



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
NÚCLEO DE PESQUISAS EM PLANTAS MEDICINAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA



RENATA FORTES SANTIAGO

**EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIO, ANTINOCICEPTIVO E ANTIOXIDANTE DA
RIPARINA B EM CAMUNDONGOS**

**TERESINA
2015**

RENATA FORTES SANTIAGO

**EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTINOCICEPTIVO DA RIPARINA B EM
CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Farmacologia do Núcleo
de Pesquisas em Plantas Medicinais - NPPM,
da Universidade Federal do Piauí - UFPI,
como requisito para a obtenção do título de
mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. André Luiz dos Reis Barbosa

TERESINA

2015

RENATA FORTES SANTIAGO

**EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTINOCICEPTIVO DA RIPARINA B EM
CAMUNDONGOS**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais – NPPM, da Universidade Federal do Piauí – UFPI como requisito para a obtenção do título de mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. André Luiz Reis Barbosa

EXAMINADO EM: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Rita de Cássia Meneses Oliveira

(Presidente)

Universidade Federal do Piauí

Profa. Dra. Rosimarie Brandim Marques

(Membro)

Universidade Estadual do Piauí

Profa. Dra. Fernanda Regina de Castro Almeida

(Membro)

Universidade Federal do Piauí

DEDICATÓRIA

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Antero Cardoso e Maria Alcioneida. Pelo amor incondicional e pelas inúmeras lições de vida. Obrigada por tudo.

Amo muito vocês!!!

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

À **Deus**, por ser a força maior que sempre me ampara, por nunca me permitir fraquejar nos momentos difíceis e não me permitir desistir de nada nessa vida. Obrigada, Senhor.

Aos **meus pais** pelo amor incondicional, pela ajuda, apoio e por todos os sacrifícios feitos ao longo da vida em prol da realização dos meus sonhos. Minha gratidão eterna à vocês;

Ao meu namorado **Sammuel**, por todo amor, cuidado e compreensão e por acreditar em mim, mesmo quando eu desacreditava. Obrigada, amor;

Às minhas irmãs **Roberta** e **Juliana**, minha afilhada **Ana Beatriz**, minha sobrinha **Ana Letícia**, meu cunhado **Jairo** pelo companheirismo, apoio e amizade e por jamais deixarem de torcer pela minha vitória;

Aos meus avós **José**(in memorian), **Raimundo Nonato**(in memorian), **Hermelinda** e **Judy** por todos os ensinamentos;

Ao meu orientador, **Professor Dr. André Luiz dos Reis Barbosa**, por ter acreditado em mim, pela transmissão de conhecimentos, orientação e apoio;

Aos **professores Dr. Francisco de Assis Oliveira** e **Dra. Fernanda Regina** por terem contribuído de forma grandiosa durante o processo de qualificação, com ensinamentos, sugestões e pela disponibilidade no esclarecimento de dúvidas;

À professora **Dra. Rita de Cássia Menenes Oliveira**, por ter me amparado em diversos momentos de angústia, sempre com sua voz serena disposta a ajudar da melhor forma possível e por se fazer presente em minha banca de qualificação. Devo muito a você, professora;

A todos os **professores do Mestrado** pelos inúmeros ensinamentos durante os dois anos de curso;

Aos amigos do LAFDor (Laboratório de Farmacologia da Dor), **Celyane, Everton, Bruno, Elza, Wilmara, Flavinha, Carlos**, por terem me ajudado sempre, em tudo que precisei, desde dúvidas em experimentos, escrita da dissertação, até os momentos de descontração. Agradeço imensamente vocês, por terem me acolhido e me ajudado sempre. Sem dúvidas a jornada teria sido bem mais difícil sem vocês perto de mim;

À **Ilmara** e **Keyla**, amigas muito especiais, que compartilharam dos meus momentos de angústia, sempre me incentivando da melhor forma possível. Vocês são muito especiais;

Aos companheiros do LAFFEX (Laboratório de Físio-Farmacologia Experimental) **Tarcísio Brito, Diva Magalhães, Pammela Santos, Heliana Fernandes, Jalles**

Arruda, Amanda Fontenelle, Isabella Braúna, pela imensa contribuição em todos os experimentos;

À minha amiga **Jordana Maia**, por me acompanhar desde o início desta jornada e sempre se fazer presente, mesmo quando fisicamente distante;

Aos demais amigos do mestrado, **Valmor, Marianne, Kamila, Gabriela, Lucas, Manu, Camila** pela amizade, pelas discussões e reflexões nas aulas, e pelo crescimento científico. Tenho um carinho especial por cada um;

Aos demais **amigos do núcleo** pela convivência sempre agradável;

Aos **funcionários** do Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais – NPPM, Gleice, Seu Carlos, Patrícia e o Josy pela ajuda prestada;

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - **CAPES** pela concessão da bolsa durante o período de realização deste mestrado;

A **Universidade Federal do Piauí** por me proporcionar um grande crescimento profissional e pessoal, construído durante a graduação e o mestrado;

A todas as pessoas que de alguma forma contribuíram para que esse trabalho fosse realizado. Muito Obrigada.

ΕΠΙΓΡΑΦΕ

EPÍGRAFE

“Se o SENHOR não fosse o meu auxílio, em breve eu habitaria no reino do silêncio.

Quando eu digo: “Meu pé vacila.” Tua graça, SENHOR me sustenta.

Quando estou oprimido pela angústia, teu conforto me consola.”

(Sl 94,17-19)

RESUMO

Efeitos Antinociceptivo e Anti-inflamatório da Riparina B em Camundongos. Fortes, R. S. Pós-Graduação em Farmacologia. Dissertação de Mestrado, NPPM/CCS/UFPI, PPGF (2015).

RESUMO

Isolada a partir do fruto-verde de *Aniba riparia*, a Riparina B (N-[2-(3,4 dimetóxi-fenil)-etil]-benzamida) (Rip B) é um alcaloide não-heterocíclico, mais especificamente, uma alcalamida natural. Na literatura há poucos relatos acerca do efeito direto da Rip B sobre o processo inflamatório e nociceptivo em diferentes modelos animais. Com isso, o objetivo deste trabalho foi investigar o efeito anti inflamatório, antinociceptivo e antioxidante da Rip B em modelos experimentais. Foram utilizados camundongos Swiss machos e fêmeas (20-25 g) (Comitê de Ética Animal/UFPI, Nº. 068/2014). A atividade anti-inflamatória foi avaliada utilizando-se o edema de pata induzido por diversos mediadores inflamatórios, tais como: dextrana, composto 48/80, histamina, serotonina, bradicinina e PGE₂; atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) na pata, a peritonite induzida por carragenina e os níveis de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 β e TNF- α), bem como contagem total e diferencial de leucócitos e neutrófilos, respectivamente. Para investigação da atividade analgésica foram utilizados os testes de: contorções abdominais induzidas por ácido acético a 0,6%, formalina a 1,2% e placa quente. A atividade antioxidante foi avaliada através da investigação dos níveis de malondialdeído (MDA) e glutathiona (GSH) no exsudato peritoneal. O pré-tratamento com Rip B (10 mg/kg, i.p.) reduziu significativamente o edema de pata induzido por carragenina, dextrana e composto 48/80. Além disso, também reduziu o edema de pata induzido pelos agentes flogísticos: histamina, serotonina, bradicinina e PGE₂. A Rip B (10 mg/kg, i.p.) reduziu de modo significativo os níveis da enzima MPO no tecido plantar, no modelo de peritonite induzida por carragenina, a Rip B (10 mg/kg, via i.p.) diminuiu as concentrações de IL-1 β e TNF- α no exsudato peritoneal e a contagem total de leucócitos e diferencial de neutrófilos. Na atividade antinociceptiva verificou-se que nos grupos onde foi administrada a Rip B (10 mg/kg, via i.p.) houve a redução estatisticamente significativa do número de contorções abdominais e do número de lambeduras de pata no teste da formalina. Todavia, os animais pré-tratados com Rip B (10 mg/kg, via i.p.) não apresentaram aumento na latência de resposta no modelo da placa quente, sugerindo que a ação desta alcalamida é dependente de eventos inflamatórios periféricos, e não de um mecanismo de ação central. Além disso, a mesma dose de Rip B também foi capaz de reduzir a concentração de MDA e o aumento dos níveis de GSH no exsudato peritoneal. Estes achados sugerem que a ação anti-inflamatória, antinociceptiva e antioxidante da Rip B esteja relacionada com a inibição da produção ou liberação de mediadores pró-inflamatórios, redução da MPO na pata, redução e da migração de leucócitos e infiltração de neutrófilos, diminuição de citocinas pró-inflamatórias, bem como redução de um efeito antioxidante. Tais dados levantam a possibilidade de que a Rip B poderia ser utilizada para melhorar a resistência do tecido aos danos ocasionados durante o processo inflamatório, bem como durante os processos álgicos.

Palavras chave: Riparina B. Anti-inflamatório. Antinociceptivo.

ABSTRACT

Anti-inflammatory and Antinociceptive of Riparin B in Mice.

Fortes, R. F. Post-Graduate Program in Pharmacology. Mastership Dissertation, NPPM/CCS/UFPI, PPGF (2015).

ABSTRACT

Isolated from the fruit-green *Aniba riparia*, the Riparina B (N- [2- (3,4-dimethoxy-phenyl) -ethyl] -benzamide) (Rip B) is a non-heterocyclic alkaloid, more specifically, a alkaloid natural. In the literature there are few reports about the direct effect of Rip B on the inflammatory and nociceptive process in different animal models. Thus, the aim of this study was to investigate the anti-inflammatory, antinociceptive and antioxidant Rip B in experimental models. Swiss mice males and females were used (20-25 g) (Animal Ethics Committee / UFPI, no. 068/2014). The anti-inflammatory activity was assessed using the paw edema induced by various inflammatory mediators, such as dextran, compound 48/80, histamine, serotonin, bradykinin and PGE₂; activity of the enzyme myeloperoxidase (MPO) in paw carrageenan-induced peritonitis, levels of proinflammatory cytokines (IL-1 β and TNF- α). For the investigation of analgesic activity test was used: abdominas writhing induced by acetic acid 0.6% 1.2% formalin and hot plate. The antioxidant activity was assessed by investigating the levels of malondialdehyde (MDA) and glutathione (GSH) in the peritoneal exudate. Pretreatment with Rip B (10 mg / kg, i.p.) significantly reduced the paw edema induced by carrageenan, dextran and compound 48/80. It also reduced the paw edema induced by phlogistic agents: histamine, serotonin, bradykinin and PGE₂. Significativemente reduced levels of MPO enzyme in plant tissue, in the model of carrageenan-induced peritonitis, Rip B (10 mg / kg, i.p.) reduced the total count of leukocytes and differential of neutrophils and IL-1 β and TNF concentrations - α peritoneal exudate. The antinociceptive activity was found that the groups which were administered Rip B (10 mg / kg, i.p.) showed a statistically significant reduction in the number of writhes and reduction of paw licking in the formalin test. However, animals pretreated with Rip B (10 mg / kg i.p.) did not show an increase in latency in hot plate model, suggesting that this action is dependent alkaloid peripheral inflammatory events, rather than a mechanism central action. In addition, the same dose of Rip B was also able to reduce the concentration of MDA and increased GSH levels in the peritoneal exudate. These findings suggest that the action of anti-inflammatory, antinociceptive and Rip antioxidant B is related to the inhibition of the production or release of pro-inflammatory mediators, reduction of MPO in the paw, reduction of leukocyte migration and infiltration of neutrophils, decreased Pre-inflammatory cytokines as well as reduction of an antioxidant effect. These data raise the possibility that Rip B could be used to improve tissue resistance to damage caused during the inflammatory process as well as during the nociceptive process.

Key Words: Riparin B. Anti-inflammatory. Antinociceptive

LISTA DE FIGURAS E TABELA

LISTA DE FIGURAS E TABELA

FIGURA 1 – Família: Lauraceae / Gênero: <i>Aniba</i>	22
FIGURA 2 – Estrutura químicas das riparinas I, II, III e IV.....	25
FIGURA 3 – Reação geral das riparinas sintéticas a, b, c, d, e, f.....	25
FIGURA 4 – Estrutura química da riparina B.....	26
FIGURA 5 – Mecanismos dos eventos celulares da resposta inflamatória - marginação, rolamento, ativação, adesão, diapedese e quimiotaxia	29
FIGURA 6 – Interação das vias ascendente e descendente na dor	37
FIGURA 7 – Plestismômetro Panlab [®]	45
FIGURA 8 – Caixa de vidro utilizada para os testes de nocicepção: contorção, formalina	48
FIGURA 9 – Contorção abdominal acompanhada por contrações do tronco e alongamento dos membros posteriores do animal	49
FIGURA 10 – Placa quente utilizada para avaliação da atividade analgésica.....	51
FIGURA 11 – Efeito da riparina b sobre o edema de pata induzido por dextrana	56
FIGURA 12 – Edema de pata induzido por composto 48/80	57
FIGURA 13 – Ação da riparina B sobre o edema de pata induzido por histamina..	58
FIGURA 14 – Edema de pata induzido por serotonina.....	59
FIGURA 15 – Ação da riparina B sobre o edema de pata induzido por bradicinina.....	60
FIGURA 16 – Efeito da riparina B no edema de pata induzido por PGE ₂	61
FIGURA 17 – Atividade da enzima mieloperoxidase na pata.....	62
FIGURA 18 – O tratamento com riparina B reduziu a migração de leucócitos para a cavidade peritoneal no modelo de peritonite induzida por carragenina em camundongos.....	64
FIGURA 19 – A riparina B reduziu a infiltração de neutrófilos no modelo de peritonite induzida por carragenina em camundongos	65
FIGURA 20 – Efeito da riparina B sobre os níveis de IL-1 β no exsudato peritoneal de camundongos.....	66
FIGURA 21 – Efeito da riparina B sobre os níveis de TNF- α no exsudato	

peritoneal de camundongos	67
FIGURA 22 – A riparina B diminui o número de contorções induzidas por ácido acético.....	68
FIGURA 23 – A riparina B diminui o tempo de lambedura de pata no teste da formalina a	69
FIGURA 24 – Efeito da riparina B na nocicepção térmica (placa quente) em camundongos.....	70
FIGURA 25 – Ação da riparina B sobre os níveis de MDA no exsudato peritoneal de camundongos	71
FIGURA 26 – Ação da riparina B sobre os níveis de GSH no exsudato peritoneal de camundongos	72
TABELA 1 – Efeito da Riparina B, veículo e indometacina sobre o edema de pata induzido por carragenina em camundongos.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE ABREVIATURAS

μM	Micromolar
AA	Ácido araquidônico
AINEs	Anti-inflamatórios não esteroidais
BK	Bradicinina
CEEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
Cg	Carragenina
COX	Ciclo-oxigenase
DMSO	Dimetilsulfóxido
DXT	Dextrana
eNOS	Oxido Nítrico Sintase endotelial
E.P.M.	Erro padrão da média
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GC	Glicocorticoides
GSH	Glutathione
IASP	Associação internacional para o estudo da dor
ICAM	Molécula de adesão intracelular
IL	Interleucina
Ind	Indometacina
iNOS	Óxido Nítrico Sintase Induzível
LOX	Lipo-oxigenase
LTs	Leucotrienos
MDA	Malondialdeído
NF- κB	Fator de Transcrição Nuclear B
NGF	Fator de Crescimento Neural
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
NPPM	Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais
OPD	Dicloridrato de o-fenilenodiamina
PAF	Fator de Ativação Plaquetária
PBS	Tampão fosfato-salino

pg	Picograma
PGs	Prostaglandinas
PGES	Prostaglandina E-sintetase
PGI	Prostaciclina
Rip B	Riparina B
RNS	Espécies reativas de Nitrogênio
ROS	Espécies reativas de Oxigênio
rpm	Rotações por Minuto
SNC	Sistema Nervoso Central
TX	Tromboxano
TNF	Fator de necrose tumoral
UMPO	Unidade de mieloperoxidase
VCAM-1	Molécula de adesão celular
5-HT	5-Hidroxitriptamina [serotonina]

SUMÁRIO



SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	20
1.1 O Uso de Plantas Medicinais	20
1.1.2 Família Lauraceae	21
1.1.3 Gênero <i>Aniba riparia</i>	22
1.1.4 Riparinas	23
1.1.5 Riparina B	26
1.2 O processo inflamatório	27
1.2.1 Eventos Vasculares	28
1.2.2 Eventos Celulares	28
1.2.3.1 Mediadores Químicos da Inflamação	30
1.2.3.1.1 Citocinas	30
1.2.3.1.2 Aminas Vasoativas	31
1.2.3.1.3 Bradicinina	32
1.2.3.1.4 Prostaglandinas	32
1.3 Dor e Nocicepção/Tipos de Dor	33
1.3.1 Dor inflamatória	34
1.3.2 Mecanismos Neurais da Dor	35
1.3.3 Terapias Anti-inflamatória e Analgésica Clássicas	37
2. OBJETIVOS	41
2.1 Geral	41
2.2 Objetivos Específicos	41
3 MATERIAL E MÉTODOS	43
3.1 Animais	43
3.2 Riparina B	43
3.3 Atividade Anti-inflamatória.....	43
3.3.1 Avaliação do Edema de Pata Induzido por Carragenina	44

3.3.2 Avaliação do Edema de Pata Induzido por Agentes Flogísticos	44
3.3.3 Avaliação da Atividade de Mieloperoxidase (MPO) na Pata:.....	45
3.3.4 Avaliação da Ação da Riparina B sobre a Peritonite Induzida por Carragenina	46
3.3.5 Dosagem dos Níveis de Citocinas Pró-inflamatórias	47
3.4 Estudo da Atividade Antinociceptiva.....	47
3.4.1 Contorções Abdominais Induzidas por Ácido Acético	47
3.4.2 Teste da Formalina (“licking test”).....	49
3.4.3 Teste da Placa Quente	50
3.5 Dosagem dos Níveis de Malondialdeído (MDA).....	51
3.6 Dosagem dos Níveis de Glutathione (GSH)	52
3.7 Análise Estatística	52
4 RESULTADOS	54
4.1.1 Efeito da Riparina B no Modelo de Edema de Pata Induzido por Carragenina em Camundongos	54
4.1.2 Efeito da Riparina B no Modelo de Edema de Pata Induzido por Dextrana em Camundongos.....	56
4.1.6 Ação da Riparina B sobre o Edema de Pata Induzido por 48/80.....	57
4.1.3 Efeito da Riparina B no Modelo de Edema de Pata Induzido por Histamina em Camundongos	58
4.1.4 Efeito da Riparina B no Modelo de Edema de Pata Induzido por Serotonina em Camundongos	59
4.1.5 Efeito da Riparina B no Modelo de Edema de Pata Induzido por Bradicinina em Camundongos	60
4.1.7 Ação da Riparina B sobre o Edema de Pata Induzido por PGE2.....	61
4.1.8 Ação da Riparina B sobre a Atividade da Mieloperoxidase (MPO) na Pata.....	62
4.1.9.1 Ação da Riparina B sobre a Migração de Neutrófilos Induzida por Carragenina em Camundongos	63
4.1.9.2 Atividade da Riparina B sobre os Níveis de Citocinas IL 1- β e TNF- α no Fluido Peritoneal de Camundongos Estimulados com Carragenina.....	66

4.1.9.3 Riparina B Atuando na Redução das Contorções Abdominais Induzidas por Ácido Acético em Camundongos	68
4.1.9.4 Nocicepção Induzida por Injeção Intraplantar de Formalina em Camundongos.....	69
4.1.9.5 Nocicepção Térmica Induzida por Placa Quente em Camundongos	70
4.1.9.6 Ação da Riparina B sobre os Níveis de Malondialdeído no Exsudato Peritoneal de Camundongos	71
4.1.9.7 Ação da Riparina B sobre os Níveis de Glutathione no Exsudato Peritoneal de Camundongos	72
5 DISCUSSÃO.....	74
6 CONCLUSÕES	89
7 PERSPECTIVAS	91
REFERÊNCIAS.....	93

INTRODUÇÃO



1 INTRODUÇÃO

1.1 O Uso de Plantas Medicinais

Entende-se por planta medicinal aquela administrada sob qualquer forma e por alguma via ao homem, exercendo alguma ação farmacológica (SILVA; CARVALHO, 2004). Por suas propriedades terapêuticas ou tóxicas, os medicamentos a base de plantas, vêm ganhando cada vez mais espaço, assumindo um papel importante como meio terapêutico alternativo (ZAFALON et al; 2007; WERKMAN et al; 2008). Todavia, a introdução de novos medicamentos no mercado requer inúmeros estudos. A partir dos primeiros trabalhos publicados na década de 90, vem sendo constatado o valor de estudos etnodirigidos na investigação de compostos químicos de plantas com potencial atividade farmacológica, baseado no conhecimento acumulado de uma determinada cultura para cura de suas doenças (ALBUQUERQUE; HANAZAKI, 2006). Desde então, a principal estratégia das grandes companhias farmacêuticas é incentivar pesquisas com o intuito de descobrir novas drogas a partir de produtos naturais (SEIDL, 2002).

No início da vida do homem, os vegetais que eram utilizados preferencialmente como alimento em alguns países, transformaram-se em aliados no arsenal terapêutico em outras regiões. Num estágio mais avançado da história do uso das plantas medicinais surgiu a Fitoterapia - ciência que trata dos problemas de saúde, seja na prevenção ou no tratamento, utilizando vegetais – fitocomplexos, que se desenvolveu dentro das Medicinas Chinesa e Ayurvédica (PANIZZA, 2004; VERDI et al., 2005). A história da Fitoterapia confunde-se com a da própria humanidade. Foi encontrado um manuscrito egípcio datado de 1.500 anos a.C., que relata o conhecimento e uso de plantas medicinais tanto pelo faraó como por seus contemporâneos. Provou-se mais tarde que este manuscrito era o primeiro tratado médico egípcio conhecido (UFU, 2014). Com isso, pode-se afirmar que a medicina como conhecemos hoje, só foi possível pelo resgate acerca dos métodos de cura e conhecimentos empíricos utilizados há milhares de anos (AQUINO et al, 2007).

Ao longo dos séculos, produtos de origem vegetal constituíram as bases para tratamento de diversas doenças, quer de forma tradicional, devido ao conhecimento das propriedades de determinada planta, que é passado de geração a geração, quer

pela utilização de espécies vegetais, como fonte de moléculas ativas (CARVALHO; SILVEIRA, 2010).

Com o surgimento da medicina moderna, houve necessidade de investigar os constituintes ativos presentes nas plantas. Diversas moléculas já foram identificadas, isoladas e testadas no que concerne à sua ação farmacológica. As moléculas ativas presentes nas plantas forneceram as ferramentas necessárias para o desenvolvimento de moléculas sintéticas mais eficazes (AGNIHOTRI et al., 2010).

Os anti-inflamatórios são os melhores exemplos da grande relação entre processos primitivos de seleção de plantas medicinais, a farmacologia e a química moderna (SILVA et al., 2002). A atividade anti-inflamatória demonstrada pelas plantas deve-se uma variedade de metabólitos secundários, tais como polifenóis, saponinas, flavonoides, ácidos fenólicos, esteroides, triterpenos e alcaloides (KUMAR et al., 2009; SAEED et al., 2010).

O Brasil pode se inserir neste cenário como uma das maiores biodiversidades do mundo, com uma imensa quantidade de produtos para serem explorados, os quais podem ser utilizados na descoberta de novos produtos de interesse farmacêutico. Nesse contexto, destaca-se a família Lauraceae com inúmeros gêneros e espécies, dentre eles o gênero *Aniba* a partir do qual deriva-se a substância Riparina B (Rip B), uma alcanida natural com diversas propriedades terapêuticas que vem sendo alvo de estudos nos últimos anos.

1.1.2 Família Lauraceae

Lauraceae (**FIGURA 1**) é uma família botânica com aproximadamente 50 gêneros e 2500 a 3000 espécies. Destas, 400 espécies distribuídas em 25 gêneros, com distribuição pantropical sendo bem representada na América, Ásia tropical, Austrália e Madagascar e pouco expressiva no sul da África (ROHWER, 1993; VAN DER WERFF; RICHTER, 1996). No Brasil, a família é reconhecida por 23 gêneros e 434 espécies, dos quais 18 gêneros e 125 espécies foram catalogadas na região Nordeste do Brasil (QUINET et al., 2012).

Os primeiros registros relativos à utilização das espécies desta família datam de 2.800 A.C, sendo originários da Grécia antiga (BARROSO et al., 1978; COETEIXEIRA, 1980).

A família Lauraceae fornece óleos essenciais e alcaloides empregados na perfumaria, cosmetologia e na fabricação de fármacos (MARQUES, 2001). Do ponto de vista ecológico formam um importante grupo, principalmente na região Neotropical, onde está entre as famílias de maior riqueza em diferentes comunidades, especialmente nas florestas de terras baixas ou em altitudes intermediárias. Em remanescentes de Floresta Atlântica, Lauraceae vem sendo apontada como uma das mais representativas, tanto em número, quanto em riqueza de táxons (QUINET; ANDREATA, 2002).

Nesse cenário de grande diversidade ao longo da Floresta Atlântica, aliada à exploração econômica, observa-se o elevado número de espécies ameaçadas de extinção. A lista referendada pela comunidade científica cita para o Brasil 36 espécies da família ameaçadas de extinção (IUCN 2009).

A Lauraceae destaca-se das demais famílias por sua importância econômica (MARQUES, 2001). Além disso, o gênero *Aniba* também tem grande representatividade quanto à presença de óleos essenciais e outras substâncias bioativas.



FIGURA 1 – Família: Lauraceae / Gênero: *Aniba* (ROHWER, 2011).

1.1.3 Gênero *Aniba*

Dentre as espécies medicinais representadas pela família Lauraceae, merecem destaque as pertencentes ao gênero *Aniba*, composto por uma média de

41 espécies e que se apresentam na diversidade da Amazônia Central e Guiana. É um gênero que se encontra nos Andes, nas montanhas do Norte da Venezuela, nas pequenas Antilhas e no leste e sul do Brasil (MELO et al., 2005).

No Brasil, o gênero é representado por cerca de 25 espécies, dentre elas, a *Aniba riparia* (Ness) Mez que é típica da região amazônica, sendo popularmente conhecida como louro-amarelo (CASTELO-BRANCO et al., 2000; BARBOSA et al., 1988). Seus frutos contêm diversos constituintes químicos, como por exemplo, flavonoides, neolignananas, estilipironas e alcanidas (BARBOSA-FILHO et al., 1990). Esta última classe de substância, tem sido fonte de interesse de diversos pesquisadores na busca de novas fontes vegetais com princípios farmacologicamente ativos (CASTELO-BRANCO, 2000).

Diversos estudos científicos já comprovaram atividades biológicas referentes às espécies do gênero *Aniba*, associadas a sua ação em nível de sistema nervoso central (SNC), tais como efeitos ansiolítico e antidepressivo, e também atividade anti-inflamatória e antinociceptiva da *Aniba riparia* (SOUSA et al., 2004; MELO et al., 2005; CARVALHO, 2011; DIAS, 2012; OLIVEIRA, 2012).

A partir do fruto verde desta planta foram isolados alguns alcalóides, do tipo alcanidas, que foram chamados de Riparinas (Barbosa-Filho et al., 1987; Thomas et al., 1994).

1.1.4 Riparinas

As alcanidas naturais constituem uma classe especial de alcaloides contendo uma função amida restrita a poucos representantes na natureza (CATÃO et al., 2005). Do ponto de vista biogênico, as alcanidas representam uma classe distinta de produtos naturais que se forma ao serem conjugadas nas diferentes rotas metabólicas, sendo, portanto, metabólitos secundários, cuja estrutura geral se origina da condensação de um ácido graxo insaturado e uma amina, formando assim, uma amida (alcanida) (HOFER et al., 1986).

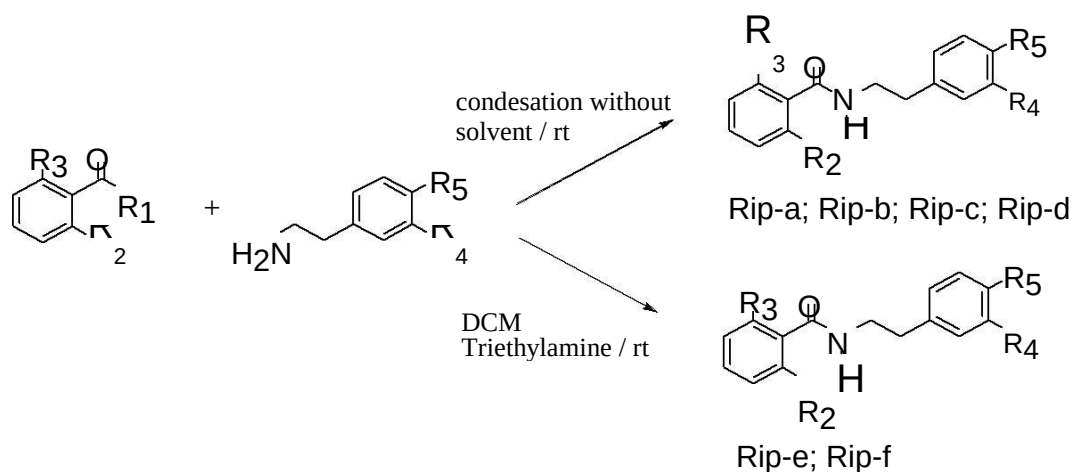
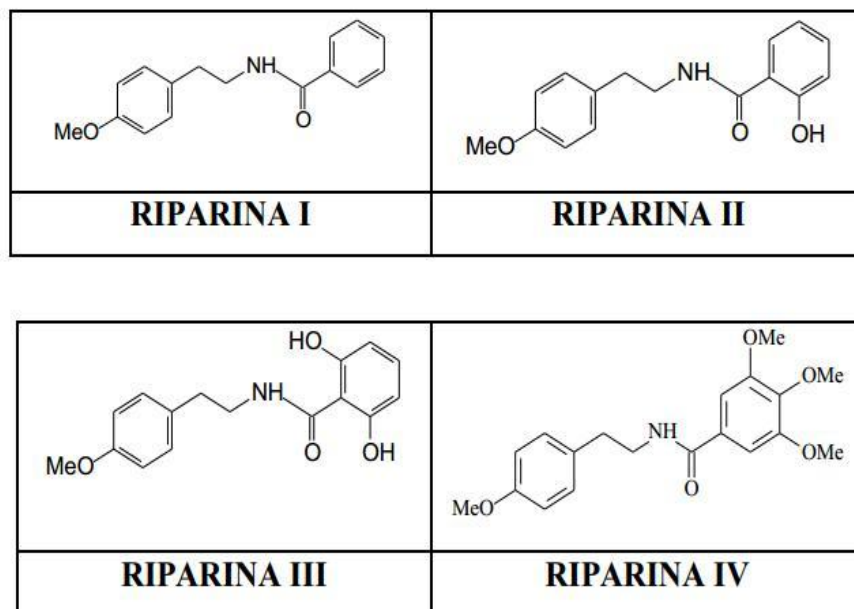
O grupo funcional amida, encontra-se em todos os organismos vivos, formando uma união entre os aminoácidos para a formação da estrutura primária de uma proteína. No entanto, as alcanidas são consideradas compostos bioativos, isto é, uma pequena quantidade desses compostos apresenta uma resposta notável nas células receptoras (TORRES; CHAVEZ, 2001). As alcanidas podem ser formadas a

partir de feniletilaminas naturais, como a tiramina e a dopamina, com ácidos orgânicos. A tiramina tem sido frequentemente encontrada em conjugados formando alcanidas, em algumas plantas, como por exemplo, na forma de N-trans-coumaroil-tiramina na espécie *Piper sanctum* (MATA et al., 2004), na forma de N-feruloil-tiramina na *Piper argyrophyllum* (SHING et al., 1996) e na forma de N-benzoil-tiramina na *Aniba riparia* (BARBOSA-FILHO et al., 1987), além de seus análogos.

Os alcaloides do tipo alcanida foram isolados do fruto verde da *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae), obtendo-se as riparinas I, II, III e IV (**FIGURA 2**). Esses compostos apresentaram atividades farmacológicas comprovadas em estudos pré-clínicos, como as atividades ansiolítica, antidepressiva e anticonvulsivante (LEITE, 2008), além de serem eficazes como antimicrobianos contra cepas de *Staphylococcus aureus* (CATÃO et al., 2010). Dessa forma, foram preparados novos derivados das riparinas, denominadas A e B e a partir da condensação dos ésteres metílicos com as feniletilaminas substituídas, foram obtidas as riparinas C, D, E e F.

Os análogos das riparinas foram obtidos utilizando uma metodologia simples e de resultados seguros com viabilização de exploração comercial dessas novas moléculas pela indústria farmacêutica, diante da disponibilidade independente da concentração da substância selecionada nas fontes naturais (GUTIERREZ, 2007).

Assim, tendo em vista que as riparinas naturais tem amplo potencial terapêutico, é importante realizar estudos das possíveis atividades farmacológicas das riparinas A-F (**FIGURA 3**), como por exemplo atividade anti-inflamatória, antioxidante e antinociceptiva.

FIGURA 2 – Estrutura químicas das riparinas I, II, III e IV (CASTELO-BRANCO et al., 1992).

- (Rip-a) R1=Cl; R2=R3=R4=R5=H
 (Rip-b) R1=Cl; R2=R3=H; R4=R5=OCH3
 (Rip-c) R1=OCH3; R2=OH; R3=R4=R5=H
 (Rip-d) R1=OCH3; R2=OH; R3=H; R4=R5=OCH3
 (Rip-e) R1=OCH3; R2=R3=OH; R4=R5=H
 (Rip-f) R1=OCH3; R2=R3=OH; R4=R5=OCH3

FIGURA 3 – Reação geral das riparinas sintéticas a, b, c, d, e, f (NUNES et al., 2012).

1.1.5 Riparina B

A Riparina B (N-[2-(3,4-dimetóxi-fenil)-etil]-benzamida) foi isolada e sintetizada pela primeira vez no Laboratório de Tecnologia Farmacêutica (LTF) da Universidade Federal da Paraíba (BARBOSA et al, 1988; BARBOSA-FILHO et al., 1990).

Por meio de reação de Schotten-Baumann, preparou-se o N-[2-(3,4-dimetoxifenil) – etil] -benzamida (Rip B) a partir de 0,41mL de cloreto de benzoílo e 1,2 mL de 3,4 -dimetoxifeniletilamina. A reação terminou em 30 minutos, resultando em 0,82g do composto chamado Rip-B com ponto de fusão entre 88,5 e 90 ° C e rendimento de 80,44%. A Riparina B é um alcaloide do ciclo não-heterocíclico, mais especificamente, uma alcalamida natural. É formada da união da tiramina, uma feniletilamina, e o ácido benzoico. Apresenta uma substituição no anel do ácido benzoico, acrescentando uma hidroxila e o anel da tiramina apresenta um metil ligado ao oxigênio formando uma função éter (NUNES et al., 2014) (**FIGURA 4**).

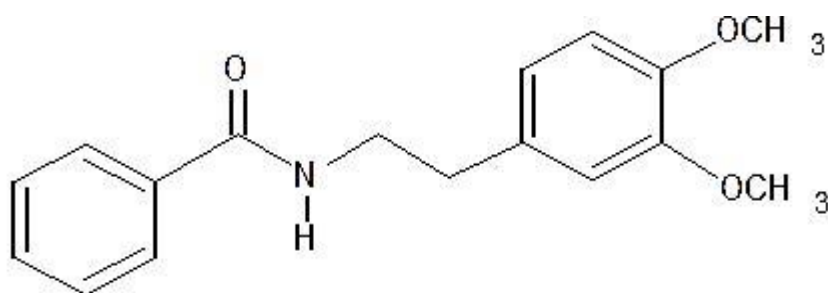


FIGURA 4 – Estrutura química da riparina B (CASTELO-BRANCO et al., 2000).

Em estudo anteriores, ficou demonstrado que essa alcalamida é capaz de induzir, de forma não-específica e reversível, o relaxamento das contrações produzidas por acetilcolina e histamina em íleo de cobaia e por ocitocina e bradicinina em útero de rata virgem, com valores de CI50 variando de 1,7 a 5 µg/mL (CASTELO-BRANCO et al, 2000).

A Riparina-B também foi capaz de causar redução da pressão arterial e da frequência cardíaca em ratos acordados e não estressados na dose de 1 mg/kg, via intraperitoneal, o que parece envolver um componente de origem parassimpática (SEIXAS, 1996).

Contudo, há poucos relatos na literatura acerca do efeito direto sobre os processos inflamatório e nociceptivo em diferentes modelos animais, com o objetivo de avaliar o potencial farmacológico desta alcalamida natural e possíveis mecanismos de ação envolvidos nessa resposta.

1.2 O processo inflamatório

A inflamação é um processo regulatório iniciado como consequência de lesão tecidual ou infecção. A principal função da inflamação é eliminar o estímulo patogênico para remover o tecido danificado, com o objetivo de restaurar a homeostase (SOEHNLEIN; LINDBOM, 2010). A reação inflamatória é fundamental, pois age como uma espécie de defesa natural do organismo e, sem ela, torna-o mais susceptível a infecções oportunistas (KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005; SCHELTER, 2008).

As primeiras descrições das características clínicas da inflamação foram encontradas em papiros egípcios, datados de aproximadamente 3000 a.C., mas o primeiro autor a listar os quatro sinais cardinais da inflamação foi Celsius, um escritor romano do século I d. C., que relatou: rubor e o calor como resultado de um aumento da circulação na área inflamada, o tumor como consequência do aumento local do líquido intersticial e a dor dependente do acúmulo, no local, de substâncias biológicas que atuam sobre as terminações nervosas. A perda de função, como um quinto sinal, foi adicionado posteriormente por Virchow (KUMAR et al., 2006; SILVA; LEME, 2006).

A inflamação pode iniciar-se por 3 gatilhos: lesão tecidual mecânica, infecção ou, estresse e mal-funcionamento tecidual. O organismo humano está preparado para responder a cada um desses gatilhos, com reparo tecidual, eliminação do patógeno e adaptação ao estresse com retorno a homeostase (MEDZHITOV, 2008).

O processo inflamatório pode ser dividido em duas categorias, levando-se em consideração sua duração ou tempo de evolução relativa, a inflamação aguda (de curta duração – horas ou dias) e a inflamação crônica (semanas, meses ou até anos). A inflamação aguda é caracterizada pelo predomínio daquilo que chamamos de fenômenos exsudativos, ou seja, referentes a alterações da permeabilidade vascular, permitindo o acúmulo na região inflamada de líquido (edema), fibrina (que se forma no interstício pela interação entre componentes do plasma, fatores dos tecidos e leucócitos, especialmente neutrófilos (CARRAWAY et al., 2003).

Independente da duração da resposta inflamatória, ela se caracteriza pela presença de eventos vasculares e celulares. Tais eventos ocorrem de forma sequencial e somada na instauração do processo inflamatório, na tentativa de

eliminar o agente agressor ou produtos do seu metabolismo (SERHAN; SAVIL, 2005).

1.2.1 Eventos Vasculares

Logo após a lesão ocorre uma vasoconstrição reflexa, de origem neurogênica, mediada pelo sistema nervoso autônomo. Poucos segundos após, inicia-se a vasodilatação arteriolar, aumentando o fluxo sanguíneo para a região, provocando calor e rubor. As modificações nos vasos de pequeno calibre levam ao extravasamento de proteínas plasmáticas para o espaço extracelular, causando aumento da pressão oncótica e retenção de água no interstício – edema. Ocorre também a estase sanguínea, devido ao aumento da permeabilidade da microvasculatura, uma vez que o extravasamento de líquidos e proteínas para o interstício provoca hemoconcentração, aumento da viscosidade sanguínea e lentidão da circulação. Todas essas alterações são causadas por substâncias liberadas no local da inflamação, que são os mediadores inflamatórios (BHANDARE et al, 2010).

Em decorrência das alterações vasculares, as células sanguíneas deixam a posição axial no interior dos vasos e assumem uma posição marginal, isto é, passam a circular mais próximas do endotélio vascular. Esse evento é chamado de marginação. Durante o processo inflamatório as células endoteliais que revestem os vasos são ativadas por diversos mediadores inflamatórios (histamina, trombina, fator ativador de plaquetas (PAF) e citocinas) e expressam várias moléculas de adesão que se ligam a moléculas complementares expressas na membrana celular dos leucócitos promovendo a rolagem e posteriormente a firme adesão dos leucócitos às células do endotélio (POBER; SESSA, 2007; LANGER; CHAVAKIS, 2009). Assim, iniciam-se os eventos celulares do processo inflamatório.

1.2.2 Eventos Celulares

A ativação do endotélio dos vasos sanguíneos permite a transmigração de neutrófilos, porém hemácias não conseguem atravessar o endotélio (EMING et al, 2007). Estes leucócitos oriundos do sangue passam para o tecido inflamado através de um processo que se apresenta em seis eventos: marginação, rolamento, ativação, adesão, diapedese com penetração através da membrana basal dos pericitos (transmigração através do endotélio) e quimiotaxia (migração no tecido intersticial em resposta ao estímulo quimiotático) (**FIGURA 5**) (LEY et al, 2007).

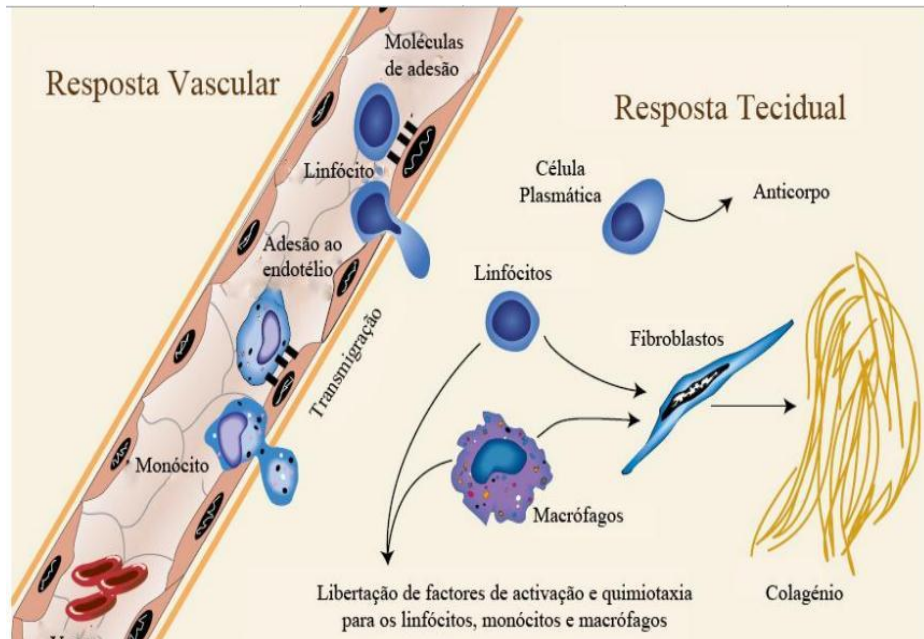


FIGURA 5 – Mecanismos dos eventos celulares da resposta inflamatória - marginação, rolamento, ativação, adesão, diapedese e quimiotaxia (SERHAN et al., 2010).

A adesão e transmigração de leucócitos são produzidas pela interação de moléculas de adesão de células endoteliais com receptores de quimiocinas e integrinas em leucócitos, que ocorre na superfície endotelial, bem como nos espaços extravasculares (EMING et al, 2007). Mediadores quimiotáticos e certas citocinas medeiam este processo modulando a expressão superficial destas moléculas de aderência. Os receptores de aderência envolvidos pertencem a quatro famílias moleculares: selectinas, imunoglobulinas, integrinas e glicoproteínas (KAKKAR; LEFER, 2004). No tecido alvo, os neutrófilos tornam-se ativados, ou pelo contato direto com patógenos ou por meio da ação de citocinas secretadas pelas células residentes, e tentam combater agentes invasores liberando o conteúdo tóxico de seus grânulos, que incluem espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécies reativas de nitrogênio (RNS), proteinase 3, catepsina G e elastase. Estes efetores altamente potentes não discriminam entre o agente agressor e células do hospedeiro, portanto, danos ao tecido do hospedeiro são inevitáveis (NATHAN, 2002).

Durante a resposta inflamatória aguda, ocorre a síntese de mieloperoxidase (MPO), liberada durante a diferenciação mielóide na medula óssea. Esta enzima é encontrada predominantemente em neutrófilos, monócitos e alguns subtipos de macrófagos teciduais. Representa cerca de 5% do conteúdo proteico total de um neutrófilo e cerca de 1% no monócito. É a principal constituinte dos

grânulos azurófilos dos neutrófilos. Liberada imediatamente após ativação dos neutrófilos, contribuindo para a defesa do organismo (ROMAN et al., 2008).

Caso não haja eliminação do patógeno durante a fase aguda, o processo inflamatório persiste e adquire novas características. O infiltrado de neutrófilos é substituído por macrófagos e, em caso de infecção também por células-T. Além de patógenos persistentes, a inflamação crônica pode resultar de outras causas de dano tecidual, como resposta autoimune ou corpos estranhos não degradados (MEDZHITOV, 2008).

1.2.3.1 Mediadores Químicos da Inflamação

O processo inflamatório envolve uma série de mediadores, além de células e enzimas, responsáveis pelo desenvolvimento da resposta inflamatória (WARD, 2004). Alguns desses mediadores são: citocinas, aminas vasoativas (histamina e serotonina), bradicinina, prostaglandinas.

1.2.3.1.1 Citocinas

As citocinas são mediadores proteicos ou peptídeos que regulam a atividade celular, incluem: interleucinas (IL), linfocinas, interferons e fator de necrose tumoral (TNF) (TYSON et al., 2001). As principais citocinas pró-inflamatórias são as interleucinas (IL-1, IL-2, IL-6, IL-8) e o TNF- α . Uma vez ativados, o TNF- α e IL-1, são secretados pelos macrófagos e apresentam tanto efeitos locais como sistêmicos (GRELLNER, 2002).

O TNF- α é produzido principalmente por fagócitos, mas também pode ser produzido por células inflamatórias (neutrófilos, linfócitos e mastócitos) ou não-inflamatórias (endotélio), exerce potentes efeitos anti-inflamatórios: induzindo a expressão endotelial ICAM-1 e VCAM-1, serve como fator de crescimento para fibroblastos e angiogênese, aumenta a permeabilidade vascular e promove liberação do fator nuclear- κ B no citosol (LAMPINEM et al., 2004; CUZZOCREA, 2005; ALWANI et al., 2006). Entre seus efeitos sistêmicos estão: indução da febre, supressão miocárdica, ativação da cascata de coagulação e indução de vasodilatadores sistêmicos (SHERWOOD; TOLIVER-KINSY, 2004).

A IL-1 é um potente mediador da inflamação e febre; seus efeitos fisiológicos são idênticos aos do TNF- α , entretanto a IL-1 não induz, por si só, lesão tecidual ou

morte apoptótica, embora possa intensificar os efeitos lesivos do TNF- α (WAGNER; ROTH, 2000; SHERWOOD; TOLIVER-KINSY, 2004).

1.2.3.1.2 Aminas Vasoativas

A histamina, é o primeiro mediador implicado nas alterações fisiopatológicas nas doenças inflamatórias. Assume importância nas fases iniciais da inflamação aguda uma vez que medeia a resposta do aumento da permeabilidade vascular (ROOME, 2007; OHTSU, 2008). Esta amina é sintetizada a partir da L-histidina que é catalisada pela enzima L-histidina descarboxilase no aparelho de Golgi, e depois armazenada nos grânulos dos mastócitos e basófilos.

Dentre as substâncias inflamatórias liberadas pelos mastócitos, a histamina é a que está melhor caracterizada e a mais potente mediadora vasoativa. No organismo, ela se liga a quatro classes de receptores histamínicos (NEUMANN et al, 2010).

Os receptores H_1 promovem constrição de músculo liso, exceto em vasos sanguíneos. Os receptores H_2 estimulam a secreção gástrica e cardíaca. Os receptores H_3 agem como autorreceptores pré-sinápticos e inibem a síntese e liberação de histamina em neurônios histaminérgicos no SNC. E, a última classe são os receptores H_4 que são expressos, preferencialmente, em células do sistema imune e mastócitos e induzem a quimiotaxia de eosinófilos, mastócitos, linfócitos T, células dendríticas e basófilos (PARSONS; GANELLIN, 2006). Dos seus quatro receptores, os receptores H_1 , H_2 e H_4 mostram ter ação sobre inflamação e respostas imunes e podem ser usados como alvos no tratamento de doenças imunes e inflamatórias (YU et al, 2010).

Tal como a histamina, a serotonina ou 5-hidroxitriptamina (5-HT) é formada pela descarboxilação do triptofano e armazenada nos grânulos secretores das plaquetas, sendo liberada das plaquetas pelo fator ativador de plaquetas (PAF). A serotonina possui ações semelhantes às da histamina, ou seja, vasoconstrição inicial, e juntamente com outros mediadores, vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular (ROOME, 2007; FAVACHO, 2009).

Sabe-se que a 5-HT apresenta uma variedade de efeitos devido à presença de múltiplos subtipos de receptores presentes em neurônios, musculatura lisa e, possivelmente, nas células endócrinas. Ela apresenta sete tipos, denominados

como: 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆, 5-HT₇, que são responsáveis por controlar as suas funções biológicas (ROOME, 2007; SIKANDER et al., 2009).

A serotonina medular também é capaz de modular processos de inflamação periférica pelo controle do nível de atividade dos terminais centrais de nociceptores. Esta atividade é tida como fator causa na geração do reflexo da raiz dorsal, responsável pela liberação de neuropeptídeos componentes da inflamação neurogênica (DAHER et al., 2005).

1.2.3.1.3 Bradicinina

A bradicinina (BK) vem da classe das cininas e é considerado um dos peptídeos mais importantes de uma série de processos patológicos que ocorrem depois de uma lesão tecidual. A BK é um importante mediador no processo inflamatório, visto que desempenha ações pró-inflamatórias. Ela é liberada após traumas e processos inflamatórios, o que promove o relaxamento das arteríolas e constrição das vênulas, gerando um aumento da permeabilidade microvascular e consequentemente aumento do extravasamento plasmático para o foco inflamatório (PESQUERO et al., 2000; COUTURE et al., 2001).

A maioria das ações fisiológicas da bradicinina são mediadas através da ativação de receptores do tipo B2. Estes receptores são constitutivos, amplamente distribuídos no organismo, incluindo o SNC de animais de várias espécies (FERREIRA et al., 2002). Os receptores B1 estão restritos a alguns tecidos, como a musculatura lisa vascular, sendo que muitas vezes coexistem com receptores B2.

Admite-se, com raras exceções, que o receptor B1 seja induzido em condições patológicas, como por exemplo, durante a inflamação crônica, lesão tecidual e em estados de hiperalgesia (MEDEIROS et al., 2004). Parece que a produção/liberação local de citocinas pró-inflamatórias pode estar envolvida na regulação destes receptores durante a inflamação (PASSOS et al., 2004; ROCHA et al., 2005).

1.2.3.1.4 Prostaglandinas

O ácido araquidônico (AA) é um ácido graxo de 20 carbonos, que pode ser metabolizado pela via das ciclo-oxigenases (COX), dando origem a formação de prostaglandinas (PGs), prostaciclina (PGI₂) e tromboxanos (TXs) ou pela via das lipo-oxigenases levando a síntese dos leucotrienos (LTs) e lipoxinas (LEES et al.,

2004; YEDGAR et al., 2007). Os eicosanoides (PGs, LTs, TXs) são mediadores lipídicos derivados do ácido araquidônico, que possuem funções importantes no processo inflamatório. As PGs possuem diversos efeitos biológicos, dentre eles destacam-se: quimiotaxia de leucócitos; vasodilatação; efeito pirógeno, diferenciação de queratinócitos; quimiotaxia sobre neutrófilos e macrófagos. Da mesma forma que as PGs, os leucotrienos encontrados no exsudato inflamatório, podem causar agregação e adesão leucocitária ao endotélio vascular, além de terem uma poderosa ação quimiotática e o poder de aumentar a permeabilidade vascular (LEE et al., 2003).

Existem duas isoformas de COX, COX-1 e COX-2, cada uma possuindo propriedades catalíticas, reguladoras e de distribuição nos tecidos específicas da sua isoforma (PHUNG, 2008).

A PGE₂, é o produto mais importante da COX, exibe uma ampla variedade de ações biológicas em diversos tecidos através da sua ligação a receptores específicos na membrana plasmática. Sendo uma das prostaglandinas mais abundantemente produzidas no organismo. Está envolvida em todos os processos clássicos da inflamação, é um importante mediador de muitas funções biológicas como a regulação de respostas imunes, pressão arterial, integridade gastrointestinal e fertilidade. Durante a inflamação, o rubor e a formação de edema resultam de um aumento do fluxo sanguíneo no tecido inflamado através de um incremento da dilatação arterial e permeabilidade vascular, mediados pela prostaglandina E₂. A dor resulta da ação da prostaglandina E₂ nos neurônios sensoriais periféricos e na medula espinhal (CLAUDINO et al., 2006; RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011).

1.3 Dor e Nocicepção/Tipos de Dor

A dor pode ser definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a uma lesão tissular potencial ou real, ou mesmo a nenhuma lesão, embora, ainda assim, descrita com termos sugestivos de que o dano tecidual tivesse de fato ocorrido. Cada indivíduo aprende a aplicação da palavra através de experiências relacionadas com lesões no início da vida (IASP, 2015). A percepção dolorosa a um determinado estímulo nocivo tem como propósito biológico alertar o organismo sobre algum perigo no ambiente, incluindo a resposta comportamental de proteger o organismo contra possíveis lesões (CHENG et al., 2002).

Uma distinção entre dor e nocicepção faz-se necessária, pois o termo nocicepção pode ser definido como a percepção de uma lesão real sendo controlada por um sistema de receptores que transmitem informações sobre a lesão para o Sistema Nervoso Central através de fibras nervosas especializadas (KONTINEN et al., 2001). Assim, enquanto a dor envolve a percepção de um estímulo aversivo e exige à capacidade de abstração e elaboração de impulsos sensoriais, a nocicepção refere-se às manifestações neurofisiológicas geradas pelo estímulo nocivo (ALMEIDA et al., 2004; LOESER; TREED et al., 2008).

Em termos de duração, a dor pode ser aguda ou crônica. A dor aguda está associada com uma lesão tecidual recente, ativação de nociceptores e pode desaparecer até mesmo antes da cura do dano tecidual (PARK; VASKO, 2005). Já a dor crônica é aquela que persiste mesmo tendo 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 protetora. Pode ser associada com a inflamação crônica, na qual o dano tecidual é óbvio (APKARIAN et al., 2009).

Por outro lado, Woolf; Salter (2000) enquadram os tipos de dor em fisiológica (quando há ativação direta dos nociceptores), inflamatória (provocada por danos teciduais) e neuropática (provocada por lesão de células do sistema nervoso central).

1.3.1 Dor inflamatória

A dor inflamatória é um sintoma comum de muitas doenças distintas, sendo caracterizada por hiperalgesia e alodinia, devido à sensibilização dos neurônios nociceptivos sensoriais primários (VERRI et al., 2006).

Após uma lesão tecidual ou inflamação, os nociceptores (terminações nervosas livres das fibras aferentes primárias) 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 doloroso (VERRI et al., 2006).

Os fragmentos celulares resultantes da lesão tecidual são capazes de desencadear uma reação inflamatória local, atraindo neutrófilos, eosinófilos, macrófagos e linfócitos. Tais células liberam mediadores inflamatórios, como: cininas (bradicinina), citocinas (interleucinas e fator de necrose tumoral), aminas (histamina e serotonininas), prostanoídes (prostaglandinas, prostaciclina e leucotrienos). Desse modo, a injúria celular e a reação inflamatória decorrente desta injúria expõem o

neurônio aferente primário a um grande número de substâncias capazes de estimular e sensibilizar o nociceptor. A resposta dolorosa que se segue é então decorrente da transformação dos estímulos em potenciais de ação que, a partir das fibras nervosas periféricas, são transferidos para o sistema nervoso central de forma bem organizada (CALIXTO et al., 2003, 2005; FERREIRA, 2008). Todos estes sistemas interagem com a função de proteger e imobilizar o tecido lesado, até que a causa da lesão seja definitivamente eliminada e o tecido restaurado. A amplificação do sinal nociceptivo é produzida não somente pelas substâncias liberadas no local da inflamação, mas também pelas fibras adjacentes ativadas ou sensibilizadas, em particular via reflexo axônico: fenômeno conhecido como inflamação neurogênica.

Este conjunto de interações neuroquímicas é a base da hiperalgesia, ambos originários do dano tecidual (hiperalgesia primária) e ao redor do tecido saudável (hiperalgesia secundária) (COUTAUX et al., 2005).

1.3.2 Mecanismos Neurais da Dor

Existem três mecanismos interligados que explicam a ocorrência da sensação de dor. O primeiro deles é a **transdução**, que consiste na ativação de nociceptores por ocorrência de um estímulo nocivo (mecânico, térmico ou químico), gerando um potencial de ação. O segundo mecanismo é a **transmissão**, efetuada pelo conjunto de vias que conduzem o impulso nervoso gerado pelo nociceptor, leva a informação dolorosa para o SNC. E por fim, a **modulação**, que pode ativar vias responsáveis pela supressão da dor gerada pelos próprios nociceptores e suas vias (JULIUS; BASBAUM, 2001).

Estímulos nocivos que resultam em uma sensação de dor rápida, fina e bem localizada em geral refletem a ativação de fibras A δ (que conduzem a dor primária, com estrita correlação com o estímulo e precisa localização espacial) e a nocicepção difusa e lenta, em queimação, é conduzida por fibras C (dor secundária, dor que continua mesmo após o estímulo nocivo ter cessado, dor de difícil localização e relacionada ao sofrimento). A dor visceral freqüentemente é pouco localizada, profunda e lenta. A lesão tecidual não é fundamental para que a dor visceral exista; ela pode resultar de uma distensão. Após a transdução do estímulo, este é transmitido através das fibras A δ e C, que se incorporam aos demais nervos periféricos e penetram na medula através dos nervos espinhais e no tronco

encefálico através do nervo trigêmeo (JULIUS; BASBAUM, 2001; LENT, 2004).

A dor rápida consiste na ativação de maior quantidade de terminações nervosas livres das fibras A δ , que são pouco mielinizadas e representam a dor —primária, que seria a dor aguda e cortante. Dividem-se em tipo I e tipo II, onde as fibras do tipo I são mais responsivas ao aquecimento lento e disparam o potencial de ação em temperaturas nocivas, a partir de 53,5 °C, enquanto que as fibras do tipo II disparam em temperaturas em torno de 46 °C. A ação lesiva no tecido provocada por uma agulha, por exemplo, e por substâncias químicas liberadas após a lesão, ativam ou sensibilizam os nociceptores constituídos por fibras livres do tipo C, que não são mielinizadas, tem velocidade de condução menor e respondem a estímulos mecânicos, térmicos ou químicos, medeiam uma dor mais latente e difusa que se perpetua por mais tempo (CRAIG, 2003; COUTAUX et al., 2005).

Classicamente, a transmissão da dor se faz por uma via bem conhecida, onde os nociceptores primários fazem sinapse no corno dorsal da medula, com neurônios de segunda ordem. Estes cruzam a medula espinhal para ascender o trato espinotalâmico, projetando suas fibras terminais principalmente ao tálamo. No tálamo, neurônios de terceira ordem emitem axônios através da cápsula interna ao córtex somatossensorial onde ocorre a percepção da dor. A convergência de estímulos inócuos e nocivos de origem articular, cutânea e muscular foi demonstrada, bem como as interconexões com o córtex somatossensorial primário, responsável pelos aspectos de localização e intensidade da dor (**FIGURA 6**) (WENG et al., 2000; LENT, 2004).

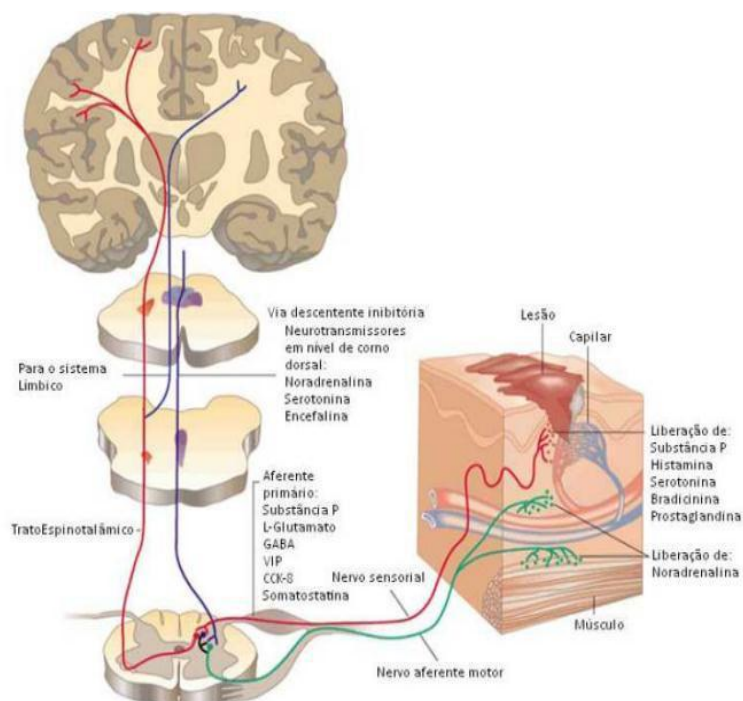


FIGURA 6 – Interação as vias ascendente e descendente na dor (fonte: http://www.sistemanervoso.com/pagina.php?secao=2&materia_id=454&materiav).

Neste contexto, substâncias capazes de diminuir a condição inflamatória tem sido empregadas no sentido de diminuir a dor, inibindo a produção de mediadores inflamatórios, ou ainda, bloqueando atividades de fibras aferentes, como os bloqueadores dos canais iônicos. Dentre essas substâncias destacam-se os produtos naturais, que podem ser considerados como uma população de estruturas selecionadas para interagir com uma grande variedade de proteínas e outros alvos biológicos para propósitos específicos; sendo reconhecidos como fármacos efetivos para uma grande variedade de indicações terapêuticas (KOEHN; CARTER, 2005).

1.3.3 Terapias Anti-inflamatória e Analgésica Clássicas

Desde a Antiguidade que as plantas têm sido utilizadas no tratamento de doenças inflamatórias e de outras patologias relacionadas (AGNIHOTRI et al., 2010; MUELLER et al., 2010). Com o surgimento da medicina moderna, houve necessidade de investigar os constituintes ativos presentes nestas plantas. Já foram identificadas, isoladas e testadas várias moléculas no que concerne às suas atividades farmacológicas. As moléculas ativas existentes nas plantas fornecem as ferramentas necessárias para o desenvolvimento de moléculas sintéticas mais eficazes (AGNIHOTRI et al., 2010). Neste contexto, temos os fármacos anti-

inflamatórios, que são capazes de interferir no processo reacional de defesa do organismo, minimizando os danos e proporcionando maior conforto ao paciente (TRACEY, 2002; NATHAN, 2002).

Os fármacos **anti-inflamatórios não esteroidais** (AINEs) são um dos mais utilizados no tratamento de diversas doenças inflamatórias. No entanto, os efeitos secundários que advêm do uso prolongado representam um grande problema no seu uso clínico (MARTELPelletier et al., 2003). Atualmente, os principais agentes anti-inflamatórios são representados pelos **glicocorticóides** e pelos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) (GOSSYE et al, 2009). Os AINEs têm aplicação mais ampla, agem, em sua maioria, inibindo a atividade das isoformas 1 e 2 da enzima COX, inibindo assim, a síntese de PG e TX (MORROW; ROBERTS II; 2003; BURIAN; GEISLINGER, 2005). Todos os AINEs convencionais, com o uso prolongado, possuem a tendência de causar efeitos gastrintestinais como sangramentos de estômago e duodeno, dispepsia e úlcera. Tais efeitos devem-se principalmente à inibição da isoforma COX-1 (MONTEIRO et. al, 2008; GELLER et al., 2012).

Os glicocorticóides (GC), como a dexametasona, são comumente prescritos devido ao fato serem potentes anti-inflamatórios e imunossupressores. Estes atuam em praticamente todos os órgãos e tecidos e agem nas fases iniciais e tardias da inflamação (GOSSYE et al, 2009).

No processo inflamatório há uma linha tênue entre os efeitos benéficos da inflamação e a possibilidade do processo causar e agravar uma lesão tecidual, levando a apoptose e necrose (ALLER et al., 2007).

Tal como a inflamação, a dor é também um processo fisiológico importante para a sobrevivência do indivíduo, por representar um sistema de alerta para alterações do organismo. Por isso o homem tem buscado a alteração do curso natural das doenças através do alívio dos sintomas dolorosos, objetivando encontrar analgésicos potentes e com menores efeitos colaterais (DANNHARDT; KIEFER, 2001).

Os **opioides** são exemplos de potentes analgésicos de ação central e também periférica, além de produzir sedação e hipnose, com tendência a produzir dependência e tolerância, agem nos mecanismos inibitórios descendentes, inibem diretamente os terminais nociceptivos ou as sinapses nociceptivas espinhais.

Porém, seu uso clínico é limitado por efeitos colaterais, como depressão respiratória, constipação e dependência física (FALKENBERG, 2007).

Enquanto os opioides agem por mecanismos centrais, os **anestésicos locais** agem bloqueando os canais de sódio, impedindo o surgimento do potencial de ação. Desta forma elevam o limiar de excitabilidade, alongam o período refratário efetivo e bloqueiam a despolarização. Além destes, vários outros fármacos são usados como analgésicos, particularmente para tratar dores neuropáticas, são eles: antidepressivos tricíclicos como a imipramina e amitriptilina (CHESTNUT et al., 2008).

Já foi demonstrado, que, uma variedade de plantas apresentam propriedades anti-inflamatórias e antinociceptivas, devido a seus metabólitos secundários, tais como polifenóis, saponinas, flavonóides, ácidos fenólicos, esteroides, triterpenos e alcaloides (KUMAR et al., 2009; SAEED et al., 2010). Dentre o grupo dos alcaloides, merecem destaque as alcaloides naturais, denominadas riparinas, que vem sendo objeto de investigação nos últimos anos, no que concerne a seus efeitos anti-inflamatórios e antinociceptivos, tais como riparina II, IV e III (CARVALHO, 2011; OLIVEIRA, 2012).

A riparina B demonstrou potencial antioxidante e antitumoral em estudo realizado por COSTA (2013). Neste estudo, teremos como fonte de investigação a Riparina B, sob aspectos anti-inflamatórios e analgésicos.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Geral

- Avaliar os potenciais anti-inflamatório, antinociceptivo e antioxidante da Riparina B em modelos clássicos de inflamação e nocicepção aguda em camundongos.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito da Riparina B no edema de pata induzido por carragenina (CG), dextrana (DXT), histamina, serotonina (5-HT), bradicinina (BK), composto 48-80, PGE2 em camundongos;
- Verificar o efeito da Riparina B sobre a atividade da mieloperoxidase (MPO) em patas de camundongos;
- Verificar o efeito da Riparina B na migração peritoneal de leucócitos e neutrófilos induzida por carragenina;
- Avaliar a atividade da Riparina B sobre os níveis de citocinas IL-1 β e TNF- α no fluido peritoneal de camundongos;
- Avaliar o efeito da Riparina B sobre a nocicepção induzida através dos seguintes testes: contorções abdominais, formalina e placa quente;
- Demonstrar a ação da Riparina B sobre os indicadores de peroxidação lipídica, tais como malondialdeído (MDA) e glutathiona (GSH).

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Animais

Para este estudo foram utilizados camundongos Swiss *Mus musculus* machos e fêmeas (20–25g), provenientes do Biotério da Universidade Federal do Ceará (UFC) e da Universidade Federal do Piauí (UFPI). Para cada experimento foi utilizado um número de 6 animais por grupo ($n=6$). Os animais foram acondicionados em salas com temperatura controlada ($22 \pm 2^\circ \text{C}$) e submetidos ao ciclo claro/escuro (12/12h). Além disso, até o momento da realização dos experimentos permaneceram com ração apropriada e água *ad libitum*. Todos os tratamentos e procedimentos realizados estão de acordo com o Guia de Cuidado em Uso de Animais do COBEA. Sendo este projeto apreciado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso em Animais da Faculdade Integral Diferencial CEEA/UFPI sob protocolo número 068/14.

3.2 Riparina B

A Riparina B utilizada nos ensaios farmacológicos foi cedida pelo professor Dr. Rivellilson Mendes de Freitas do Núcleo de Tecnologia Farmacêutica (NTF) da Universidade Federal do Piauí (UFPI).

As alcanidas naturais denominadas riparinas, foram isoladas e sintetizadas por meio da reação de Schotten Bauman, alguns derivados foram preparados e obtidas riparinas A e B, e pela condensação dos correspondentes ésteres metalados com fenetilaminas substituídos, riparinas C, D, E e F foram obtidas (NUNES et al., 2014).

3.3 Atividade Anti-inflamatória

A ação da Riparina B foi avaliada sobre o edema de pata induzido por carragenina e por agentes flogísticos (dextrana, histamina, serotonina, bradicinina, PGE2 e composto 48/80), por meio da pletismometria; na dosagem de mieloperoxidase (MPO), bem como na avaliação da migração leucocitária com o método descrito por Souza e Ferreira (1985), dosagem de citocinas pró-inflamatórias (IL1- β e TNF- α) e de indicadores de peroxidação lipídica (MDA e GSH).

3.3.1 Avaliação do Edema de Pata Induzido por Carragenina

Para avaliação do efeito antiedematogênico; os animais foram divididos aleatoriamente em grupos de 6 animais/grupo e o edema foi induzido por injeção intraplantar na pata traseira direita de 50 µL a 0,03% de suspensão de carragenina (300 µg/pata) em solução salina estéril a 0,9%. Os experimentos de edema de pata foram realizados conforme descrito por Winter e colaboradores (1962), com pequenas modificações.

Os grupos foram divididos da seguinte forma: animais receberam solução salina estéril a 0,9% (i.pl., grupo-controle, não tratado); indometacina 10 mg/kg (i.p.; controle positivo), ou Riparina B 1, 3 ou 10 mg/kg (i.p.) (as doses foram padronizadas, por meio de um screening inicial, para avaliação da melhor dose). Após 30 minutos, receberam injeção intraplantar de carragenina. O volume da pata traseira direita foi medido a 0, 1, 2, 3 e 4 horas após a administração da Cg. As medidas foram realizadas através do método do deslocamento da solução aquosa de detergente neutro (0,3g NaCl, 0,7L H₂O, 2mL de detergente) utilizando-se um pletismômetro da marca Panlab[®] (**FIGURA 7**). Os efeitos do pré-tratamento foram calculados como a: porcentagem de inibição do edema da pata em relação ao volume do grupo controle tratados com solução salina, utilizando-se a seguinte fórmula:

$$\% \text{ inibição do edema} = \frac{(V_f - V_0) \text{ Controle} - (V_f - V_0) \text{ Tratado}}{(V_f - V_0) \text{ Controle}} \times 100$$

Na qual, V_f é o volume final, medido nos tempos 0, 1, 2, 3 e 4 h e V₀ é o volume basal, medido no tempo-zero (basal).

3.3.2 Avaliação do Edema de Pata Induzido por Agentes Flogísticos

Para avaliação do possível mecanismo anti-inflamatório produzido pela Rip B foram realizados diversos ensaios de inflamação envolvendo diferentes mediadores do processo inflamatório. Os animais foram divididos do seguinte modo (n=6/grupo): grupo que recebeu injeção salina intraplantar, indometacina (10 mg/kg; i.p.) ou Rip B (10 mg/kg; i.p.) 01 hora antes da injeção na pata traseira direita dos agentes

flogísticos - dextrana (500µg/pata, 50 µL), composto 48/80 (5µg/pata; 50µL), histamina (1% diluída em salina), serotonina (1% diluída em salina), bradicinina (6nmol, 50 µl) e PGE2 (5µg/pata; 50µl). O volume da pata foi mensurado 0, 30, 60, 90 e 120 min após a indução dos edemas utilizando-se o pletismômetro da marca Panlab[®] (**FIGURA 7**). Esses tempos de medição foram utilizados, pois o pico do edema induzido por carragenina ocorre na 3^a hora após a injeção desse estímulo, enquanto que, o da dextrana, composto 48/80, histamina, serotonina, bradicinina e PGE2, entre 30 minutos e 1 hora após os estímulos.



FIGURA 7 – Pletismômetro Panlab[®]

3.3.3 Avaliação da Atividade de Mieloperoxidase (MPO) na Pata:

A avaliação indireta do acúmulo de neutrófilos na pata direita dos camundongos foi realizada por meio da medida da enzima mieloperoxidase (MPO), utilizando-se a metodologia descrita por Bradley e colaboradores (1982). Sucintamente, após a última leitura dos edemas de pata induzidos por Cg, os animais foram eutanasiados, recolhidos entre 50-100 mg de tecido da pata traseira, separados por grupos (salina; DMSO; Rip B; indometacina), em seguida, a amostra colhida foi homogeneizada 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 4.500 rpm durante 12 min a 4°C. Os níveis teciduais da atividade de MPO foram determinados utilizando-se peróxido de hidrogênio 0,0005 como substrato para MPO. Uma unidade de MPO foi definida como a quantidade capaz de

converter 1 μ mol de peróxido de hidrogênio a água em 1 min a 22 °C. No ensaio, à medida que o peróxido de hidrogênio foi degradado ocorreu a produção de ânion superóxido, responsável pela conversão de o-dionisidina em composto de cor marrom. A variação de densidade óptica da mistura foi medida por espectrofotômetro à 450 nm. Os resultados foram expressos como unidades de MPO/mg de tecido (UMPO). Após esse procedimento, as amostras foram estocadas em freezer (-80 °C) para dosagem de citocinas pró-inflamatórias IL-1 β e TNF- α (metodologia descrita posteriormente).

3.3.4 Avaliação da Ação da Riparina B sobre a Peritonite Induzida por Carragenina

Para avaliação da ação da Rip B sobre a peritonite, foi utilizada a metodologia de Souza; Ferreira (1985), com algumas modificações. Os animais foram divididos em três grupos (n=5/grupo), da seguinte forma: G1 – controle, recebeu salina estéril; G2 – recebeu DMSO (3%) + carragenina; G3 – Riparina B (10 mg/kg) + carragenina; G4 – controle, que recebeu indometacina (10 mg/kg) + carragenina. Todas as substâncias foram administradas via intraperitoneal, sendo a carragenina administrada 01 hora depois, na dose de 300 μ g diluída em 1 mL de salina estéril. Após 4 horas, a cavidade peritoneal foi lavada com 1,5mL. de tampão fosfato-salino (PBS), realizada uma leve massagem na região e, em seguida, com uma pipeta Pasteur foi retirado o exsudato e colocado em um tubo de ensaio devidamente identificado, contendo o grupo e o número de animais, para realização da contagem total e diferencial de leucócito. Do líquido recolhido, 20 μ L foram diluídos em 380 μ L de solução Turk, dessa solução foram pipetados aproximadamente 20 μ L na câmara de Neubauer e realizado a contagem total. Essa contagem foi feita nos quatro quadrantes da câmara e o número de células contadas foi multiplicado por 50 (20 da diluição e 2,5 do fator de correção da câmara de Neubauer). Para contagem diferencial, 30 μ L do exsudato foram colocados em citocentrífuga (10 min a 2800 rpm). Logo em seguida, as lâminas foram coradas com corante rápido HEMA3. A leitura foi realizada ao microscópio óptico. Foram contadas 100 células em cada lâmina, diferenciando-as em: neutrófilos, eosinófilos, macrófagos e linfócitos. O número de células diferenciadas foi calculado pelo percentual encontrado em relação ao número total de células.

3.3.5 Dosagem dos Níveis de Citocinas Pró-inflamatórias

Do exsudato peritoneal advindo do modelo de peritonite foi realizada a dosagem das citocinas TNF- α e IL-1 β . As amostras foram adicionadas a um tampão inibidor de protease (500 μ L de tampão por cada 100 mg de exsudato) e em seguida, processado e centrifugado a 3000 rpm a 4°C por 10 minutos. Logo após, o sobrenadante foi colhido e incubado com 2g/mL de anticorpo (anticorpo de captura) diluído em tampão de bicarbonato (pH = 8,2), 100 μ L por poço, por 24 horas a 4°C. A placa foi lavada com PBS -0,1% Tween 20. A reação foi então bloqueada com albumina do soro bovino (1%) diluída em tampão de lavagem (100 mL/poço) por duas horas à temperatura ambiente. Depois, a placa foi novamente lavada usando a mesma solução. Em seguida, a placa foi incubada com uma curva padrão de citocinas (TNF- α e IL-1 β) diluída em tampão de lavagem e as amostras para serem analisadas (100 mL/poço) por 24 horas a 4°C. A placa foi novamente lavada e depois incubada com o anticorpo biotilado (1:1000) diluído em tampão de lavagem contendo soro de ovelha 1% por uma hora à temperatura ambiente. A placa foi novamente submetida ao processo de lavagem e, em seguida, incubada com avidina-peroxidase (Dako) diluída a 1:5000 em tampão de lavagem, 100 μ L/poço durante 15 minutos à temperatura ambiente. A placa foi lavada pela última vez e incubada com dicloridrato de o-fenilenodiamina (OPD) em tampão de substrato, 100 μ L/poço, no escuro e à temperatura ambiente durante um período entre 5 a 20 minutos, dependendo da citocina. A reação foi interrompida por 150 μ L/poço de 1M H₂SO₄. A intensidade da cor foi medida em espectrofotômetro a 490 nm e os resultados expressos como média $\pm$ E.P.M. da quantidade de TNF- α e IL-1 β em pg/mL (TAVARES-MURTA et al., 1998).

3.4 Estudo da Atividade Antinociceptiva

3.4.1 Contorções Abdominais Induzidas por Ácido Acético

Empregando-se a metodologia descrita por Koster e colaboradores (1959), grupos experimentais de 10 camundongos, cada foram tratados via subcutânea com Riparina B (1, 3, 10 mg/kg), DMSO (3%), morfina (5 mg/kg). Neste protocolo, foram utilizados camundongos Swiss machos, pesando entre 25 e 30 gramas mantidos em jejum por 8 horas com livre acesso à água antes da realização do experimento.

O método consiste na administração da substância teste (Riparina B = 10 mg/kg), do controle positivo (morfina = 5 mg/kg) e controle negativo (DMSO a 3%) no tempo 0h e após 30 minutos, foi injetado por via i.p. o ácido acético 0,6% (10 mL/kg). Em seguida, há um intervalo de 10 min para o completo estabelecimento das contorções abdominais e, a partir deste momento, a contagem é realizada por um período de 20 min. O animal foi colocado em uma caixa de vidro (**FIGURA 8**), onde terá o número de contorções observadas por um avaliador-cego. O estímulo induzido pelo ácido acético consiste em provocar uma sequência de contorções e extensões ao longo da parede abdominal, acompanhada por contrações do tronco e alongamento dos membros posteriores do animal (**FIGURA 9**). Os resultados foram expressos como a média ($\pm$ erro padrão da média) dos números de contorções acumuladas durante os 20 minutos de observação experimental, ou como porcentagem de inibição das contorções comparativamente ao grupo controle, permitindo dessa forma, a determinação da dose inibitória 50% (DI50).



FIGURA 8 – Caixa de Vidro utilizada para os testes de nocicepção: contorção e formalina.



FIGURA 9 – Contorção abdominal, acompanhada por contrações do tronco e alongamento dos membros posteriores do animal.

3.4.2 Teste da Formalina (“licking test”)

O teste da formalina é um método de avaliação comportamental utilizado para medir a efetividade de agentes antinociceptivos. Este modelo de dor está associado à lesão tecidual, no qual se quantifica a resposta comportamental provocada pela injeção subcutânea de formalina diluída na pata traseira do animal. A vantagem deste teste sobre outros métodos de nocicepção é a possibilidade de avaliar dois tipos diferentes de dor ao longo de um período prolongado de tempo e, assim, permite o teste de analgésicos com diferentes mecanismos de ação. As respostas comportamentais à formalina seguem um padrão bifásico composto de uma fase inicial aguda (primeira fase), e por um período mais prolongado (segunda fase) de atividade comportamental aumentada, que pode durar até cerca de uma hora. O período entre as fases é denominado intervalo de quiescência. A primeira fase inicia-se imediatamente após a injeção de formalina e se estende pelos primeiros 5 minutos (dor neurogênica ou aguda), estando relacionada com a estimulação química direta dos nociceptores das fibras aferentes do tipo C e, em parte, das fibras do tipo A δ , e está associada à liberação de aminoácidos excitatórios, óxido nítrico e substância P. A segunda fase ocorre entre 15 e 30 minutos após a injeção de formalina e está relacionada com a liberação de vários mediadores pró-inflamatórios, como bradicinina, prostaglandinas e serotonina, entre outros. Seguindo a

metodologia descrita por Hunskaar; Hole (1987), um volume de 20 μ L/pata de formalina 1,2% (em salina estéril) foi aplicado no espaço subplantar da pata direita dos camundongos ($n = 10$) e a duração do tempo de lambida foi determinado de 0 a 5 minutos (1ª fase) e 15 a 25 minutos (2ª fase).

A Riparina B foi administrada via i.p. na dose de 10 mg/kg, os animais do grupo controle-negativo receberam DMSO a 3% (via i.p.) e os do grupo controle-positivo, morfina na dose de 5 mg/kg (via s.c.). Após 30 minutos foi injetada formalina na pata traseira direita. Em seguida, os animais foram colocados em uma caixa de vidro (**FIGURA 8**) para leitura da reatividade do animal por um avaliador-cego. Foi considerado como reatividade o tempo, em segundos, que o animal permaneceu lambendo ou mordendo a pata injetada. O efeito antinociceptivo foi avaliado nas duas fases de dor: durante os primeiros 5 minutos e no período de 15 a 25 minutos.

3.4.3 Teste da Placa Quente

O método da placa quente consiste em colocar camundongos sobre uma placa aquecida e observar quanto tempo os animais levam para manifestar as respostas de saltar e/ou lamber a pata traseira; caracterizando-se como um teste de resposta central.

Utilizando-se o modelo descrito por Woolfe; MacDonald (1944), modificado por Ankier (1974), os camundongos foram divididos em 10/grupo, tratados com DMSO (3%, via i.p.), morfina (5 mg/kg, via s.c.) e Riparina B (10 mg/kg, via i.p.). Nesse experimento a placa quente foi mantida a uma temperatura de 50 ± 1 °C (**FIGURA 10**). Cada animal foi colocado individualmente sobre a placa e a medição do tempo foi interrompida quando o animal apresentou o comportamento instintivo de saltar sobre a placa ou, logo em seguida, lamber as patas traseiras com 35 segundos, para evitar injúria tecidual. Foi realizada uma observação basal e após 30, 60, 90 e 120 minutos dos tratamentos.

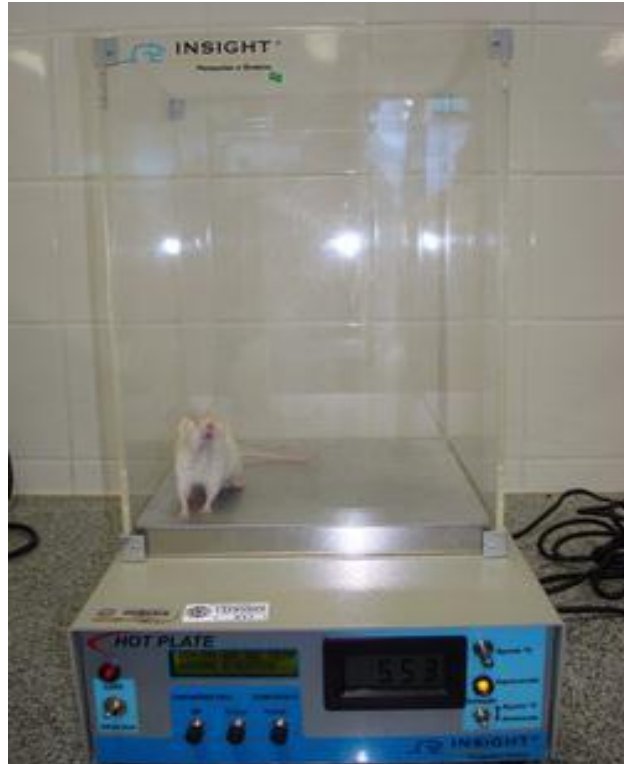


FIGURA 10 – Placa quente utilizada para avaliação da atividade analgésica.

3.5 Dosagem dos Níveis de Malondialdeído (MDA)

Os níveis de MDA foram mensurados utilizando-se o método descrito por Uchiyama; Mihara (1978). Foram colhidos entre 100 e 150 mg de exsudato peritoneal advindos do modelo da peritonite anteriormente realizado. Tais exsudatos foram homogeneizados com 1,15% de KCl para preparar homogenatos 10%. Em suma: 250 μ L de cada homogenato foram adicionados a 1,5 mL de 1% de ácido fosfórico (H_3PO_4) e 0,5 mL de 0,6% de álcool terc-butílico (solução aquosa). Em seguida, esta mistura foi agitada e aquecida em banho-maria durante 45 minutos. A mistura foi arrefecida imediatamente num banho de água gelada, seguido da adição de 4 mL de n-butanol. Esta mistura foi agitada e a camada butanólica foi separada por centrifugação a 1200 rpm durante 10 min. A densidade óptica foi determinada como sendo 535 e 520 nm, e a diferença de densidade óptica entre as duas determinações foi calculada como o valor de álcool terc-butílico. Os níveis de MDA são expressos em mmol/g de tecido.

3.6 Dosagem dos Níveis de Glutathione (GSH)

Para avaliação dos níveis de GSH foi utilizado o método de Sedlak e Lindsay (1968). Em suma, o lavado peritoneal (entre 100 e 150 mg de exsudato, recolhido anteriormente no ensaio da peritonite) 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 80µL de ácido tricloroacético (TCA) a 50% para precipitação de proteínas. Este material foi então novamente centrifugado a 3.000 rpm por 15 min a 4°C. A 400 µL do sobrenadante foram adicionados 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. Os resultados foram expressos em µg/g de lavado.

3.7 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (EPM) de, no mínimo 5 e no máximo 10 animais por grupo. A análise estatística foi realizada através da análise de variância, seguida pelo teste de Newman-Keuls *post hoc* quando necessário. Os valores foram considerados estatisticamente significantes quando o $p < 0,05$. Em todos os procedimentos, foi utilizado o programa estatístico GraphPad Prism[®] versão 5.0.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1.1 Efeito da Riparina B no Modelo de Edema de Pata Induzido por Carragenina em Camundongos

Como mostrado na Tabela 1, a administração de carragenina na pata posterior direita (300 ug/pata) induziu edema 1 h após a injeção, tal edema aumentou gradualmente até atingir o seu pico em 4 h após a injeção. A administração de Indometacina (10 mg/kg, i.p.) diminuiu significativamente o edema da pata depois de 1 h, e este efeito inibitório foi mantido durante todo o período experimental (* $p < 0,05$), com uma inibição máxima de 88,52%. O pré-tratamento com Riparina B induziu uma inibição significativa do edema da pata ao longo do período experimental. Após 3 h, em comparação com o grupo de carragenina, os animais pré-tratados com doses de 1, 3 e 10 mg/kg, i.p. apresentaram reduções de edema de 64,0%, 78,0%, e 96,0%, respectivamente.

A dose de 10 mg/kg de Riparina B foi a que demonstrou o efeito máximo contra o edema da pata induzido por Cg. Por conseguinte, esta dose foi selecionada para todos os protocolos subsequentes. De acordo com estes dados, podemos inferir que esta dose pode atuar em ambas as fases, precoces e tardias da inflamação.

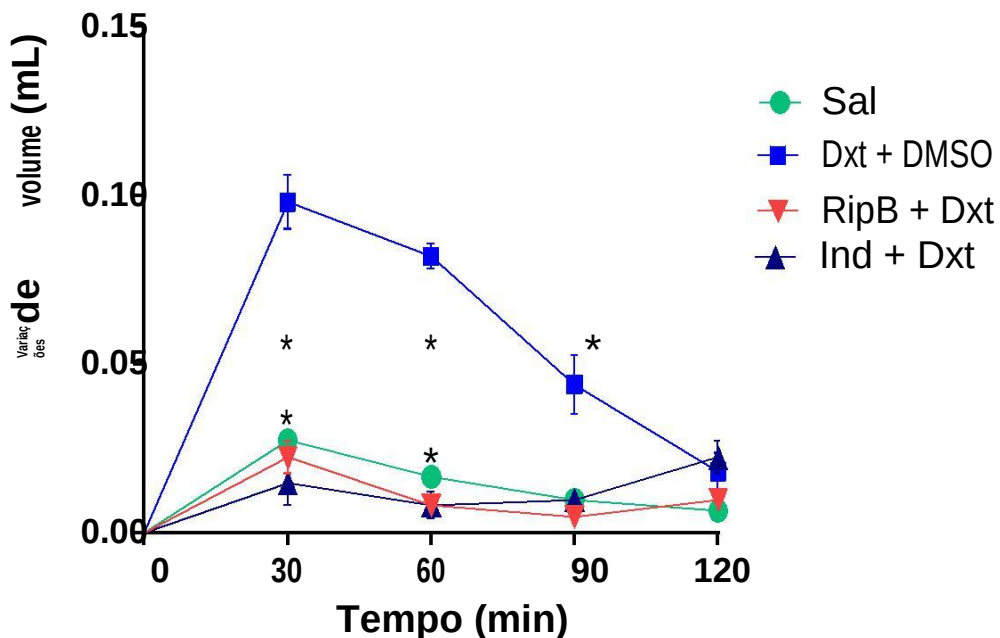
TABELA 1 – Efeito do tratamento agudo com Riparina B no edema de pata induzido por carragenina em camundongos, tratados com Riparina B (1, 3, 10 mg/kg, i.p.), controle (DMSO 3%, i.p.), veículo (salina 0,9%, i.p.) e indometacina (10 mg/kg, i.p.). Os valores são expressos em mL e % de inibição. Valores expressos em média $\pm$ SEM (n=5). *p<0,05 em relação ao controle (teste de Newman-Keuls).

TRATAMENTO	Dose (mg/kg)	Edema de Pata (% inibição) 1 h	Edema de Pata (% inibição) 2 h	Edema de Pata (% inibição) 3 h	Edema de Pata (% inibição) 4 h
Controle	-	0,047 $\pm$ 0,011	0,080 $\pm$ 0,012	0,100 $\pm$ 0,007	0,122 $\pm$ 0,005
Salina	-	0,011 $\pm$ 0,004	0,001 $\pm$ 0,001	0,006 $\pm$ 0,003	0,006 $\pm$ 0,003
Indometacina	10	0,028 $\pm$ 0,007* (40,42%)	0,016 $\pm$ 0,004* (80,00%)	0,014 $\pm$ 0,008* (86,00%)	0,014 $\pm$ 0,007* (88,52%)
	1	0,024 $\pm$ 0,004* (48,93%)	0,030 $\pm$ 0,003* (62,50%)	0,036 $\pm$ 0,005* (64,00%)	0,025 $\pm$ 0,005* (79,50%)
Riparina B	3	0,002 $\pm$ 0,002* (95,74%)	0,028 $\pm$ 0,004* (65,00%)	0,022 $\pm$ 0,004* (78,00%)	0,015 $\pm$ 0,005* (87,70%)
	10	0,006 $\pm$ 0,0024* (87,23%)	0,006 $\pm$ 0,004* (92,50%)	0,004 $\pm$ 0,002* (96,00%)	0,002 $\pm$ 0,002* (98,36%)

4.1.2 Efeito da Riparina B no Modelo de Edema de Pata Induzido por Dextrana em Camundongos

Os nossos resultados demonstraram que o pré-tratamento com Riparina B inibiu de forma significativa o edema promovido por Dextrana (500 µg/pata, 50 µL) na pata traseira direita dos camundongos na dose de 10 mg/kg, em 30 minutos após a injeção (30 min: $0,022 \pm 0,0040 \text{ mL}^*$) em relação aos animais do grupo Dextrana (30 min: $0,098 \pm 0,0080 \text{ mL}^*$) (**FIGURA 11**).

FIGURA 11 – Efeito da riparina B sobre o edema de pata induzido por dextrana. Os animais foram pré-tratados com Riparina B (10 mg/kg; i.p.) trinta minutos antes da administração de dextrana na pata (500µg/pata). O controle positivo do edema recebeu indometacina (10 mg/kg; i.p.) e o controle negativo salina (0,9%; i.p.). Os resultados foram expressos como média ± 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 da análise de variância seguido pelo teste de Newman-Keuls. Legenda: Sal = salina; Dxt = dextrana; DMSO = dimetilsulfóxido; RipB = Riparina B; Indo = indometacina.

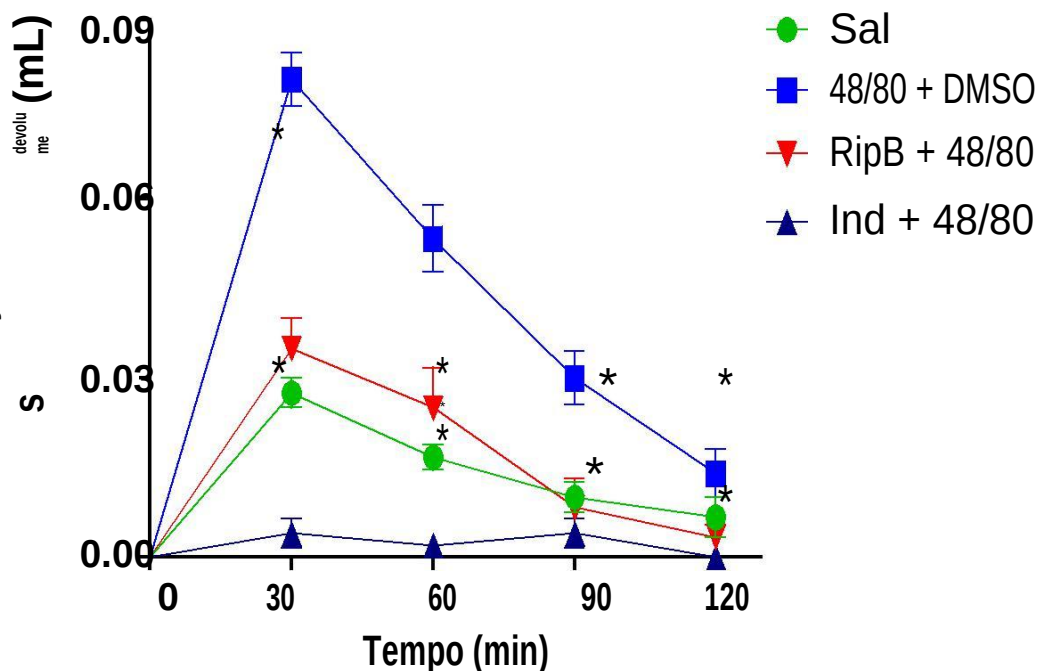


4.1.6 Ação da Riparina B sobre o Edema de Pata Induzido por 48/80

O agente inflamatório 48/80, ocasionou intenso edema de pata em todos os tempos, apresentando seu pico nos primeiros 30 minutos após a sua administração. O grupo que recebeu apenas a administração do agente flogístico na pata (30 min: $0,042 \pm 0,038$ mL) apresentou valores maiores do que o grupo que recebeu tratamento prévio com 10 mg/kg de Rip B (30 min: $0,020 \pm 0,015$ mL)

(FIGURA 12).

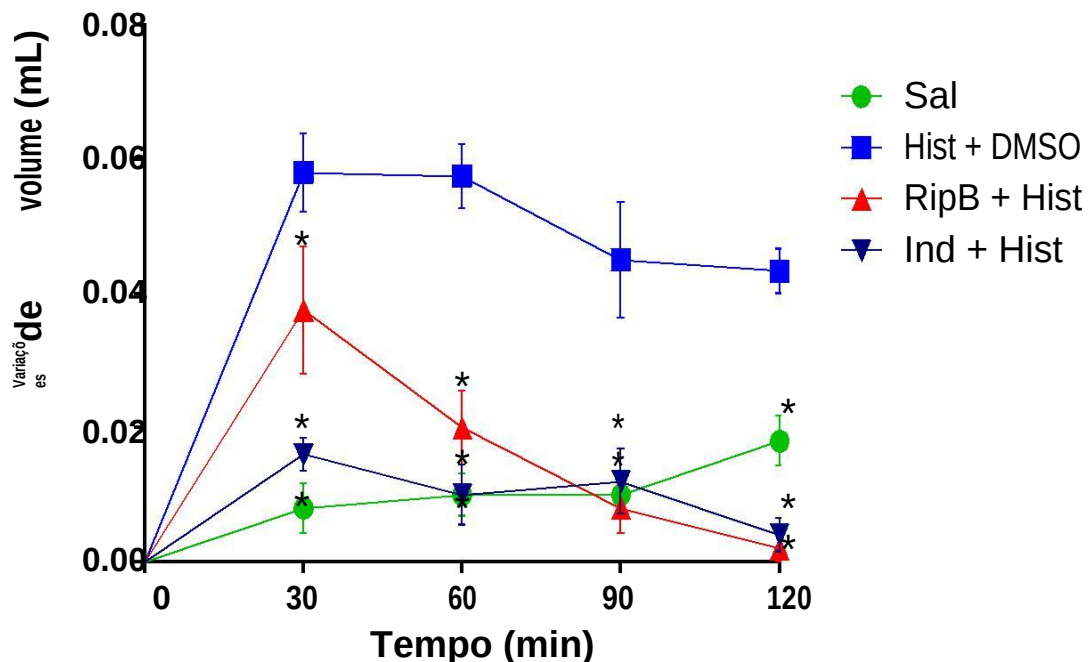
FIGURA 12 - Edema de pata induzido por composto 48/80. O edema foi medido antes (tempo zero) e 30, 60, 90 e 120 min após a injeção de histamina e expresso como a variação dos volumes das patas (mL) entre os vários tempos e o tempo zero. A Riparina B foi administrada (10 mg / kg; i.p.) 30 minutos antes do 48/80 (5 μ g / pata); controle positivo: Indometacina(10 mg / kg; i.p.); controle negativo: salina (0,9%; i.p.). Média $\pm$ E.P.M. (n= 6). * $p < 0,05$ em relação ao 48/80. A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância seguido pelo teste de Newman-Keuls. Legenda: Sal = salina; 48/80 = composto 48/80; DMSO = dimetilsulfóxido; RipB = Riparina B; Indo = indometacina.



4.1.3 Efeito da Riparina B no Modelo de Edema de Pata Induzido por Histamina em Camundongos

O pré-tratamento com Rip B, na dose de 10 mg/kg ($0,023 \pm 0,0014$ mL), mostrou uma redução significativa do volume da pata depois do tratamento com o mediador inflamatório, histamina, após 30 minutos de indução do edema de pata ($0,032 \pm 0,026$ mL). De modo semelhante ocorreu com a indometacina (10 mg/kg, i.p.), que também exibiu uma significativa ($*p < 0,05$) resposta antiedematogênica ($0,009 \pm 0,007$) (**FIGURA 13**).

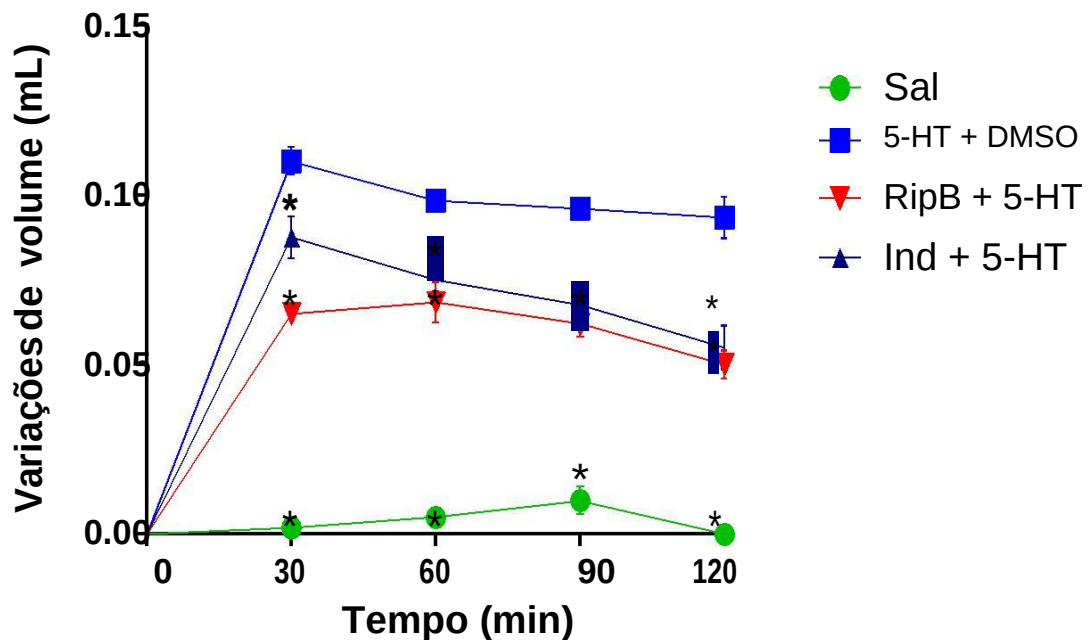
FIGURA 13 - Ação da riparina B sobre o edema de pata induzido por histamina. O edema foi medido antes (tempo zero) e 30, 60, 90 e 120 min após a injeção de histamina e expresso como a variação dos volumes das patas (mL) entre os vários tempos e o tempo zero. A Riparina B foi administrada (10 mg/kg; i.p.) 30 minutos antes da histamina (1% diluída em salina; i.p.); controle positivo: Indometacina (10 mg/kg; i.p.); controle negativo: salina (0,9%; i.p.). Média $\pm$ E.P.M. (n= 6). $*p < 0,05$ em relação a histamina. A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância seguida pelo teste de Newman-Keuls. Legenda: Sal = salina; Hist = histamina; DMSO = dimetilsulfóxido; RipB = Riparina B; Indo = indometacina.



4.1.4 Efeito da Riparina B no Modelo de Edema de Pata Induzido por Serotonina em Camundongos

Os nossos resultados demonstram que o pré-tratamento com Rip B (10mg/kg), foi capaz de reduzir o edema da pata em 30 minutos (tempo de pico) após a injeção com a serotonina. O pré-tratamento com Rip B ($0,034 \pm 0,0030$ mL), reduziu o edema da pata induzido por 5-HT, semelhante ao observado com o uso da Indometacina (10 mg/kg) com redução estatisticamente significativa do edema de pata ($*p < 0,05$) ($0,047 \pm 0,041$ mL) (**FIGURA 14**).

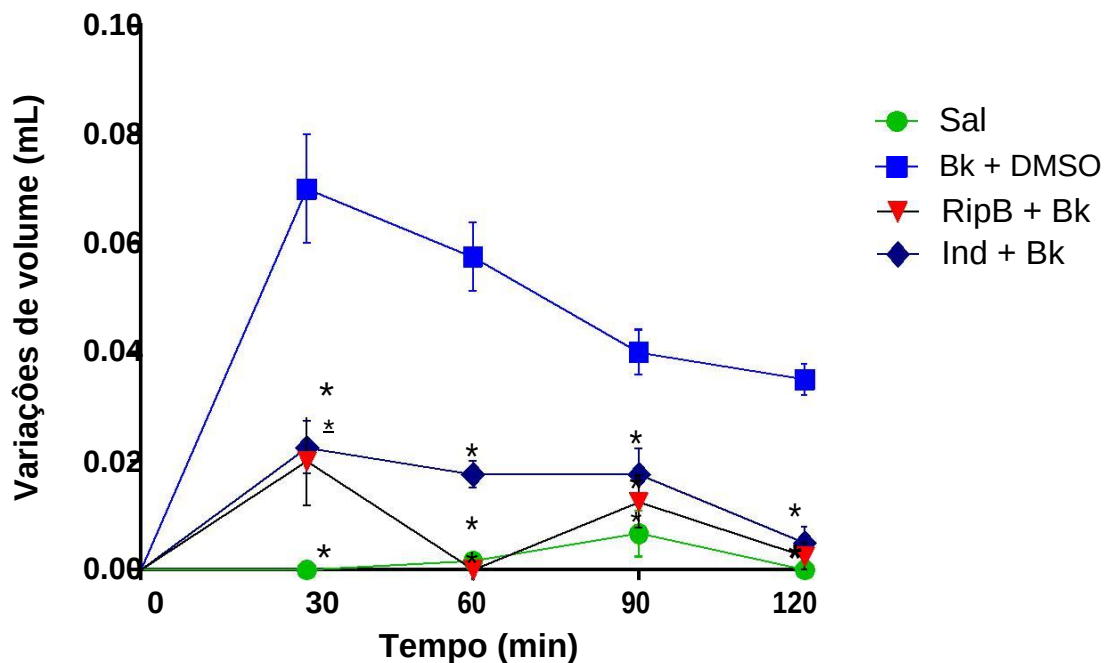
FIGURA 14 - Edema de pata induzido por serotonina. O edema foi medido antes (tempo zero) e 30, 60, 90 e 120 min. após a serotonina (1% diluída em salina; i.pl.) e calculado como a variação dos volumes (mL) deslocados pelas patas, utilizando-se o pletismômetro. O controle positivo de edema recebeu indometacina (10 mg/kg; i.p.); controle negativo: salina (0,9%; i.p.). Média $\pm$ E.P.M. (n=6). $*p < 0,05$ em relação a serotonina. A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância seguido pelo teste de Newman-Keuls. Legenda: Sal = salina; 5-HT = 5-hidroxitriptamina ou serotonina; DMSO = dimetilsulfóxido; RipB = Riparina B; Indo = indometacina.



4.1.5 Efeito da Riparina B no Modelo de Edema de Pata Induzido por Bradicinina em Camundongos

O pré-tratamento com Rip B (10mg/kg), reduziu o edema de pata, com pico aos 30 minutos após injeção ($0,014 \pm 0,006$ mL), quando comparado ao grupo que recebeu o mediador BK ($0,040 \pm 0,030$ mL). Também houve redução significativa do edema, com pico nos primeiros 30 minutos, no grupo que recebeu indometacina (10 mg/kg) ($0,014 \pm 0,009$ mL). Como esperado, o grupo da solução salina não apresentou qualquer efeito (**FIGURA 15**).

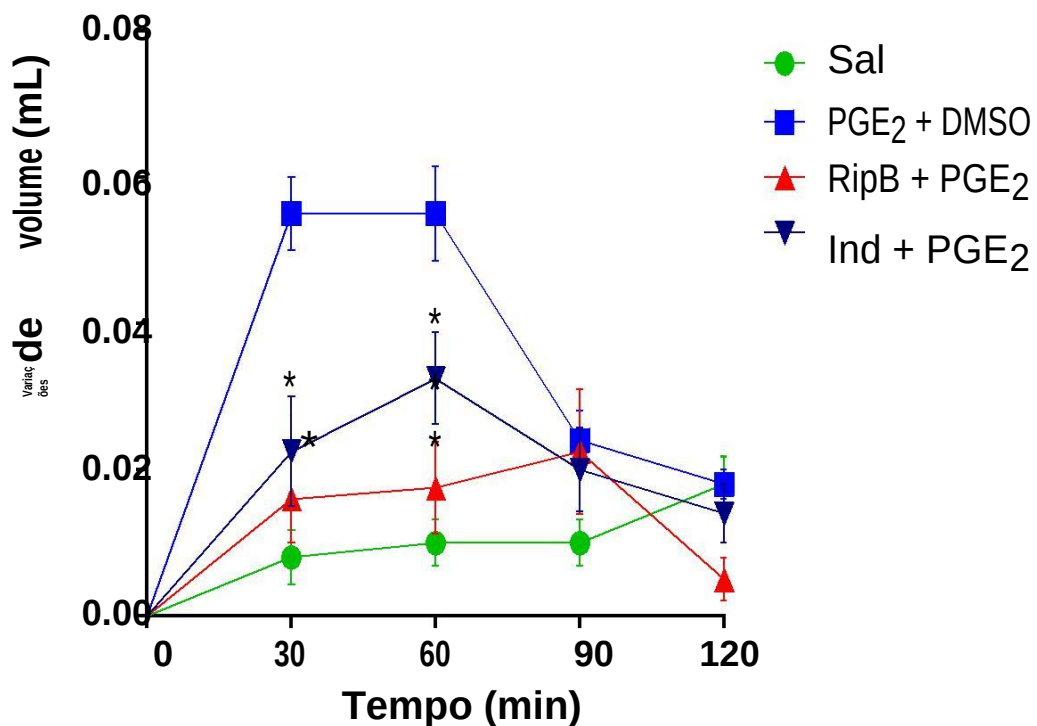
FIGURA 15 – Ação da riparina B sobre o edema de pata induzido por bradicinina. Os animais foram pré-tratados com Riparina B (10 mg/ kg; i.p.) 30 min antes da administração de bradicinina (6 nmol) na região intraplantar. O controle positivo do edema recebeu indometacina (10 mg/kg; i.p.) e o controle negativo salina (0,9%; i.p.). 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 bradicinina. A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância seguido pelo teste de Newman-Keuls. Legenda: Sal = salina; BK = 5-bradicinina; DMSO = dimetilsulfóxido; RipB = Riparina B; Indo = indometacina.



4.1.7 Ação da Riparina B sobre o Edema de Pata Induzido por PGE2

Na **FIGURA 16** podemos observar que a Prostaglandina E2 (30 min: $0,030 \pm 0,025$; 60 min: $0,031 \pm 0,024$ mL), ocasionou um aumento significativo no volume da pata dos animais quando comparamos este grupo com o grupo com administração via intraplantar de solução salina (30 min: $0,006 \pm 0,002$ mL). O grupo que recebeu o pré-tratamento com 10 mg/kg de Rip B (30 min: $0,011 \pm 0,005$ mL) apresentou redução significativa no volume da pata quando comparado ao grupo controle-negativo.

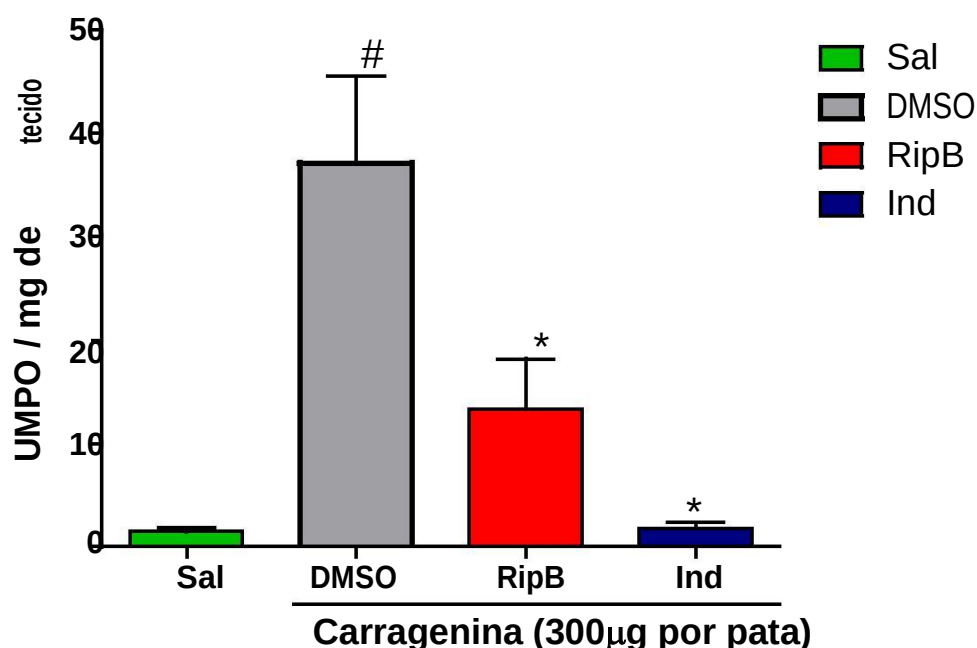
FIGURA 16 – Efeito da riparina B no edema de pata induzido por PGE₂. Os animais foram pré-tratados com Riparina B (10 mg/kg; i.p.) trinta minutos antes da administração de PGE₂ na pata (5µg/pata). O controle positivo do edema recebeu indometacina (10 mg/kg; i.p.) e o controle negativo salina (0,9%; i.p.). 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 PGE₂. A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância seguido pelo teste de Newman-Keuls. Legenda: Sal = salina; PGE₂ = prostaglandina E2; DMSO = dimetilsulfóxido; RipB = Riparina B; Indo = indometacina.



4.1.8 Ação da Riparina B sobre a Atividade da Mieloperoxidase (MPO) na Pata

A resposta inflamatória induzida pela carragenina no tecido da pata é conhecida por ser acompanhada de intensa migração leucocitária (CARVALHO et al., 1996). Esta resposta pode ser medida utilizando a enzima mieloperoxidase (MPO), que é um indicador da migração de neutrófilos para o sítio inflamatório (AJUEBOR et al., 2000). Na **FIGURA 17** observamos que o grupo de animais pré-tratados com a Riparina B na DOSE de 10 mg/kg ($13,30 \pm 4,87^*$ UMPO/mg de tecido, $*p<0,05$) apresentou uma redução significativa na atividade dessa enzima, quando comparado com o grupo que recebeu DMSO via intraplantar ($37,15 \pm 8,4$ UMPO/mg de tecido).

FIGURA 17 – Atividade da enzima mieloperoxidase na pata. Para avaliação da atividade de MPO, os animais receberam 250 µl de solução salina (i.p.) ou indometacina (10 mg/kg) ou Rip B (10 mg/kg). Uma hora depois, foi administrado 500 µg de Cg diluída em 250 µl solução salina na cavidade peritoneal. A variação da densidade óptica da mistura das amostras foi medida por espectrofotômetro. 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 DMSO; $\#p<0,05$ comparado com o grupo salina. A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância seguido pelo teste de Newman-Keuls. Legenda: Sal = salina; DMSO = dimetilsulfóxido; RipB = Riparina B; Indo = indometacina.



4.1.9.1 Ação da Riparina B sobre a Migração de Neutrófilos Induzida por Carragenina em Camundongos

Administração de Cg na cavidade peritoneal promoveu um aumento de leucócitos ($16,48 \pm 0,58 \times 10^3 \times 10^3$ células/mL) e neutrófilos ($15,22 \pm 0,81 \times 10^3 \times 10^3$ células/mL) no fluido peritoneal. No entanto, no pré-tratamento com Rip B (10mg/kg), foi observada redução significativa na migração de leucócitos para a cavidade peritoneal ($2,52 \times 10^3 \pm 0,61 \times 10^3$ células/mL) (**Figura 18**) e a mesma dose também reduziu consideravelmente o número de neutrófilos para a cavidade ($1,80 \pm 0,42 \times 10^3 \times 10^3$ células/mL) (**Figura 19**).

FIGURA 18 – O tratamento com riparina B reduziu a migração de leucócitos para a cavidade peritoneal no modelo de peritonite induzida por carragenina em camundongos. Contagem total de células. Os animais foram pré-tratados com 10 mg/kg de Rip B antes da indução da peritonite com administração de carragenina intraperitoneal. O grupo controle positivo recebeu indometacina (10 mg/kg; i.p.) e o controle negativo, salina (0,9%; i.p.). Observou-se o número de leucócitos totais migrantes para a cavidade peritoneal durante o intervalo de tempo de 30, 60, 90, 120 min após a indução da inflamação. 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 da análise de variância seguido pelo teste de Newman-Keuls. Legenda: Sal = salina; DMSO = dimetilsulfóxido; RipB = Riparina B; Indo = indometacina.

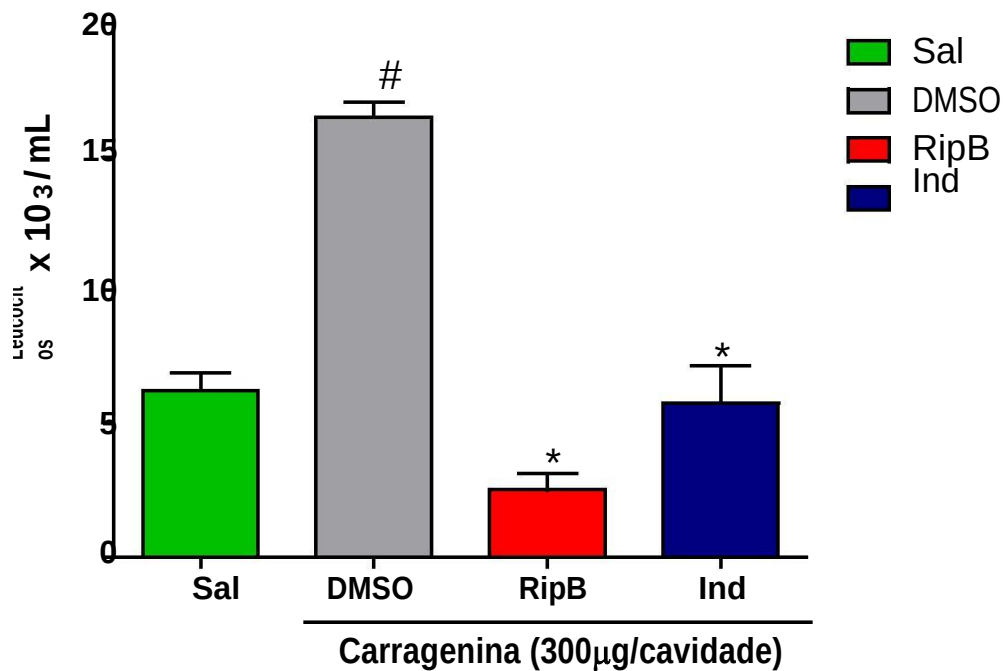
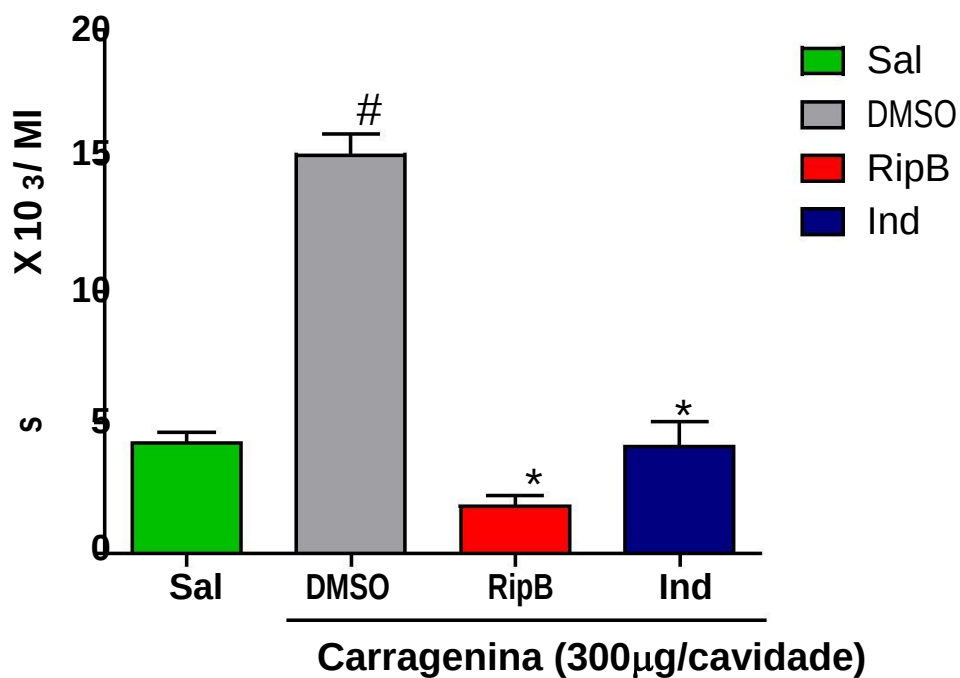


FIGURA 19 – A riparina B reduziu a infiltração de neutrófilos no modelo de peritonite induzida por carragenina em camundongos. Contagem diferencial de células. Os animais foram pré-tratados com 10 mg/kg de Rip B. O grupo controle positivo recebeu indometacina (10 mg/kg; i.p.) e o controle negativo, salina (0,9%; i.p.). Os valores foram representados como média $\pm$ E.P.M. de neutrófilos. * $p < 0,05$ comparado com o grupo carragenina; # $p < 0,05$ comparado com o grupo salina. A análise estatística foi realizada por meio do teste de variância seguido pelo teste de Newman-Keuls. Contagem de neutrófilos por cavidade. Legenda: Sal = salina; DMSO = dimetilsulfóxido; RipB = Riparina B; Indo = indometacina.



4.1.9.2 Atividade da Riparina B sobre os Níveis de Citocinas IL-1 β e TNF- α no Fluido Peritoneal de Camundongos Estimulados com Carragenina

A administração intraperitoneal de carragenina induziu um aumento acentuado na IL-1 β ($564,9 \pm 52,32$ pg/mL) (**Figura 20**) e TNF- α ($506,6 \pm 49,86$ pg/mL) (**Figura 21**). O pré-tratamento com Rip B (10 mg/kg, ip), reduziu IL-1 β ($78,91 \pm 17,25$ pg/mL) e as concentrações de TNF- α significativamente ($13,77 \pm 5,39$ pg/mL).

FIGURA 20 - Efeito da riparina B sobre os níveis de IL-1 β no exsudato peritoneal de camundongos. Os animais foram pré-tratados com: salina (0,9%, i.p.) ou DMSO (3%, i.p.) ou Riparina B (10 mg/kg, i.p.) ou indometacina (10 mg/kg, i.p.) 1 hora antes da administração de carragenina no peritônio. Os valores estão representados como média $\pm$ E.P.M de pg/mL. * $p < 0,05$ comparado com o grupo carragenina; # $p < 0,05$ comparado com o grupo salina. A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância seguido pelo teste de Newman-Keuls. Legenda: Sal = salina; DMSO = dimetilsulfóxido; RipB = Riparina B; Indo = indometacina.

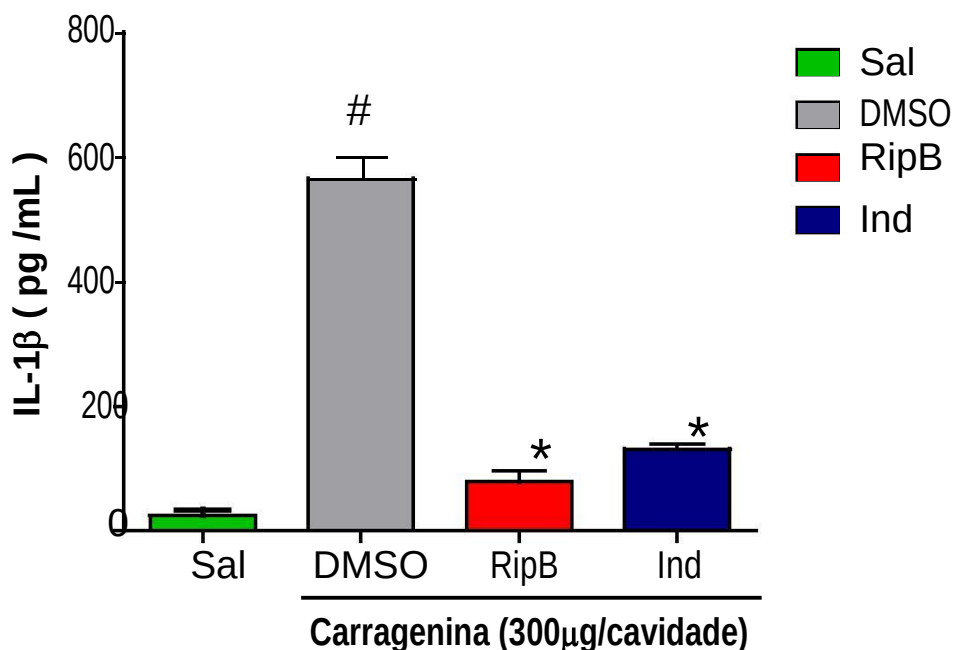
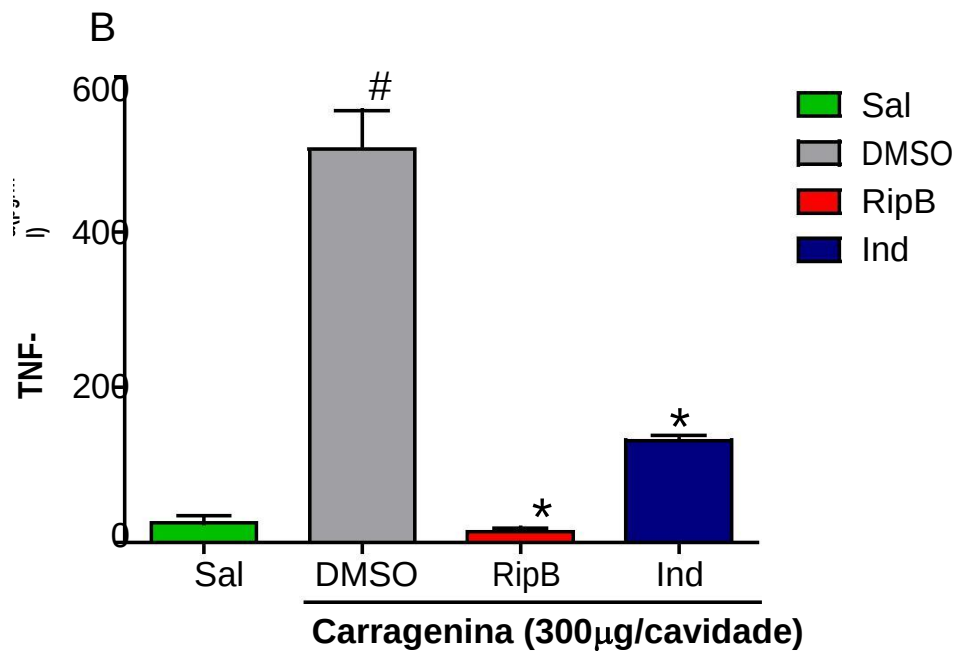


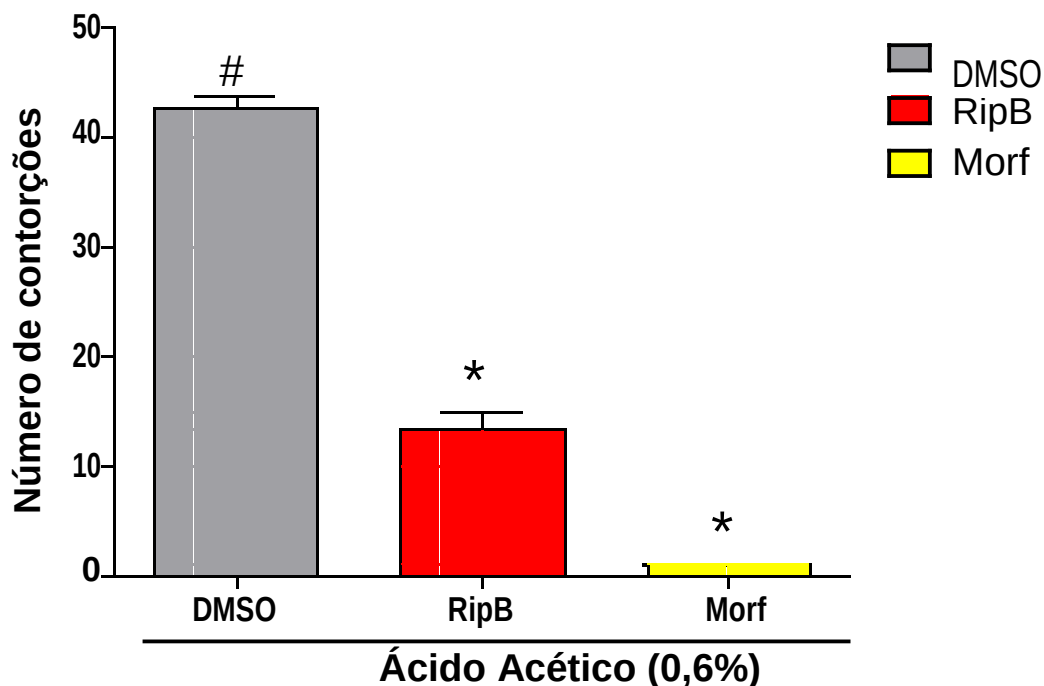
FIGURA 21 - Efeito da riparina B sobre os níveis de TNF- α no exsudato peritoneal de camundongos. Os animais foram pré-tratados com: salina (0,9%, i.p.) ou DMSO (3%, i.p.) ou Riparina B (10 mg/kg, i.p.) ou indometacina (10 mg/kg, i.p.) 1 hora antes da administração de carragenina no peritônio. Os valores estão representados como média $\pm$ E.P.M de pg/mL. * $p < 0,05$ comparado com o grupo carragenina; # $p < 0,05$ comparado com o grupo salina. A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância seguido pelo teste de Newman-Keuls. Legenda: Sal = salina; DMSO = dimetilsulfóxido; RipB = Riparina B; Indo = indometacina.



4.1.9.3 Riparina B Atuando na Redução das Contorções Abdominais Induzidas por Ácido Acético em Camundongos

Os valores obtidos no teste de contorção foram analisados a partir dos resultados obtidos do grupo veículo (DMSO a 3%, i.p.), grupo controle positivo (Morfina – 5 mg/kg, s.c.) e o grupo tratado com a Riparina B (10 mg/kg, i.p.). Foram analisados o número de contorções de cada grupo e verificou-se que, a Rip B diminuiu significativamente as contorções induzidas por ácido acético em 68,54%, enquanto a Morfina reduziu em 97,65% os movimentos de contorção (**FIGURA 22**).

FIGURA 22 - A riparina B diminui o número de contorções induzidas por ácido acético. Os animais foram pré-tratados com Rip B (10 mg/kg, i.p.) ou morfina (5 mg/kg, s.c.) ou DMSO (3%, i.p.) e após 30 minutos receberam ácido acético a 0,6% via i.p. As barras representam a média do número de contorções por grupo *p < 0.05 indica diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo controle DMSO e # quando comparado ao grupo Rip B. Legenda: DMSO = dimetilsulfóxido; RipB = Riparina B; Morf = morfina.

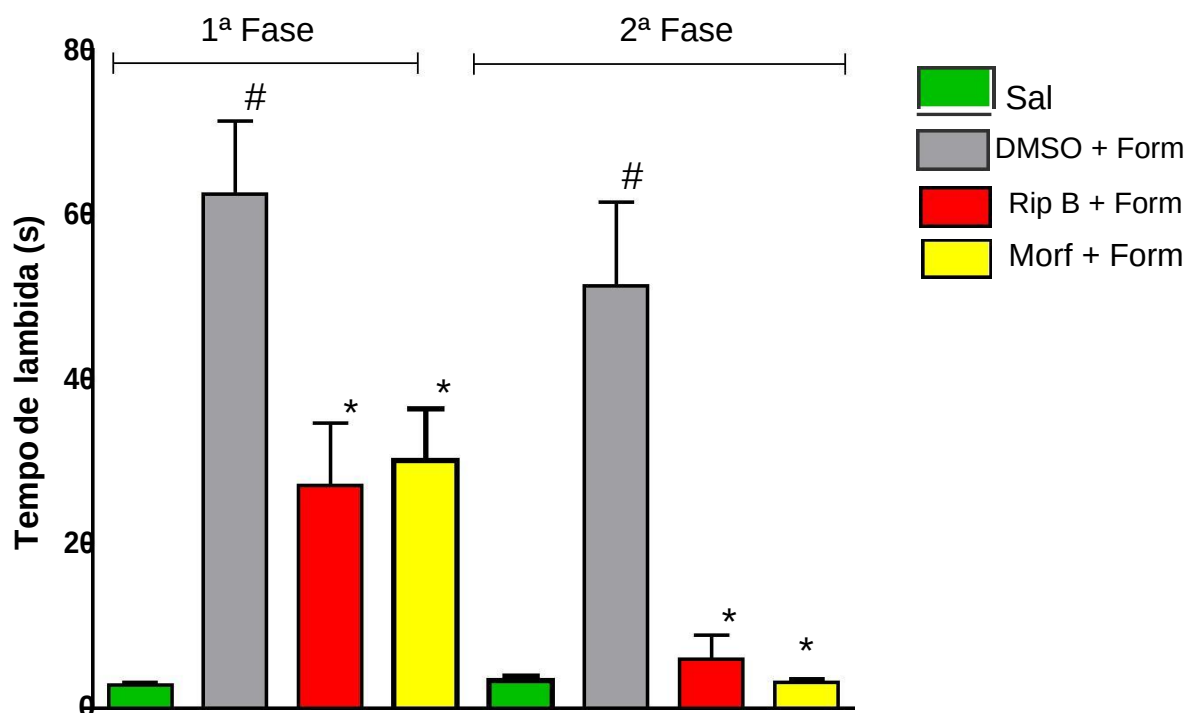


4.1.9.4 Nocicepção Induzida por Injeção Intraplantar de Formalina (1,2%) em Camundongos

Os resultados apresentados na **FIGURA 23**, mostram que a Riparina B na dose de 10 mg/kg, via intraperitoneal, promoveu redução significativa do tempo em que o animal permanece lambendo a pata nas duas fases do teste de formalina (1ª fase – Riparina B 10 mg/kg: 52,64%) (2ª fase – Riparina B 10 mg/kg: 94,18%).

A morfina (5 mg/kg, via subcutânea), analgésico opióide utilizado como controle positivo neste protocolo experimental, inibiu significativamente as duas fases de resposta (1ª fase: 69,15%; 2ª fase: 100%) (**FIGURA 23**).

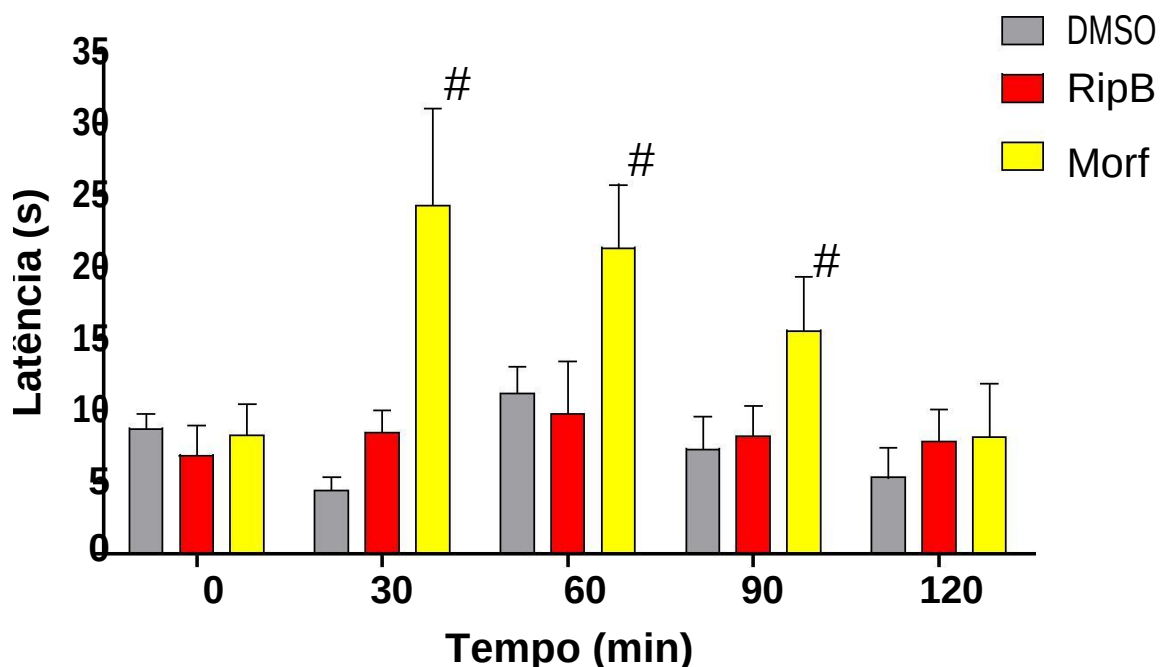
FIGURA 23 - A riparina B diminui o tempo de lambedura de pata no teste da formalina a 1,2%. Os animais foram pré-tratados com Riparina B (10 mg/kg; i.p.) ou DMSO a 3% (via i.p.) ou morfina na dose de 5 mg/kg (via s.c.). Após 30 minutos foi injetada formalina. As respostas nociceptivas dos animais à injeção de formalina (1,2%, 12 µL) foram avaliadas durante as fases I (0-5 min) e II (15-25 min). Cada ponto representa a média $\pm$ E.P.M de 7-10 animais. A análise estatística dos resultados foi realizada comparando-se todos os grupos experimentais (nos diferentes tempos) utilizando a análise de variância de uma via (ANOVA) seguida pelo teste de Bonferroni. As barras representam a média do tempo de lambedura por grupo *p<0.05 indica diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo controle DMSO e # quando comparado ao grupo Rip B. Legenda: Sal = salina; DMSO = dimetilsulfóxido; Form = formalina; RipB = Riparina B; Morf = morfina.



4.1.9.5 Nocicepção Térmica Induzida por Placa Quente em Camundongos

Para avaliar o envolvimento de mecanismos centrais sobre o efeito antinociceptivo de Riparina B, foi realizado o teste de placa quente. Em nossos ensaios, os animais pré-tratados com Rip B na dose de 10 mg/kg, i.p. não apresentaram um aumento na latência para este teste em quaisquer momentos analisados (**FIGURA 23**), quando comparados ao grupo controle (DMSO – 3%, i.p.). Administração do fármaco de referência, a morfina (10 mg/kg, s.c.), induziu um aumento significativo no tempo de latência no teste da placa quente, como esperado, que persistiu durante pelo menos 90 minutos (**FIGURA 24**).

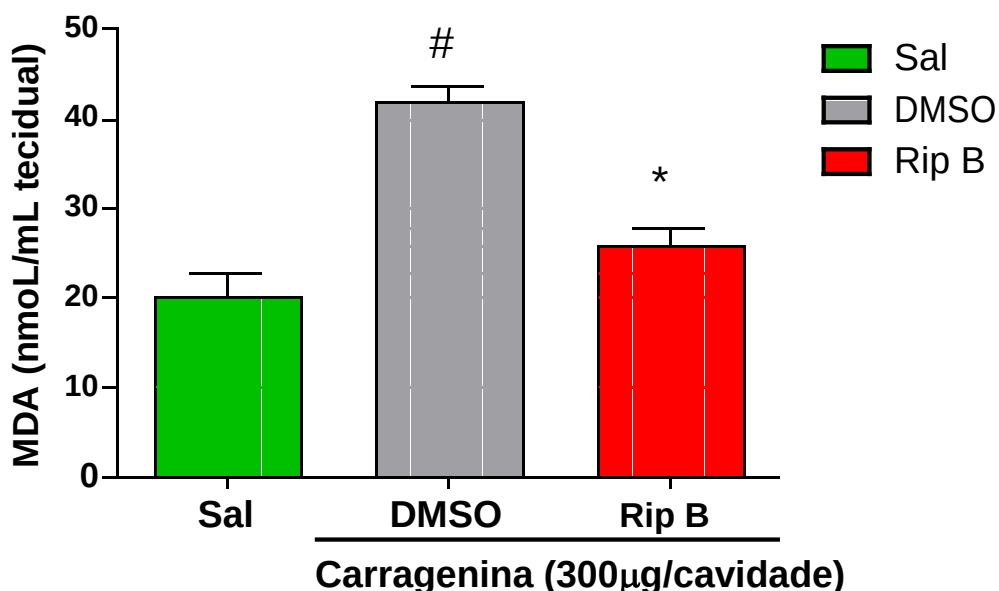
FIGURA 24 - Efeito da riparina B na nocicepção térmica (placa quente) em camundongos. Os camundongos foram pré-tratados com DMSO (3%; i.p.) ou morfina (5 mg/kg; s.c.) ou Riparina B (10 mg/kg; i.p.). Em seguida, cada animal, individualmente, foi colocado sobre a placa quente (50 ± 1 °C) e contado seu tempo de permanência na placa. As barras representam a média de latência para resposta * $p < 0.05$ indica diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo controle DMSO e # quando comparado ao grupo Rip B. Legenda: DMSO = dimetilsulfóxido; RipB = Riparina B; Morf = morfina.



4.1.9.6 Ação da Riparina B sobre os Níveis de Malondialdeído no Exsudato Peritoneal de Camundongos

Para avaliação da peroxidação lipídica, foram verificados os níveis de malondialdeído (MDA) presentes nas amostras de exsudato peritoneal de camundongos após as quatro horas de indução da peritonite. Após uma hora de tratamento com Riparina B 10 mg/kg, i.p., houve redução significativa ($25,74 \pm 2,06^*$, $*p < 0,05$) dos níveis de MDA, quando comparados ao grupo que recebeu injeção de Carragenina + DMSO ($41,83 \pm 1,78$). Esses resultados estão expressos na **FIGURA 25**.

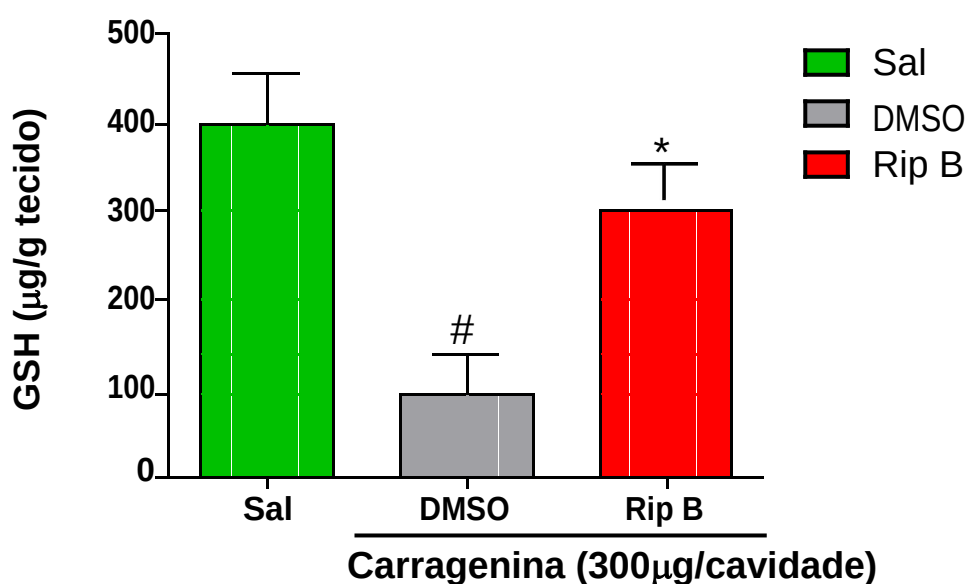
FIGURA 25 – Ação da riparina B sobre os níveis deMDA no exsudato peritoneal de camundongos. Os níveis de MDA no exsudato peritoneal foram avaliados 4 horas após a administração de carragenina. Os animais foram pré-tratados 30 minutos antes da injeção de carragenina na cavidade peritoneal com Riparina B (10 mg/kg; i.p.) ou DMSO (3%; i.p.). O grupo controle recebeu apenas injeção de salina (0,9%, i.p.) no peritônio. Os valores foram expressos como média $\pm$ E.P.M. de nmoL/mL de MDA. $*p < 0,05$ comparado com o grupo carragenina + DMSO; $\#p < 0,05$ comparado com o grupo salina. A análise estatística foi realizada por meio da análise de variância seguido pelo teste de Newman-Keuls. Legenda: Sal = salina; DMSO = dimetilsulfóxido; RipB = Riparina B.



4.1.9.7 Ação da Riparina B sobre os Níveis de Glutathione no Exsudato Peritoneal de Camundongos

Após a indução da peritonite em camundongos, os animais foram eutanasiados e os níveis de glutathione foram posteriormente analisados, uma hora antes, os animais foram pré-tratados com 10 mg/kg de Riparina B intraperitoneal. Na **FIGURA 26** observa-se que o grupo que não recebeu nenhum tratamento prévio ($96,66 \pm 44,67$), apresentou maior consumo de GSH quando comparado ao grupo salina ($410,69 \pm 47,8$). Observou-se ainda, que o grupo Riparina B ($312,99 \pm 38,7^*$, $*p < 0,05$) restabeleceu significativamente os níveis de GSH quando comparado ao grupo que recebeu apenas carragenina + DMSO via intraperitoneal.

FIGURA 26 – Ação da riparina B sobre os níveis de GSH no exsudato peritoneal de camundongos. Os animais foram eutanasiados após as 4 horas da indução da peritonite por carragenina. Uma hora antes da realização do experimento foram pré-tratados com Riparina B (10 mg/kg; i.p.) ou salina (0,9%; i.p.) ou DMSO (3%; i.p.). Os valores foram expressos como média $\pm$ E.P.M. de μg de NPSH/g 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 da análise de variância seguido pelo teste de Newman-Keuls. Legenda: Sal = salina; DMSO = dimetilsulfóxido; RipB = Riparina B.



DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

Os produtos naturais têm sido aplicados à saúde humana há milhares de anos. Muitos medicamentos atualmente prescritos são diretamente isolados de plantas ou são versões modificadas de produtos naturais. Atualmente os cientistas estão à procura de compostos com estruturas específicas que geralmente possam apresentar efeitos farmacológicos oriundos de fontes naturais (WANG et al, 2007).

Tradicionalmente utilizam-se modelos animais para se estudar mecanismos patológicos e características no desenvolvimento e resolução da dor e inflamação, bem como avaliar possíveis atividades anti-inflamatórias e antinociceptivas de novas substâncias, marcadamente drogas de origem natural (PINTO et al., 2008).

Tendo em vista que a Riparina B trata-se de uma alcanida com já demonstrado potencial antioxidante *in vitro*, e sabendo-se que o estresse oxidativo desempenha um papel importante na patogênese dos processos inflamatórios e manutenção da dor, nós avaliamos vários modelos *in vivo* para estabelecer os efeitos anti-inflamatório, antinociceptivo, e antioxidante da Rip B (JOSSE et al., 2001; NUNES et al., 2014).

Os nossos dados mostraram que a Riparina B exibiu atividades anti-inflamatória, antinociceptiva e antioxidante em modelos experimentais *in vivo*.

Um modelo clássico que vem sendo utilizado há muito tempo para avaliar a atividade anti-inflamatória de novos fármacos é o edema de pata induzido por carragenina. A carragenina é um agente inflamatório capaz de produzir edema na pata de roedores caracterizado pelo exsudato aquoso contendo proteínas plasmáticas e extravasamento de neutrófilos e produção de metabólitos do ácido araquidônico, também é capaz de produzir os sinais cardinais da inflamação – edema (tumor), eritema (rubor), hiperalgesia (maior sensibilidade aos estímulos dolorosos), os quais se desenvolvem rapidamente em decorrência da ação de vários mediadores pró-inflamatórios (PASSOS et al., 2007; MARIOTTO et al., 2004).

O ponto de partida deste estudo foi avaliar a atividade anti-inflamatória da Riparina B. Por meio de uma triagem inicial, observou-se que a Rip B foi capaz de reduzir o edema de pata induzido por carragenina em relação aos controles em todos os tempos, durante 4 horas, assim como a indometacina.

Após 3 horas de indução do edema, em comparação com o grupo carragenina, os animais pré-tratados com Rip B (1, 3 e 10 mg/kg) apresentaram

redução de edema. Uma vez que, a dose de 10 mg/kg foi a que apresentou redução mais significativa do edema em todos os tempos avaliados, esta foi a escolhida para os protocolos subsequentes. De acordo com estes dados, podemos inferir que a Rip B pode atuar em ambas as fases iniciais e finais da inflamação.

Nossos resultados contrastaram com os obtidos por Silva e colaboradores (2014), onde, em estudo para verificar a atividade anti-inflamatória do abacate da família Lauraceae, através do edema de pata induzido por carragenina, em nenhum dos grupos houve redução do edema. Resultados estes, que corroboram àqueles constatados em outro trabalho da mesma linha de pesquisas da UNINCOR (RODRIGUES, 2008), no qual tampouco foram encontrados efeitos anti-inflamatórios do extrato do caroço do abacate em um modelo de peritonite induzida pela carragenina em ratos. Somam-se, portanto, evidências contra a alegada ação antiflogística deste produto vegetal.

Em contrapartida, estudo realizado por Silva e colaboradores (2011) evidenciaram a ação antiedematogênica, no edema de pata evocado por carragenina em camundongos entre a segunda e a quarta hora após a injeção do extrato derivado da espécie *Anadenanthera macrocarpa* (Benth) Brenan. Demonstrando assim, importante atividade anti-inflamatória de compostos derivados de plantas medicinais.

A inflamação aguda induzida por injeção de vários agentes flogísticos na pata traseira de roedores, tem sido um procedimento amplamente utilizado para estudo e avaliação de agentes anti-inflamatórios (MORRIS, 2003; ZHANG et al., 2007).

Através do uso deste modelo da carragenina foi que os pesquisadores Sharp; Dohme demonstraram a atividade anti-inflamatória da indometacina. Portanto, este modelo foi, e continua sendo importante para o desenvolvimento de novos fármacos com potencial anti-inflamatório (MORRIS, 2003; WILLOUGHBY, 2003).

O edema de pata induzido por carragenina possui um perfil multifásico, onde a fase inicial do modelo é mediada principalmente por histamina, serotonina, bradicinina, seguida do aumento de prostaglandinas no tecido inflamado. Este aumento coincide com a migração de leucócitos, os quais são capazes de amplificar a resposta inflamatória, com a produção de outros mediadores inflamatórios, de espécies reativas de oxigênio, aumento da atividade da mieloperoxidase e aumento da produção de óxido nítrico (NANTEL et al., 1999; POSADAS et al., 2004).

No modelo de edema de pata induzido por carragenina, o pré-tratamento com indometacina, um anti-inflamatório não esteroide, aboliu quase totalmente o edema, confirmando a validade do teste; pois a literatura demonstra que a indometacina produz efeitos antiedematogênicos no modelo de edema de pata induzido por CG (HENRIQUES et al., 1987).

A Riparina B, de modo semelhante a indometacina mostrou-se capaz de reduzir a formação do edema. Sugerindo que a ação da Rip B pode envolver alguns dos mediadores implicados no edema de pata induzido por carragenina, como: histamina, serotonina e prostaglandinas.

Partindo do princípio que a ação anti-inflamatória poderia envolver mediadores como a histamina e a serotonina partimos para investigação dos efeitos da mesma no edema de pata induzido por composto 48/80 e dextrana, um polissacarídeo reconhecido pela capacidade de liberar dos mastócitos os mediadores histamina e serotonina (GUPTA et al., 2003).

O edema de pata induzido por dextrana apresenta um mecanismo distinto ao edema de pata induzido por carragenina. Tal como a carragenina, promove aumento da permeabilidade vascular, porém este fenômeno ocorre devido a degranulação dos mastócitos, com a subsequente liberação de serotonina e histamina. Outra diferença é que, o exsudato, que ocorre como consequência desse processo, apresenta menor concentração de proteínas e neutrófilos (CARVALHO, 2011).

Os nossos resultados demonstram que o pré-tratamento com Riparina B (10mg/kg, via i.p.), foi capaz de reduzir o edema da pata após a injeção de dextrana e composto 48/80. Estes resultados sugerem que a Rip B pode apresentar ação vasoativa ou propriedade antagonista.

A fim de esclarecer a influência da Riparina B sobre os mediadores histamina e serotonina na mediação de seus efeitos anti-inflamatórios decidimos avaliar os efeitos desta substância nos edemas de pata induzidos pela injeção intraplantar da histamina e serotonina.

Histamina e serotonina (5-HT) são aminas vasoativas, que levam a alterações de permeabilidade vascular. Possuem ação rápida e são liberadas logo que ocorre o estímulo agressor. A histamina é fundamental para a contração e separação das células endoteliais permitindo assim a passagem de leucócitos circulantes. O principal local de armazenamento da histamina na maioria dos tecidos é no mastócito e no sangue, no basófilo. É relevante também destacar que a histamina

tem um efeito ativador sobre a fosfolipase A2, enzima responsável pela formação de prostaglandinas. A 5-HT, possui ações semelhantes às da histamina, favorecendo o aumento da permeabilidade vascular e promovendo vasodilatação (KUMAR et al., 2005; MENEZES DE LIMA JR, et al., 2006; JUTEL et al., 2009).

Nossos resultados mostraram que a Riparina B foi capaz de diminuir o edema induzido tanto pela histamina quanto pela serotonina, a partir dos primeiros 30 minutos de indução. Ambos os mediadores, são estudados na fase inicial, pois estão relacionados com os eventos vasculares do processo inflamatório agudo. Estes dados sugerem que o efeito antiedematogênico da Riparina B, envolve um possível antagonismo de ambos mediadores. A partir daí decidimos investigar o efeito da Riparina B sobre a bradicinina, um outro reconhecido mediador inflamatório.

A bradicinina (BK), proveniente do sistema de cininas, é um potente peptídeo vasoativo que promove: aumento da permeabilidade vascular, dilatação das vênulas, maior secreção de fluidos e hiperalgesia (CALIXTO et al., 2000).

Na inflamação, os receptores B1 presentes em macrófagos desencadeiam a produção de IL-1 e de TNF- α . Além disso, podem levar a hipersensibilização de fibras nociceptivas e podem levar à hiperalgesia com estimulação da liberação de substância P e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina por neurônios nociceptivos (MORROW; ROBERTS II, 2005). Neste trabalho, a Riparina B reduziu o edema de pata induzido por BK em todos os tempos avaliados.

Um estudo realizado por Carvalho (2011) verificou que a Riparina II, alcamida análoga a Riparina B, foi capaz de reduzir o edema de pata induzido por carragenina, dextrana, histamina e bradicinina, sugerindo uma capacidade desta alcamida em interferir no estabelecimento inicial do processo inflamatório, visto que esses mediadores são mais importantes no processo inflamatório agudo.

Os efeitos observados sobre o edema de pata induzido por PGE₂ são considerados promissores e podem demonstrar um real potencial anti-inflamatório.

A Riparina B reduziu significativamente a inflamação ocasionada pelo agente PGE₂, corroborando com a minimização do edema induzido pela carragenina em sua fase final, pois é nesta fase que os prostanóides são liberados, o que sugere que o mecanismo de ação do fármaco possa estar relacionado com mecanismos mediados por este mediador durante o processo inflamatório. A PGE₂ induz a produção de diversos quimioatraentes, tais como citocinas pró-inflamatórias e leucócitos (HARRIS et al., 2002; KAUR et al., 2004).

Podemos verificar por meio do nosso estudo que a Riparina B, na dose de 10 mg/kg foi eficaz para redução dos edemas de pata induzidos por: dextrana, composto 48/80, histamina, serotonina, bradicinina e PGE₂. Assim, pode-se observar que este alcaloide de origem natural, afeta o componente vascular do edema e esta ação parece ser mediada pela redução da ação destes diferentes mediadores inflamatórios.

Na intenção de reforçar nossos achados e delinear o qual mecanismo estaria envolvido na diminuição da resposta inflamatória aguda, realizamos protocolos experimentais para avaliar a migração de leucócitos e infiltração de neutrófilos no local da inflamação aguda. O primeiro deles foi avaliação da atividade da enzima mieloperoxidase (MPO) na pata, que consiste em um método de análise indireta da migração de neutrófilos para o sítio inflamatório (ARNHOLD, 2004).

No grupo que não recebeu pré-tratamento com a Riparina B (10 mg/kg, via i.p.), houve um aumento significativo dos níveis de MPO na pata de camundongos após 4 horas da indução do edema de pata induzido por carragenina. Tal aumento indica uma maior atividade neutrofílica no sítio de aplicação do estímulo, quando comparados com o grupo que recebeu pré- tratamento com Riparina B, sugerindo que a mesma reduz o processo inflamatório por reduzir a migração de neutrófilos.

Tais achados assemelham-se às respostas encontradas por Carvalho (2011), que em estudo com camundongos, verificou que o pré-tratamento com Riparina II reduziu a atividade da MPO, sugerindo um papel inibidor da riparina neste processo.

E, de modo semelhante, demonstrou-se um efeito importante do extrato etanólico da casca de *Anadenanthera macrocarpa* como um modulador chave em eventos inflamatórios relacionados com a inibição da migração de neutrófilos; tal atividade apoia a utilização tradicional da planta na medicina popular (SILVA, 2011)

A fase aguda do processo inflamatório é marcada dentre outros acontecimentos, pela presença de infiltrado neutrofílico. Para verificar a influência da Riparina B sobre a migração de células para o sítio inflamatório foi utilizado o modelo de peritonite induzida pela carragenina. Neste modelo ocorre a liberação de citocinas, tais como IL-1 β e TNF- α . A IL- 1 β ocasiona uma inflamação sistêmica pela ativação de ciclo-oxigenase-2, levando à formação de PGE₂, NO e moléculas de adesão endotelial (OLIVEIRA et al., 2011).

Dentre as células que produzem citocinas destacam-se os linfócitos T auxiliares que são divididos em duas sub-populações, TH₁ e TH₂. As células TH₁ secretam principalmente TNF- α , enquanto as células TH₂ liberam IL-4, IL-5, IL-9, IL-10 e IL-13 (ROMAGNANI, 2000). Dentre as principais citocinas que possuem efeitos pró-inflamatórios destaca-se o TNF- α . Este é produzido e liberado principalmente por macrófagos e também por linfócitos e mastócitos (ALVES; RIBEIRO, 2004).

O TNF- α também está envolvido em diversas doenças nas quais ocorrem um processo inflamatório importante. Dentre elas cita-se a síndrome da resposta inflamatória sistêmica (SPIELMANN et al., 2001), a espondilite anquilosante (DE KEYSER et al., 2004), infarto agudo do miocárdio (TORRE-AMIONE, 2005), artrite reumatoide (LANGE et al., 2005; SARZI-PUTTINIA et al., 2005), entre outras.

A família da IL-1 é composta por duas cadeias (α e β) e os receptores para esta família podem ser do tipo I ou II (IL-1R I e IL-R1 II) (AREND, 2002). A isoforma IL-1 β exerce papel importante na defesa do organismo contra micro-organismos intracelulares como o *Mycobacterium tuberculosis*. Estudos demonstraram que camundongos infectados com *Mycobacterium tuberculosis* e que não expressam o gene para IL-1 têm o tempo de vida média reduzido (JUFFERMANS et al., 2000). Além disso, outras doenças de caráter inflamatório pelo qual ocorre o envolvimento da IL-1 β tem sido descritas, como a artrite reumatoide (IWAKURA, 2002; FLEISCHMANN et al., 2004), o infarto agudo do miocárdio (LONG, 2001) e ainda a inflamação em nível de SNC (BASU et al., 2004), entre outras.

A lesão tecidual inicial resulta na liberação de mediadores pelas células lesadas, incluindo os prótons H⁺ e K⁺, serotonina (5-HT), bradicinina, histamina, adenosina trifosfato (ATP) e óxido nítrico (NO). Posteriormente, a ativação do processo inflamatório induz a via do ácido araquidônico, resultando na produção de prostaglandinas e leucotrienos e, por fim, as células do sistema imune são recrutadas liberando ainda outros mediadores, incluindo fatores de crescimento e citocinas como interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (KIDD e URBAN, 2001).

Estudos anteriores demonstraram que a administração de carragenina na cavidade peritoneal promove a liberação de excesso de produção de TNF- α e IL-1 β por ativação de células residentes (CHAVES et al., 2013).

Nossos achados evidenciaram que a Riparina (10mg/kg) reduziu significativamente os níveis de tais citocinas pró-inflamatórias (IL1- β e TNF- α).

Sugere-se que esta alcanida atue também no mecanismo inflamatório, pela regulação dos níveis de citocinas inflamatórias.

Uma característica de inflamação aguda é a ativação de neutrófilos e a migração de células endoteliais vasculares através de locais de inflamação. Durante a inflamação aguda induzida pela carragenina, os leucócitos polimorfonucleares (PMN) migram em grande quantidade para as áreas de tecido danificado. Eles são as primeiras células a serem recrutadas para o local da agressão e podem ser altamente ativados por uma grande variedade de ligantes (LI et al., 2014). Assim, sabendo que a migração neutrófilos para sítios inflamatórios e/ou a sua ativação exerce um papel fundamental na gênese da hipernocicepção inflamatória (CUNHA et al., 2008; LAVICH et al., 2003) e que a injeção de carragenina na cavidade peritoneal promove extensa migração de neutrófilos, foi avaliado o efeito da Riparina B sobre a migração de leucócitos e infiltração de leucócitos induzida por carragenina.

Além de reduzir os níveis de citocinas pró-inflamatórias, o tratamento com a Riparina B, reduziu significativamente a contagem total de leucócitos da amostra, bem como a contagem diferencial, que corresponde ao número de neutrófilos presentes no exsudato peritoneal, demonstrando a minimização do processo inflamatório que não foi observada naquele grupo que não recebeu tratamento com o anticonvulsivante.

A dor é um sinal clássico dos processos inflamatórios, e o seu controle contribui de maneira substancial na terapêutica a ser empregada, portanto, os fármacos anti-inflamatórios que possuem boa eficácia no tratamento da dor são bastante desejados (CASTRO, 2011).

A nocicepção induzida experimentalmente varia com o grau de consciência do animal e também com a presença de outras aferências sensoriais como o ambiente agressivo, as baixas temperaturas, o estresse ou a irritação com possível lesão tecidual no animal, produzida, por exemplo, por extratos vegetais contendo saponinas, taninos ou o pH das soluções, quando injetados por via subcutânea ou intraperitoneal. Além disso, a maioria dos métodos de avaliação experimental da dor envolvem uma resposta motora dos animais, de tal forma, que resultados falsos positivos podem ser obtidos caso os extratos ou os compostos testados produzam sedação e imobilização dolorosa, comprometendo a motricidade (RATES; BARROS, 1994).

O desenvolvimento de métodos para a medida de dor e seu alívio, em animais de laboratório, tem sido incrementado nos últimos anos. O princípio da maioria desses métodos se baseia na indução da dor através de um estímulo, supostamente doloroso, previamente escolhido, que determina uma resposta mensurável de preferência quantitativamente, com valores diretamente proporcionais à intensidade do estímulo que, com a introdução de um procedimento ou substância, é diminuída (analgésico) ou aumentada (hiperalgésico). Os modelos experimentais utilizados no estudo da dor são divididos em três categorias: os que utilizam estímulos mecânicos, térmicos e químicos (OLIVEIRA et al., 2008).

O primeiro modelo farmacológico empregado foi o teste de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos, que frequentemente é utilizado para a triagem de compostos sintéticos e naturais, com o qual se objetivou observar a presença de atividade antinociceptiva central e/ou periférica (ZAKARIA et al., 2006; FISCHER et al., 2008).

O modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético é um teste robusto e reprodutível em camundongos, sendo demonstrado o envolvimento de vários mediadores inflamatórios, como por exemplo: PGE_2 e PGF_2 , histamina, bradicinina e serotonina (LEI GUO et al., 2008). Várias classes de drogas são capazes de suprimir ou diminuir as contorções induzidas pelo ácido, antihipertensivos, antihistamínicos, antidepressivos tricíclicos, narcóticos e anti-inflamatórios não-esteroidais são exemplos de classes com efeitos antinociceptivo neste teste (STEPANOVIC-PETROVIC et al., 2008; COUTO et al., 2011).

A Riparina B, na dose de 10 mg/kg administrada por via intraperitoneal, diminuiu de forma significativa a nocicepção induzida pelo ácido acético, assim como a morfina, um potente opioide de ação central, utilizada como droga referência no teste. O que sugere que, o efeito da Riparina B poderia estar relacionado com a inibição de mediadores liberados em resposta ao ácido acético.

Tal resposta foi semelhante à encontrada por Dias (2012) em estudo da Riparina IV, onde está apresentou significativa redução das contorções abdominais induzidas por ácido acético; bem como, a Riparina I, que também foi eficaz para reduzir as contorções induzidas por este ácido (CARVALHO, 2011). Em ambos os estudos, as Riparinas (I e IV) foram testadas nas doses de 25 e 50 mg/kg.

Assim, a redução das contorções observadas no presente trabalho pode ter ocorrido por diversos mecanismos, tanto a nível central como periférico, visto que

este teste não discrimina entre uma e outra, ou pode ter ocorrido por meios não relacionados à nocicepção, ou devidos a mecanismos inflamatórios, tais como o comprometimento das habilidades motoras (LE BARS et al., 2001).

Portanto, a fim de ampliar os resultados, o efeito antinociceptivo da Riparina B foi, em seguida avaliado no teste da formalina.

O teste da formalina, primeiramente introduzido por Dubuisson e Dennis (1977), é um dos modelos mais bem estabelecidos e empregados experimentalmente para o estudo de mecanismos nociceptivos (CHICHORRO et al, 2004). É considerado um modelo experimental de dor com duas fases distintas, que podem relacionar-se a diferentes tipos de dor.

A fase inicial, denominada nociceptiva ou não inflamatória, é o resultado da estimulação direta de nociceptores e tem mediação central; a fase tardia, denominada inflamatória, é causada pela inflamação local com liberação de mediadores hiperalgésicos e inflamatórios (HUNSKAAR e HOLE, 1987). O edema causado pela formalina, diferentemente daquele causado pelos agentes flogísticos anteriores, desenvolve-se rapidamente por um mecanismo neurogênico envolvendo estimulação de fibras sensoriais aferentes primárias nociceptivas. Neste sentido, o processo inflamatório é fortemente dependente da liberação de substância P, outras taquicininas e glutamato, por ativação direta das fibras pela formalina, ou indireta por intermédio da formação de bradicinina e liberação de histamina, serotonina e prostaglandinas por fibroblastos, mastócitos, neutrófilos e plaquetas (BEIRITH et al., 2002).

A formalina induz produção e liberação de um componente essencial da resposta nociceptiva / pró-inflamatória através da estimulação da produção de citocinas, como espécies reativas de oxigênio e prostaglandinas (GUIMARÃES et al., 2010).

Investigações anteriores relataram que, a substância P e a bradicnina participam da fase inicial do teste e que, drogas como a Morfina e Codeína, reduzem o tempo de lambertura da pata, no teste da formalina, tanto na primeira como na segunda fase. Todavia, drogas como a Indometacina e Naproxeno (exemplos de AINES), diminuem a nocicepção apenas na segunda fase do teste (HUNSKAAR; FASMER; HOLE, 1985; TJOLSEN et al., 1992; DAI et al., 2002).

Neste trabalho, foi demonstrado que a administração de Riparina B reduziu a nocicepção tanto na fase inicial quanto na fase tardia do teste da formalina. Como

esperado, a morfina reduziu significativamente a resposta de formalina em ambas as fases.

Em estudo realizado por Dias (2012), verificou-se que, a Riparina IV apresentou ação antinociceptiva somente na segunda fase do teste da formalina, em contrapartida, a Riparina B apresentou resposta em ambas as fases do teste.

Os resultados obtidos em nosso estudo são indicativos de atuação da Riparina B na dor neurogênica e inflamatória, sugerindo-se que a atividade antinociceptiva pode ser devida, pelo menos em parte, à ação anti-inflamatória.

Para avaliar se a Riparina B é eficaz em produzir antinocicepção em modelos de estímulos nocivos térmicos, testamos o modelo da placa quente, inicialmente descrito por WOOLFE; MACDONALD, 1994. Este modelo é sensível para drogas que atuam centralmente (atuação no SNC – medula espinhal e encéfalo), como antidepressivos e sedativos. Utilizando este teste é possível determinar a hiperalgesia térmica. Além disso, este modelo é útil na pesquisa de fármacos com propriedades analgésicas (CARTER, 1991; WOOLFE; MACDONALD, 1944).

O modelo da placa quente mostra uma resposta do animal frente a um estímulo térmico que é associado à neurotransmissão central. O comportamento do roedor de saltar ou lambear as patas é indicativo de resposta ao estímulo nociceptivo térmico e a redução nesses parâmetros é interpretado como efeito antinociceptivo (ALMEIDA et al., 2004; ARAÚJO et al., 2009). Este modelo é sensível e específico, utilizado para avaliar a atividade analgésica mediada por mecanismos centrais, pois o calor é frequentemente utilizado como um estímulo nódico em modelos de dor aguda (SULAIMAN et al., 2008; ONG et al., 2011).

A placa quente é um dos modelos mais utilizados para testar nocicepção em roedores por ser rápido, preciso, simples e com baixo custo (MAI, 2007).

O tratamento com Riparina B, não foi capaz de aumentar o tempo de reação no teste da placa quente, diferente da injeção intraperitoneal de morfina que promoveu um aumento no tempo de reação de camundongos em resposta ao calor.

Dados estes, que corroboram aos apresentados pela Riparina II e Riparina IV que, igualmente, não apresentaram aumento do tempo de reação do animal na placa quente (CARVALHO, 2011; DIAS, 2012).

Este resultado negativo, portanto indica que a atividade antinociceptiva da Riparina B não atua em mecanismos de ação central. Além disso, estudos anteriores verificaram que, as riparinas I, II e III, quando tratadas por via

oral e intraperitoneal em camundongos, aumentaram o número e o tempo de permanência dos braços abertos no teste do *plus maze* sem, contudo, alterar a atividade locomotora no teste do campo aberto ou o número de quedas no teste do *rota rod* (SOUSA et al., 2004; 2007; MELO et al., 2006).

Estes resultados reunidos mostraram que as substâncias isoladas da planta *Aniba riparia* apresentaram efeito ansiolítico, desprovidas de efeitos sedativo ou relaxante muscular, portanto, com menos efeitos colaterais que os benzodiazepínicos clássicos (OLIVEIRA, 2011).

Em humanos, o desequilíbrio entre espécies oxidantes e antioxidantes pode provocar uma série de desordens celulares, como a peroxidação lipídica, danos proteicos e enzimáticos, bem como alterações no DNA, as quais podem estar associadas a inúmeros processos deletérios, como o câncer, arterosclerose, diabetes mellitus, artrite reumatóide, distrofia muscular, catarata, desordens neurológicas, problemas respiratórios e o envelhecimento precoce (FLESHIN et al, 2000; HIRATA; SATO; SANTOS, 2004).

A instalação do processo de estresse oxidativo pode ocorrer pela existência de um desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes, em favor da geração excessiva de radicais livres ou em detrimento da velocidade de remoção desses. Esse processo conduz à oxidação de biomoléculas com consequente perda de suas funções biológicas e/ou desequilíbrio homeostático, cuja manifestação é o dano oxidativo potencial contra células e tecidos (HALLIWELL; WHITEMAN, 2004).

O equilíbrio entre a produção de espécies reativas derivadas do oxigênio (EROS) e as defesas antioxidantes determinam o grau de estresse oxidativo. Há evidência significativa que a geração de espécies reativas com oxigênio e a resposta correspondente ao estresse oxidativo são fatores fundamentais para determinar, ou ao menos participar do processo de determinação da longevidade (FINKEL; HOLBROOK, 2000). Os antioxidantes, além do seu tradicional uso como aditivo à alimentos para ajudar a protegê-los contra a deterioração e como estabilizadores em Combustíveis e Lubrificantes para evitar a oxidação, têm sido propostos como potenciais ferramentas preventivas e terapêuticas para combater os prejuízos e danos à saúde decorrentes do stress oxidativo, além de ser um instrumento na prevenção de doenças (MALDONADO et al, 2011).

Mecanismos distintos podem levar a um dano no tecido por meio das ROS, como peroxidação lipídica, dano proteico, e incremento nas citocinas pró-

inflamatórias. Assim, o presente estudo também investigou o efeito da Rip B em dois marcadores de estresse oxidativo: glutathiona (GSH) e malondialdeído (MDA).

Os nossos resultados demonstraram que a administração de Riparina B diminuiu a concentração de MDA e aumentou os níveis de GSH e em camundongos no modelo de peritonite induzida por carragenina.

A peroxidação lipídica, é um mecanismo bem estabelecido de dano celular, é usada como um marcador de estresse oxidativo em células e tecidos (WOTHERSPOON et al., 2005). O processo de peroxidação é iniciado pela reação de um radical livre com um ácido graxo poli-insaturado e propagado por radicais peroxilas, resultando na formação, entre outros compostos, do MDA. O MDA é um dialdeído formado como produto secundário durante a oxidação de ácidos graxos poli-insaturados peroxidados, principalmente o ácido araquidônico, ocorre naturalmente e é produto da peroxidação lipídica (LIMA et al., 2006).

Em estudo realizado por Antunes e colaboradores (2008) demonstraram que o MDA possui ação genotóxica e citotóxica, encontrando-se em níveis elevados em algumas patologias associadas ao estresse oxidativo.

Nosso trabalho demonstrou que os animais tratados apenas com carragenina apresentaram níveis mais elevados de MDA quando comparados com os animais tratados apenas com solução salina ou Riparina B.

Já a glutathiona, sintetizada principalmente no fígado, é um tripeptídeo encontrada no organismo sob as formas reduzida (GSH) e oxidada (GSSG) e atua direta ou indiretamente em muitos processos biológicos importantes, como participação na detoxificação de agentes químicos e eliminação de produtos da lipoperoxidação; é o principal componente do sistema de defesa antioxidante em células vivas e exerce diversos efeitos sobre o sistema imune, estimulando ou inibindo a resposta imunológica, a fim de controlar a inflamação (PERRICONE et al., 2009).

A GSH é um indicador muito sensível da funcionalidade e viabilidade das células, e os seus níveis nos tecidos humanos normalmente variam de 0,1 a 10 mM, sendo a maioria concentrada no fígado, rins, baço, eritrócitos e leucócitos. Em humanos, sua depleção está relacionada à presença de doenças como câncer, doenças neurodegenerativas e cardiovasculares (PASTORE et al., 2003), desempenha importante função em reações enzimáticas e não-enzimáticas, protegendo o tecido contra o estresse oxidativo (KLOEK et al., 2002;

VENKETARAMAN et al., 2003). Nas reações antioxidantes é convertida à sua forma oxidada, a glutathione dissulfido (GSSG) a qual torna a ser reduzida enzimaticamente em GSH a fim de manter o equilíbrio redox fisiológico. Em condições normais, 95-99% do total de GSH presente no corpo está na forma reduzida (KLOEK et al., 2002). Trata-se do principal antioxidante intracelular, a qual é importante em muitas funções biológicas, tais como prevenção do dano oxidativo, remoção de hidroperóxidos e desintoxicação e estabilização das membranas biológicas (PANJAMURTHY et al., 2005).

De acordo com nossos resultados e com base na literatura, pode-se inferir que a Riparina B diminui o dano tecidual induzido pela inflamação, estimulando a produção e ação de antioxidantes endógenos (GSH) e diminuindo a peroxidação lipídica no organismo.

Nossos dados corroboram aos encontrados por Costa (2013), no qual ficou demonstrado que as Riparinas (A, B, C, D, E, F) exerceram um potencial antioxidante significativo, em todas as concentrações testadas, contra os radicais peróxil gerados, protegendo os lipídios da oxidação.

Resultado semelhante foi obtido com o trolox, um análogo sintético hidrofílico do α -tocoferol, que é largamente usado como padrão antioxidante. Um forte potencial sequestrante contra o radical hidroxila também foi gerado *in vitro*, especialmente na concentração mais alta, semelhante ao resultado obtido com o trolox e sugestivo de potencial antioxidante. As substâncias demonstraram exercer ainda um efeito significativo sequestrador contra o óxido nítrico (NO), havendo uma diminuição significativa na produção desse composto pelas riparinas em todas as concentrações testadas.

As atividades antioxidantes *in vitro*, demonstradas nos testes das riparinas, podem ser exploradas para uma possível proteção *in vivo* de biomoléculas, contra danos causados pelos radicais livres. Compostos isolados de plantas medicinais estão sendo testados, por diversas metodologias, quanto a sua possível atividade antioxidante pelo potencial promissor de tal atividade biológica para bioprospecção de fármacos para o tratamento de doenças como Alzheimer, Parkinson, esclerose múltipla, doença de Huntington e alguns tipos de neoplasias. As propriedades antioxidantes têm se tornado um importante objeto de estudo para compostos naturais e/ou sintéticos, como é o caso das riparinas (REED, 2011).

As Riparinas, além de sua disponibilidade, pela viabilidade da síntese, demonstraram nos testes realizados por Costa (2013) essa promissora bioatividade.

Os constituintes herbários para os quais os efeitos comportamentais e as propriedades farmacológicas têm sido bem caracterizados devem ser ótimos candidatos para melhores investigações que podem resultar em uso clínico. Alguns desses constituintes com estruturas químicas bem definidas podem servir de amostras e modelos para a síntese de drogas análogas com maior eficácia e menos efeitos adversos. Contudo, apesar dessas preparações herbárias terem mostrado potencial terapêutico em modelos animais, a ciência clínica da maioria dos extratos e misturas herbárias ainda está limitada (REED, 2011).

Portanto, o alcaloide Riparina B, com efeitos antiedematogênico no edema de pata induzido por carragenina, anti-inflamatório, antinociceptivo e antioxidante aqui demonstrados em modelos animais devem servir para melhores avaliações em estudos pré-clínicos e clínicos.

CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

A investigação realizada no presente estudo, nos permite concluir que:

- A administração de Riparina B mostrou atividade antiedematogênica ao inibir, de forma significativa, os edemas de pata induzido por carragenina, dextrana, composto 48/80, histamina, serotonina, bradicinina, e PGE2 em camundongos;
- A Riparina B apresentou significativa redução da enzima mieloperoxidase na pata de camundongos;
- A Riparina B reduziu significativamente a migração de neutrófilos e leucócitos totais nos modelos de peritonite e inflamação induzidos por carragenina;
- O pré-tratamento com Riparina B reduziu de modo significativo a concentração de citocinas inflamatórias (IL-1 β e TNF- α) no exsudato peritoneal de camundongos;
- A Riparina B demonstrou atividade antinociceptiva no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos;
- A atividade antinociceptiva da Riparina B foi demonstrada nas duas fases do teste da formalina;
- A Riparina B não apresentou efeito antinociceptivo central no modelo da placa quente;
- A Riparina B reduziu a peroxidação lipídica, diminuindo significativamente os níveis de MDA;
- A Riparina B aumentou os níveis de GSH no exsudato peritoneal de camundongos, corroborando sua atividade antioxidante.

PERSPECTIVAS

7 PERSPECTIVAS

Na perspectiva de complementar o estudo se faz necessário prosseguir com a investigação mais aprofundada da Riparina B através dos seguintes experimentos:

- Investigar os mecanismos de ação envolvidos na analgesia e inflamação;
- Elucidar o efeito da Rip B ao serem testadas novas doses no tratamento agudo da Inflamação, bem como avaliar o efeito de administrações repetidas;
- Elucidar o efeito da Rip B ao serem testadas novas doses no tratamento agudo da Dor, bem como avaliar o efeito de administrações repetidas;
- Verificar se a Rip B tem efeitos de indução de gastrite / úlceras, tais como a maioria dos anti-inflamatórios convencionais.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- AGNIHOTRI S, WAKODE S & AGNIHOTRI A. An overview on antiinflammatory properties and chemo-profiles of plants used in traditional medicine. **Indian Journal of Natural Products and Resource**, v. 1, p.150-167, 2010.
- ALBUQUERQUE, U.P. DE; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. Supl., p. 678–689, 2006.
- ALMEIDA, T. F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Research**, v.1000, n.1-2, p.40-56, 2004.
- ALVES, A.L.; RIBEIRO, F.A.Q.. O papel das citocinas na colesteatoma adquirido da orelha média: Revisão da literatura. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 70, p. 813-818. 2004.
- ARNHOLD, J. Properties, functions, and secretion of human myeloperoxidase. **Biochemical**, v.69, p. 4-9, 2004.
- APKARIAN, A. V.; BALIKI, M. N., et al. "Towards a theory of chronic pain." **Program Neurobiology**, v.2, p.81 -97, 2009.
- AQUINO, D. et al. de. Nível de conhecimento sobre riscos. e benefícios do uso de plantas medicinais e fitoterápicos de uma comunidade do recife — PE. **Revista de Enfermagem UFPE On Line**, v.1, n.1, p.107-110, 2007.
- ALWANI, M.E.; WU, B.X.; OBEID, L.M.; HANNUN, Y.A. Bioactive sphingolipids in the modulation of the inflammatory responses. **Pharmacologic Therapeutic**. Vol. 112, p.171-183, 2006.
- BARBOSA-FILHO, J.M.; SILVA, E.C.; BHATTACHARYYA, J. Synthesis of severall new phenylethylamides of substituted benzoic acids. **Quimica Nova**. v.13, p.332–334, 1990.
- BARBOSA-FILHO, J. M.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R.; BARBOSA, R. C. S. B. C.; GIESBRECHT, A. M.; YONG, M. C. M. Benzoyl esters and amides,

stryrylpyrones and neolignans from the fruits of *Aniba riparia*. **Phytochemical**, 26,9,2615, 1987.

BARROSO, G. M; GUIMARÃES, E. F; ICHASO, C. L. F; COSTA, C. G; PEIXOTO, A. L. **Sistemática das Angiospermas do Brasil**. Vol I. 1 a ed. São Paulo, EDUSP, P.155, 1978.

BEIRITH, A.; SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. Mechanisms underlying the nociception and paw oedema caused by injection of glutamate into the mouse paw. **Brain Research**, v. 924, p. 219-228, 2002.

BHANDARE, A.M.; KSHIRSAGAR, A.D.; VYAWAHARE, N.S.; HADAMBAR, A.A.; THORVE, V.S. Potential Analgesic, anti-inflammatory and antioxidant activities of hydroalcoholic extract of *Areca catechu* L. nut. **Food Chemical Toxicology**. Vol.48, 3412–3417, 2010.

BURIAN, M.; GEISLINGER, G. COX-dependent mechanisms involved in the antinociceptive action of NSAIDs at central and peripheral sites. **Pharmacology Therapeutic**, v.10, p. 139–154, 2005.

CALIXTO, J.B.; CABRINI, D.A.; FERREIRA, D.J.; CAMPOS, M.M. Inflammatory pain: kinins and antagonists. **Current Opinion Anesthesiology**, Vol. 14, p. 519-526, 2001.

CALIXTO, J.B.; CABRINI, D.A.; FERREIRA, D.J.; CAMPOS, M.M. Kinins in pain and inflammation. **Pain**. Vol. 87, p.1-5, 2000.

CALIXTO J. B.; OTUKI M. F.; SANTOS A. R. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part I. Action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor kappa B (NF-Kappa B). **Plantas Medicinais**, v.69, p.973-983, 2003.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal view. **Journal Ethnopharmacology**, v. 100, p.131 -4, 2005.

Fortes, R. S. Efeitos Anti-inflamatório e Antinociceptivo da Riparina B em Camundongos. 2015.

CARRAWAY, M.S.; WELTY-WOLF, K.E.; MILLER, D.L. Blockade of tissue factor: treatment of injury in established sepsis. **American Journal of Respiratory Critical Care Medicine.**, Vol. 76, p.1200-1209, 2003.

CARVALHO, A.C.B.; SILVEIRA, D. Drogas vegetais: uma antiga nova forma de utilização de plantas medicinais. **Brasil. Médi.**, v.48, n.2, p.219-237, 2010.

CARVALHO, A.M.R. **Estudo da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória da Riparina II (O-METIL-N-2-HIDROXI-BENZOIL-TIRAMINA) em modelos experimentais.** Dissertação de Mestrado, 2011.

CASTELO-BRANCO, U.V.; CASTELO-BRANCO, U.J.V.; THOMAS, G.; ARAÚJO, C.C.; BARBOSA-FILHO, J.M.; Preliminary pharmacological studies on three benzoyl amides, constituents of Aniba riparia (Ness) Mez (Lauraceae). **Acta Farmacology Bonaerense**, v.19, p. 197-202, 2000.

CASTRO, R.A. Avaliação do Potencial Analgésico e Anti-inflamatório do Composto Pirazólico 1,5-difenil-3-hidrazinopirazol(a) – DHP. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2011.

CATÃO, R.M.R. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana e efeitos biológicos de riparinas sobre eliminação de resistência a drogas em amostras de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas.** v. 42, p. 9-14, 2010.

CATÃO, R.M.R.; BARBOSA-FILHO, J.M.; GUTIERREZA, S.J.C.; LIMA, E.O.; PEREIRA, M.S.V.; ARRUDA, T.A.; ANTUNES, R.M.P. Avaliação da atividade antimicrobiana de riparinas sobre cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* multirresistentes, **RABC**, Vol 34 (4), p. 247-249, 2005.

CHA E , L. .; NICOLA , L. A. D.; IL A, R. O.; BARRO , F. C.; FREITA , A. L.; ARAG O, K. .; RIBEIRO, R. A.; O A, M. H. L. P.; BARBOSA, A. L. R.; MEDEIROS, J. V. R. **Immunopharmacology and Immunotoxicology.** Vol.35, 93–100, 2013.

CHENG, H.Y.; PITCHER, G.M.; LAVIOLETTE, S.R.; WHISHAW, I.Q.; TONG, K.I.; KOCKERITZ, L.K.; WADA, T.; JOZA, N.A.; CRACKOWER, M.; GONCALVES, J.; SAROSI, I.; WOODGET, J.R.; OLIVEIRADOS-SANTOS, A.J.; IKURA, M.; VAN DER KOOY, D.; SALTER, M.W.; PENNINGER, J.M.; **Dream is a critical transcriptional repressor for pain modulation**. Elsevier, vol.108(1): 31-43, 2002.

CHESTNUT, D. H., ABRÃO, S. E. & BLACK, S. **Year Book of Anesthesiology and Pain Management**. Elsevier, 2008.

CHICHORRO, J.G.; LORENZETTI, B.B.; ZAMPRONIO, A.R. Involvement of bradykinin, cytokines, sympathetic amines and prostaglandins in formalin-induced orofacial nociception in rats. **British Journal of Pharmacology**., v.141, p.1175-1184, 2004.

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. **The Journal of pharmacology and Experimental Therapeutic**, vol. 318, p. 611 -618, 2006.

COE-TEIXEIRA, B. Lauráceas do gênero *Ocotea* do estado de São Paulo. *Rodriguésia*, v. 32, n. 52, p. 55 – 190, 1980.

COSTA, L.M. Investigação de atividades biológicas das riparinas A, B, C, D, E e F: Citotoxicidade, atividade antioxidante e potencial antiesquistossoma. Dissertação de Mestrado, 2013.

COUTAUX, A.; ADAM, F.; WILLER, J.C.; CHELLY, J. E. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. **Joint Bone Spine**, 2005, v. 72, p. 359-371.

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 *Emilia sonchifolia* in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.134, p.348 – 353, 2011.

Fortes, R. S. Efeitos Anti-inflamatório e Antinociceptivo da Riparina B em Camundongos. 2015.

COUTURE, R.; HARRISON, M.; VIANNA, R.M.; CLOUTIER, F. Kinin receptors in pain and inflammation. **European Journal Pharmacology**, vol. 429, p. 161 -176, 2001.

CUNHA, T. M. et al. Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. **Journal of leukocytes and biology**, v. 83, p. 824–832, 2008.

De KEYSER, F.; BAETEN, D.; VAN DEN BOSCH, F.; KRUITHOF, E.; VERBRUGGEN, G.; MIELANTS, H.; VEYS, E.. Structure-modifying capacity of antitumour necrosis factor-alpha therapy in ankylosing spondylitis. **Drug**, 2004, v. 64, p. 2793- 2811.

DIAS, M.L. **Atividade antinociceptiva da Riparina IV: participação dos receptores TRPV1, TRPM8, receptores glutaminérgicos e do óxido nítrico.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Ceará. 2012.

DUBUISSON, D.; DENNIS, S. G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain**,v.4, p.1 61 -1 74, 1997.

EMING, S.A.; KRIEG, T.; DAVIDSON, J.M. Inflammation in Wound Repair: Molecular and Cellular Mechanisms. **Journal of Investigation Dermatology**, vol 127, p.514–525, 2007.

FALKENBERG, M.B.P., P. A. Epibatidina: uma breve revisão. **Latin american Journal Pharmacology**, Vol. 26, p.614-618, 2007.

FAVACHO, H.A.S. **Caracterização Fitoquímica e Avaliação da Atividade AntiInflamatória e Antinociceptiva do Óleo Fixo de *Euterpe Oleracea* Mart.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Brasil, 79 pp, 2009.

Fortes, R. S. Efeitos Anti-inflamatório e Antinociceptivo da Riparina B em Camundongos. 2015.

FERREIRA, J.; CAMPOS, M.M.; ARAUJO, R.; BADER, M.; PESQUERO, J.B.; CALIXTO, J.B. The use of kinin B1 and B2 receptor knockout mice and selective antagonists to characterize the nociceptive responses caused by kinins at the spinal level. **Neuropharmacology**, vol. 43, p. 1188-1197, 2002.

FERREIRA, K.A.S.L. **Dor e qualidade de vida relacionada a saúde de pacientes com câncer: influência das citocinas pro-inflamatória TNF- α , IL-6, IL-8 e IL1- β .**

Tese de doutorado apresentada à Escola de Enfermagem da Universidade de São Paulo, 2008.

FINKEL, T; HOLBROOK, N.J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing.

Nature. v. 408, p. 239-247, 2000.

FISCHER, L.G.; SANTOS, D.; SERAFIN, C.; MALHEIROS, A.; DELLE MONACHE, F.; DELLE MONACHE, G.; CECHINEL, V.F.; SOUZA, M.M. Further antinociceptive properties of extracts and phenolic compounds from *Plinia glomerata* (Myrtaceae) leaves. **Biology & Pharmacology Bull**, v.32, p.235-239, 2008.

FLESchIN, S.; FLESchIN, M.; NITA, S.; PAVEL, E.; MAGEARU, V. Free radicals mediated protein oxidation in biochemistry. **Roumain Biotechnology Lett**. v. 5, p. 479-495, 2000.

GELLER, M.; KRYMCHANTOWSKI, A. V.; STEINBRUCH, M. et al. Utilização do diclofenaco na prática clínica: revisão das evidências terapêuticas e ações farmacológicas. **Revista Brasileira Clínica Médica**, v. 10, n. 1, p. 29-38, 2012.

GENTRY, A. Changes in plant community diversity and floristic composition on environmental and geographical gradients. **Annals of the Mis. Botanic Garden**, 69: 557-593, 1988.

GOSSYE, V.; ELEWAUT, D.; BOUGARNE, N.; BRACKE, D.; CALENBERGH, S. V.; HAEGEMAN, G.; DE BOSSCHER, K. Differential Mechanism of NF- κ B Inhibition by Two Glucocorticoid Receptor Modulators in Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts. **Arthritis and Rheumatism**, vol 60, nº 11, p.3241-3250, 2009.

Fortes, R. S. Efeitos Anti-inflamatório e Antinociceptivo da Riparina B em Camundongos. 2015.

GUIMARÃES, A.G.; OLIVEIRA, G.F.; MELO, M.S.; CAVALCANTI, S.C.; ANTONIOLLI, A.R.; BONJARDIM, L.R.; SILVA, F.A.; SANTOS, J.P.A.; ROCHA, R.F.; MOREIRA, J.F.C.; ARAÚJO, A.A.; GELAIN, D.P.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J. Bioassay-guided evaluation of antioxidante and antinociceptive activities of carvacrol. **Basic and Clinic Pharmacology and toxicology**. Vol. 107, p. 949-957, 2010.

GRELLNER, W. Time-dependent himunohistochemical detection of pro-inflammatory cytokines (IL-1, IL-6,TNF) in human skin wounds. **Forensic Science Interaction**. Vol. 130, p.90-96, 2002.

GUPTA, M.; MAZZUDAR, U.K.; SIVAKUMAR, T.; VAMSI, M.L.; KARKI, S.S.; SAMBATHKUMAR, R.; MANIKANDAN, L. Evaluation of anti-inflammatory activity of chloroform extract of Bryonia acinosa in experimental animals models. **Biology Pharmacology Bull**; Vol.26, p. 1342-1344, 2003.

GUTIERREZ, S.J.C. **Síntese do Bowdenol, um Dihidrobenzofuranoide Isolado de Bowdichia Virgilioides e Preparação de Derivados da Riparina Isolada de Aniba Riparia com Potencial Atividade Biológica**. Ph.D. Thesis, UFPB/CCS: João Pessoa, Brazil, 2007.

HALLIWELL, B.; WHITEMAN, M. Measuring reactive species and oxidative damage in vivo and in cell culture: how should you do it and what do the results mean? **British Journal of Pharmacology**. v. 142, n. 2, p. 231-255, 2004.

HARRIS, S.G., PADILLA, J., KOUMAS, L., RAY, D., PHIPPS, R.P. Prostaglandins as modulators of immunity. **Therapeutic. Immunology**, 3: 144–150, 2002.

HENRIQUES, M.G.M.O.; SILVA, P.M.R.; MARTINS, M.A.; FLORES, C.A.; CUNHA, F.Q.; FILHO, J.A.; CORDEIRO, R.S.B. Mouse paw edema. A new model for inflammation? **Brazilian Journal of Medicine and Biology Resolution**. Vol. 20, p.243-249, 1987.

HIRATA, L.L.; SATO, M.E.O.; SANTOS, C.A.M. Radicais livres e o envelhecimento cutâneo. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 23, p.418, 2004.

HOFER, O.; GREGER, H.; ROBIEN, W.; WERNER, A. ¹³C NMR and lanthanide induced shifts of naturally occurring alkamides with cyclic amides moieties: amides from *Achillea falcata*. **Tetrahed. Letter**, Vol. 42, p. 2707 – 2716, 1986.

Fortes, R. S. Efeitos Anti-inflamatório e Antinociceptivo da Riparina B em Camundongos. 2015.

HUNSKAAR, S., HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v. 25, 103-114, 1987.

IASP **Pain Terminology**. <http://www.iasp-Definitions&Template=/CM/HTMLDisplay.cfm&ContentID=1728#Pain> (Acesso em 20 de março de 2015).

IUCN. 2009. IUCN **Red list of threatened species**. Disponível em:<<http://www.biodiversitas.org.br/flraBr/iucn.pdf>> Acesso em 15 de dezembro 2014.

JOSSE, C. *et al*. Importance of post-transcriptional regulation of chemokine genes by oxidative stress. **Biochemical Journal**, 2001, 360, 321 –333, 2001.

JUTEL, M. *et al*. Histamine, histamine receptors and their role in immune pathology. **Clinical Experimental Allergy**, v. 39, p.1786-800, 2009.

JUFFERMANS, N.P.; FLORQUIN S.; CAMOGLIO, L.; VERBON A.; KOLK, A.H., SPEELMAN P. V.; VAN DEVENTER, S.J.; VAN DER POLL, T.. Interleukin-1 signaling is essential for host defense during murine pulmonary tuberculosis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 182, p. 902-908, 2000.

JULIUS, D. E BASBAUM, A. I. "**Molecular mechanisms of nociception.**" *Nature*, 2001, 413(6852): 203-10.

KAKKAR, A.K.; LEFER, D.J. Leucocyte and endothelial adhesion molecule studies in knockout mice. *Curren. Opinion Pharmacology*, vol.4, P. 154-158, 2004.

KIDD, B.L.EL.A. URBAN.. Mechanisms of inflammatory pain. **Brazilian Journal Anaesthesiology**, 87(1): 3-11, 2001.

KOENH, F.E.; CARTER, G.T. The envolving role of natural products in drug discovery. **Natural Reviews**. Vol.4, p.206-220, 2005.

KONTINEN, V. K.; STANFA, L. C.; BASU, A.; DICKENSON, A. H. Electrophysiological evidence for increased endogenous GABAergic but not glycinergic inhibitory tone in the rat spinal nerve ligation model of neuropathy. **Anesthesiology**, v. 94, p. 333-339, 2001.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; DE BEER, E. J. Acetic acid for analgesic screening. **Fed. Proc.**, v. 18, p. 412-416, 1959.

KUMAR, A.; ILAVARASAN, R.; JAYACHANDRAN, T.; DECARAMAN, M.; ARAVINDHAN, P. Phytochemicals Investigation on a Tropical Plant, *Syzygium cumini* from Kattuppalayam, Erode District, Tamil Nadu, South India. **Pakistan Journal of Nutrition** 8 (1): 83-85, 2009.

KUMAR, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T.; **Patologia estrutural e funcional**, 7ª Edição, Rio de Janeiro, Editora: Guanabara Koogan, 2006.

LEITE C. P. Avaliação dos efeitos farmacológicos de (o-metil)-n-2-hidroxi-benzoil tiramina (riparina II) de *Aniba riparia* (nees) mez (lauraceae) em modelos comportamentais de ansiedade e depressão em camundongos. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Ceará: Fortaleza, CE, 2008.

MAI, C.M.G. **Avaliação do potencial antinociceptivo de novos 3-metil-1h-1-pirazol metil esterres 5-substituídos em camundongos**. Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Bioquímica Toxicológica da Universidade Federal de Santa Maria, 2007.

MALDONADO, O.S.; Lucas, R.; COMELLES, F.; GONZALEZ, M.J.; PARRA, J.L.; MEDINA, I; MORALES, J.C. Synthesis and characterization of phenolic antioxidants with surfactant properties: glucosyl- and glucuronosyl alkyl gallates. **Tetrahedron**. v. 67, p. 7268- 7279, 2011.

MARIOTTO, S.; MENEGAZZI, M.; SUZUKI, H. **Biochemical aspects of nitric oxide**. **Curr. Pharm. Des.**, v.10, p.1627–1645, 2004.

MARQUES, C. A. Importância econômica da família Lauraceae. **Lindl. Flore. e Amb.**, v.8, n.1, p. 195-206, jan./dez., 2001.

MATA, R.; MORALES, J.; PÉREZ, O.; RIVERO-CRUZ, I.; ACEVEDO, R.; ENRIQUES-MENDONZA, I.; BYE, R.; FRANZBLAU, S.; TIMMERMAN, B.J.; **Natural Products**, Vol. 67, p. 19-61, 2004.

MELO, C.T.V. **Estudo dos efeitos farmacológicos de O-metil-n-2,6-hidroxi-benzoil-tiramina (riparina III) de *Aniba riparia* (Ness) Mez Lauraceae em**

modelos comportamentais de ansiedade e depressão em camundongos.

Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Ceará, 2006.

MELO, C.T.V.; MONTEIRO, A.P.; LEITE, C.P.; ARAÚJO, F.L.O.; LIMA, V.T.M.; BARBOSA-FILHO, J.M.; FONTELES, M.M.F.; VASCONCELOS, S.M.M.; VIANA, G.S.B.; SOUSA, F.C.F. Anxiolytic-like effects of (O-methyl)-N-benzoyl tyramine (riparin III) from *Aniba riparia* (Nees) Mez (Lauraceae) in mice. **Biol. Pharm Bull**, v. 29, p.451-454, 2006.

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

MEDEIROS, R. CABRINI, D. A.; FERREIRA, J.; FERNANDES, E. S.; MORI, M. A.; PESQUERO, J. B.; BADER, M.; AVELLAR, M. C.; CAMPOS, M. M.; CALIXTO, J. B. Bradykinin B1 receptor expression induced by tissue damage in the rat portal vein. A critical role for mitogen-activated protein kinase and nuclear factor- κ B signaling pathways. **Circ. Resear.**, v. 94, p. 1375-1382, 2004.

MENEZES-DE-LIMA, O., JR., KASSUYA, C. A., NASCIMENTO, A. F., HENRIQUES, M. G. & CALIXTO, J. B. Lipoxin A4 inhibits acute edema in mice: implications for the antiedematogenic mechanism induced by aspirin. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**, v.80, p.123-35, 2006.

MONTEIRO, E. C. A.; TRINDADE, J. M. de F.; DUARTE, A. L.B. P. et al. Os antiinflamatórios não esteroidais (AINEs). **Revista temas de reumatologia clínica**, v. 9, n. 2, p. 53-63, 2008.

MORRIS, C. J. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. **Methods Moleculer Biology**, v.225, p.115-121, 2003.

MORROW JD, ROBERTS II J. **Autacóides derivados de lipídeos**. In: Hardman, JG, Limbird LE. As Bases Farmacológicas da Terapêutica. 10ª.ed., São Paulo: Mc Graw Hill, 2003.p. 503-515.

MUELLER M, HOBIGER S & JUNGBAUER A. Anti-inflammatory activity of extracts from fruits, herbs and spices. **Food Chemistry**, v.122, p. 987–996, 2010.

Fortes, R. S. Efeitos Anti-inflamatório e Antinociceptivo da Riparina B em Camundongos. 2015.

NANTEL, F; DENIS, D.; GORDON, R.; NORTHEY, A.; CIRINI, M.; METTERS, K.M.; CHAN, C.C. Distribution and regulation of cyclooxygenase-2 in carrageenan-induced inflammation. **British Journal Pharmacology**. Vol. 128, p.853-859, 1999.

NATHAN, C. Points of control in inflammation. **Natural – insight Revist Article.**, vol. 420 (1 9/26), p. 846 – 852, 2002.

NEUMANN, D.; BEERMANN, S.; SEIFERT, R. Does the Histamine H 4 Receptor Have a Pro- or Anti-Inflammatory Role in Murine Bronchial Asthma? **Pharmacology**, vol 85, p.217– 223, 2010.

NUNES, G. B. L.; POLICARPO, P. R.; COSTA, L. M.; DA SILVA, T G.; MILITÃO, C, G. G.; CÂMARA, C. A.; BARBOSA FILHO, J. M.; GUTIERREZ, S. J. C.; ISLAM, M. T.; DE FREITAS, R. M. In vitro antioxidant and citotoxic activity of some synthetic riparin-derived compounds. **Molecules**. 2014, 19, 4595-4607.

OHTSU, H. Progress in Allergy Signal Research on Mast Cells: The Role of Histamine in Immunological and Cardiovascular Disease and the TransportingSystem of Histamine in the Cell. **Jo. of Pharmacologic. Sci.**, v.106, p. 347-353, 2008.

OLIVEIRA FS, SOUSA DP, ALMEIDA RN. Antinociceptive effect of hydroxydihydrocarvone. **Biol Pharm Bull** v.3.p. 588 – 591, 2008.

OLIVEIRA, I.C.M. **Efeitos centrais da Riparina I de *Aniba riparina* (Ness) Mez Lauraceae em modelos comportamentais de ansiedade, depressão, sono e convulsão em camundongos.** Dissertação de Mestrado, 2012.

ONG CKS, TAN JM. Preoperative intravenous tramadol versus ketorolac for preventing postoperative pain after third molar surgery. **International Journal Oral and Maxillofacial Surgery**.Vol. 33: 274-8, 2004.

PANIZZA, S.T. Fitoterapia. Disponível em <<http://www.fitoterapia.com.br/fitoterapia>> acesso em 23 de fevereiro de 2004.

PARSONS, M. E.; GANELLIN, C. R. Histamine and its receptors. **British Journal of Pharmacology**, vol. 147, P. 127-135, 2006.

PAO, G. F.; FERNANDES, E.; CAMPO, M. M.; ARAUJO, J. G. C.; PESQUERO, J. L.; SOUZA, G. E. P.; AVELLAR, M. C. W.; TEIXEIRA, M. M.; CALIXTO, J. B. Kinin B1 receptor up-regulation after lipopolysaccharide administration: Role of proinflammatory cytokines and neutrophil influx. **Journal of Immunology**, vol. 172, p. 1839-1847, 2004.

PASSOS G. F., FERNANDES E. S., CUNHA F. M., FERREIRA J., PIANOWSKI L. F., CAMPOSA, M. M., CALIXTO J. B. **Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea***. Journal of Ethnopharmacology, 2007, v. 110, p. 330- 332.

PASTORE, A. et al. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. **Clinica Chimica Acta**, v.333, p. 19-39, 2003..

PERRICONE, C.; De CAROLIS, C.; PERRICONE, R. Glutathione: a key player in autoimmunity. **Autoimmune Revist**, v.8, p.697-701, 2009.

PESQUERO, J.B.; ARAUJO, R.C.; HEPPENSTALL, P.A.; STUCKY, C.L.; SILVA, J.A.; WALTHER, T.; OLIVEIRA, S.M.; PESQUERO, J.L.; PAIVA, A.C.M.; CALIXTO, J.B.; LEWIN, G.R.; BADER, M. Hypoalgesia and altered inflammatory responses in mice lacking kinin B1 receptors. **Product Natural Academic Science** vol. 97, p. 8140-8145, 2000.

PHUNG, D.T. **Regulation of prostanoid effects in whole blood: immediateearly anti-inflammatory effects of prostaglandin E2**. Dissertação (Mestrado) - University of Tromsø, Tromsø, Norway, 94 pp, 2008.

PINTO, H.S.A. et al. Antinociceptive effect of triterpenoid alpha,beta-amyrin in rats on orofacial pain induced by formalin and capsaicin. **Phytomedicine**, v.15, N.08, p. 630-634, 2008.

POBER, J. S.; SESSA, W. C. Evolving functions of endothelial cells in inflammation. **Nature review Immunology**, vol. 7, n. 10, p. 803-15, 2007.

Fortes, R. S. Efeitos Anti-inflamatório e Antinociceptivo da Riparina B em Camundongos. 2015.

POSADAS, I.; BUCCI, M.; ROVIEZZO, F.; ROSSI, A.; PARENTE, L.; SAUTEBIN, L.; CIRINO, G. Carrageenan induced mouse paw edema is biphasic age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. **British Journal Pharmacology**. Vol. 142, p. 331-338, 2004.

QUINET, A.; ANDREATA, R.H.P. Lauraceae Jussieu na Reserva Ecológica de Macaé de Cima, município de Nova Friburgo, Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia**, 53(82): 59-121, 2002.

QUINET, A., BAITELLO, J.B., MORAES, P.L.R. DE, ALVES, F.M. & ASSIS, L. 2012. Lauraceae. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro**. Disponível em: <<http://flradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB008426>>. Acessado: 22 de outubro de 2012.

RATES, S.M.K.; BARROS, H.M.T. Modelos animais para a avaliação da dor: métodos para triagem de novos analgésicos. **Revista Brasileira de Farmacologia**, v.75, n.2, p.31– 34, 1994.

REED, T.T. Lipid peroxidation and neurodegenerative disease. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 51, 1302-1319, 2011.

RICCIOTTI E & FITZGERALD GA. Prostaglandins and Inflammation. **Arteriosclerosis Thrombosis Vasculare Biologic**, v.31, p.986-1000, 2011.

ROCHA, A.C.; FERNANDES, E.S.; PASSOS, G.F.; CALIXTO, J.B.; CAMPOS, M.M. Assessment of TNF α contribution to the functional up-regulation of kinin B1 receptors in the mouse paw after treatment with LPS. **Intern. Immunopharmacol.**, vol. 5, p. 1593-1600, 2005.

RODRIGUES, L.C.C. **Avaliação da atividade antiinflamatória do extrato hidroalcoólico do caroço do abacate sobre a peritonite induzida pela carragenina em ratos**. 2008. 37 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia)- Universidade Vale do Rio Verde, Três Corações, 2008

ROHWER, J.G. Lauraceae. In: KUBITZKI, K., & BITTRICH, V. ROHWER, J.G. (Eds.). The Families and Genera of Vascular Plants. v.2. **Berlin: Spring-Verlag**. p. 366-391, 1993.

Fortes, R. S. Efeitos Anti-inflamatório e Antinociceptivo da Riparina B em Camundongos. 2015.

ROMAN RM, WENDLAND AE, POLANCZYK CA. Myeloperoxidase and coronary arterial disease: from research to clinical practice. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v.91, p.11-9, 2008.

ROOME T. **Anti-inflammatory activity of Aegiceras corniculatum and its mechanism of action using in vivo and in vitro systems.** Dissertação (Doutoramento) - University of Karachi, Pakistan. 364 pp, 2007.

SAEED MK, DENG Y, DAI R, LI W, YU Y & IQBAL Z. Appraisal of antinociceptive and anti-inflammatory potential of extract and fractions from the leaves of *Torreya grandis* Fort Ex. Lindl. **Jurnal of Ethnopharmacology**, v.127, p. 414–418, 2010.

SARZI-PUTTINIA, P.; ATZENIA, F.; SHOENFELDB, Y.; FERRACCIOLIC, G.. **TNF- α , rheumatoid arthritis, and heart failure: A rheumatological dilemma.** Autoimmunity Reviews, v. 4, p. 153-161, 2005.

SEDLAK, J.; LINDSAY, R.H. Estimation of total, protein-bound, an nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical biochemistry**, v: 25, p.192-205, 1968.

SEIDL, P.R. Pharmaceuticals from natural products: current trends. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 74, n. 1, p. 145–50, 2002.

SEIXAS, S.R.S. **Preparação de derivados benzoiltiramínicos e sua atividade cardiodepressora.** Dissertação de mestrado; 1996

SERHAN, C.N.; WARD, P.A.; GILROY, D.W. Fundamentals of Inflammation. **Cambridge University Press**, p.473, 2010.

SERHAN, N.C.; SAVIL, J. Resolution of inflammation: the beginning programs the end. **Natur. Immunol.**, v.6, n.12, p.1191-1197, 2005.

SHERWOOD, E. R. & TOLIVER-KINSKY, T. Mechanisms of the inflammatory response. **Best. Practical Reserach Clinical Anaesthesiology**, vol. 18, p. 385-405, 2004.

SINGH, S.K.; PRASAD, A.K.; OLSEN, C.E.; JHA, A.; JAIN, S.C.; PARMAN, V.S.; WENGEL. **Journal Phytochemistry**, Vol. 43, p.1355, 1993.

Fortes, R. S. Efeitos Anti-inflamatório e Antinociceptivo da Riparina B em Camundongos. 2015.

SILVA, C.M.; CARVALHO, J.C.T. Gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe). In: CARVALHO, J. C., T. **Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. Ribeirão Preto, SP: Tecmedd, p. 323 – 325. 2004.

SILVA, G. R. da; MEYER, T. N.; PEREIRA, J. B. B. Efeitos do extrato do caroço do abacate sobre a inflamação induzida na pata de ratos pela carragenina **Conexão ciência.: revista científica**, UNIFOR-MG, Formiga, v. 9, n. 1, p. 39-58, jan./jun. 2014.

SILVA, K.O. **Avaliação das atividades antimicrobiana, aderência, antioxidante, anti-inflamatória e antinociceptiva de *anadenanthera macrocarpa* (benth) brenan**. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal da Bahia. 2011.

SILVA, M.G. et al. **Fitoterápicos guia do profissional de saúde**. João Pessoa, Secretaria de Saúde do Estado da Paraíba, 2002.

SILVA, M. R.; LEME, J. G. Chemical mediators of the acute inflammatory reaction. *In*: INTERNATIONAL series of monographs in pure and applied biology, modern trends in physiological sciences. **New York: Academic Press**, v. 37, p. 1-47, 2006.

SOEHNLEIN, O., LINDBOM, L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. **Natur. Rev. Immunol.**, v.10, p. 427-439, 2010.

SOUSA, F.C.F.; LEITE, C.P.; MELO, C.T.V.; ARAÚJO, F.L.O.; GUTIERREZ, S.J.C.; BARBOSA-FILHO, J.M.; FONTENELES, M.M.F.; VASCONCELOS, S.M.M.; VIANA, G.S.B. Evaluation of effects of N(2-hydroxybenzoyl)tiramine (Riparin II) from *Aniba riparia* (Ness) Mez Lauraceae in Anxiety models em mice. **Pharmacology Biochemical Be**. Vol. 78, p. 27-33, 2004.

SOUSA, F.C.F.; LEITE, C.P.; MELO, C.T.V.; ARAÚJO, F.L.O.; GUTIERREZ, S.J.C.; BARBOSA-FILHO, J.M.; FONTENELES, M.M.F.; VASCONCELOS, S.M.M.; VIANA, G.S.B. Evaluation of effects of N(2-hydroxybenzoyl)tiramine (Riparin II) from *Aniba riparia* (Ness) Mez Lauraceae in Anxiety models em mice. **Biology Pharmacology Bull**, Vol 30, p.1212-1216, 2007

Fortes, R. S. Efeitos Anti-inflamatório e Antinociceptivo da Riparina B em Camundongos. 2015.

SULAIMAN, M. R.; HUSSAIN, M. K.; ZAKARIA, Z. A.; SOMCHIT, M. N.; MOIN, S.; MOHAMAD, A. S.; ISRAF, D. A. Evaluation of the antinociceptive activity of *Ficus deltoidea* aqueous extract. **Fitoterapia**, v. 79, p. 557–56, 2008.

SPIELMANN, S.; KERNER, T.; AHLERS, O.; KEH, D.; GERLACH, M.; GERLACH, H.. Early detection of increased tumour necrosis factor alpha (TNFa) and soluble TNF receptor protein plasma levels after trauma reveals associations with the clinical course. **Acta Anaesthesiologica Scandinavica**, v. 45. p. 364-370, 2001.

THOMAS, G.; BRANCO, U. J .V .C.; BARBOSA-FILHO, J. M.; BACHELET, M.; VARGAFTIG, B. B. Studies on the mechanism of spasmolytic activity of (*O*-Methyl)-*N*-(2,6-Dihydroxybenzoyl)-tyramine, a constituent of *Aniba riparia* (Ness) Mez. (Lauraceae), in rat uterus, rabbit aorta and guinea-pig alveolar leucocytes. **Journal of Pharmacology**, v. 46, p. 103-107, 1994.

TJOLSEN, A.; BERGE, O.; HUNSKAAR, S.; ROSLAND, J. H.; HOLE, K. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, v.51, p.5-17, 1992.

TORRE-AMIONE, G.. Immune activation in chronic heart failure. **American Journal of Cardiology**, v. 95, p. 3C-8C, 2005.

TORRES, J.M.; CHAVEZ, A.G.; Secamidas en plantas: distribución e importância. **Avance y perspective**. Vol. 20, p. 377-387, 2001.

TRACEY, K. J. The inflammatory reflex. **Nature– insight review articles**, v.420 (1 9/26), p. 852 – 859, 2002.

UCHIYAMA, M.; MIHARA, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. **Analisis Biochemical**., v.86, n.1 -2, p.271 -278, 1978.

U.F.U. UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA. **História da Fitoterapia**. Disponível em <http://www.pet.famed.ufr.br/fitoterapia/historico.htm> acesso em 16 de dezembro de 2014.

VAN DER WERFF, H.; RICHTER, H.G. Toward an improved classification of Lauraceae. **Annals Mis. Botanic Garden**, 83: 409- 418, 1996.

VERDI, L.G.; BRIGHENTE, I.M.C.; PIZZOLATTI, M.G. Gênero *Baccharis* (ASTERACEAE): Aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química Nova**, v. 28 (1), p. 85-94, 2005.

VERRI, W. A. Jr.; CUNHA, T. M., et al. "Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development?" **Pharmacology Therapeutic**, v.112, p.116-38, 2006.

WAGNER, J.G.; ROTH, R.A. Neutrophil migrations mechanisms with an emphasis on the pulmonary vasculature. **Pharmacology Review** Vol. 52, p.349-374, 2000.

WANG, M.-W.; HAO, X.; CHEN, K. Biological screening of natural products and drug innovation in China. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 362, p.1093–1105, 2007.

WANNAMACHER, L.; FERREIRA, M.B.C. **Princípios gerais no tratamento da inflamação**. In: FUCHS, F.D.; WANNAMACHER, L.; FERREIRA, M.B.C. *Farmacologia Clínica*, 3ª ed. Guanabara Coogan, p.294-295, 2004.

WARD, P.A; The dark side of C5A in sepsis. **Natur. Revi. Immunol.**, vol.4, p. 133-142, 2004.

WENG, H. R.; LEE, J. I.; LENZ, F. A.; SCHWARTZ, A.; VIERCK, C.; ROWLAND, L.; DOUGHERTY, P. M. Functional plasticity in primate somatosensory thalamus following chronic lesion of the ventral lateral spinal cord. **Neuroscience**, 2000, v. 101, p. 393-401, 2000.

WERKMAN C, et al. Aplicações terapêuticas da *Punica granatum* L. (romã). **Revista Brasileira de Medicina**, v. 10, p.104-111, 2008.

WILLOUGHBY, D.A. In vivo models of inflammation. **Methods Molecular Biology**, Vol.225, p.109-113, 2003.

WOOLF, C. J.; SALTER, M. W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. **Science**, v. 288, p. 1765-1768, 2000.

YEDGAR, S.; KRIMSKY, M.; COHEN, Y.; FLOWER, R. Treatment of inflammatory diseases by aselective eicosanoid inhibiton: a double-edged sword? **Pharmacological Science**, vol.28, n.9, p.459-464, 2007.

YU, B.; SHAO, Y.; ZHANG, J.; DONG, X.L.; LIU, W.L.; YANG, H.; LIU, L.; LI, M.H.; YUE, C.F.; FANG, Z.Y.; ZHANG, C.; HU, X.P.; CHEN, B.C.; WU, Q.; CHEN, Y,W.; ZHANG, W.; WAN, J.; Pholimorfisms in human histamine receptor H4 gene are associated with atopic dermatitis. **British Journal of Dermatology**, vol. 162, P1038-1043, 2010.

YU, L. Opioids in Reference Module in Biomedical Sciences. **Biomedical Sciences**, 2014.

ZAKARIA, Z.A.; ABDUL, Z.D.G.; RADEN, R.N.M.N; GOPALAN, H.K.; SULAIMAN,M.R.; ABDULLAH, F.C. Antinociceptive and antiinflamatory activities of Dicranopteris linearis leaves clhoroform extract in experimental animals. **Yakugaku Zasshi**, v.126, p.1197- 1203, 2006.

ZAFALON, L.F.; FILHO, N.A.; OLIVEIRA, J.V.; REZENDE, F.D. Mastite subclínica causada por *Staphylococcus aureus*: custo-benefício da antibioticoterapia de vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, p.577-585, 2007.

ZHANG, B.; LI, B. J. B.; ZHANG, D. M.; DING,Y.; D. U, G. H. **Analgesic and antiinflamatory activities of a fraction rich in Gaultherin isolated from *Gaultheria yunnanensis* (Franch.) Rehder**. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2007, v.30, n.3, p.465-469.

**Anexo 1 – Comprovante de submissão e aprovação na Comissão de Ética no
Uso de Animais**



**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



Teresina, 24 de Outubro de 2014.

Ilmo.

Prof. Dr. JAND VENES ROLIM MEDEIROS
Departamento: Biotecnologia- CMRV_ Parnaíba /UFPI

Senhor Pesquisador,

Em reunião na presente data (24 de Outubro de 2014), a Comissão de Ética e Experimentação no Uso de Animais em Pesquisa, da Universidade Federal do Piauí, analisou e **Aprovou** no que diz respeito aos aspectos de natureza da ética em experimentação animal, sob o número **068/14**, o projeto de pesquisa intitulado **"Prospecção farmacológica de moléculas biologicamente ativas extraídas de produtos naturais- ênfase no potencial terapêutico"**, sob a sua responsabilidade. Informamos que este projeto tem Período de Vigência de Dezembro/2014 à Dezembro/2020, e serão usados 340 Camundongos isogênicos (machos e fêmeas) e 320 Ratos isogênicos (machos e fêmeas). Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEEA/UFPI, o relatório final sobre a pesquisa, (Lei Procedimentos para o Uso Científico de Animais – Lei Nº 11.794, 8 de outubro de 2008).

Atenciosamente,



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

Anexo 2 – Comprovante de submissão de artigo ao *Inflammation***Subject: SUBMISSION OF NEW MANUSCRIPT FOR EVALUATION**

by André Luiz dos Reis Barbosa Dear editorial board of **Inflammation**, I am enclosing here with a manuscript entitled **“Riparin B, a synthetic compound analogue of Riparin, inhibits the systemic inflammatory response and oxidative stress in mice.”** by **Renata Fortes Santiago et al.**, submitted to **“Inflammation”** for possible evaluation.

With the submission of this manuscript I would like to undertake that the above mentioned manuscript has not been published elsewhere, accepted for publication elsewhere or under editorial review for publication elsewhere; and that my Institute's LAFEX – Laboratory of Experimental Physiopharmacology, Biotechnology and Biodiversity Center Research (BIOTEC), Federal University of Piauí-CMRV representative is fully aware of this submission. All co-authors have seen and agree with the contents of the manuscript and there is no financial interest to report.

In the manuscript we demonstrated that Riparin B can inhibit inflammatory pathways by modulating the formation of pathological signs of inflammation including: paw edema induced by several mediators; neutrophil migration; cytokine release; and hyperalgesia. Further, these effects seem to be dependent on the inhibition of free radicals in inflammatory events. These findings suggest that Riparin B represents an important pharmacological tool to promote tissue resistance against damage that occurs during an inflammatory condition. According our findings, we believe that this manuscript has drawn the attention of researchers and could be of interest to the readers of **Inflammation**. We hope that the editorial board will agree on the interest of this study. Sincerely yours, André Luiz dos R. Barbosa on behalf of the authors.

Author to whom correspondence should be addressed: André Luiz dos R. Barbosa.

Laboratory of Experimental Physiopharmacology, Biotechnology and Biodiversity Center Research (BIOTEC), Federal University of Piauí-CMRV, 64202-020, Parnaíba, Cover Letter PI, Brazil. E-mail: andreluiz@ufpi.edu.br (A.L.R.B.); Tel.: +55-86-99567821/ Fax: +55- 85-88072102.

