragenina;

-Avaliar a atividade do PLSn sobre os critérios microscópicos de lesão tecidual no edema de pata induzido por carragenina;

-Determinar a ação do PLSn sobre a migração peritoneal de leucócitos e sobre o indicador de estresse oxidativo GSH (glutationa) após peritonite induzida por estímulo inflamatório da carragenina na cavidade peritoneal;

- Avaliar o potencial antinociceptivo do PLSn através do modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético;

-Avaliar o potencial antinociceptivo do PLSn nas fases do teste da Formalina.

4 METODOLOGIA

4.1 Animais experimentais

Para os protocolos experimentais foram utilizados 270 camundongos albinos (*Mus musculus*), variedade Swiss, adultos, pesando entre 20 a 25 gramas, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Piauí. Os animais foram acondicionados em gaiolas, mantidos em ambiente com temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$) e ciclo claro/escuro (12h/12h) controlados. Também foram mantidos com água e alimentação *ad libitum* até o momento da realização dos experimentos. Todos os tratamentos e procedimentos realizados estão de acordo com o Guia de cuidados em uso de animais do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Nos protocolos, os camundongos foram divididos em grupos de 6 animais.

4.2 Coleta do material e extração do polissacarídeo de *Morinda citrifolia*

Os frutos foram colhidos manualmente em uma propriedade localizada em Fortaleza – CE. Em seguida foi realizada uma pré-seleção, descartando os frutos danificados. O trabalho foi feita em parceria com o Laboratório de Polímeros da Universidade Federal do Ceará. O método de extração da fração polissacarídica do fruto de *M. citrifolia* foi realizado de acordo com modificações no método de Hirazumi e Furasawa (1999), com base em processos de centrifugação e liofilização sucessivos.

4.3 Ensaios para avaliação do efeito anti-inflamatório

4.3.1 Edema de pata induzido por carragenina

Inicialmente foram feitos testes com três doses do polissacarídeo de *Morinda citrifolia*(PLSn) para que pudesse ser estabelecida a dose com a melhor resposta anti-inflamatória e que assim fosse utilizada nos experimentos subsequentes (FURUSAWA et al., 2003). O edema foi induzido pela injeção intraplantar (i.pl.) de 50 μL de uma suspensão de carragenina (500 μg /pata) em solução salina estéril 0,9% na pata direita traseira dos camundongos. Um dos

grupos não recebeu nenhum pré-tratamento, somente o agente inflamatório (grupo I – grupo controle positivo). Os animais foram pré-tratados por injeção intraperitoneal (i.p.) com solução salina 0,9% (grupo II - grupo não tratado/controlenegativo), indometacina 10mg/kg (grupo III – grupo controle referência) ou PLSn (0,1; 1,0; 10mg/kg; grupos tratados IV, V, VI). O volume da pata foi mensurado por meio de plestismometria (Panlab LE75000), sendo as leituras realizadas antes do experimento (volume basal, V_0) e em 1, 2, 3 e 4 horas após o tratamento com carragenina (V_t) usando pletismômetro (WINTER, 1962).

O efeito do pré-tratamento foi calculado como porcentagem de inibição do edema relativa ao volume da pata do grupo controle não tratado que recebeu Solução salina 0,9% usando a seguinte fórmula:

$$\% \text{inibição do edema} = \frac{(V_t - V_0)_{\text{control}} - (V_t - V_0)_{\text{tratado}}}{(V_t - V_0)_{\text{control}}} \times 100$$

4.3.2 Determinação da atividade da Mieloperoxidase

Foi induzido edema pela injeção intraplantar de 50 μ L de uma suspensão de carragenina (500 μ g/pata) em solução salina estéril 0,9% na pata direita traseira dos animais. Os animais foram pré-tratados por injeção intraperitoneal de indometacina 10mg/kg (grupo I - grupo controle referência) ou PLS de *Morinda citrifolia* (na melhor dose escolhida no ensaio de edema de pata induzido por carragenina - grupo II) ou não receberam nenhum pré-tratamento (grupo III – grupo controle positivo). Um grupo de animais não recebeu estímulo inflamatório e recebeu apenas 50 μ L de Salina estéril 0,9% i.pl. (grupo IV – grupo controle negativo). Em seguida foram retirados segmentos da região sub-plantar dos animais dos grupos em estudo, que foram usados na avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO). O procedimento seguiu o protocolo estabelecido por Bradley et al. (1982).

A mieloperoxidase (MPO) é um marcador quantitativo da infiltração de neutrófilos nos processos inflamatórios em vários tecidos. Para mensurar a concentração dessa enzima, foi utilizado 50-100mg de tecido subcutâneo proveniente da pata, por animal, de cada grupo. Sucintamente, o tecido da pata traseira foi homogeneizado em 1 mL de tampão de potássio com 0,5% de brometo de hexadeciltrimetilamônio para cada 50 mg de tecido. Tal homogeneizado foi então

centrifugado a 4.000 rpm durante 20 min a 4°C. A atividade da MPO na suspensão foi então avaliada pela medida da alteração na absorbância a 450 nm utilizando o-dionisidina e peróxido de hidrogênio a 1%. O resultado foi expresso como sendo Unidade de MPO/mg de tecido.

4.3.3 Avaliação Histológica dos escores microscópicos de lesão inflamatória

Foi induzido edema pela injeção intraplantar de 50µL de uma suspensão de carragenina (500µg/pata) em solução salina estéril 0,9% na pata direita traseira dos animais. Os animais foram pré-tratados por injeção intraperitoneal de indometacina 10mg/kg (grupo I - grupo controle referência) ou PLS de *Morinda citrifolia* (na melhor dose escolhida no ensaio de edema de pata induzido por carragenina - grupo II) ou não receberam nenhum pré-tratamento (grupo III grupo controle positivo). Um grupo de animais não recebeu estímulo inflamatório e recebeu 50µL de Salina estéril 0,9% i.pl. (grupo IV – grupo controle negativo). Em seguida foram retirados segmentos da região sub-plantar dos animais dos grupos em estudo, que foram usados assim na avaliação histológica.

Depois disso, os fragmentos de tecido da pata foram analisados quanto aos escores microscópicos de lesão inflamatória, sendo os segmentos de tecido fixados em solução de formaldeído tamponado com fosfatos a 10% (pH=7), lavados e submetidos à desidratação gradual crescente com soluções alcólicas ascendentes de 30%, 50%, 70%, 90% em intervalos de uma hora cada e por fim no álcool absoluto por uma hora e meia. O processo de diafanização foi feito em xilol I por 45 minutos e em xilol II por mais 45 minutos, inclusão em parafina líquida para banho I durante 15 a 20 minutos a 80°C e parafina líquida para inclusão II a 80°C. Quando derretida e resfriada a parafina, essa foi aparada em um bloco que foi cortado com lâmina de aço pelo micrótomo (LUPETEC®, MRP 09). A desparafinização foi feita com xilol I por 7 minutos e mais 3 minutos com xilol II. Seguiu-se a hidratação com álcool absoluto por 7 minutos, álcool 90%, 75%, 50%, 30%, água destilada I e água destilada II por dois minutos cada. A coloração foi feita com hematoxilina por 2 minutos, banho em água corrente por 3,5 minutos, seguido da coloração eosina por 5 minutos e banho em água corrente, foi secado em temperatura ambiente e seguido para a montagem das lâminas para visualização em microscópio de luz (NOVA®). Foram obtidas uma lâmina para cada animal,

totalizando 6 lâminas por grupo. Em seguida, um histopatologista de forma randomizada avaliou a severidade da inflamação pela técnica descrita por Appleyard e Wallace (1995) de acordo com a Tabela 1 a seguir.

Tabela 1 -Avaliação dos escores microscópicos das lesões inflamatórias de animais com edema de pata induzido por carragenina (500µg/pata).

Critério	Escore
Tecido conjuntivo e epitelial saudáveis sem células inflamatórias visíveis	0
Tecido conjuntivo e epitelial com edema leve e células inflamatórias visíveis.	1
Tecido conjuntivo e epitelial com edema moderado e células inflamatórias visíveis	2
Tecido conjuntivo e epitelial com edema intenso e células inflamatórias, ocorrência de congestão de vasos sanguíneos visível.	3
Tecido conjuntivo e epitelial com edema grave e presença intensa de células inflamatórias, ocorrência de congestionamento vascular e vasodilatação vascular	4

Fonte:Modificado deAppleyard e Wallace, 1995.

4.3.4 Edema de pata induzido por diferentes agentes inflamatórios

Para indução de edema nos animais dos grupos, eles foram tratados com a administração de 50µL de Dextrana sulfato (500µg/pata), Serotonina (100µg/pata), Histamina (100µg/pata) e Bradicinina (6.0nmol/pata)na pata direita traseira (CLAUDINO et al., 2006; SILVA et al., 2013; BARBOSA et al., 2009; VASCONCELOS et al., 2011). Um grupo de animais recebeu50µLde solução Salina 0,9%na pata (grupo I – grupo controlenegativo).No experimento com bradicinina, os animais do grupo foram pré-tratados com captopril (5mg/kg i.p.) 1 hora antes da indução do edema por bradicinina para se prevenir a degradação sistêmica da bradicinina. No ensaio, os camundongos receberam somente os diferentes agentes flogísticos (grupos II, III, IV, V – grupos controlespositivos), ou receberam os tais agentes e também foram pré-tratados 30 min antes com melhor dose de PLS de *Morinda citrifolia*estabelecida no experimento com carragenina (grupos VI, VII, VII, IX – grupos tratados). O volume da pata dos animais foi mensurado por meio de

pletismometria (Panlab LE75000), sendo as leituras realizadas antes da administração dos agentes (volume basal, V_0) e em 30 min, 60 min, 90 min e 120 min para os diferentes grupos de animais. Os resultados foram expressos como sendo a variação do volume da pata (mL), calculado pela diferença entre o volume final e o volume basal em todos os tempos indicados.

4.3.5 Indução da peritonite

Inicialmente foi administrado por via i.p. 250 μ l de Solução salina 0,9% (grupo I - grupo controle negativo) ou 250 μ l de solução contendo 500 μ g de Carragenina na cavidade peritoneal (grupos II- controle positivo, III e IV). Aos animais dos grupos que receberam o inflamógeno foi dado por via i.p. antes da injeção de Carragenina: 1h antes Indometacina 10mg/kg (grupo III- grupo controle referência) ou 30min antes oPLS de *M. citrifolia* na melhor dose estabelecida no experimento com carragenina (grupo IV – grupo tratado). Os camundongos foram eutanasiados depois de 4 he a cavidade peritoneal foi lavada com 1,5 mL de PBS (Tampão fosfato heparinizado) para colher o fluido e as células peritoneais segundo metodologia adaptada por Chaves et al. (2013). Foram executadas contagem de células totais e contagem de células diferencial e mensuração dos níveis de GSH.

4.3.6 Determinação da Migração de leucócitos

Dos exsudatos peritoneais advindos do ensaio de peritonite foram realizadas as contagens total e diferencial dos leucócitos. Estas foram realizadas conforme metodologia descrita previamente por Souza e Ferreira (1985).

4.3.6.1 Contagem total de leucócitos

Para a contagem do número total de células presentes no lavado peritoneal foi utilizado 20 μ L do lavado após ser diluído em líquido de Tukey (380 μ L). Para a contagem, foi usada a câmara de Neubauer com auxílio de microscópio óptico sob aumento de 40x. Os resultados foram expressos como número total de leucócitos por cavidade.

4.3.6.2 Contagem diferencial de leucócitos

Para a contagem diferencial de leucócitos, alíquotas de 100µL da suspensão celular foram utilizadas para o preparo do citoesfregaço em centrífuga. A coloração foi realizada pelo método de Instant- Prov e a contagem diferencial foi realizada com auxílio de um microscópio óptico com objetiva de imersão em óleo sob aumento de 100x. Foram avaliadas as populações de células mononucleares e polimorfonucleares.

4.3.7 Análise dos níveis de Glutathione

Para avaliar os níveis de glutathione (GSH), foi utilizado o método de Sedlak e Lindsay (1968). Em suma, o lavado peritoneal foi centrifugado a 1500 rpm por 15 min a 4°C. Na sequência, alíquotas de 400 µL do homogeneizado foram misturadas a 320 µL de água destilada e a 80 µL de ácido tricloroacético (TCA) a 50% para precipitação das proteínas. Este material foi então novamente centrifugado a 3.000 rpm por 15 min a 4°C. A 400 µL do sobrenadante foi adicionado em 800 µL de tampão Tris 0,4 M (pH 8.9) e 20 µL de DTNB (Reagente de Ellman) 0,01M. A mistura foi então agitada por 3 min e a absorbância foi lida a 412 nm em espectrofotômetro. As concentrações de grupos sulfidrílicos não-protêicos foram expressas em µg de NP-SH/ml.

4.4 Ensaios para avaliação do efeito antinociceptivo

4.4.1 Contorções abdominais induzidas por ácido acético

Os animais receberam Salina 0,9% i.p. (grupo I - grupo controle negativo) ou uma solução de ácido acético 0,6% i.p. (grupos II- controle positivo, III e IV). Os animais foram tratados com a melhor dose de polissacarídeo de *Morinda citrifolia* estabelecida no experimento com carragenina (grupo III - grupo tratado) ou a substância Morfina por via subcutânea (s.c.) na dose de 5mg/kg foi usada como droga de referência (grupo IV - grupo controle referência). Após 30 min, os animais dos grupos III e IV tratados receberam uma injeção intraperitoneal de 250 µL de uma solução de ácido acético 0,6%. Decorridos 10 min da administração da solução

de ácido acético, o número de contorções abdominais foi determinado, para cada animal por um período de 20min. Uma contorção foi identificada como uma extensão das patas traseiras, acompanhadas de constrição do abdômen (KOSTER et al., 1959).

4.4.2 Teste da Formalina

Os camundongos receberam 20µL de solução Salina 0,9% i.pl. (grupo I - grupo controle negativo) ou receberam uma solução de formalina 2,5% (20µL) (grupos II- controle positivo, III e IV). Os animais foram tratados com a melhor dose de polissacarídeo de *Morinda citrifolia* estabelecida no experimento com carragenina (grupo III - grupo tratado) ou Morfina por via subcutânea (s. c.) na dose de 5mg/kg (grupo IV - grupo controle referência). Decorridos 30 minutos do tratamento dos grupos III e IV foi administrado formalina por via intraplantar na pata direita traseira de cada animal. O tempo de lambertura da pata (tempo de reatividade dos animais) foi registrado, em segundos, de 0-5 min (1° fase, correspondente à estimulação direta de nociceptores) e 20-25 min (2° fase, envolve a liberação de mediadores inflamatórios) após a injeção de formalina. (HUNSKAAR et al., 1987; FASMER et al., 1986).

4.5 Análise Estatística

De todos os experimentos foram calculadas as médias \pm EPM de certo número de eventos (n) em cada grupo, com exceção dos Escores histológicos que foram expressos como mediana.

A análise estatística dos dados foi realizada por meio de software GraphPad Prisma, versão 5.0. A diferença estatística entre os grupos foi determinada através de análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de comparações múltiplas de Newman Keuls e para os escores histopatológicos foi realizado por meio de teste de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de Dunn. Uma diferença de $p < 0,05$ foi considerada estatisticamente significativa.

4.6 Questões Éticas

O presente projeto foi realizado com base nos princípios e normas internacionalmente aceitas para utilização de animais em projetos de pesquisa e do COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal). O projeto foi submetido ao comitê de ética em pesquisa animal da Universidade Federal do Piauí – UFPI e aprovado sob Protocolo 123/2015 (ANEXO 1).

5 RESULTADOS

5.1 Efeito do PLS extraído de *M. citrifolia* (Noni) sobre o edema de pata induzido por carragenina

O PLS de *Morinda citrifolia* nas diferentes doses (0,1; 1,0 e 10 mg/kg) foi testado na tentativa de estabelecer a melhor dose do polissacarídeo que possuísse efeito anti-inflamatório satisfatório e que assim seria aplicada nos demais ensaios. A dose de 10mg/kg se destacou frente às outras doses testadas (Tabela 2), uma vez que provocou redução do edema de maneira significativa em todo o curso temporal do efeito testado (1h - 0,024 ±0,013 ml; 2h - 0,018±0,009 ml; 3h - 0,017±0,006 ml; 4h - 0,022±0,007 ml) quando comparado aos animais que receberam apenas o agente inflamatório carragenina (1h - 0,038 ±0,005 ml; 2h - 0,09± 0.017 ml; 3h - 0,1±0,013 ml; 4h 0,082±0,008 ml). Em face disso, a dose do polissacarídeo do Noni (PLSn) utilizada para os demais testes inflamatórios e de nocicepção foi a dose de 10mg/kg por via intraperitoneal.

Tabela 2 -Efeito do PLS extraído de *M. citrifolia* (Noni) sobre o edema de pata induzido por carragenina

Tratamento mg/kg	Volume da pata em ml (tempo após a administração do inflamógeno)			
	1h	2h	3h	4h
Sal	0.011 ± 0.004	0.001 ± 0.001	0.006 ± 0.003	0.006 ± 0.003
Cg	0.038 ± 0.005	0.090 ± 0.017	0.100 ± 0.005	0.082± 0.008
Indo 10	0.028 ± 0.007 (26,4%)*	0.016 ± 0.004 (82,3)*	0.014 ± 0.008 (86%)*	0.014 ± 0.007 (83%)*
PLSn 0,1	0.068 ± 0.006 (- 78,9%)*	0.082 ± 0.010 (8,9%)	0.096 ± 0.009 (4%)	0.083 ± 0.012 (-1,2%)
PLSn 1,0	0.044 ± 0.007 (-15,8%)	0.046 ± 0.006 (48,9%)*	0.070 ± 0.018 (30%)	0.058 ± 0.014 (29,3%)
PLSn 10	0.024 ± 0.013 (36,9%)*	0.022 ± 0.011 (75,6%)*	0.017 ± 0.006 (83%)*	0.022 ± 0.007 (73,2%)*

Valores são expressos como média ± E.P.M. em ml de pelo menos cinco animais por grupo, analisada pela análise de variância ANOVA seguida pelo teste de Newman Keuls ($p < 0.05$).

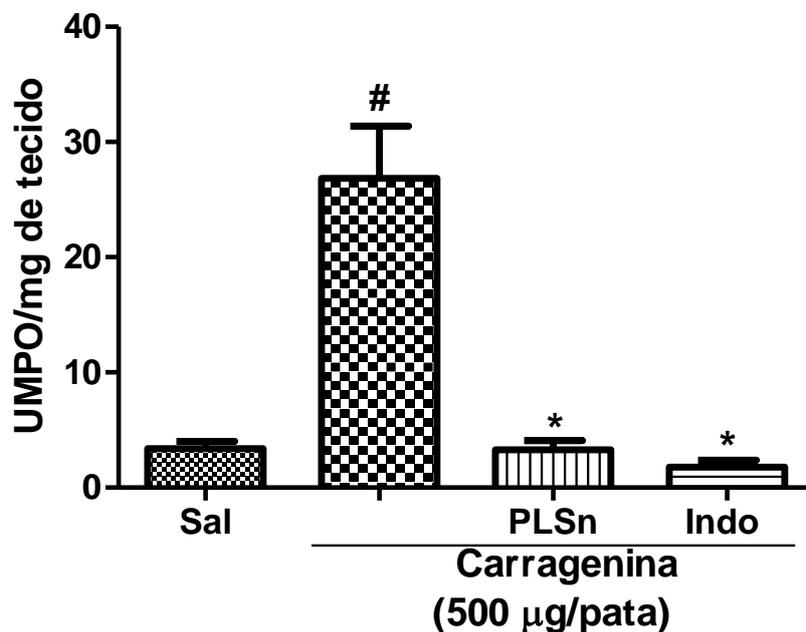
Legenda: PLSn: Polissacarídeo de *Morinda citrifolia*; Cg: carragenina; Sal: Salina; Indo: Indometacina.

*Comparado com o grupo Carragenina.

5.2 Efeito do PLSn sobre a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) na pata

O tecido da pata dos animais foi removido e a atividade da enzima MPO foi determinada após 4 horas da indução do edema de pata por Cg. Na Figura 6 observa-se que o grupo de animais pré-tratados com o PLSn na dose de 10 mg/kg ($3,27 \pm 0,807$ UMPO/mg) apresentou uma redução significativa ($p < 0,05$) na atividade dessa enzima, quando comparado com o grupo que recebeu somente Cg via intraplantar ($26,84 \pm 4,541$ UMPO/mg). A redução da atividade de MPO no grupo tratado com PLSn aproximou-se inclusive dos valores basais representados pelo grupo que recebeu apenas Salina 0,9% i.pl. ($3,36 \pm 0,6361$ UMPO/mg). Pela análise estatística não houve diferença relevante entre os resultados obtidos para os camundongos do grupo que recebeu PLSn (10mg/kg i.p.) + Cg (500 μ g/pata) e do grupo que recebeu somente Salina 0,9% i.pl..

Figura 6. Efeito do PLSn sobre a atividade da enzima mieloperoxidase na pata.

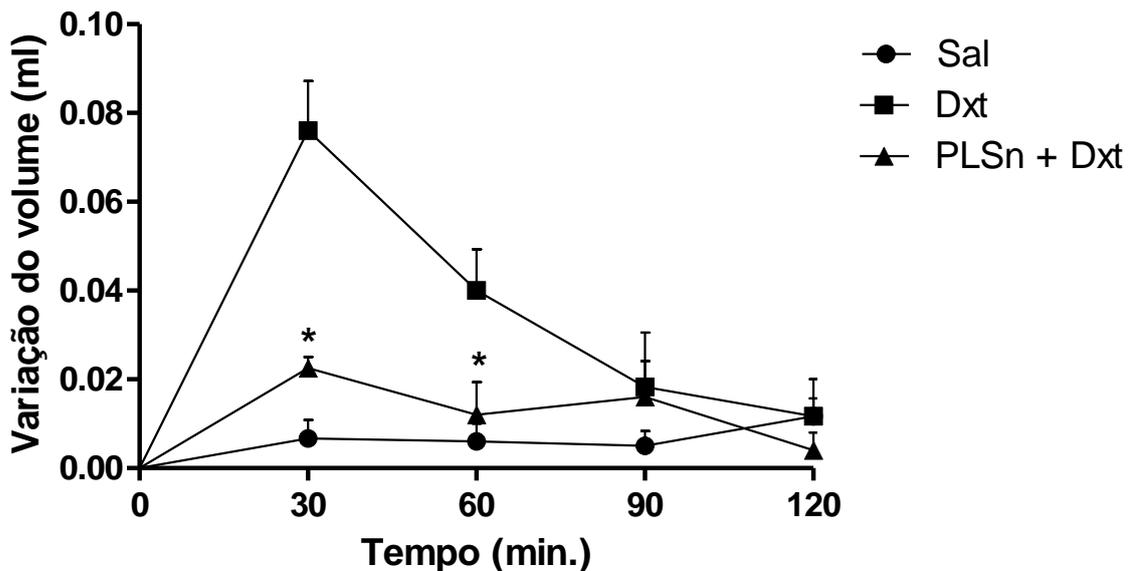


Atividade de MPO foi detectada 4 horas após a indução do processo inflamatório por injeção de Carragenina (i.pl.). Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. de unidades de MPO (UMPO)/mg de tecido. * $p < 0,05$ comparado com o grupo carragenina; # $p < 0,05$ comparado com o grupo salina. A análise estatística foi realizada por meio do teste de variância ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

5.3 Ação do PLSn sobre o edema de pata induzido por Dextrana

A injeção intraplantar de dextrana (500 μ g/pata) causou um intenso edema, com pico máximo nos primeiros 30 minutos (0,076 \pm 0,0112 ml), o que pode ser visto de forma clara na comparação com o grupo salina (0,006 \pm 0,004ml). O PLSn injetado por via intraperitoneal na dose de 10mg/kg, 30 minutos antes da administração do estímulo, reduziu o edema causado pela aplicação intraplantar de Dextrana (0,0225 \pm 0,0025 ml) no tempo 30 min que foi o pico do edema por Dextrana, causando redução significativa do edema também no tempo 60min (Dxt – 0,04 \pm 0,009 ml; PLSn + Dxt – 0,012 \pm 0,007 ml) como apresentado na Figura 7.

Figura 7. Ação do PLSn sobre o edema de pata induzido por Dextrana.



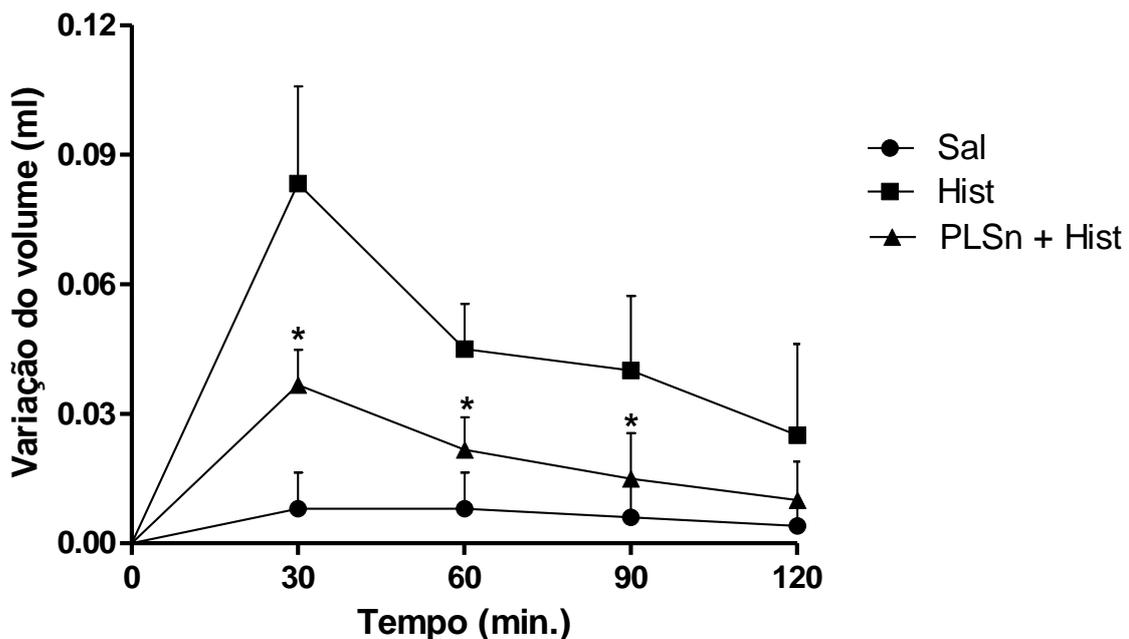
Os animais foram pré-tratados com PLSn (10 mg/kg) 30min antes da administração de Dextrana (500 μ g) na pata. O volume da pata foi medido no tempo 0, e 30 min, 60, 90 e 120min após a administração do agente flogístico para mensurar o edema. Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. da variação do volume da pata em ml. *p<0,05 comparado com o grupo dextrana. A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

5.4 Ação do PLSn sobre o edema de pata induzido por Histamina

Conforme mostra a Figura 8, os animais que receberam injeção intraplantar de Histamina (100 μ g) na pata sofreram formação de edema de maneira

mais acentuada no tempo 30min ($0,083 \pm 0,009$ ml), o que se confirma quando confrontados com os valores dos animais do grupo controle negativo que receberam apenas Salina 0,9% na pata (30min $-0,008 \pm 0,003$ ml), os animais do grupo Salina por sua vez apresentaram variação no volume da pata 10 vezes menor que o grupo Histamina. O edema se manteve relativamente constante e ainda acentuado nos tempos: 60min ($0,045 \pm 0,004$ ml) e 90 min($0,04 \pm 0,007$ ml) o que pôde ser verificado pelo intenso volume das patas dos animais que receberam o estímulo edematogênico. O PLSn(10mg/kg) foi capaz de diminuir o edema associado à injeção intraplantar de histamina de maneira significativa nos tempos: 30 min($0,036 \pm 0,003$ ml), 60 min ($0,021 \pm 0,003$ ml) e 90min ($0,015 \pm 0,004$ ml).

Figura 8. Ação do PLSn sobre o edema de pata induzido por Histamina.



Os

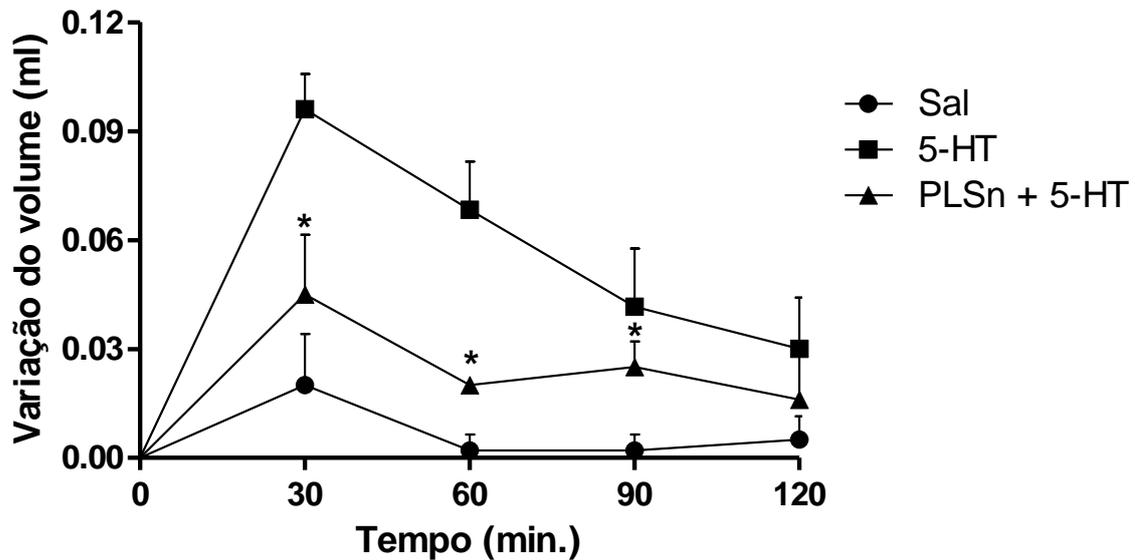
Os animais foram pré-tratados com PLSn (10 mg/kg) 30min antes da administração de histamina (100µg) na pata. O volume da pata foi medido no tempo 0 e após 30 min, 60, 90 e 120min da administração do agente flogístico para mensurar o edema. Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. da variação do volume da pata em ml. * $p < 0,05$ comparado com o grupo histamina. A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

5.5 Ação do PLSn sobre o edema de pata induzido por Serotonina

No edema de pata induzido por Serotonina (Figura 9), o grupo controle positivo recebeu injeção intraplantar do inflamógeno (5-HT 100 µg/pata) e

sofreu indução de edema verificado pelo aumento no volume das patas dos animais em comparação aos animais que receberam apenas Salina 0,9% (30min- 5-HT $0,096 \pm 0,004$ ml, Sal- $0,02 \pm 0,006$ ml; 60min- 5-HT- $0,0683 \pm 0,005$ ml, Sal – $0,002 \pm 0,002$ ml; 90min – 5-Ht - $0,048 \pm 0,002$ ml, Sal – $0,002 \pm 0,002$ ml; 120min – 5-HT - $0,03 \pm 0,005$ ml, Sal – $0,005 \pm 0,002$ ml). O composto testado PLSn (10mg/kg) diminuiu significativamente o edema provocado pela Serotonina de maneira acentuada no pico máximo do edema no tempo 30min ($0,035 \pm 0,002$ ml) e seguiu diminuindo o volume do edema consideravelmente tempos posteriores 60 min ($0,02 \pm 0,0$ ml) e 90 min ($0,025 \pm 0,02$ ml).

Figura 9. Ação do PLSn sobre o edema de pata induzido por Serotonina.



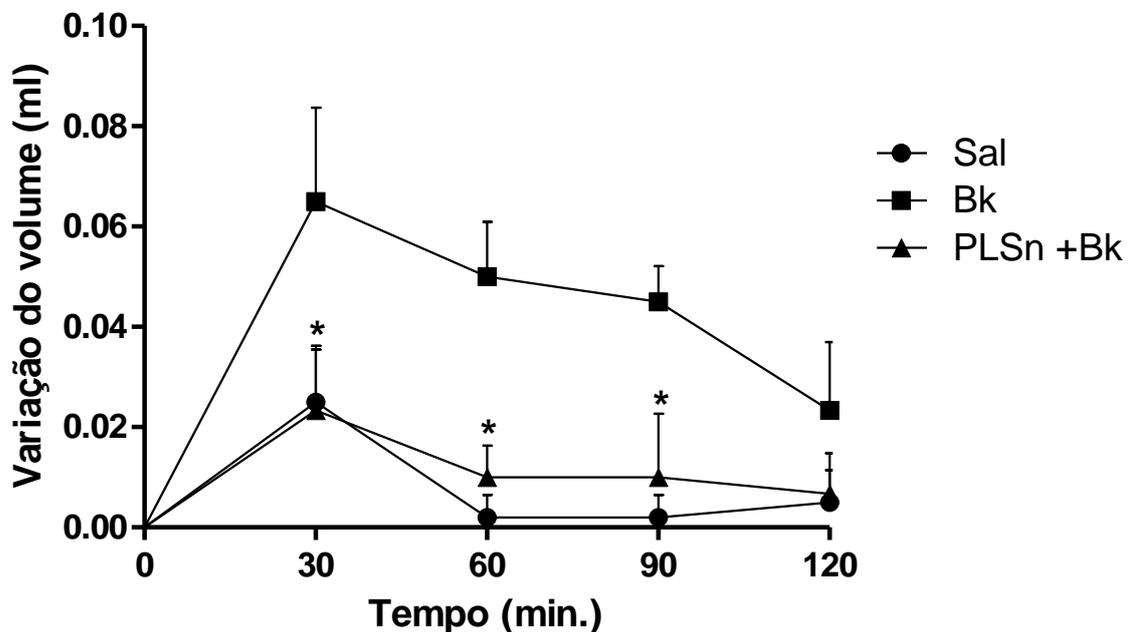
Os animais foram pré-tratados com PLSn (10 mg/kg) 30min antes da administração de Serotonina (100µg) na pata (i.pl.). O volume da pata foi medido no tempo 0 e após 30 min, 60, 90 e 120min da administração do agente flogístico para mensurar o edema. Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. da variação do volume da pata em ml. * $p < 0,05$ comparado com o grupo serotonina. A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

5.5 Ação do PLSn sobre o edema de pata induzido por Bradicinina

No edema de pata realizado, a bradicinina (0,6nmol/pata) causou edema intenso nos primeiros 90 min nas patas dos camundongos em relação aos que receberam apenas Salina 0,09% i.pl. (Figura 10), sendo mais proeminente no tempo 30 min (BK - $0,065 \pm 0,007$ ml, Sal - $0,025 \pm 0,005$ ml). OPLSn reduziu o nível de

edema em todos os tempos e deu-se de maneira significativa nos primeiros 90 min (30min- $0,023 \pm 0,004$ ml; 60min- $0,01 \pm 0,002$ ml; 90min- $0,01 \pm 0,005$ ml). Ao se analisar os valores das variações de volume na pata dos animais do grupo tratado com PLSn com os animais do grupo Salina (30min- $0,025 \pm 0,005$ ml; 60min - $0,02 \pm 0,02$ ml; 90min- $0,02 \pm 0,02$ ml; 120 min - $0,005 \pm 0,002$ ml), vê-se que são muito semelhantes ao ponto de não haver diferença estatística em nenhum dos pontos temporais verificados.

Figura 10. Ação do PLSn sobre o edema de pata induzido por bradicinina.



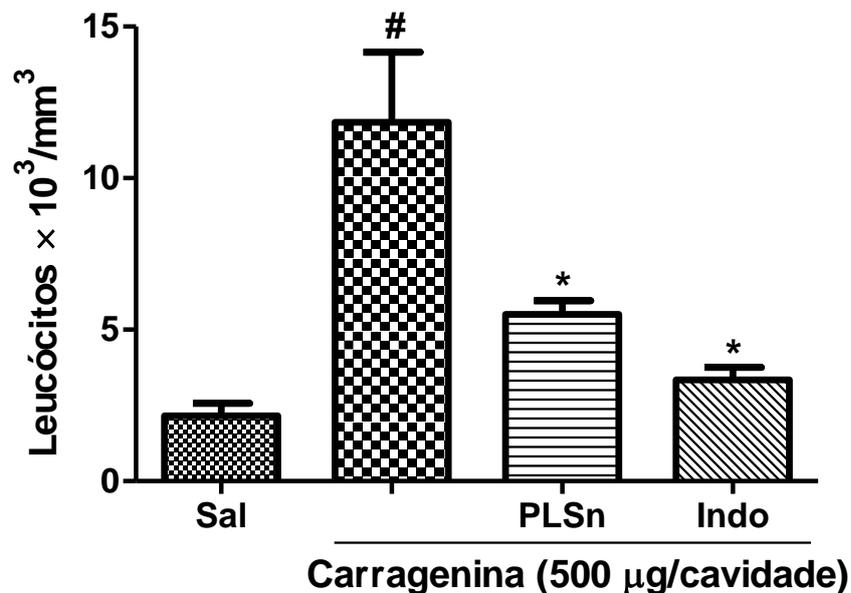
Os animais foram pré-tratados com PLSn (10 mg/kg) 30min e com Captopril (5mg/kg i.p.) 1h antes da administração de Bradicininina (0,6nmol) na pata (i.pl.). O volume da pata foi medido no tempo 0 e após 30 min, 60, 90 e 120min da administração do agente flogístico para mensurar o edema. Os resultados foram expressos como média \pm E.P.M. da variação do volume da pata em ml. * $p < 0,05$ comparado com o grupo bradicininina. A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

5.6 Efeito do PLSn na Contagem total de células na peritonite induzida por carragenina

Ao analisar a Figura 11 vê-se que o polissacarídeo do Noni na dose 10mg/kg inibiu em 46,41% ($5,5 \pm 0,46$) a migração de leucócitos para a cavidade

peritoneal dos animais quando comparado ao grupo que não recebeu nenhum tipo de tratamento, apenas 500µg de Carragenina na cavidade ($11,85 \pm 2,31$). Fica evidente o aumento na contagem de leucócitos ocasionada pela injeção i.p. do inflamógeno Cg ao se apreciar os valores desta contagem celular para o grupo que recebeu apenas Salina 0,9% via i.p. ($2,163 \pm 0,402$). Não houve também neste ensaio, diferença estatisticamente significativa na contagem total de leucócitos na cavidade peritoneal dos animais que receberam PLSn e Indometacina na dose de 10mg/kg como forma de tratamento ($3,35 \pm 0,405$).

Figura 11. Efeito do PLSn na Contagem total de células na peritonite induzida por carragenina.



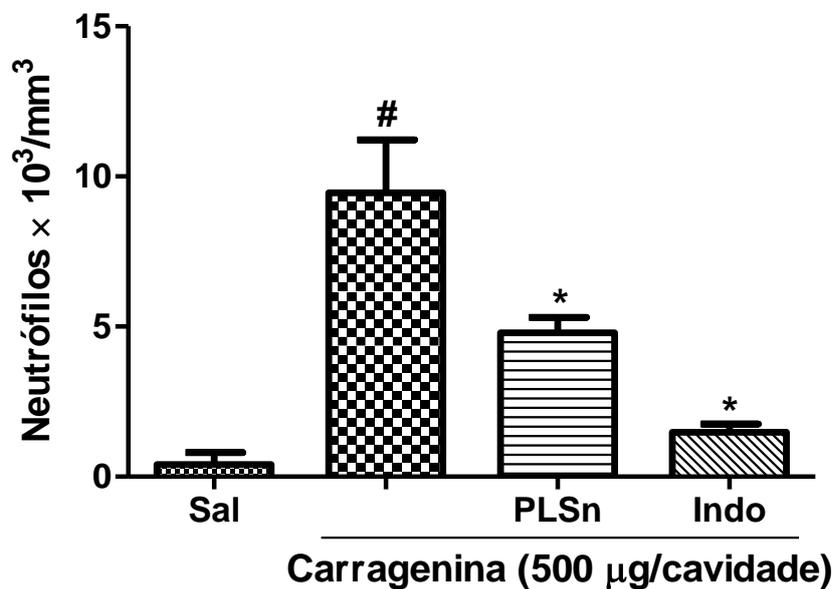
Os animais foram pré-tratados com 10 mg/kg de PLSn 30min antes da indução da peritonite com administração de carragenina (500µg) intraperitoneal. Os valores foram representados como média \pm E.P.M. de leucócitos totais. * $p < 0,05$ comparado com o grupo carragenina; # $p < 0,05$ comparado com o grupo salina. A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

5.7 Efeito do PLSn na Contagem diferencial de neutrófilos na peritonite induzida por carragenina em camundongos

A injeção de Carragenina (500µg) causou alta migração de neutrófilos ($9,456 \pm 1,759$) na cavidade peritoneal dos animais (Figura 12), o que pode ser visto

quando se analisa a contagem neutrofílica na cavidade peritoneal dos animais do grupo controle negativo que recebeu apenas Salina 0,9% ($0,4 \pm 0,4$). Em se tratando do grupo que recebeu o tratamento com PLSn vê-se que a diminuição da contagem de neutrófilos foi muito expressiva ($4,8 \pm 0,512$) quando comparada com o grupo que recebeu o inflamógeno sem nenhum tratamento.

Figura 12. Efeito do PLSn na Contagem diferencial de neutrófilos na peritonite induzida por carragenina.



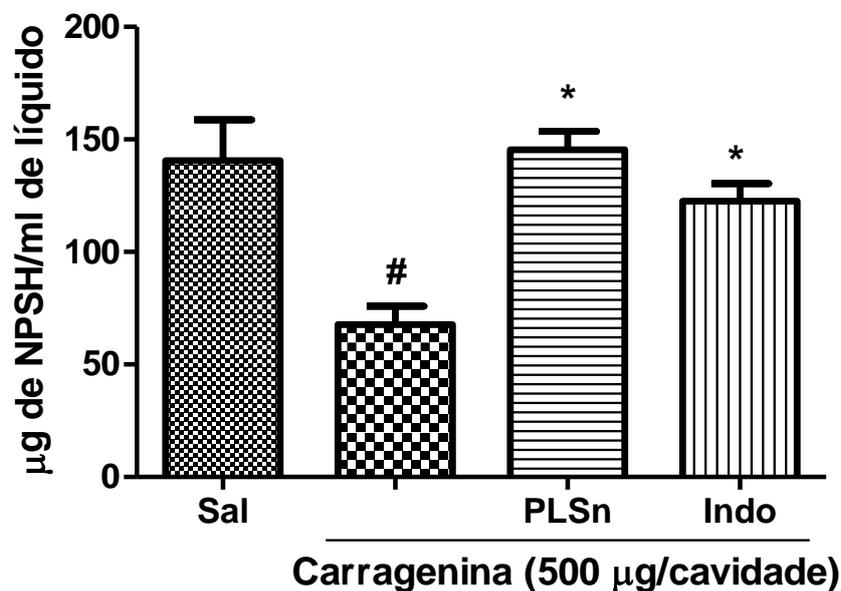
Os animais foram pré-tratados com 10 mg/kg de PLSn 30min antes da indução da peritonite com administração de carragenina (500µg) intraperitoneal. Os valores foram representados como média \pm E.P.M. de leucócitos totais. * $p < 0,05$ comparado com o grupo carragenina; # $p < 0,05$ comparado com o grupo salina. A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

5.8 Ação do PLSn sobre os níveis de GSH no exsudato peritoneal

Os camundongos passaram por processo de indução da peritonite e os animais do grupo de análise foram pré-tratados com 10mg/kg de PLSn i.p. De acordo com o que mostra a Figura 13, evidenciou-se que o grupo que não recebeu nenhum tratamento prévio, somente a injeção de carragenina 500µg ($67,75 \pm 8,128 \mu\text{gNPSH/ml}$), apresentou maior consumo de glutathiona no teste quando comparado com o grupo Salina ($140,6 \pm 18,19 \mu\text{gNPSH/ml}$). Observou-se ainda, que

o grupo que recebeu PLSn ($145,4 \pm 8,12 \mu\text{gNPSH/ml}$) manteve significativamente os níveis de GSH quando comparado com o grupo que recebeu apenas carragenina intraperitoneal em que houve alto consumo da enzima. O grupo PLSn não apresentou inclusive, nenhuma diferença estatisticamente significante com o grupo controle negativo que recebeu apenas Salina 0.9% e com o grupo que recebeu a droga de referência Indometacina 10mg/kg ($122,6 \pm 7,72 \mu\text{gNPSH/ml}$).

Figura 13 – Ação do PLSn sobre os níveis de GSH no exsudato peritoneal.



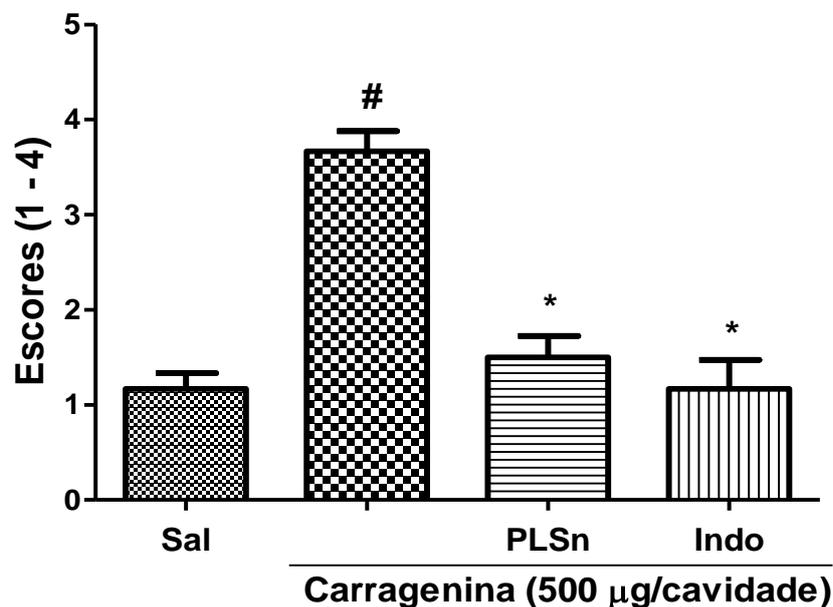
Os animais foram pré-tratados com 10 mg/kg de PLSn 30min antes da indução da peritonite com administração de carragenina ($500\mu\text{g}$) intraperitoneal. Os animais foram eutanasiados após as 4 horas da indução da peritonite. Os valores foram expressos como média \pm E.P.M. de μg de NPSH/ml de líquido. * $p < 0,05$ comparado com o grupo carragenina; # $p < 0,05$ comparado com o grupo salina. A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

5.9 Efeito do PLSn sobre os critérios microscópicos de lesão do tecido da pata no edema induzido por Carragenina

Após submetidos ao edema de Carragenina, o tecido da pata dos animais foi coletado para análise histológica. Os resultados mostram que os animais do grupo Salina apresentaram as menores pontuações de escores microscópicos para os parâmetros avaliados (Figura 14, coluna A), através da análise da fotomicrografia fica evidente a manutenção da arquitetura tecidual e o baixo número de células

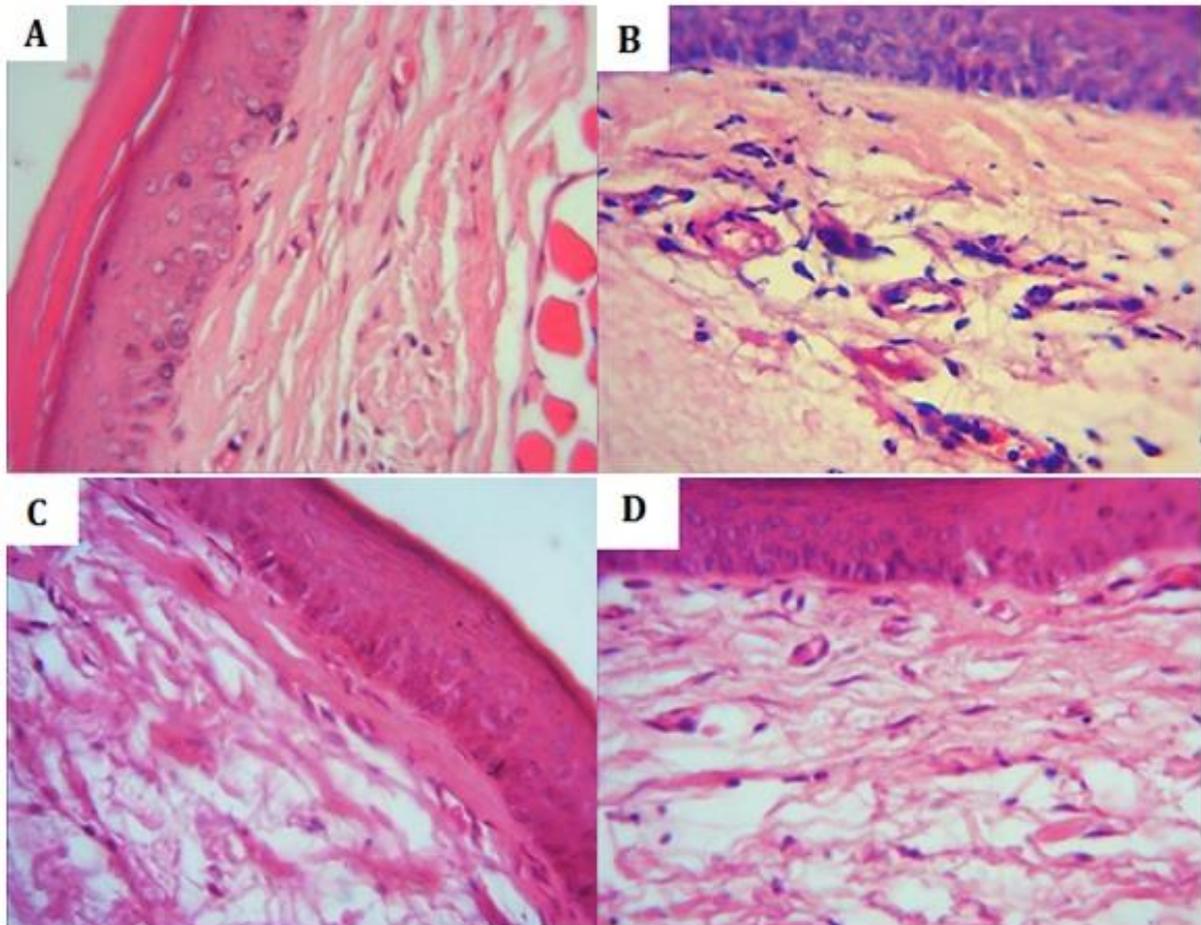
inflamatórias no tecido (Figura 16A). Em contraste, o grupo que recebeu a injeção i.pl. de Carragenina apresentou significativa mudança do aspecto tecidual com alta infiltração de células inflamatórias, atingindo uma pontuação de escores com média de $3,66 \pm 0,210$ (Figura 15, coluna B) e representado pela Figura 16B. O PLSn (10 mg/kg, i.p.) conforme mostrado na Figura 14-coluna B e Figura 15C mostrou capacidade de diminuir o dano tecidual com uma significativa diminuição dos parâmetros ($p < 0,05$) em comparação ao grupo controle-positivo (Carragenina). Como estabelecido por seu mecanismo de ação, a Indometacina agiu com potência anti-inflamatória esperada reduzindo os escores microscópicos avaliados (Tabela 15) quando comparados com o grupo Carragenina e representado pela Figura 16D. O PLSn agiu com potência semelhante à Indometacina na diminuição dos escores histológicos de inflamação sem existir diferença estatística significativa entre os dois grupos ($p < 0,05$).

Figura 14. Efeito do PLSn nos Escores de lesão microscópica histológica da pata.



Os escores de lesão foram mensurados após o edema de pata induzido por Carragenina (500µg/pata). A avaliação de escores microscópicos foi realizada conforme proposto por Appleyard e Wallace, 1995. Os resultados foram expressos como medianas com mínimo e máximo. A análise estatística foi realizada por meio do teste não-paramétrico Kruskal–Wallis, seguido pelo Teste de múltiplas comparações de Dunn's usado para avaliação histológica. * $p < 0,05$ quando comparado ao grupo Carragenina. # $p < 0,05$ quando comparado ao Grupo Salina.

Figura 15. Microfotografia (200x, escala 50 μm) representando o efeito do PLSn sobre os danos microscópicos da lesão tecidual provocado pelo edema de pata induzido por Carragenina.



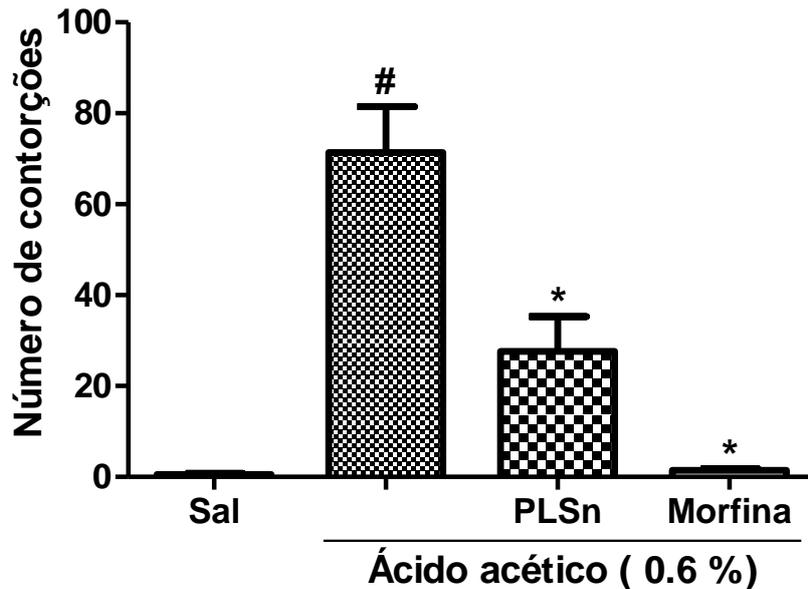
Tecido da pata de um animal que recebeu apenas solução salina a 0,9% por via i.pl.(A); tecido da pata de um animal que recebeu apenas Carragenina 500 μg /pata (B); tecido da pata de um animal com edema por Carragenina e tratado PLSn (10 mg/kg, i.p.) (C); tecido da pata de um animal com edema por Carragenina e tratado com Indometacina (10 mg/kg, i.p.) (D).

5.10 Ação do PLSn sobre as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético

A injeção intraperitoneal de ácido acético 0,6% provocou alto número de contorções abdominais nos camundongos do grupo controle positivo mostrado na coluna B da Figura 16(71,4 \pm 10,07 contorções), já o grupo que não recebeu o indutor de dor e nenhum tratamento (grupo Sal) não teve número de contorções abdominais acentuado durante o teste (0,571 \pm 0,202 contorções). O tratamento pela via intraperitoneal com o PLSn reduziu, de forma significativa o número de contorções

abdominais após 30 minutos da sua administração. Deste modo, foi observada redução de 61,34% ($27,6 \pm 7,724$ contorções) no número de contorções no grupo PLSn quando comparado ao grupo que recebeu apenas ácido acético 0,6%.

Figura 16. Ação do PLSn sobre as contorções abdominais induzidas pelo ácido acético.



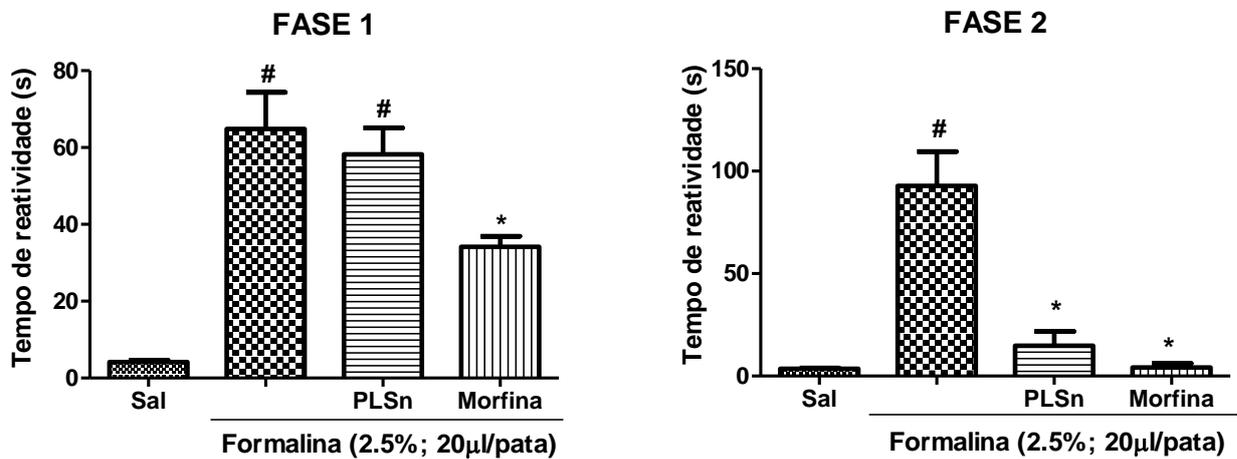
Os animais foram pré-tratados com 10 mg/kg de PLSn 30min antes da injeção de Ácido acético 0,6% (250µL) por via i.p. Após 10 min da administração da solução de ácido acético, o número de contorções abdominais foi determinado, para cada animal por um período de 20min. Os valores foram expressos como média ± E.P.M. do número de contorções * $p < 0,05$ comparado com o grupo carragenina; # $p < 0,05$ comparado com o grupo salina. A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

5.11 Efeito do PLSn na Reatividade dos animais nas fases do Teste da formalina

Neste modelo verificou-se que o PLS de *Morinda citrifolia* administrado por via intraperitoneal na dose de 10 mg/kg, possui significativo efeito antinociceptivo na segunda fase do Teste de Formalina (fase inflamatória), como mostra a figura 15. Ficou evidente também que a Formalina foi capaz de induzir o efeito doloroso nos animais, o que está representado na Figura 17 pelo maior tempo de reatividade dos animais do grupo nas duas fases do teste (1º Fase - $64,8 \pm 9,568$ s, 2º Fase $69 \pm$

18,63s). O efeito antinociceptivo do PLSn foi tão acentuado na segunda fase do teste que diminuiu a reatividade dos animais causada pelo efeito de dor em 84,04% (92,75±16,78s) quando comparado ao grupo que recebeu apenas injeção de formalina 2,5%, agindo também com potência semelhante a Morfina (4,2 ± 1,98 s) na segunda fase não existindo diferença estatística significativa entre os grupos PLSn e Morfina.

Figura 17. Efeito do PLSn na Reatividade dos animais nas fases do Teste da formalina.



Os animais receberam 20µL de solução de formalina a 2,5% na pata e receberam 30 min antes PLSn (10mg/kg por via i.p). Os valores foram expressos como média ± E.P.M. de nmol/ml de MDA. *p<0,05 comparado com o grupo carragenina; #p<0,05 comparado com o grupo salina. A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA seguido pelo teste de Newman-Keuls.

6 DISCUSSÃO

A inflamação é uma reação fisiológica do tecido vascularizado a estímulos endógenos ou exógenos que podem causar dano celular e tecidual, podendo haver a prevenção ou progressão da mesma pelo isolamento ou destruição do agente lesivo com a finalidade de restaurar a homeostase dos tecidos (SUGIMOTO et al., 2016; FLOWER e PERRETTI, 2005). Este processo envolve diferentes tipos de células, tais como macrófagos, mastócitos, células dendríticas, granulócitos e os linfócitos inatos (ZHOU et al., 2014). Embora a inflamação aguda seja benéfica para o organismo, a inflamação crônica contribui para a etiologia de muitas doenças entre elas o câncer, doenças cardiovasculares e diabetes (MARNETT, 2012).

Os processos inflamatórios descontrolados são, sem dúvida, problemas bastante comuns em nosso dia a dia. E, por esta ocorrência frequente, medicamentos anti-inflamatórios são muito utilizados. Mesmo diante do progresso no desenvolvimento de novos fármacos com fins terapêuticos nas últimas décadas, ainda existe uma busca ativa por anti-inflamatórios potentes e efetivos seja pela falha da terapêutica atual que possui evidentes efeitos colaterais ou pela necessidade iminente devido ao envolvimento do processo inflamatório em doenças de alta morbidade e mortalidade.

Nesta busca, surge a necessidade do uso de modelos animais, que no caso, para o estudo da inflamação acontece geralmente com uso de roedores (camundongos e ratos). A utilização de animais acontece, em parte, por razões históricas, mas também por causa dos custos de manutenção, facilidade de reprodução, disponibilidade de um grande número de variantes genéticas e a capacidade de pronta manipulação de suas células e tecidos para desenvolver modelos que se assemelham a doenças humanas (WEBB, 2014).

A demanda por novas moléculas com potencial anti-inflamatório que sejam eficazes e com efeitos adversos menores é contínua e necessária. Compostos e diferentes frações do arbusto *Morinda citrifolia* (Noni) possuem diferentes relatos no meio científico de propriedades biológicas, entre elas a propriedade anti-inflamatória. No entanto, mesmo com os diversos estudos, ainda não há na literatura nenhuma pesquisa acerca da propriedade anti-inflamatória da fração polissacarídica sulfatada extraída do Noni (PLSn), o objetivo deste trabalho.

Um dos modelos mais clássicos para estudo da inflamação aguda é o edema de pata induzido por carragenina. O método foi introduzido por Winter em 1962, sendo ainda hoje, amplamente utilizado e valioso para análise de novas terapias anti-inflamatórias. A formação de edema está entre os sinais iniciais da inflamação, é causado pela ação de mediadores inflamatórios que provocam o aumento do fluxo sanguíneo para o tecido inflamado através do aumento da dilatação arterial e do aumento da permeabilidade microvascular (RICCIOTTI e FITZGERALD, 2011); sendo desta maneira, a formação de edema muito utilizada para estudo da inflamação aguda.

O edema de pata por carragenina foi desde muito tempo reconhecido como uma resposta inflamatória caracterizada por edema de pata dependente da infiltração de neutrófilos e do aumento dos níveis de mediadores inflamatórios que operam em uma sequência para produção da resposta inflamatória (VINEGAR et al., 1969). O edema é bifásico, onde a primeira fase é atribuída à ação de mediadores como histamina, serotonina e bradicinina aumentando a permeabilidade vascular. A segunda fase é caracterizada por um excesso de produção de prostaglandinas e um infiltrado de neutrófilos de grande intensidade (DAMASCENO et al., 2014; BARROS et al., 2004). A carragenina também é importante no estudo da nocicepção, pois provoca a sensibilização de nociceptores, quando estimulados de forma mecânica ou térmica (SOUZA, 2013).

Nesse estudo, foram utilizadas inicialmente no edema de pata por carragenina três doses diferentes de PLSn (0,1; 1,0 e 10 mg/kg) aplicadas intraperitonealmente nos diferentes grupos de camundongos, de maneira a se estabelecer a concentração que teria efeito anti-inflamatório satisfatório. Foi demonstrado que a fração polissacarídica isolada dos frutos do Noni (*Morinda citrifolia*) inibiu o edema de pata induzido por carragenina em camundongos na dose de 10mg/kg.

Por apresentar um efeito estatisticamente significativo no modelo inflamatório durante todo o tempo de análise do edema de carragenina, a dose de 10mg/kg foi utilizada nos demais ensaios desta pesquisa. A dose de 10mg/kg se apresentou bem menor que a dose que alcançou efeito antitumorigênico contra um sistema de tumor de Sarcoma 180 em estudos de Furusawa et al. (2003); na

ocasião a dose de 5mg/camundongo (aproximadamente 25mg/kg) alcançou taxa de cura para o tumor entre 25-45% na avaliação.

Muitos polissacarídeos de plantas têm sido investigados pelo seu potencial anti-inflamatório e apresentado resultados positivos. Dessa forma, os resultados presentes corroboram com esta premissa. Outros exemplos de frações de PLS originários de plantas superiores que apresentaram ação de redução do edema de carragenina são os estudos das espécies *C. ferrea* (vagem) e *A. indica* (tegumento da semente) (PEREIRA 2011; PEREIRA et al., 2012).

Em estudo de Dussosoy et. al. (2014), o suco do fruto do Noni administrado por via intraperitoneal e por via oral, diminuiu significativamente o edema da pata 3 horas após a injeção de carragenina de maneira equivalente ao fármaco padrão indometacina. Considerando que o suco do fruto do noni apresentou no estudo citado ação antiedematogênica no edema de pata por carragenina e considerando também os resultados alcançados no presente estudo, pode-se inferir que os polissacarídeos presentes no fruto de *M. citrifolia* são responsáveis, pelo menos em parte, pela ação anti-inflamatória do suco do fruto da planta, ação essa já muito difundida pela cultura popular. A diminuição do nível do edema aconteceu em todo o curso temporal analisado no experimento de edema por carragenina (englobando assim, as duas fases deste modelo), o que pode indicar uma ação antiedematogênci multimedida para o PLSn.

Sabe-se que o edema de carragenina é considerado um edema geral, sendo formado pela ação de inúmeros mediadores. De forma a esclarecer a participação dos possíveis mediadores inflamatórios e eventos envolvidos no efeito do PLSn, utilizou-se alguns importantes agentes inflamatórios para indução de edema de pata durante a execução experimental deste trabalho, como será descrito a seguir.

Pesquisas no ano de 1956 feitas por Rowley e Benditt já relatavam a capacidade da dextrana em causar inflamação. O edema de pata provocado por dextrana é caracterizado pela liberação de aminas vasoativas como histamina e serotonina decorrentes da degranulação de células mastocitárias (CARNEIRO et al., 2014; MOTOYAMA et al., 2016). Ocorre aumento da permeabilidade vascular, provocando osmose com formação de exsudato caracterizado por níveis reduzidos de proteínas e neutrófilos (SOUZA et al., 2007; CALIXTO et al., 2004).

O PLSn causou redução do edema por dextrana de maneira significativa durante seu pico (30 min). De acordo com tal achado, o mecanismo pelo qual a fração de polissacarídeos de *M. citrifolia* exerce seu efeito antiedematogênico parece incluir, como alvos de inibição, mediadores osmóticos envolvidos no edema elicitado pela dextrana, bem como outros diferentes mediadores envolvidos neste edema (histamina e serotonina, por exemplo).

Os polissacarídeos podem ser encontrados em microrganismos (fungos, leveduras e bactérias), algas, plantas e animais em diferentes arranjos físicos e químicos com biomoléculas (LIU et al., 2014). Não obstante, o efeito anti-inflamatório apontado neste estudo para o PLS da planta *Morinda citrifolia* em diferentes modelos de inflamação vêm sendo visto também em diferentes exemplares de PLS originários de diversas fontes com comprovação científica.

A fração polissacarídica da alga marinha *Gracilaria caudata* mostrou, em trabalho recente, a capacidade semelhante ao PLSn de diminuir em quase 50% o edema de pata por dextrana quando comparado o grupo controle positivo (MARQUES et al., 2014). Motoyama et al. (2016) verificaram que a ação anti-inflamatória da fração polissacarídica de cianobactérias da espécie *Aphanothece sacrum* envolve inúmeros alvos, resultando em supressão da função de mediadores inflamatórios, inclusive dos mediadores envolvidos no edema por dextrana também testado no trabalho.

O efeito do PLSn sobre o edema de dextrana abriu precedente para investigação do efeito desta fração de macromoléculas sobre a ação de outros mediadores. Partindo do comprovado na literatura que a histamina e a serotonina participam na formação do edema por carragenina e que são substâncias liberadas pelos mastócitos e que por sua vez, sofrem degranulação na presença de dextrana (DIAS et al., 2014), o edema causado por esses dois compostos na pata dos camundongos também foi investigado.

A histamina e a serotonina desencadeiam ação rápida sobre a vasculatura (ASHLEY et al., 2012) e estão entre os mediadores inflamatórios responsáveis pela vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular durante o processo da inflamação (GOSSLAU et al., 2011). Isso, por sua vez, provoca o rubor pelo consequente aumento de sangue no local que sofreu a lesão (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004) e também o edema, pois promove extravasamento de

fluido rico em proteínas de alto peso molecular, do compartimento intravascular para o interstício(ALLER et al., 2007).

Essas aminas vasoativas (histamina e serotonina) participam também da formação de outro sinal cardinal da inflamação: a dor. Juntamente com outros mediadores inflamatórios, a serotonina e a histamina participam da ativação de nociceptores contribuindo para a dor inflamatória (VERGNOLLE, 2008).

Assim como ocorreu nos modelos experimentais com carragenina e dextrana, o tratamento com PLSn também inibiu a formação edema de pata por histamina e por serotonina quando comparados ao grupo controle. Dessa maneira, os resultados apresentados neste estudo, sugerem uma possível ação anti-inflamatória da fração polissacarídica do Noni sobre o bloqueio da vasodilatação e do aumento da permeabilidade vascular, eventos que ocorrem normalmente na inflamação, visto que já foi estabelecido que a resposta inflamatória induzida pelas aminas está em grande parte relacionada à vasculatura.

De forma semelhante aos resultados para o PLSn aqui em estudo, Pereira et al. (2012) verificaram que os polissacarídeos sulfatados da árvore conhecida como pau ferro ou jucá - *Caesalpinia ferrea* diminuíram o edema por histamina (65%) e serotonina (62%). Já em estudos com a própria *Morinda citrifolia*, Okusada et al. (2014) mostraram que o extrato da raiz CHCl₃-solúvel a 3 g/kg por via oral reduziu significativamente o edema de histamina em camundongos. Segundo Jethani et al.(2014) o efeito anti-inflamatório do Noni pode ser devido à inibição da Histamina endógena.

Outro modelo animal utilizado para verificar a ação antiedematogênica do PLSn foi o edema de pata induzido por bradicinina. A bradicinina é uma relevante substância mediadora do sistema calicreína-cininas que age estimulando uma gama de processos fisiológicos (MOREAU et al., 2005). É um peptídeo vasoativo formado no plasma envolvido no processo da dor (HARIZI et al., 2008); está entre os mediadores da inflamação que alteram intensamente as funções de barreira dos pequenos vasos e que aumentam a permeabilidade dos capilares e vênulas à água e proteínas, facilitando a chegada de células e fatores solúveis, como anticorpos e proteínas de fase aguda, ao sítio de lesão tecidual (ALLER et al., 2007).

Do mesmo modo que ocorreu nos outros edemas, o PLSn exibiu efeito positivo sobre a redução do edema de pata causado por bradicinina em

camundongos. O efeito sucedeu-se de maneira tão proeminente que os animais que receberam o pré-tratamento com PLSn 10mg/kg antes da administração do inflamógeno bradicinina e os animais que receberam apenas injeção de salina na pata (grupo controle negativo) não mostraram nenhuma diferença estatisticamente significativa nos volumes de suas patas.

Sabe-se que a cultura polinésia tem uma rica herança de conhecimento sobre os usos medicinais do Noni que foram transmitidos ao longo de muitas gerações (WANG et al.,2013); sendo o suco do fruto usado correntemente para alívio das inflamações (CHAN-BLANCO et al., 2006), porém o conhecimento científico, de fato, ainda é muito pequeno. Nesse sentido, muitas pesquisas têm sido feita na busca de esclarecer as reais propriedades biológicas da espécie *M. citrifolia*. A suposta ação anti-inflamatória tem sido muito explorada se utilizando de diversos modelos experimentais de inflamação.

Nesse sentido, os resultados encontrados no presente estudo solidificam achados sobre o Noni em outras pesquisas. Marsha-lyn et al. (2002) relatou que a respostas inflamatórias induzidas pela bradicinina e também pela carragenina foram inibidas rapidamente em ratos que foram pré-tratados oral ou intraperitonealmente com extrato do sumo de fruta do noni. Mais uma vez, pode-se inferir que a atividade anti-inflamatória do suco da fruta de *M. citrifolia* deva se dar, pelo menos em parte, devido à sua composição polissacarídica.

Em vista do fato de que a histamina, serotonina e bradicinina estão envolvidas no processo de dor inflamatória, os resultados alcançados pelo polissacarídeo em questão sobre o edema de pata de histamina, serotonina e bradicinina já sinalizam também a possibilidade de um efeito antinociceptivo do PLSn, o que ratificou como conveniente outro objetivo deste trabalho em avaliar uma possível ação antinociceptiva do PLSn.

Considerando que a inibição da migração leucocitária também é um dos efeitos proeminentes de fármacos anti-inflamatórios, o teste da peritonite induzida pela carragenina foi executado com a finalidade de avaliar a influência do PLSn na migração de leucócitos para cavidade peritoneal após injeção do inflamógeno.

A migração de leucócitos, em especial de neutrófilos, para o local inflamado colabora de maneira importante para o processo inflamatório contribuindo para destruição de patógenos e para cicatrização de tecidos (MEDZHITOV, 2008).

Por outro lado, a ativação destas células induz o metabolismo oxidativo caracterizado por um intenso consumo de oxigênio e produção de substâncias reativas, mas que sob certas circunstâncias podem promover estresse oxidativo e lesão tecidual (LINO, 2011).

É perceptível a importância da ação anti-inflamatória de fármacos na inibição da migração neutrofílica, pois no processo de resolução da inflamação deve acontecer a neutralização e eliminação do agente agressor, normalização da permeabilidade vascular, cessação da infiltração leucocitária, apoptose dos neutrófilos dentre outros eventos (GILROY et al., 2004).

Neste sentido, a quantificação de leucócitos através do uso de uma câmara de Neubauer e posterior contagem diferencial permite avaliar a influência de drogas neste parâmetro da resposta inflamatória, sendo particularmente sensíveis a anti-inflamatórios esteroidais. Os mediadores inflamatórios também podem ser avaliados e dosados no exsudato inflamatório obtido da lavagem do peritônio (LAPA et al., 2003).

De forma semelhante, tal resultado já foi encontrado para outros polissacarídeos, como os isolados de *Hypnea musciformis* que reduziram a contagem total de leucócitos e diferencial de neutrófilos na cavidade peritoneal de forma expressiva não havendo diferença estatística com o grupo controle negativo (BRITO et al., 2013) e de *Agardhiella ramosissima* que também agiu diminuindo significativamente a contagem total e diferencial (BATISTA et al., 2014).

Corroborando com todos os outros resultados, a migração leucocitária na cavidade peritoneal foi fortemente inibida pelo PLSn, fato comprovado pela diminuição expressiva do número total de células leucocitárias e relativa de neutrófilos no líquido peritoneal dos camundongos que receberam carragenina i.p. e também o tratamento com a fração. De acordo com os dados do teste de peritonite aliados aos resultados já listados, pode-se supor que o PLSn diminuiu a migração de neutrófilos, pela diminuição da produção e liberação de citocinas pró-inflamatórias e/ou do bloqueio das suas ações e conseqüente redução do processo inflamatório.

A atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) correlaciona-se com o recrutamento de neutrófilos nos tecidos em condições inflamatórias tanto agudas como crônicas, figurando assim, o teste de mensuração da atividade desta

enzima, de grande valia para o estudo da inflamação e para busca de novas drogas com potencial anti-inflamatório.

A enzima MPO é armazenada nos grânulos azurófilos dos leucócitos polimorfonucleares, principalmente neutrófilos. Esta enzima é muito estudada em condições inflamatórias, pois além de ser um marcador do grau da inflamação de diversos tecidos, ela também está envolvida no estresse oxidativo, contribuindo desta forma para a patogênese da inflamação (BRADLEY et al., 1982; LORIA et al., 2008).

Por conseguinte, para continuar investigando o potencial do PLSn na inflamação, a atividade da MPO foi mensurada para reforçar os dados já citados. Como esperado e indo de acordo com os outros achados, o PLSn reduziu a atividade da enzima no tecido da pata dos animais que sofreram edema por carragenina. Com isso, sugere-se que o efeito anti-inflamatório do polissacarídeo de *M. citrifolia* deva envolver a inibição da migração leucocitária e infiltração neutrofílica durante a inflamação.

Analogamente ao PLSn Chaves et al. (2013) estudaram a ação anti-inflamatória e antinociceptiva da fração polissacarídica extraída de *Gracilaria caudata* e concluíram que nas doses 5 e 10 mg/kg ocorreu inibição da infiltração de neutrófilos, medida pelas atividades de MPO nas patas de camundongos. Alguns compostos presentes no suco do fruto do noni também mostraram forte capacidade de diminuir a atividade da enzima mieloperoxidase (YU et al., 2008).

É fato que nos locais da inflamação existem altas concentrações de radicais livres e substâncias oxidantes que apresentam importante envolvimento na inflamação. Por isto, durante esta análise também foi investigada a capacidade antioxidante do PLSn no processo inflamatório da peritonite induzida por carragenina. Isso se deu através da mensuração dos níveis de glutathione (GSH), pois esta enzima é consumida pelas espécies reativas de oxigênio durante processos que ocasionem estresse oxidativo.

Mediadores pró-inflamatórios como as citocinas e enzimas como a iNOS (óxido nítrico sintetase), que produz grandes quantidades de NO e de enzimas que catalisam reações que originam espécies reativas de oxigênio como o ânion superóxido (O_2^-). Por sua vez, a produção simultânea de NO e O_2^- resulta na geração

deperoxinitrito (ONOO⁻) que lesiona moléculas alvo como proteínas, glutathione (GSH), mitocôndrias e DNA (GABAY, 1999; PACHER et al., 2007).

A glutathione na forma reduzida protege as células através da remoção de metabólitos reativos pela sua conjugação com as formas reativas, seus níveis são um indicador muito sensível da funcionalidade e viabilidade celular (RODRIGUES NETO, 2010). Dentre os radicais de oxigênio e nitrogênio, o ONOO⁻ é capaz de depletar os grupamentos -SH e com isso alterar o balanço redox da glutathione no sentido do estresse oxidativo (FILIPPIN et al., 2008).

Os dados alcançados mostraram que os camundongos tratados com PLSn 10mg/kg que sofreram processo de peritonite não tiveram consumo significativo dos níveis de GSH, mantendo-se os níveis próximos aos níveis do grupo tratado apenas com Salina 0,9%. Esses dados reforçam os resultados obtidos com a enzima MPO, que indiretamente mostrou uma menor infiltração de neutrófilos determinada pelo tratamento com PLSn, pois a manutenção dos níveis de glutathione também significa menor número dessas células (maiores produtoras de espécies reativas de oxigênio no microambiente da inflamação).

Porquanto, pode-se prever que a manutenção dos níveis de GSH no grupo tratado com PLSn indica que este é um dos mecanismos de ação anti-inflamatória da fração. Uma possibilidade alternativa é que a manutenção nos níveis de GSH possa ser secundária a uma diminuição na produção de radicais livres e/ou aumento da produção de antioxidantes endógenos.

Para confirmar todos os resultados apresentados, foi feita a investigação da microscopia do tecido da pata dos camundongos submetidos ao edema por carragenina. Ratificou-se desta forma, através da histologia, a ação anti-inflamatória do PLSn, já que este preservou a arquitetura e um baixo número de células inflamatórias no tecido subplantar de maneira semelhante à estrutura do tecido basal representado pelo grupo de animais que receberam apenas Salina 0.9% subplantar.

A análise histológica contribui de maneira importante para a avaliação do percurso da inflamação, visto que a resolução do processo restaura a homeostase do tecido agredido, atuando através do isolamento, da diluição e/ou da destruição do agente agressor (GALLIN, 1993). É bem definido que a resposta por carragenina determina forte infiltração de neutrófilos no tecido subcutâneo da pata de roedores

em 60 min após sua inoculação no tecido, isso se intensifica 2h após a injeção do composto (VINEGAR et al., 1973).

Ademais, a produção de fatores de crescimento por neutrófilos e macrófagos, de espécies reativas do oxigênio e nitrogênio e de proteases no microambiente inflamado, leva a lesão tecidual (MEDZHITOV, 2008). Uma falha na resolução da inflamação pode desencadear uma resposta crônica com dano tecidual grave e fibrose com consequente desenvolvimento de diversos tipos de doenças (ROCK et al., 2010).

Vários polissacarídeos naturais vêm sendo relatados por suas propriedades na inflamação, visto que muitos têm sido testados pelo modelo experimental de edema de pata em camundongos e ratos, não é novidade que estes compostos tenham também resultados positivos na análise microscópica tecidual. Em artigo publicado recentemente Coura et al. (2015) demonstraram através de recortes do tecido da pata de ratos que o PLS da alga *Gracilaria cornea* diminui de maneira relevante a infiltração de células inflamatórias no tecido. Foram encontrados resultados similares para o tratamento de edema inflamatório com polissacarídeos derivados do fungo *Scleroderma nitidum* (NASCIMENTO et al., 2012).

A dor figura como um sinal cardinal importante da inflamação, é um fator debilitante da vida social de indivíduos. Certamente se torna prudente e necessário o estudo da ação antinociceptiva de novas drogas, com enfoque especial para os compostos que já apresentam prévio efeito anti-inflamatório. Seguindo esta linha de raciocínio, após findados os testes experimentais do PLSn sobre a inflamação foram feitos também testes relativos à capacidade dos polissacarídeos em relação a diminuição da dor.

Os mediadores inflamatórios promovem de forma sinérgica uma alteração no mecanismo de transdução periférica dos estímulos de dor, aumentando a sensibilidade de transdução dos nociceptores, com consequente redução no limiar de percepção do estímulo doloroso, exagerada resposta a estímulos nociceptivos supra limiares e dor espontânea (LINO et al., 2011; VERRI et al., 2006). O processo inflamatório ainda é capaz de recrutar nociceptores silenciosos, não excitáveis em tecidos normais, mas que durante a inflamação são sensibilizados, tornando-se responsivos a estímulos posteriores (SCHAIBLE e RICHTER, 2004).

A atividade antinociceptiva de PLSn foi inicialmente avaliada utilizando o teste de contorções abdominais provocadas por ácido acético em camundongos. O teste é vastamente utilizado para seleção de novos analgésicos, pois avalia a atividade antinociceptiva de substâncias que atuam em nível central e também periférico ou em ambos (PUNJANON e NANDHASRI, 2005).

O teste de contorções por ácido acético é sensível, no entanto, pode ser visto como um modelo geral. É inespecífico, pois é responsivo também a substâncias não analgésicas, como sedativos e miorrelaxantes e não seletivo pois esse modelo é positivo para substâncias analgésicas de ação central e/ou periférica com os mais variados mecanismos de ação (COUTO et al., 2011; PERAZA et al., 2007). É um modelo químico de nocicepção usado há muito tempo, baseado na contagem das contorções da parede abdominal seguidas de torção do tronco e extensão dos membros posteriores, como resposta reflexa à irritação e à peritonite produzidas pela injeção intraperitoneal de ácido acético (WHITTLE, 1964).

O ácido acético produz uma resposta dependente da interação de vários neurotransmissores e neuromoduladores envolvidos na nocicepção (PERAZA et al., 2007). Este atua liberando mediadores endógenos de maneira indireta (bradicinina, serotonina, histamina e prostaglandinas) que estão envolvidos na modulação da nocicepção. A nocicepção induzida pelo ácido acético também depende da liberação de citocinas pró-inflamatórias tais como IL-1 β , IL-6, IL-8 e TNF- α pelos macrófagos e basófilos residentes na cavidade abdominal (WHITTLE, 1964; RIBEIRO et al., 2000; SILVA, 2013).

Fitopreparados do Noni são usadas pela cultura popular de alguns países há muitos anos para tratar variadas situações patológicas, inclusive para diminuir as dores. Não impressionante, muitos estudos mostram essa ação, inclusive comprovados nos testes de contorções por ácido acético. Nos achados de Younos et al. (1990) o extrato aquoso da planta reduziu significativamente as contorções em animais que receberam ácido acético intraperitoneal. Khurana et al. (2003) concluíram uma performance semelhante na diminuição de contorções abdominais sofridas pelos camundongos (provocadas por ácido acético) para o extrato alcoólico de *M. citrifolia*.

Muitos polissacarídeos isolados de fontes naturais apresentam comprovação científica de atividade antinociceptiva. Animais que foram pré-tratados

com fração de PLS da alga verde marinha *Caulerpa cupressoides* modificaram a resposta nociceptiva induzida pelo ácido acético de uma maneira dependente da dose, (RODRIGUES et al., 2012). A alga congênere *Caulerpa mexicana* igualmente reduziu as contorções pelo ácido de maneira dose-dependente em até 88,9% (CARNEIRO et al., 2014).

Nesta pesquisa, o PLSn exibiu pronunciada eficácia antinociceptiva no teste de contorções abdominais, chegando a diminuir em mais de 60% o número de contorções sofrida pelos camundongos testados. Tal desfecho no teste propõe que a ação analgésica da fração estudada pode ser pela capacidade de inibir a liberação de mediadores em resposta ao ácido acético.

Com o intuito de esclarecer a natureza do efeito antinociceptivo do PLSn foi executado também o Teste da formalina. É um modelo experimental muito utilizado que consegue mostrar se a atividade analgésica é central ou de cunho inflamatório. Analgésicos de ação central, como os opioides são capazes de inibir ambas as fases do teste de formalina, enquanto AINES e corticoides inibem apenas a fase inflamatória do teste (MIRANDA et al., 2001; EL HAZABI et al., 2006)

O modelo do teste da formalina é bifásico, o que permite avaliar duas fases de sensibilidade dolorosa: a primeira fase, que ocorre durante os primeiros 5 min após a injeção da formalina, é caracterizada pelo estímulo direto de substâncias nos nociceptores (dor de origem neurogênica) e a segunda fase, que é o tempo entre 15 a 30 min após a formalina, representa a resposta tônica à dor, acompanhada de uma resposta inflamatória relacionada à liberação de mediadores inflamatórios (RODRIGUE et al., 2012; MORI, 2010).

O PLSn teve ação contra a dor provocada pela injeção de formalina apenas na segunda fase do teste. O efeito foi muito acentuado diminuindo a reatividade dos animais em mais de 80% e agindo de maneira semelhante ao analgésico opioide de potência muito conhecida, a morfina. Os dados permitem supor assim que o polissacarídeo diminui a dor por diminuir a resposta inflamatória.

Como já mencionado, muitos trabalhos tem relatado a ação analgésica dos compostos e frações do Noni. A inibição da dor induzida por formalina foi observada na administração oral de Noni liofilizado na dose de 500mg/kg que mostrou inibição significativa na fase inicial (0-5 min) da dor. Na fase tardia, as doses de Noni liofilizado 250 e 500mg/kg foram efetivas na inibição da resposta de

dor (SINGH et al., 2013). A atividade antinociceptiva de uma fração protéica do Noni foi demonstrada recentemente, sendo observado que após a administração oral da fração houve diminuição no tempo de reatividade em ambas as fases do teste da formalina (CAMPOS, 2013).

Apresentando resultado muito similares ao PLSn, Quinderé et al. (2013) e Araújo et al. (2011) constataram que os polissacarídeos de *Acanthophora muscoides* e *Solieria filiformis* respectivamente, também inibiram somente a segunda fase do teste da formalina, tendo assim igual caráter analgésico periférico do PLSn.

Os resultados expostos no presente trabalho indicam que a fração polissacarídica extraída de *Morinda citrifolia* possui atividade antinociceptiva e anti-inflamatória, constituindo uma interessante possibilidade para o desenvolvimento farmacológico desta espécie. Além disso, os dados obtidos apresentados nesta pesquisa corroboram coma utilização da espécie na medicina popular muito comercializada em feiras livres do Brasil, destacando-se pela contribuição do mesmo para o estudo desta planta de uso tão disseminado no país, com diversas plantações no estado do Piauí e no vizinho estado do Ceará. Todos os resultados apresentados neste trabalho são inéditos e somados aos diversos estudos já publicados que atribuem ao Noni e seus fitoquímicos muitos efeitos biológicos podem estimular o desenvolvimento de novas pesquisas.

6 CONCLUSÕES

Os resultados alcançados sugerem atividade anti-inflamatória e antinociceptiva da fração polissacarídica de *Morinda citrifolia* em camundongos. O PLSn foi capaz de reduzir de maneira significativa os parâmetros inflamatórios analisados nos edemas de pata induzido por carragenina, dextrana, serotonina, histamina e bradicinina; nas avaliações bioquímicas de MPO e GSH, migração de leucócitos na cavidade peritoneal e avaliação histológica do tecido subplantar inflamado. A fração polissacarídica extraída do Noni também diminuiu de maneira significativa os parâmetros de dor em camundongos comprovados através do teste de contorções abdominais induzidos pelo ácido acético e teste da formalina.

Portanto, o desenvolvimento do trabalho proposto mostra potencial farmacológico da fração polissacarídica sulfatada de *Morinda citrifolia* como agente anti-inflamatório em camundongos, podendo ser uma fonte de novas moléculas para uso na inflamação, necessitando assim de mais estudos para tal aplicabilidade e dessa forma impulsionar mais pesquisas sobre a fração em especial no que remete à sua aplicação biotecnológica.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-AZIZ; A. A. M.; ELTAHIRC, K. E. H.; ASIRID, Y. A. Synthesis, anti-inflammatory activity and COX-1/COX-2 inhibition of novel substituted cyclic imides. Part 1: Molecular docking study. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46 (5), p. 1648–1655, 2011.

ALLER, M. A.; ARIAS, J. L.; ARIAS, J. I.; SANCHESZ-PATAN, F.; ARIAS, J. The inflammatory response recapitulates phylogeny through trophic mechanisms to the injured tissue. **Medical Hypotheses**, v. 68, n. 1, p. 202-209, 2007.

ALMEIDA, T. F.; ROISENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Res**, v. 1000, p. 40-56, 2004.

AMANLOU, M., DADKHAH, F., SALEHNIA, A., FARSAM, H. An anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of hydroalcoholic extract of *Satureja khuzistanica* Jamzad extract. **J Pharm Pharmaceut Sci**, v. 8 (1), p. 102-106, 2005.

APKARIAN, A. V.; BALIKI, M. N.; GEHA, P. Y. Towards a theory of chronic pain. **Progress in Neurobiology**, v. 87, n. 2, p. 81-97, 2009.

APPLEYARD, C.B; WALLACE, J.L. Reactivation of hapten-induced colitis and its prevention by anti-inflammatory drugs. **Am J Physiol**, v. 269, p. 119-25, 1995.

ARAÚJO, I. W. F.; VANDERLEI, E. DE S. O.; RODRIGUES, J. A. G.; COURA, C. O.; QUINDERÉ, A. L. G.; FONTES, B. P.; QUEIROZ, I. N. L.; JORGE, R. J. B.; BEZERRA, M. M.; SILVA, A. A. R.; CHAVES, H. V.; MONTEIRO, H. S. A.; PAULA, R. C. M.; BENEVIDES, N. M. B. Effects of a sulfated polysaccharide isolated from the red seaweed *Solieria filiformis* on models of nociception and inflammation. **Carbohydrate Polymers**, v. 86; p. 1207– 1215, 2011.

ASHLEY, N. T.; WEIL, Z. M.; NELSON, R. J. Inflammation: Mechanisms, Costs, and Natural Variation. **Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.** -Reviews in advance, v. 43, 2012.

ATKINSON, N. Antibacterial substances from flowering plants Antibacterial activity of dried Australian plants by rapid direct plate test. **Australian Journal of Experimental Biology**, v. 34, p. 17 – 26, 1956.

BARBOSA, A. L.; PINHEIRO, C. A.; OLIVEIRA, G. J.; MORAES, M. O.; RIBEIRO, R. A.; VALE, M. L.; SOUZA, M. H. Tumor bearing decreases systemic acute inflammation in rats—role of mast cell degranulation. **Inflamm Res**, v.58, p. 235–240. 2009.

BARROS, F. E. V.; SOUSA, M. G. T de; COSTA, J. L.; OLEA, R. S. G.; FREIRE, S. M. de F.; BORGES, A. C. R.; BORGES, M. O. da R. Avaliação das atividades analgésica e anti-inflamatória do extrato metanólico de *Calotropis procera*. **Infarma**, v. 16, p. 9-10, 2004.

BARROS, S. P. N. **Caracterização Química e Bioquímica da Polpa de produtos de Noni (*Morinda citrifolia* L.)**. 87f. 2009. Dissertação de mestrado (Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, 2009.

BASAR, S.; UHLENHUT, K.; HÖGGER, P.; SCHÖNE, F.; WESTENDORF, J. Analgesic and antiinflammatory activity of *Morinda citrifolia* L. (Noni) fruit. **Phytother. Res.**, v. 24, n.1, p. 38-42, 2010.

BATISTA, J. A.; DIAS, E. G. N.; BRITO, T. V.; PRUDÊNCIO, R. S.; SILVA, R. O.; RIBEIRO, R. A.; SOUZA, M. H. L. P.; PAULA, R. C. M. DE P.; FEITOSA, J. P. A.; CHAVES, L. S.; MELOC, M. R. S.; FREITAS, A. L. P.; MEDEIROS, J. V. R.; BARBOSA, A. L. R. Polysaccharide isolated from *Agardhiella ramosissima*: Chemical structure and anti-inflammation activity. **Carbohydrate Polymers**, v.99, p. 59–67, 2014.

BATLOUNI, M. Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs: Cardiovascular, Cerebrovascular and Renal Effects. **Arq Bras Cardiol**, v. 94 (4), p. 522-529, 2010.

BONECCHI, R; GRAHAM, G. J. Atypical Chemokine Receptors and Their Roles in the Resolution of the inflammatory Response. **Frontiers in Immunology**, v. 7 (224), p. 1-7, 2016.

BOULOGNE, M; SADOUNE, M; LAUNAY, J. M.; BAUDET, M.; COHEN-SOLAL, A.; LOGEART, D. Inflammation versus mechanical stretch biomarkers over time in acutely decompensated heart failure with reduced ejection fraction. **International Journal of Cardiology**, v. 226, p. 53–59, 2016.

BRADLEY, P. P.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Cellular and extracellular myeloperoxidase in pyogenic inflammation. **Blood.**, v. 60 (3), p. 618-622, 1982.

BRITO, D. R. B. **Avaliação da atividade anti-helmíntica de *Morinda citrifolia* (noni) em aves poedeiras naturalmente infectadas**. 2008. Dissertação de mestrado (Área de Concentração em Sanidade e Reprodução Animal) - Universidade Federal do Piauí, Teresina-2008.

BRITO, T. V. de; PRUDÊNCIO, R. da S.; SALES, A. B., VIEIRA, F. Jr.; CANDEIRA, S. J.; FRANCO, A. X.; ARAGÃO, K. S.; RIBEIRO, R. de A.; SOUZA, M. H. P. de; CHAVES, L. de S.; FREITAS, A. L.; MEDEIROS, J. V.; BARBOSA, A. L. dos R. Anti-inflammatory effect of a sulphated polysaccharide fraction extracted from the red algae *Hypnea musciformis* via the suppression of neutrophil migration by the nitric oxide signalling pathway. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 65, p. 724–733, 2013.

BROCHNER, A. C.; TOFT, P. Pathophysiology of the systemic inflammatory response after majoraccidental trauma. **Scandinavian Journal of Trauma**, v. 17 (43), p. 1-10, 2009.

BUI, A. K. T.; BACIC, A.; PETTOLINO, F. Polysaccharide composition of the fruit juice of *Morinda citrifolia* (Noni). **Phytochemistry**, v. 67, p. 1271–1275, 2006.

BURIAN, M.; GEISLINGER, G. COX-dependent mechanisms involved in the antinociceptive action of NSAIDs at central and peripheral sites. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 107, p.139–154, 2005.

CALDAS, D.; SCHRANK, Y. Síndrome de Cushing por uso abusivo de descongestionante nasal contendo dexametasona: Relato de caso. **Rev Bras Otorrinolaringol**, v. 67, n.6, p. 868-871, 2001.

CALIXTO, J. B.; CAMPOS, M. M.; OTUKI, M. F.; SANTOS, A. R. S. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part 1: Action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor κ B (NF- κ B). **Planta Med**, v. 69, p. 973-983, 2003.

CALIXTO, J. B.; CAMPOS, M. M.; OTUKI, M. F.; SANTOS, A. R. S. Anti-inflammatory compounds of plant Origin. Part II. Modulation of pro-inflammatory cytokines, chemokines and adhesion molecules. **Planta Med**, v. 70, p. 93-103, 2004.

CAMPOS, D. de C. O. Isolamento de um princípio ativo de natureza proteica de sementes de *Morinda citrifolia* L. com potencial para alívio da inflamação e da dor. 97fls. 2013. Dissertação de Mestrado (Mestrado Acadêmico em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal do Ceará - Fortaleza-CE, 2013.

CARNEIRO, J. G.; RODRIGUES, J. A. G.; VANDERLEI, E. DE S. O.; SOUZA, R. B.; QUINDERÉ, A. L. G.; COURA, C. O.; ARAÚJO, I. W. F.; CHAVES, H. V.; BEZERRA, M. M.; BENEVIDES, N. M. B. Peripheral Antinociception and Anti-Inflammatory Effects of Sulphated Polysaccharides from the Alga *Caulerpa mexicana*. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 115, p. 335–342, 2014.

CASTRO, M. Efeitos Antiinflamatórios e Antiproliferativos dos Glicocorticóides: Concordância ou Discordância? **Arq.Bras.Endocrinol. Metab.**, v. 49, n. 3, p. 334-336, 2005.

CHAN-BLANCO, Y.; VAILLANT, F.; PEREZ, A. M.; REYNESC, M.; BRILLOUET, J. M.; BRAT, P. The noni fruit (*Morinda citrifolia* L.): A review of agricultural research, nutritional and therapeutic properties. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.19, p. 645–654, 2006.

CHAN-BLANCO, Y.; VAILLANT, F.; PÉREZ, A.M.; BELLEVILLE, M.; ZÚNIGA, C.; BRAT, P. The ripening and aging of noni fruits (*Morinda citrifolia* L.): microbiological flora and antioxidant compounds. **J. Sci. Food Agric.**, London, v. 87, p. 1710-1716, 2007.

CHAVES, L. S.; NICOLAU, L. A. D.; SILVA, R. O.; BARROS, F. C. N.; FREITAS, A. L. P.; ARAGÃO, K.S. Antiinflammatory and antinociceptive effects in mice of a sulfated polysaccharide fraction extracted from the marine red algae *Gracilaria caudata*. **Immunopharmacol. Immunotoxicol.**, v. 35, p.93–100, 2013.

CHENG, J. K.; JI, R. R. Intracellular signaling in primary sensory neurons and persistent pain. **Neurochemistry Research**, v.33, p. 1970-1978, 2008.

CLAUDINO, R. F.; KASSUYA, C. A. L.; FERREIRA, J.; CALIXTO, J. B. Pharmacological and molecular characterization of the mechanisms involved in prostaglandin E2-induced mouse paw edema. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 318, p.611–618. 2006.

CORREIA, A. A. da S. **Maceração Enzimática da Polpa do Noni (*Morinda citrifolia* L)**. 106f. 2010. Dissertação de Mestrado (Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, 2010.

COURA, C. O.; SOUZA, R. B.; RODRIGUES, J. A. G.; VANDERLEI, E. DE S. O.; ARAÚJO, I. W. F.; RIBEIRO, N. A.; FROTA, A. F.; RIBEIRO, K. A.; CHAVES, H. V.; PEREIRA, K. M. A.; CUNHA, R. M. S.; BEZERRA, M. B.; BENEVIDES, N. M. B. Mechanisms Involved in the Anti-Inflammatory Action of a Polysulfated Fraction from *Gracilaria cornea* in Rats. **PLoS One**, v. 10, n. 3, 2015.

COUTO, V. M.; VILELA, F. C.; DIAS, D. F.; SANTOS, M. H.; SONCINI, R.; NASCIMENTO, C. G.; GIUSTI-PAIVA, A. Antinociceptive effect of extract of *Emiliasonchifolia* in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 134, n. 2, p. 348–353,2011.

CUMASHI, A. et al. A comparative study of the anti-inflammatory, anticoagulant, antiangiogenic, and antiadhesive activities of nine different fucoidans from brown seaweeds. **Glycobiology**, v. 17, n. 5, p. 541-552, 2007.

CUNHA, P. L. R. et al. Isolation and characterization of galactomannan from *Dimorphandra gardneriana* Tul. seeds as a potential guar gum substitute. **Food Hydrocolloids**, Oxford, v. 23, n. 3, p. 880-885, 2009.

CUNHA, T. M.; VERRI, W. A. Jr, SILVA, J. S.; POOLE, S; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 102, n. 5, p. 1755-1760, 2005.

DAMASCENO, S. R.B.; OLIVEIRA, F. R. A.M. ; CARVALHO, N. S.; BRITO, C. F.C.; SILVA, I. S.; SOUSA, F. B. M.; SILVA , R. O.; SOUSA, D. P.; BARBOSA, A. L. R.; FREITAS, R. M.; MEDEIROS, J. V. R. Carvacryl acetate, a derivative of carvacrol, reduces nociceptive andinflammatory response in mice. **Life Sciences**, v. 94, p. 58-66, 2014.

DIAS, J. M.; BRITO, T. V.; MAGALHÃES, D. A.; SANTOS, P. W. S.; BATISTA, J. A.; DIAS, E. G. DO N.; FERNANDES, H. B.; DAMASCENO, S. R. B.; SILVA, R. O.; ARAGÃO,K. S.; SOUZA, M. H. L. P.; MEDEIROS, J. V. R.; BARBOSA, A. L. R. Gabapentin, a Synthetic Analogue of Gamma Aminobutyric Acid, Reverses Systemic Acute Inflammation and Oxidative Stress in Mice. **Inflammation**, v. 37, n. 5, p. 1826-1837, 2014.

DORE, C. M. P. G.; ALVES, M. G. das C. F.; SANTOS, M. da G. L.; SOUZA, L. A. R. de; BASEIA, I. G.; LEITE, E. L. Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties of an Extract Rich in Polysaccharides of the Mushroom *Polyporus dermoporus*. **Antioxidants**, v. 3, p. 730-744, 2014

DUCHARME, J. Acute Pain and Pain Control: State of the Art. **Annals of Emergency Medicine**, v. 35 (6), p. 593-603, 2000.

DURAN, W. N.; BRESLIN, J. W.; SÁNCHEZ, F. A. The NO cascade, eNOS location, and microvascular permeability. **Cardiovasc. Res.**, v. 87, n. 2, p. 254-261, 2010.

DUSSOSSOY, E.; BONY, E.; MICHEL, A.; BRAT, P.; VAILLANT, F.; BOUDARD, F.; GIAIMIS, J. Anti-Oxidative and Anti-Inflammatory Effects of the *Morinda citrifolia* Fruit (Noni). **Acta Hort.**, v. 1040, p. 69-73, 2014.

DUSSOSSOY, E.; BRAT, P.; BONY, E.; BOUDARD, F.; POUCHERET, P.; MERTZ, C.; GIAIMIS, J.; MICHEL, A. Characterization, anti-oxidative and anti-inflammatory effects of Costa Ricannoni juice (*Morinda citrifolia* L.). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, p. 108–115, 2011.

ESSER, S.; JABLONKA, R.; HEINEMANN, F. M.; REUTER, S.; JAEGER, H.; VON KROSIGK, A.; SCHENK-WESTKAMP, P.; SCHADENDORF, D.; HORN, P.A.; LINDEMANN, M. Detection of abacavir hypersensitivity by ELIS pot method. **Inflammation & Allergy Drug Targets**, v.11, p. 227-234, 2012.

FAKIM, A. G. Medicinal plants: Traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 27, p. 1–93, 2006.

FASMER, O. B.; BERGE, O. G.; HOLE, K. Changes in nociception after lesions of descending serotonergic pathways induced with 5,6-dihydroxytryptamine. Different effects in the formalin and tail-flick tests. **Neuropharmacology**, v. 24, n. 7, p.29–34, 1986.

FERREIRA, M. L. C. **Polissacarídeos solúveis de folhas de *Artemisia absinthium* e *Artemisia vulgaris*: isolamento, caracterização e efeitos sobre células THP-1**. 136fls. 2012. (Dissertação de Mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba-PR, 2012.

FILIPPIN, L. I.; VERCELINO, R.; MARRONI, N. P.; XAVIER, R. M. Influência de Processos Redox na Resposta Inflamatória da Artrite Reumatóide. **Rev. Bras. Reumatol.**, v. 48, n.1, p. 17-24, 2008.

FLOWER, R. J.; PERRETI, M. Controlling inflammation a fat chance? **The Journal of Experimental Medicine**, v. 201, p. 671-674, 2005.

FREITAS, F.; ALVES, V. D.; PAIS, J.; COSTA, N.; OLIVEIRA, C.; MAFRA, L.; HILLIOU, L.; OLIVEIRA, R.; REIS, M. A. M. Characterization of an extracellular polysaccharide produced by a *Pseudomonas strain* grown on glycerol. **Bioresource Technology**, v. 100, p. 859–865, 2009.

FURUSAWA, E.; HIRAZUMI, A.; STORY, S.; JENSEN, J. Antitumor Potential of a Polysaccharide-rich Substance from the Fruit Juice of *Morinda citrifolia* (Noni) on Sarcoma 180. **Phytotherapy Research**, v. 17, n. 10, p. 1158 – 1164, 2003.

GABAY, C. Interleukin-6 and chronic inflammation. **Arthritis Research & Therapy**, v. 8, n. 2, p. 1- 6, 2006.

GABAY, C.; IRVINGK, U. Acute-phase Proteins and Other Systemic Responses to Inflammation. **The New England Journal of Medicine**, v.340, p. 448-455, 1999.

GALLIN, J. I. et al. Delineation of the phagocyte NADPH oxidase through studies of chronic granulomatous diseases of childhood. *Int. J. Tissue React.*, v. 15, n. 3, p. 99-103, 1993.

GILROY, D.W.; NEWSON, J.; SAWMYNADEN, P.; WILLOUGHBY, D.A.; CROXTALL, J.D. A novel role for phospholipase A2 isoforms in the checkpoint control of acute inflammation. **Faseb J.**,v. 18, p. 489-98, 2004.

GLASS, C. K.; SAIJO, K.; WINNER, B.; MARCHETTO, M. C.; GAGE, F. H. Mechanisms underlying inflammation in neurodegeneration. **Cell**, v. 140, p. 918-934, 2010.

GOSSLAU, A.; LI, S.; HO, C. T.; CHEN, K. Y.; RAWSON, N. E. The importance of natural product characterization in studies of their anti-inflammatory activity. **Mol. Nutr. Food Res.**, v. 55, n. 1, p. 74-82, 2011.

GREEN, L.C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S. TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. **Anal Biochem.**, v.126, p.131–138, 1982. 2010.

GRIFFIS, C. A.; COMPTON, P.; DOERING, L. The effect of pain on leucocyte cellular adhesion molecules. **Biological Research for Nursing**, v. 7, p. 297-312, 2006.

GRIVENNIKOV, S. I.; GRETEN, F. R.; KARIN, M. Immunity, Inflammation, and Cancer. **Cell**, v. 140, p. 883–899, 2010.

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

HART, J. Inflammation 1: its role in the healing of acute wounds. **Journal of Wound Care**, v. 11, n. 6, 2002.

HEINZE, T. **Polyssacarides I**: structure, caracterizacion and use. Springer: Alemanha, 2005.

HIRAZUMI, A.; FURUSAWA, E. An immunomodulatory polysaccharide-rich substance from the fruit juice of *Morinda citrifolia* (noni) with antitumour activity. **Phytotherapy Research**, v. 13, n. 5, p. 380 – 387, 1999.

HUANG, H.; LIU, C.; CHOU, M.; KO, C.; WANG, C. Noni (*Morinda citrifolia* L.) Fruit Extracts Improve Colon Microflora and Exert Anti-Inflammatory Activities in Caco-2 Cells. **Journal of Medicinal Food**, v. 18, p. 663-676, 2015.

HUNSKAAR, S.; FASMER, O. B.; HOLE, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. **J. Neurosci. Methods**, v.14, p. 69–76, 1985.

INNGJERDINGEN, K. T. et al. Bioactive pectic polysaccharides from *Glinus oppositifolius* (L.) Aug. DC., a Malian medicinal plant, isolation and partial characterization. **Journal of Ethnopharmacology**, Clare, v. 101, n. 1-3, p. 204–214, 2005.

INOUE, N.; YAMANO, N.; SAKATA, K.; NAGAO, K.; HAMA, Y.; YAGANITA, T. The sulfated polysaccharide porphyran reduces apolipoprotein B100 secretion and lipid synthesis in HepG2 cells. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 73, p. 447-9 2009.

IWALEWA, E. O.; MCGAW, L. J.; NAIDOO, J. N.; ELOFF, J. N. Inflammation: the foundation of diseases and disorders. A review of phytomedicines of South African origin used to treat pain and inflammatory conditions. **African Journal of Biotechnology**, v. 6, p. 2868-2885, 2007.

JAINKITTIVONG, A.; BUTSARAKAMRUHA, T; LANGLAIS R. P. Antifungal activity of *Morinda citrifolia* fruit extract against *Candida albicans*. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, v. 108(3), p. 394-398, 2009.

JAYARAMAN, K. S.; MANOHARAN, M. S.; ILLANCHEZIAN, S. Antibacterial, antifungal and tumor cell suppression potential of *Morinda citrifolia* fruit extracts. **International Journal of Integrative Biology**, v. 3, n. 1, p. 44-49, 2008.

JETHANI, B.; SHARMA, R. K.; SHARMA, V.; JAIN, S. K. Role of inflammatory mediators in anti-inflammatory activity of noni (*Morinda citrifolia*) on acute inflammatory process in rats. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 4, n. 4, 2011.

JIAO, G.; YU, G.; ZHANG, J.; EWART, H. S. Chemical structures and bioactivities of sulfated polysaccharides from marine algae. **Marine Drugs**, v. 9, n. 2, p. 196-223, 2011.

JOSEPH, S.; SABULAL, B.; GEORGE, V.; ANTONY, K. R.; JANARDHANAN, K. K. Antitumor and anti-inflammatory activities of polysaccharides isolated from *Ganoderma lucidum*. **Acta Pharm**, v. 61, p. 335–342, 2011.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, p. 203-210, 2001.

KACZKOWSKI, J. Starch and other polysaccharides - modification and applications - a review. **Polish Journal of Food and Nutrition Sciences**, v. 12 (53), n. 1, p 3-12, 2003.

KAMIYA, K.; HAMABE, W.; TOKUYAMA, S.; HIRANO, K.; SATAKE, T.; YONEZAWA, Y.K.; YOSHIDA, H.; MIZUSHINA, Y. Inhibitory effect of anthraquinones isolated from the Noni (*Morinda citrifolia*) root on animal A-, B- and Y-families of DNA polymerases and human cancer cell proliferation. **Food Chemistry**, v. 118, p. 725–730, 2010.

KHURANA, H.; JUNKRUT, M.; PUNJANON, T. Analgesic activity and genotoxicity of *Morinda citrifolia*. **Thai Journal of Pharmacology**, v. 25, n. 1, p. 86- 104, 2003.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; DEBEER, E. I. Acetic acid for analgesic screening. **Federation Proceedings**, v.8, p.412–416, 1956.

KRISHNAIAH, D.; SARBATLY, R.; NITHTYANANDAM, R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. **Food and Bioproducts Processing**, v. 89, p. 217–233, 2011.

LAPA, A. J.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M. T. R.; CASTRO, M. S.; LIMA, T. C. M. **Métodos de avaliação da atividade farmacológica de plantas medicinais**. Ed. Lagoa, Florianópolis: 2003.

LAVAUT, N. E. G.; LAVAUT, J. A. G. *Morinda citrifolia* Linn.: potencialidades para su utilización em la salud humana. **Revista Cubana de Farmácia**, v. 37, p. 1, 2003.

LENTSCH, A. B.; WARD, P. A. Regulation of inflammatory vascular damage. **J. Pathol.**, v. 190: p. 343-348, 2000.

LICHTMAN, M. A.; WILLIAMS, W. J. **Williams hematology**, 7th. ed. New York: McGraw-Hill, Medical Pub. Division, 2006.

LINO, R. C. **Estudo dos mecanismos envolvidos nos efeitos analgésico e anti-inflamatório de dois candidatos a protótipos de fármacos**–85 fls. 2011. Dissertação de Mestrado (Pós-graduação em Ciências Biológicas) – Universidade Federal de Goiás – Goiânia-GO, 2011.

LISHUANG, L. V.; HUANDONG, C.; HO, C. T.; SHENGMIN, S. Chemical components of the roots of Noni (*Morinda citrifolia*) and their cytotoxic effects. **Fitoterapia**, v. 82, p. 704–708, 2011.

LIU, J.; WILLFÖR; S. M.; XU, C. A review of bioactive plant polysaccharides: Biological activities, functionalization, and biomedical applications. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**, v. 5, p. 31–61, 2015.

LIU, Y.; LIU, C.; TAN, H.; ZHAO, T.; CAO, J.; WANG, F. Sulfation of a polysaccharide obtained from *Phellinus ribis* and potential biological activities of the sulfated derivatives. **Carbohydrate Polymers**, v. 77, p. 370–375, 2009.

LOESER, J.D.; TREEDE, R.D.. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. **Pain**, v. 137, p. 473-477, 2008.

LONGUI, C. A. Glucocorticoid therapy: minimizing side effects. **Journal of Pediatrics**, v. 83, n. 5, p. 163-171, 2007.

LORIA, V., DATO, I.; GRAZIANI, F.; BIASUCCI, L. M. Myeloperoxidase: A new biomarker of inflammation in ischemic heart disease and acute coronary syndromes. **Mediators of Inflammation**, n. 135625, p. 1–4, 2008.

LÜBERCK, W.; HANNES, H. Noni. El Valioso Tesoro Curativo de los Mares del Sur. **Editora EDAF S.A.**, Madrid, 2001.

LUSTER, A D.; ALON, R.; ANDRIAN, U. H. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. **Nature Immunology**, v. 6, n. 12, p.1182-1190, 2005.

MACINTYRE, P. E.; SCOTT, D. A.; SCHUG, S. A.; VISSER, E. J.; WALKER, S. M. **Acute Pain Management: Scientific Evidence**. 3 ed. Austrália: Australian and New Zealand College of Anaesthetists, 2010.

MARNETT, L. J. Inflammation and Cancer: Chemical Approaches to Mechanisms, Imaging, and Treatment. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 77, p. 5224–5238, 2012.

MARNETT, L. J. The COXIB experience: a look in the rearview mirror. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 49, p. 265-90, 2009.

MARQUES, T. H. C.; MARQUES, M. L. B. G. C.; MEDEIROS, J. V. R.; SILVA, R. O.; BARBOSA, A. L. R.; LIMA, T. C.; SOUSA, D. P.; FREITAS, R. M. Cyane-carvone, a Synthetic Derivative of Carvone, Inhibits Inflammatory Response by Reducing Cytokine Production and Oxidative Stress and Shows Antinociceptive Effect in Mice. **Inflammation**, v. 37, p. 966-978, 2014.

MARSHA-LYN, G. M.; EVERTON, A. T.; OSWALD R. S. Preliminary investigation of the anti-inflammatory properties of an aqueous extract from *Morinda citrifolia* (Noni). **Proc. West. Pharmacol. Soc.**, v. 45, p. 76-78, 2002.

MATOSO, L. M. L.; MELO, C. C. R. de; MENEZES, L. M. da C. S.; OLIVEIRA, L. E. de O.; OLIVEIRA, K. K. D. de O. Características e a utilização do Noni (*Morinda Citrifolia*). **C&D-Revista Eletrônica da Fainor**, v.6, n.1, p.42-50, 2013.

McCLATHEY, W. From Polynesian Healers to Health Food Stores: Changing Perspectives of *Morinda citrifolia* (Rubiaceae). **Integrative Cancer Therapies**, v.1, p. 110–120, 2002.

McKOY, M. G.; THOMAS, E. A.; SIMON, O. R. Preliminary Investigation of the Anti-inflammatory Properties of an Aqueous Extract from *Morinda citrifolia* (Noni). **Proceedings of the Western Pharmacology Society**, v. 45, p. 76–78, 2002.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, p. 428-435, 2008.

MEHTA, D.; MALIK, A. B. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. **Physiological Reviews**, v. 86, p. 279-367, 2006.

MIHARA, M.; UCHIYAMA, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. **Anal. Biochem.**, v. 86(1), p. 271-278, 1978.

MILES, A.; LIASKOU, E.; EKSTEEN, B.; LALOR, P. F.; ADAMS, D. H.; CCL25 and CCL28 promote alpha-4 beta 7-integrin-dependent adhesion of lymphocytes to MAdCAM-1 under shear flow. **American Journal of Physiology Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 294, p. 1257-1267, 2008.

MILIANI, L. F.; NIELSEN, O. H.; ANDERSE, P. S.; GIRARDIN, S. E. Chronic inflammation: importance of NOD2 and NALP3 in interleukin-1 β generation. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 147, p. 227–235, 2006.

MILLAN, M. J. Descending control of pain. **Prog. Neurobiol.**, v. 66, p. 355-474, 2002.

MIRANDA, F. G. G.; VILAR, J. C.; ALVES I. A.; CAVALCANTI, S. C. ANTONIOLLI, A. R. Antinociceptive and antiedematogenic properties and acute toxicity of *Tabebuia avellanedae* Lor. Ex Griseb. Inner bark aqueous extract. **BMC Pharmacology**, v. 1, p. 1-16, 2001.

MITCHELL, J. A., WARNER, T. D. COX isoforms in the cardiovascular system: understanding the activities of non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 5, p. 75-86, 2006.

MOREAU, M.E.; GARBACKI, N.; MOLINARO, G.; BROWN, N.J.; MARCEAU, F.; ADAM, A. The kallikrein-kinin system: current and future pharmacological targets. **Journal Pharmacology Science**, v. 99, p. 6-38, 2005.

MORI, L. S. **Atividade antinociceptiva do extrato etanólico e do derivado semi sintético da xilopina, n-acetil xilopina, obtidos de *Magnolia ovata***. 87 fls. 2010. Dissertação de Mestrado (Pós-Graduação em Farmacologia) - Universidade Federaldo Paraná – Curitiba-PR, 2010.

MOTOYAMA, K.; TANIDA, Y.; HATA, K.; HAYASHI, T.; HASHIM, I. I. A.; HIGASHI, T.; ISHITSUKA, Y.; KONDO, Y.; IRIE, T.; KANEKO, S.; ARIMA, H. Anti-inflammatory Effects of Novel Polysaccharide Sacran Extracted from Cyanobacterium *Aphanothece sacrum* in Various Inflammatory Animal Models. **Biol. Pharm. Bull**, v. 39, p. 1172–1178, 2016.

MOURÃO, P. A. S. Perspective on the Use of Sulfated Polysaccharides from Marine Organisms as a Source of New Antithrombotic Drugs. **Mar. Drugs.**, v. 13, p. 2770-2784, 2015.

MULLER, W. A. Mechanisms of Leukocyte Transendothelial Migration. **Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.**, v. 6, p. 232-344, 2011.

MURAKAMI, M.; HIRANO, T. The molecular mechanisms of chronic inflammation development. **Frontiers in Immunology – Inflammation**, v. 3, art. 323, p. 1-2, 2012.

MURI, E. M. F.; SPOSITO, M. M. DE M.; METSAVAHT, L. Nonsteroidal antiinflammatory drugs and their local pharmacology. **Acta Fisiatr**, v. 16 (4), p. 186-190, 2009.

NASCIMENTO, M. S.; MAGALHÃES, J. E. M.; PINHEIRO, T. S.; SILVA, T. A.; COUTINHO, L. G.; BASEIA, I. G.; LIMA, L. F. A.; LEITE, E. L. Polysaccharides from the fungus *Scleroderma nitidum* with anti-inflammatory potential modulate cytokine levels and the expression of Nuclear Factor K β . **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 22, n. 1, 2012.

NATHAN, C. Points of control in inflammation. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 846-52, 2002.

NINGTHOUJAM, S. S.; TALUKDAR, A.; POTSANGBAM, K. S.; CHOUDHURY, M. D. Challenges in developing medicinal plant databases for sharing ethnopharmacological knowledge. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 141, p. 9-32, 2012.

NOURSHARGH, S.; MARELLI-BERG, F. M. Transmigration through venular walls: a key regulator of leukocyte phenotype and function. **Trends in Immunology**, v. 26, n. 3, 2005.

OAKLANDER, A., L. Chronic pain. **ACP Medicine**, p. 1-19, 2011.

OKUSADA, K.; NAKAMOTO, K.; NISHIDA, M.; FUJITA-HAMABE, W.; KAMIYA, K.; MIZUSHINA, Y.; SATAKE, T.; TOKUYAMA, S. The antinociceptive and anti-inflammatory action of the CHCl₃-soluble phase and its main active component, damnacanthal, isolated from the root of *Morinda citrifolia*. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 34, n. 1, p.103-107, 2011.

OLIVEIRA, L. A. **Caracterização estrutural e atividade antitumoral de polissacarídeo extraído do fruto de *Morinda citrifolia* linn (noni)**. 116fls, 2014. Dissertação de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-CE, 2014.

PACHER, P.; BECKMAN, J. S.; LIAUDET, L. Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. **Physiology Reviews**, v. 87, n. 1, p. 315-424, 2007.

PATEL, S. Therapeutic importance of sulfated polysaccharides from seaweeds: updating the recent findings. **Biotech**, v. 2, p. 171–185, 2012.

PAWLUS, A.D.; SU, B-N; KELLER, W.J.; KINGHORN, A.D. An anthraquinone with potent quinine reductase-inducing activity and other constituents of the fruits of *Morinda citrifolia* (Noni). **Journal of Natural Product**, v. 68, p. 1720-1722, 2005.

PERAZA, G. G., RODRIGUES, S. T., MEDEIROS, S. H. L., MUCCILLO-BAISCH, A. N. **O uso de modelos animais para avaliar o potencial antinociceptivo dos de origem natural**. Vitale, Rio Grande, v. 1, n. 19, p. 35-44, 2007.

PEREIRA, L. de P.; SILVA, K. E. S. da; SILVA, R. O. da S.; ASSREUY, A. M. S.; PEREIRA, M. G. Anti-inflammatory polysaccharides of *Azadirachta indica* seed tegument. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, p. 617-622, 2012.

PEREIRA, L. P. **Atividade anti-inflamatória de polissacarídeos isolados das plantas *Caesalpinia ferrea* e *Azadirachta indica***. 97 fls. 2011. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual do Ceará - Fortaleza-CE, 2011.

PETHO, G., REEH, P.W., Sensory and signaling mechanisms of bradykinin, eicosanoids, platelet-activating factor, and nitric oxide in peripheral nociceptors. **Physiological Reviews**, v.92, p.1699-1775, 2012.

PINHEIRO, M.; NONI, fruta milagrosa? **Verdades e mitos**, p. 1-4, 2006.

PINHO-RIBEIRO, F. A.; VERRI JR., W. A.; CHIU, I. M. Nociceptor Sensory Neuron–Immune Interactions in Pain and Inflammation. **Trends in Immunology**, v. 1331, p. 1-15, 2016.

PUNJANON, T. E NANDHASRI, P. Analgesic Effect of the Alcoholic Extract from the Fruits of *Morinda citrifolia*. **Acta Hort (ISHS)**, p. 103–106, 2005.

QUINDERÉ, A. L. G.; FONTES, B. P.; VANDERLEI, E. DE S. O.; QUEIROZ, I. N. L.; RODRIGUES, J. A. G.; ARAÚJO, I. W. F.; JORGE, R. J. B.; MENEZES, D. B.; SILVA, A. A. R.; CHAVES, H. V.; EVANGELISTA, J. S. A. M.; BEZERRA, M. M.; BENEVIDES, N. M. B. Peripheral antinociception and anti-edematogenic effect of a sulfated polysaccharide from *Acanthophora muscoides*. **Pharmacological Reports**, v. 65, p. 600-613, 2013.

RAZAFIMANDIMBISON, S. G.; McDOWELL, T. D.; HALFORD, D. A.; BREMER, B. Origin of the pantropical and nutraceutical *Morinda citrifolia* L. (Rubiaceae): comments on its distribution range and circumscription. **Journal of Biogeography**, v. 37, p. 520–529, 2010.

RHEN, T.; CIDLOWSKI, J. A. Antiinflammatory action of glucocorticoids--new mechanisms for old drugs. **New England Journal of Medicine**, v. 353, n. 16, p. 1711-23, 2005.

RIBEIRO, R. A.; VALE, M. L.; THOMAZZI, S. M.; PASCHOALATO, A. B.; POOLE, S.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **Eur. J. Pharmacol.**, v.387, p.111-118,2000.

RICCIOTTI, E. e FITZGERALD, G. A. Prostaglandins and Inflammation. **Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.**, v. 31, p. 986-1000, 2011.

RINAUDO, M. Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. **Polymer International**, v. 57, p. 397-430, 2008.

ROCK, K. L.; LATZ, E.; ONTIVEROS, F.; KONO, H. The Sterile Inflammatory Response. **Annu. Rev. Immunol.**, v. 28, p. 321-342, 2010.

RODRIGUES, J. A. G.; VANDERLEI, E. de S.O.; SILVA, L. M. C. M.; ARAÚJO, I. W. F.; QUEIROZ, N. L.; DE PAULA, G. A.; ABREU, T. M.; RIBEIRO, N. A.; BEZERRA,

M. M.; CHAVES, H. V.; LIMA, V.; JORGE, R. J. B.; MONTEIRO, H. S. A.; LEITE, E. L.; BENEVIDES, N. M. B. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of a sulfated polysaccharide isolated from the green seaweed *Caulerpa cupressoides*. **Pharmacological Reports**, v. 64, p. 282-292, 2012.

RODRIGUES-NETO, A. S. S. **Glutathione: Envolvimento em defesa antioxidante, regulação de morte celular programada e destoxificação de drogas**. 77 fls. 2010. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade do Porto – Porto-POR, 2010.

ROWLEY, D. A.; BENDITT, E. P. 5-Hydroxytryptamine and histamine as mediators of the vascular injury produced by agents which damage mast cells in rats. **J. Exp. Med.**, v. 103, p. 399–412, 1956.

ROY, M; PICHÉ, M; CHEN, J.; PERETZ, I.; RAINVILLE, P. Cerebral and spinal modulation of pain by emotions. **Proceedings of The National Academy of Sciences**, v. 106, n. 49, p. 1-6, 2009.

SALLUM, A. M. C.; GARCIA, D. M.; SANCHES, M. Acute and chronic pain: a narrative review of the literature. **Acta Paul Enferm**, v. 25, p. 150-154, 2012.

SALUDES, J. P. e col. Antitubercular constituents from the hexane fraction of *Morinda citrifolia* L. (Rubiaceae). **Phytotherapeutic Research**, v. 16, p. 683 – 685, 2002.

SAMPAIO, C. de G. **Estudo químico bioquímico das sementes de *Morinda citrifolia* Linn (NONI) e suas aplicações**. 136f. 2010. Dissertação de Mestrado (Pós-graduação em Química) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza- CE, 2010.

SANDBORN, W. J. e YEDNOCK, T. A. Novel approaches to treating inflammatory bowel disease: targeting alpha-4 integrin. **American Journal of Gastroenterology**, v. 98, p. 2372-2382, 2003.

SCHAIBLE, H. G., EBERSBERGER, A., NATURA, G. Update on peripheral mechanisms of pain: beyond prostaglandins and cytokines. **Arthritis Research and Therapy**, v. 13, p. 210, 2011.

SCHAIBLE, H. G; RICHTER, F. Pathophysiology of pain. **Langenbecks Arch. Surg.**, v. 389, n. 4, p. 237-43, 2004.

SCHEPEKTIN, I. A.; QUINN, M. T. Botanical polysaccharides: Macrophage immunomodulation and therapeutic potential. **International Immunopharmacology**, v. 6, p. 317– 333, 2006.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R.H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Anal. Biochem.**, v. 24, p. 1992–2005, 1968.

SEPODES, B.; MAIO, R.; PINTO, R.; MARQUES, C.; MENDES-DO-VALE, J.; MCDONALD, M. C.; THIEMERMANN, C.; FILIPE, H. M. Tempol, an intracellular free

radical scavenger, reduces liver injury in hepatic ischemia-reperfusion in the rat. **Transplantation Proceedings**, v. 36 (4), p. 849–853, 2004.

SERAFINI, M. R.; LIMA, C. M.; SANTOS, R. C.; DÓRIA, G. A. A.; JESUS, J. Y.; MELO, M. G. D.; SANTOS, J. P. A.; RABELO, T. K.; FORTES, V. S.; FONSECA, M. J. V.; ALBUQUERQUE JR, R. L. C.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; ARAÚJO, A. A. de S. Pre-clinical toxicity of *Morinda citrifolia* Linn. leafextract. **African Journal of Biotechnology**, v. 10(65), p. 14566-14572, 2011.

SERHAN, C. N. E SAVILL, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. **Nature Immunology**, v. 6, n.12, p. 1191-1197, 2005.

SERHAN, C. N. et al. Resolution of inflammation: state of the art, definitions and terms. **The Faseb Journal**, v. 21, n. 2, p. 325-32, 2007.

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

SILVA, J. C. **Efeito antinociceptivo e anti-inflamatório de *Annona vepretorum* Mart. (Annonaceae) em roedores.** 183 fls. Dissertação de Mestrado (Pós-graduação em Recursos Naturais do Semiárido) – Universidade Federal do Vale do São Francisco – Petrolina-PE, 2013.

SILVA, V. G.; SILVA, R. O.; DAMASCENO, S. R. B.; CARVALHO, N. S.; PRUDÊNCIO, R. S.; ARAGÃO, K. S. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of epiisopiloturine, an imidazole alkaloid isolated from *Pilocarpus microphyllus*. **Journal of Natural Products**, v. 76, p. 1071–1077, 2013.

SILVEIRA, L. M. da S.; OLEA, R. S. G.; GONÇALVES, L. H. B. ; SANTOS, P. F. Atividade antibacteriana de amostras de fruto do noni (*Morinda citrifolia* L. - rubiaceae) vendidas em feiras livres de São Luís, Maranhão. **Revista Saúde & Ciência**, v. 2, ano II, p. 31-37, 2011.

SINGH, H.; BANERJEE, S.; KARAN, S.; CHATTERJEE, T. K. Antinociceptive activity of freeze dried powdered *Morinda citrifolia* L. fruit. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 5, Sup. 2, 2013.

SINGH. D. R. *Morinda citrifolia* L. (Noni): A review of the scientific validation for its nutritional and therapeutic properties. **Journal of Diabetes and Endocrinology**, v. 3, n. 6, p. 77-91, 2012.

SÔNEGO, F.; CASTANHEIRA, F. V. E S.; FERREIRA, R. G.; KANASHIRO, A.; LEITE, C. A. V.; NASCIMENTO, D. C.; COLÓN, D. F.; BORGES, V. DE F.; ALVES FL., J. C.; CUNHA, F. Q. Paradoxical Roles of the neutrophil in Sepsis: Protective and Deleterious. **Frontiers in Immunology**, v. 7 (155), p. 1-7, 2016.

SOROKIN, L. The impact of the matrix on inflammation. **Nat. Immunol**, v. 10, p. 217-223, 2010.

SOUZA, A. V. M. **Atividade anti-inflamatória do extrato, de frações e do alcalóide dicentrinona obtidos de *Duguetia furfuracea* (st. hil) em camundongos.** 73 fls. 2013. Dissertação de mestrado (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Federal da Grande Dourados – Dourados-MS, 2013.

SOUZA, G. E. P.; FERREIRA, S. H. Blockade by antimacrophage serum of the migration of PMN neutrophils into the inflamed peritoneal cavity. *Agents and Actions. Basel*, v. 17, n. 1, p.97- 103, 1985.

SOUZA, S.M.; AQUINO, L.C.; MILACH JR. A.C.; BANDEIRA, M.A.; NOBRE, M.E.; VIANA, G.S. Antiinflammatory and antiulcer properties of tannins from *Myracrodouon urundeuva* Allemao (Anacardiaceae) in rodents. ***Phytotherapy Res.***, v. 21, p. 220-225, 2007.

STEINMEYER, J. Pharmacological basis for the therapy of pain and inflammation with nonsteroidal anti-inflammatory drugs. ***Arthritis Res.***, v. 2(5), p. 379–385, 2000.

SUGIMOTO, M. A.; SOUSA, L. P.; PINHO, V.; PERRETTI, M.; TEIXEIRA, M. M. Resolution of inflammation: What Controls its Onset? ***Frontiers in Immunology***, v. 7 (160), p. 1-18, 2016.

TABERNERO, A.; SCHNEIDER, F.; POTENZA, M. A. Cyclooxygenase-2 and Inducible nitric oxide synthase in omental arteries harvested from patients with severe liver diseases: immune-localization and influence on vascular tone. ***Intensive Care Medicine***, v. 29, p. 262- 270, 2003.

TAVARES-MURTA, B.M.; RESENDE, A.D.; CUNHA, F.Q.; MURTA, E.F.C. Local profile of cytokines and nitric oxide in patients with bacterial vaginosis and cervical intraepithelial neoplasia. ***Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.***, v.138, p.93–99, 1998.

ULBRICH, H., ERIKSSON, E. E; LINDBOM, L. Leukocyte and endothelial cell adhesion molecules as targets for therapeutic interventions in inflammatory disease. ***Trends Pharmacol. Sci.***, v. 24, p. 640–647, 2003.

USHA, R.; SANGEETHA, S.; PALANISWAMY, M. Antimicrobial activity of a rarely known species, *Morinda citrifolia* L. ***Ethnobotanical Leaflets***, v.14, p. 306-311, 2010.

VAN MIERT, A. S. J. P. A. M. Present concepts on the inflammatory modulators with special reference to cytokines. ***Veterinary Research Communications***, v. 26, n. 2, p. 111-126, 2002.

VARALDA, D. B.; MOTTA, A. A. Reações adversas aos antiinflamatórios não esteroidais. ***Rev. Bras. Alerg. Immunopatol.***, v. 32, n. 1, p. 27-34, 2009.

VASCONCELOS, D. I. B.; LEITE, J. A.; CARNAEIRO, L. T.; PIUVEZAM, M. R.; LIMA, M. R. V.; MORAIS, L. C. R.; RUMJANEK, V. M.; MASCARENHAS, S. R. Anti-inflammatory and antinociceptive activity of ouabain in mice. ***Mediators Inflammat***, v.11, p. 1–12, 2011.

VASCONCELOS, A. G.; ARAÚJO, K.V. de; SANTANA, L. de A. B. Polissacarídeos extraídos de algas marinhas e suas aplicações biotecnológicas: Uma Revisão. **Revista Brasileira de Inovação Tecnológica em Saúde**, p. 27-51, 2015.

VERGNOLLE, N. Postinflammatory visceral sensitivity and pain mechanisms. **Eurogastroenterology and Motility**, v. 20. p. 73-80, 2008.

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

VICKERS, A. The management of Acute pain. **Surgery**, v. 28, n. 4, p. 175-180, 2010.

VINEGAR, R.; SCHREIBER, W.; HUGO, R. Biphasic development of Carrageenan edema in rats. **Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 166, p. 96- 103, 1969.

VINEGAR, R.; TRUAX, J.F.; SELOH, J.L. Some quantitative temporal characteristics of carrageenin-induced pleurisy in the rats. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.143, p.711-714, 1973.

VORWERK, S.; SOMERVILLE, S.; SOMERVILLE, C. The role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. **Trends in Plant Science**, v. 9,n.4, 2004.

WAGNER, J. G.; ROTH, R. A. Neutrophil migration mechanisms, with an emphasis on the pulmonary vasculature. **Pharmacological Reviews**, v. 52, n. 3, p. 349-374, 2000.

WALZOG, B.; GAEHTGENS, P. Adhesion Molecules: The path to a new understanding of acute inflammation. **News in Physiological Sciences**, v. 15, n. 3, p. 107-113, 2000.

WANG, J.; ZHANG, Q.; ZHANG, Z.; LI, Z. Antioxidant activity of sulfated polysaccharide fractions extracted from *Lamiaria japonica*. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 41, p. 127-132, 2008.

WANG, L.; ZHAO, D.; DI, L.; CHENG, D.; ZHOU, X.; YANG, X.; LIU, Y. The anti-hyperplasia of mammary gland effect of *Thladiantha dubia* root ethanol extract in rats reduced by estrogen and progesterone. **J. Ethnopharmacol**, v.134, n. 1, p. 136-140, 2011.

WANG, M. Y.; PENG, L.; ANDERSON, G.; NOWICKI, D. Breast cancer prevention with *Morinda citrifolia* (noni) at the initiation stage. **Functional Foods in Health and Disease**, v. 3, n.6, p. 203-222, 2013.

WANG, M. Y.; WEST, B. J.; JENSEN, C. J.; NOWICKI, D.; SU, C.; PALU, A. ANDERSON, G. *Morinda citrifolia* (Noni): a literature review and recent advances in noni research. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 23, n. 12, p. 1127-1141, 2002.

WANG, M.; SU, C. Cancer preventive effect of *Morinda citrifolia* (Noni). **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 952, p. 161-168, 2001

WEBB, D. R. Animal Models of Human Disease: Animal Models of Inflammation. **Biochemical Pharmacology**, v. 87, n. 1, p. 121-130. 2014.

WEIGERT, A. JENNEWEIN, C; BRÜNE, B. The liaison between apoptotic cells and macrophages--the end programs the beginning. **Biological Chemistry**, v. 390, n. 6, p. 379-90, 2009.

WEST, B. J.; JENSEN, C. J.; PALU, A. K.; DENG, S. Toxicity and Antioxidant Tests of *Morinda citrifolia* (noni) Seed Extract. **Advance Journal of Food Science and Technology**, v. 3, n. 4, p 303-307, 2011.

WEST, B. J; SU, C. X.; JENSEN, J. Hepatotoxicity and subchronic toxicity tests of *Morinda citrifolia* (noni) fruit. **The Journal of Toxicological Sciences**, v. 34, n. 5, p. 581-585, 2009.

WHITTLE, B. A. Release of a kinin by intraperitoneal injection of chemical agents in mice. **International Journal of Neuropharmacology**, v. 3, p. 369-378, 1964.

WINTER, C. A.; RISLEY E. A.; NUSS, G. W. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. **Proceedings of Society for Experimental Biology and Medicine**, v.111, p. 544–547, 1962.

WU, C. L.; RAJA, S. N. Treatment of acute postoperative pain. **The Lancet**, v.377, p. 2215-2225, 2011.

YANG, E. J.; KIM, S. I.; PARK, S. Y. Fermentation enhances the in vitro antioxidative effect of onion (*Allium cepa*) via an increase in quercetin content. **Food Chem Toxicol**, v. 50, p. 2042–2048, 2012.

YANG, J.; PAULINO, R.; JANKE-STEDRONSKY, S.; ABAWI, F. Free-radicalscavenging activity and total phenols of noni (*Morinda citrifolia* L.) juice and powder in processing and storage. **Food Chemistry**, v. 102, p. 302–308, 2007.

YANG, L; ZHANG, L-M. Chemical structural and chain conformational characterization of somebioactive polysaccharides isolated from natural sources. **Carbohydrate Polymers**, v. 76, p. 349–361, 2009.

YOUNOS, C.; ROLLAND, A.; FLEURENTIN, J.; LANHERS, M. C.; MISLIN, R.; MORTIER, F. Analgesic and behavioral effects of *Morinda citrifolia*. **Planta Medicine**, v. 56, p. 430–434, 1990.

YU, H.; LI, S.; HUANG, M. T.; HO, C. T. Antiinflammatory Constituents in Noni (*Morinda citrifolia*) Fruits. **A. C. S. Symposium Series**, v. 987, p. 179-190, 2008 .

ZEILHOFER, H.U, BRUNE, K. Analgesic strategies beyond the inhibition of cyclooxygenases. **Trends. Pharmacol. Sci.**, v. 9, p.467-74, 2006.

ZHOU, X-L; YANG, M.; XUE, B-G; HE,H-T;ZHANG, C-M; LIU, M-M. Anti-inflammatory action of *Ginkgo biloba* leaf polysaccharide via TLR4/NF-kb signaling suppression.**Biomedical Research**, v. 25, n. 4, p. 449-454, 2014.

ZIN, Z. M.; ABDUL-HAMID, A.; OSMAN, A. Antioxidative activity of extracts from Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) root, fruit and leaf. **Journal of Food Chemistry**, v. 78, p. 227-231, 2002.

8ANEXO I



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

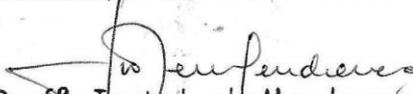


CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto intitulado **“Efeito anti-inflamatório e antinociceptivo da fração polissacarídica sulfatada (PLS) extraída de *Morinda citrifolia* (Noni)”**, protocolo nº **123/15**, sob a responsabilidade do **Prof. Dr. ANDRÉ LUIZ DOS REIS BARBOSA**- 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 11/12/2015.

Vigência do Projeto	Fevereiro/ 2016 à Agosto/ 2016
Espécie/Linhagem	Camundongo Heterogênico/ Swiss
Nº de Animais	270
Peso/ Idade	25-30 g/ - - -
Sexo	Machos
Origem	Biotério da Universidade Federal do Piauí.

Teresina, 11 de Dezembro de 2015.


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