



**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CEILÂNDIA
CURSO DE FARMÁCIA**

MARIANE APARECIDA DA SILVA MARQUES

**CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL EFEITO ANALGÉSICO E/OU ANTI-
INFLAMATÓRIO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS DE *Eugenia
dysenterica* DC EM TESTE DE DOR DECLARADA EM RATOS**

BRASÍLIA, 2019

MARIANE APARECIDA DA SILVA MARQUES

**CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL EFEITO ANALGÉSICO E/OU
ANTINFLAMATÓRIO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS DE
EUGENIA DYSENTERICA DC SOBRE O MODELO DE DOR INFLAMATÓRIA E
TESTE DE DOR DECLARADA EM RATOS**

Monografia de Conclusão de Curso
apresentada como requisito parcial
para obtenção do grau de
Farmacêutico, na Universidade de
Brasília, Faculdade de Ceilândia.

Orientador (a): Prof^a Dr^a Mani Indiana Funez
Co-orientador (a): Prof. Dr^o Paulo Gustavo Barboni Dantas Nascimento

BRASÍLIA, 2019.

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

MM357c MARQUES, Mariana Aparecida da Silva
CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL EFEITO ANALGÉSICO E/OU
ANTINFLAMATÓRIO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS DE
EUGENIA DYSENTERICA DC SOBRE O MODELO DE DOR INFLAMATÓRIA E
TESTE DE DOR DECLARADA EM RATOS / Mariana Aparecida da
Silva MARQUES; orientador Mani Indiana FUNEZ; co
orientador Paulo Gustavo Barboni Dantas NASCIMENTO. --
Brasília, 2019.
41 p.

Monografia (Graduação - FARMÁCIA) -- Universidade de
Brasília, 2019.

1. Teste de Formalina;. 2. Dor;. 3. Eugenia dysenterica
DC;. I. FUNEZ, Mani Indiana , orient. II. NASCIMENTO, Paulo
Gustavo Barboni Dantas, co-orient. III. Título.

MARIANE APARECIDA DA SILVA MARQUES

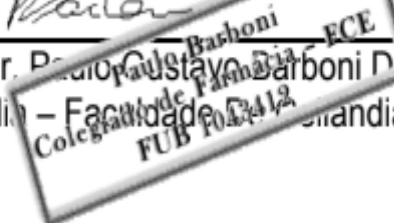
**CARACTERIZAÇÃO DO POTENCIAL EFEITO ANALGÉSICO E/OU ANTI-
INFLAMATÓRIO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DAS FOLHAS DE *Eugenia
dysenterica* DC EM TESTE DE DOR DECLARADA EM RATOS**

Mani Funez

Orientador (a): Prof^a Dra Mani Indiana Funez
(Universidade de Brasília – Faculdade De Ceilândia – UnB/ FCE)

Rafael

Co-Orientador (a) : Prof^o Dr. Rafael Gustavo Barboni Dantas Nascimento
(Universidade de Brasília – Faculdade De Ceilândia – UnB/ FCE)



Claire Nain Lunardi Gomes

Prof^a Dra Claire Nain Lunardi Gomes
(Universidade de Brasília – Faculdade De Ceilândia – UnB/ FCE)

Fabiane H. V. de Souza

Prof^a Dra Fabiane Hiratsuka Veiga de Souza
(Universidade de Brasília – Faculdade De Ceilândia – UnB/ FCE)

BRASÍLIA, 2019.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao programa CNPq/PIBIC pela concessão da bolsa de Iniciação Científica e do financiamento do projeto de pesquisa.

Agradeço imensamente à minha orientadora, Professora Dra. Mani Indiana Funez, que é um exemplo de profissional e ser humana, uma mulher inspiradora, a qual sempre me motivou a buscar conhecimento, que teve paciência e soube me ensinar tudo que aprendi na iniciação científica que além dos ensinamentos profissionais me ensinou a ser um ser humano melhor. Obrigada professora! Não há palavras que possam descrever o tamanho do agradecimento que tenho por ti.

À Thayná Gomes, Adriele Alves, Mirelle Falcão, Aryanne Albernaz e Ivanete Freitas, agradeço a cada uma de vocês pelo esforço e dedicação, companheirismo e paciência que colocam no trabalho. Obrigada! Vocês me ensinaram que um trabalho com uma equipe unida e companheira juntamente com o talento, a determinação e esforço de cada uma alcança o sucesso.

Agradeço a toda equipe que compõe a REDE PRÓ – CENTRO – OESTE de PESQUISA, em especial ao Professor Dr. Franscisco Neves, coordenador da rede.

Agradeço a Professora Dra. Pérola Magalhães, que nos forneceu o extrato e possibilitou o estudo.

Ao Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina da UnB, por ceder o espaço físico para a realização dos experimentos.

Aos médicos veterinários Ana Luiza Sarkis Vieira e Rafael Rocha de Andrade e ao técnico Herculy Lafite Silva Ribeiro pela boa vontade, simpatia e apoio técnico que prestaram e ainda prestam à pesquisa.

Agradeço aos meus pais, Anderson Marques e Josiane Marques, que apesar de todas as dificuldades, não mediram esforços para que eu chegasse até este momento de minha vida. Pai e mãe, obrigada por todos os momentos que os senhores dedicaram em favor a minha educação, pelo amor, pelo afeto, pela amizade e companheirismo. Saiba que nunca deixarei de vos amar

Agradeço aos meus irmãos, Wanderson Marques e Warley Marques, que em momentos de dúvida e indecisões souberam me ajudaram a tomar decisões, mostrando que companheirismo e irmandade nos fizeram ser 3 grandes pessoas unidas. Sei que sempre poderei contar com vocês.

Agradeço ao meu companheiro, Jefferson Rodrigues, juntamente com minha melhor amiga Layane Ramalho, que nos momentos de estresse e desespero sempre estiveram ao meu lado, me dando apoio e ajudando a levantar a minha autoestima. Eu amo vocês!

Agradeço a todos os meus amigos, em todos os convívios sociais, os quais me apoiaram e estiveram comigo em todos os momentos de dificuldades e de conquistas. Vocês são demais!

Ao Professor Dr. José Eduardo Pandóssio por todos os ensinamentos e curiosidades que me proporcionou; a experiência em ter um profissional igual a você como referência me faz a cada dia querer superar meus limites de conhecimento.

À Professora Dra. Fabiane Hiratsuka Veiga de Souza, que me proporcionou a experiência de ser tutora da disciplina de Farmacologia Básica, que me despertou o amor e interesse por essa área de pesquisa, sempre serei grata a ti por todos os ensinamentos que me proporcionou, agradeço-a também por ter aceitado participar da banca examinadora;

À Professora Dra. Claire Nain Lunardi Gomes, por aceitar participar da banca examinadora.

Ao Professor Dr. Paulo Gustavo Barboni Dantas Nascimento por ter aceito ser meu co-orientador, além de ter me aceitado no projeto de extensão Dor On Line, o qual me fez amadurecer criticamente e intelectualmente. Tenho uma grande admiração pela sua pessoa.

Por fim, gostaria de agradecer a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, por meio de apoio, revisões e sugestões.

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi caracterizar o potencial efeito do extrato hidroalcoólico das folhas de *Eugenia dysenterica* DC (EHFE) sobre o modelo de dor declarada em ratos. Foi realizada a padronização do modelo de dor inflamatória por indução química, com a administração intradérmica (id) de Formalina 1% juntamente com teste comportamental nociceptivo químico. Foi realizada a avaliação do possível efeito do EHFE sobre a metodologia padronizada. Na padronização do método foi estabelecido que a quantidade de *flinch*, ao longo do período de 45 minutos, foi considerada como indicativo de nocicepção. O teste padronizado de acordo com a literatura, caracterizando-se bifásico, sendo a fase inicial (fase 1) nociceptiva e a fase tardia (fase 2) inflamatória. O pré-tratamento com EHFED diminuiu significativamente ($p > 0,05$) a quantidade de *flinch* em ambas as fases do teste. Portanto, conclui-se que o modelo de dor declarada e o teste de comportamental, ambos por indução química, foi padronizado, e que o pré-tratamento com o EHFED previu o comportamento nociceptivo característico, sugerindo possíveis efeitos analgésico e/ou anti-inflamatório sobre este modelo, sendo necessária a avaliação deste tratamento em outros modelos de dor e inflamação para a diferenciação entre efeito analgésico e/ou anti-inflamatório.

Palavras Chaves: Teste de Formalina; Dor; *Eugenia dysenterica* DC;

ABSTRACT

The aim of this study was to characterize the potential effect of the hydroalcoholic extract of *Eugenia dysenterica* DC (EHFED) leaves on the declared model of pain in rats. The standardization of the inflammatory pain model was performed by chemical induction, with intradermal administration (id) of 1% Formalin along with chemical nociceptive behavioral test. The possible effect of the EHFED leaves on the standardized methodology was evaluated. In the standardization of the method, the amount of flinch was determined over the 45-minute period and was considered as indicative of nociception. The standardization of test was according to the literature, characterizing biphasic, being the initial phase (phase 1) nociceptive and the late phase (phase 2) inflammatory. Pre-treatment with the EHFED leaves significantly decreased ($p > 0.05$) the amount of flinch in both phases of the test. Therefore, it was concluded that the stated pain model and the behavioral test, both by chemical induction, were standardized, and that pre-treatment with the EHFED prevented the characteristic nociceptive behavior, suggesting possible analgesic and / or anti-inflammatory effect on this model. It is necessary to evaluate this treatment in other models of pain and inflammation for the differentiation between analgesic and / or anti-inflammatory effect.

Keywords: Formalin Test; Pain; *Eugenia dysenterica* DC;

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Relação Dor X Inflamação	11
Figura 2. Fármacos utilizados para o controle da dor e/ou inflamação	14
Figura 3. Fotos da ED que se encontram na Universidade de Brasília.....	16
Figura 4. Estruturas moleculares dos polifenóis encontrados na ED. A – D.....	16
Figura 5. Curva Temporal da Padronização do teste.....	27
Figura 6. Curva da padronização do teste nociceptivo por indução química.....	28
Figura 7. Curva Dose-Resposta e Temporal do efeito do EHFED.....	30
Figura 8. Curva Dose-Resposta Das Fase 1 e Fase 2 do efeito do EHFED (33, 100 e 300 mg/kg) sobre a resposta nociceptiva induzida por formalina.....	31

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

3 R's	Reduction, Refinement e Replacement
α	Alfa
AINE	Antiinflamatório Não – Esteroidal
ANOVA	Análise de Variância
ARE	Antioxidant Response Element
CEUA	Comitê de Ética no Uso Animal
CG	Carragenina
CONCEA	Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
ED	<i>Eugenia dysenterica</i> DC
EHFED	Extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Eugenia dysenterica</i> DC
EPM	Erro Padrão da Média
ERO	Espécie reativa de oxigênio
H	Horas
IASP	International Association for Study of Pain
Id	Intradérmica
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
KEAP1	Kelch Like ECH Associated Protein 1
Kg	Kilograma
mg	Miligrama
mL	Mililitro
NRF2	Nuclear Factor Erythroid 2-Related Factor 2
PGE2	Prostaglandina
TNF	Fator de Necrose Tumoral
UnB	Universidade de Brasília
UVA	Raio ultravioleta do tipo A
μ L	Microlitro

SUMÁRIO

01. INTRODUÇÃO	11
01.01. Revisão da literatura	13
01.02. Justificativa	22
02. OBJETIVOS.....	23
02.01. Objetivo geral	23
02.02. Objetivos específicos	23
02.02.01. Padronizar o modelo de dor inflamatória por indução química.....	23
02.02.02. Padronizar o teste comportamental nociceptivo químico (teste de form.....	23
02.02.03. Avaliar o possível efeito do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>eugenia dysenterica dc</i> sobre o modelo de dor inflamatória e teste comportamental nociceptivo induzido por estímulo químico.	23
03. METODOLOGIA.....	24
03.01. Animais.....	24
03.02. Fármacos utilizados.....	24
03.03. Modelo de dor inflamatória por indução química.....	25
03.04. Teste comportamental nociceptivo químico.....	25
03.05. Avaliação do possível efeito do EHFED.....	25
03.06. Análise estatística.....	25
04. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
04.01. Padronização do teste do modelo de dor inflamatória e teste de dor declarada em ratos.....	27
04.02. Avaliação do efeito do EHFED sobre o modelo de dor inflamatória e teste de dor declarada em ratos	29
05. CONCLUSÃO.....	34
REFERÊNCIA BIBLIOGRAFICA	35
ANEXOS.....	40

01.INTRODUÇÃO

A dor aguda exerce função protetora para os tecidos, entretanto, quando ocorre uma adaptação incorreta, desenvolvida por fatores fisiopatológicos; uma cronificação desta dor pode desenvolver-se (KUNER et al., 2017).

Apesar dos avanços substanciais em pesquisa e manejo da dor, milhões de pessoas continuam a sofrer por causa do seu controle inadequado. Dor aguda descontrolada não só leva a desconforto e sofrimento, mas, também pode ter consequências indesejáveis, tais como atraso na cicatrização, aumento do risco de morbidade, tempo de internação prolongado e o risco de desenvolver dor crônica (DEUMENS et al., 2013; BARRERAS – ESPINOZA et al., 2017).

A inflamação aguda é um importante processo de defesa fisiológica do organismo, onde há síntese e liberação de uma série de mediadores inflamatórios, que são importantes para um fenômeno que a acompanha, a sensibilização dos nociceptores (PASHMFOROSH et al., 2018; ADEYEMI et al., 2018). A sensibilização é definida como uma redução do limiar nociceptivo e aumento na magnitude de uma resposta à estimulação nociva (Gold & Gebhart, 2010; VILLARREAL et al., 2013).

Os nociceptores são um conjunto de neurônios periféricos que transmite a informação nociceptiva para o sistema nervoso central (Gold & Gebhart, 2010).

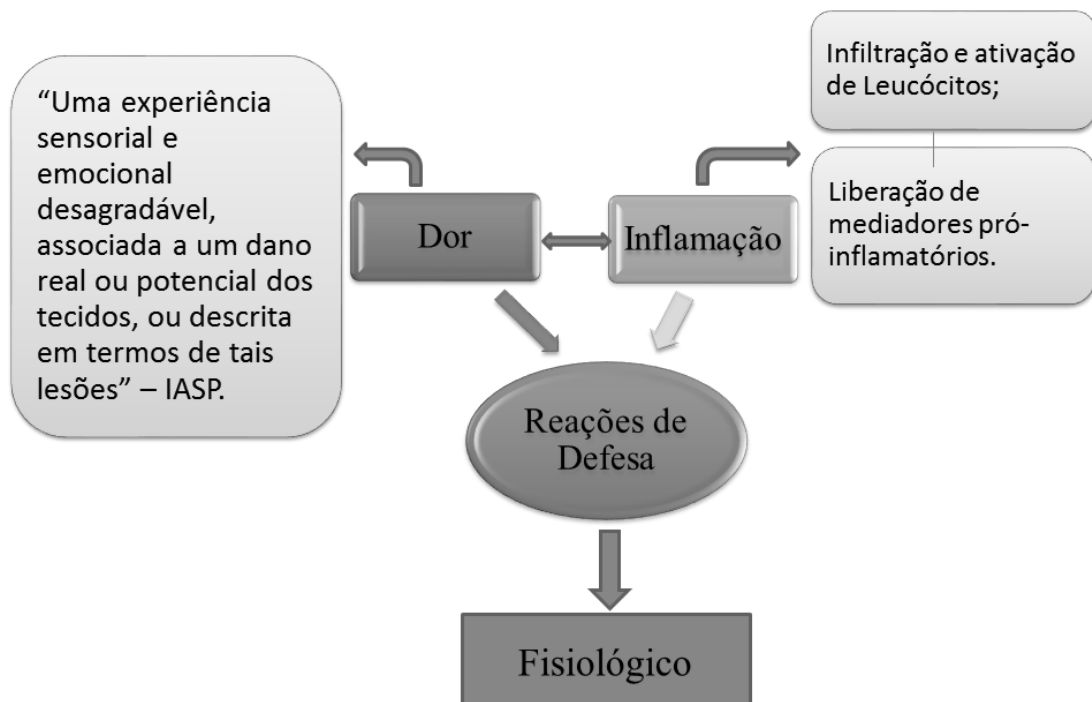


Figura 1. Relação Dor X Inflamação. Fonte: próprio autor.

No entanto, a inflamação aguda com resolução ineficaz pode contribuir para a persistência do quadro doloroso, já que as alterações plásticas nos neurônios nociceptivos e a sua sensibilização, poderão permanecer, independentemente da resolução da lesão inicial (PASHMFOROSH et al., 2018; ADEYEMI et al., 2018; BERTOLDI et al., 2019).

Moléculas que têm demonstrado um importante papel no processamento para o desenvolvimento da dor inflamatória aguda, em nível central e periférico, são as espécies reativas de oxigênio (ERO's) (FERREIRA et al., 2018), que são moléculas altamente reativas que possuem meia-vida curta e contribuem para perpetuar doenças inflamatórias resultando em ineficácia terapêutica e progressão da patologia inicial (BERTOLDI et al., 2018; HASSLER et al., 2014; FERREIRA et al., 2018), consideradas importantes sinalizadoras intracelulares e amplificadoras da resposta inflamatória (MITTAL et al., 2014).

A resposta do organismo ao estresse oxidativo se dá por vários mecanismos, destacando-se a sinalização KEAP1/NRF2/ARE (Kelch-like ECH-associated protein 1 (Keap1)-nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) elementos da resposta oxidativa), sistema de sinalização que parece reduzir a intensidade da inflamação aguda e impede a transformação das condições patológicas agudas em doenças crônicas (MA., 2013). Assim, a modulação dessa via tem se tornado um alvo interessante para o tratamento de diversas doenças, como câncer e doenças neurodegenerativas, onde também há atuação das ERO (AHMED et al., 2017). Mecanismos que apresentam um potencial antioxidante são consideradas grande investimento para este tipo de estudo (VELOSO, 2016).

Muitos moduladores desta via são tipicamente metabólitos secundários de plantas e fungos, tais como os derivados do ácido cinâmico, cumarinas, chalconas, flavonóides e terpenóides, entre outros, sendo a bioprospecção de extratos de plantas e fungos, com potencial ação antioxidante, um fornecedor de uma rica fonte de substâncias com potencial atividade na via KEAP1/NRF2/ARE (LI et al., 2018).

O bioma do Cerrado é composto por uma variedade de plantas que são utilizadas pela população por possuírem efeitos benéficos à saúde, empiricamente, tanto na alimentação quanto para fins de cura de enfermidades (SILVA et al., 2015).

São consideradas, portanto, plantas que necessitam de estudos mais aprofundados com o objetivo de identificação das principais substâncias existentes, para associar aos efeitos gerados quando consumidas, podendo comprovar assim

sua real atividade farmacológica, desempenhando papel significativo na produção de compostos bioativos (MALHEIROS et al., 2016).

Entre as espécies importantes existentes neste bioma, destaca-se a *Eugenia dysenterica* DC (ED), popularmente denominada Cagaita, utilizada para alimentação e fins terapêuticos pela população da região Centro - Oeste (MALHEIROS et al., 2016).

A ED produz um fruto, a Cagaita, que é considerado um alimento altamente difundido por todo o bioma Cerrado. A planta, em sua totalidade, possui diversos compostos, tais como: fenóis, flavonóides, taninos, saponinas e terpenos (COUTO et al., 2009; ROESLER et al., 2007) e tem sido considerada, devido a dados publicados, relevante quanto a possíveis efeitos anti-inflamatórios, analgésicos e antioxidantes (MALHEIROS et al., 2016).

01.01. Revisão da literatura

A inflamação associada a dor é o principal conjunto de sintomas comum de muitas doenças, considerados sintomas inespecíficos para diagnóstico (PASHMFOROSH et al., 2018), consideradas apenas como reações de defesa dos sistemas vivos em resposta a qualquer fator que possa prejudicar os processos fisiológicos do organismo (MANDEGARY et al., 2012; KARIM et al., 2019).

A inflamação é uma das principais causas de morbidade em toda o mundo, podendo implicar na progressão de vários distúrbios associados, tais como inflamação cutânea, disfunções cardiovasculares e progressão de dor crônica (PASHMFOROSH et al., 2018; ZAPATA – MORALES et al., 2018).

A Associação Internacional para o Estudo da Dor (*International Association for Study of Pain* - IASP) conceitua a dor como ser “uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a um dano real ou potencial dos tecidos, ou descrita em termos de tais lesões”, portanto, uma experiência subjetiva e pessoal, que envolve aspectos sensitivos e culturais que podem ser alterados pelas variáveis socioculturais e psíquicas do indivíduo e do meio em que se encontra inseridos (DELLAROZA & MATTOS, 2012).

A inflamação aguda do tecido é mediada pela infiltração e ativação de leucócitos na região lesada e pela liberação de mediadores pró-inflamatórios, como o fator de necrose tumoral (TNF), interleucina 6 (IL-6) e interleucina 1 (IL-1), dentre

outros (PASHMFOROSH et al., 2018) os quais conseguem, quimicamente, sensibilizar os nociceptores presentes no local, podendo ser capaz de gerar a nocicepção, ou como para humanos, gerando uma dor aguda (ADEYEMI et al., 2018; RAMÍREZ – CAMACHO et al., 2019; KARIM et al., 2019).

A sensibilização pode ser definida como uma redução no limiar nociceptivo dos nociceptores e um aumento na magnitude da sua resposta à estímulos considerados nocivos, isto é, a sua capacidade de excitabilidade pode ser alterada (GOLD & GEBHART, 2010; VILARREAL et al, 2013).

A nocicepção é caracterizada como a capacidade de geração de um potencial de ação nos nociceptores, gerando uma informação (GOLD & GEBHART, 2010).

A gestão adequada da dor aguda é importante para os resultados positivos dos pacientes a curto e longo prazo, pois seu manejo inadequado pode levar à um quadro de persistência do quadro doloroso (BARRERAS – ESPINOZA el al., 2017).

Assim, se faz necessária o controle adequado das desordens inflamatórias, que envolve a utilização de anti-inflamatórios não – esteroidais - AINEs -, corticoides, analgésicos não opioides - paracetamol e dipirona – e opioides(ADEYEMI et al., 2018; BARRERAS – ESPINOZA et al., 2016).

Estudos sugerem que a coadministração de diferentes tipos de analgésicos é a melhor maneira de tratar a dor aguda, conseguindo assim atuar através de diferentes mecanismos de ação antinociceptiva. É particularmente interessante o uso de analgésicos opióides e AINEs quando utilizado o esquema terapêutico de co – administração (ZAPATA – MORALES et al., 2018; RAMÍREZ-CAMACHO et al., 2019; BERTOLDI et al., 2019).

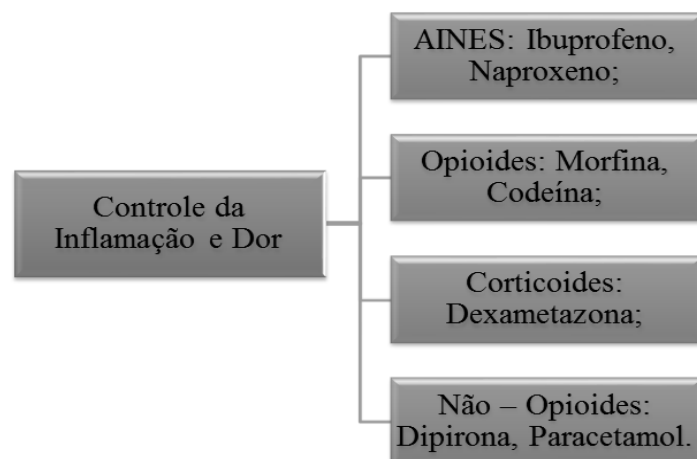


Figura 2. Fármacos utilizados para o controle da dor e/ou inflamação. Fonte: próprio autor

Embora os medicamentos citados acima sejam amplamente utilizados no tratamento de doenças inflamatórias e no manejo da dor e possuindo um alto potencial de eficácia, a suas utilizações estão associadas a diversas reações adversas, envolvendo tecido hepático e renal, sistema cardiovascular e digestório, além da pele (ADEYEMI et al., 2018; PASHMFOROSH et al., 2018).

Apesar da disponibilidade de um número substancial de fármacos sintéticos considerados potentes, os produtos naturais têm sido extensivamente estudados, demonstrando resultados promissores em seus efeitos anti – inflamatórios e analgésicos, desencadeando efeitos adversos leves, possuindo um papel fundamental na descoberta de novas e efetivas moléculas (ADEYEMI et al., 2018; KARIM et al., 2019).

É relatada que a biodiversidade brasileira, que é composta por seis biomas diferentes - Amazônia, Cerrado, Mata Atlântica, Caatinga, Pampa e Pantanal – é uma grande fonte de possíveis moléculas, derivadas de produtos naturais, com efeitos benéficos à saúde, que, por meio de estudos, foi constatada possuidora de um grande potencial para o desenvolvimento de novos fármacos, fonte de possíveis substâncias bioativas com atividades farmacológicas, cosméticas, agroquímicas e de suplementação alimentar (SILVA, 2013; QUEIROZ et al., 2015; MOREIRA et al., 2017).

Devido a essas características, as plantas nativas destes biomas desempenham importante papel na área de economia e biotecnologia, resultando em um crescente interesse de indústrias farmacêuticas, alimentícias e de produtos cosméticos que realizem a produção de produtos derivados de produtos naturais (MOREIRA et al., 2017).

O bioma do Cerrado é composto por uma biodiversidade, utilizada, em sua maioria, pela população por possuir efeitos benéficos à saúde, tanto na alimentação quanto para fins de cura de enfermidades (SILVA et al., 2015), desempenhando papel significativo na produção de compostos bioativos (MALHEIROS et al., 2016).

É considerando que os produtos naturais existentes no bioma Cerrado necessitam de estudos mais aprofundados com o objetivo de identificação das principais substâncias existentes, associando-as com os efeitos gerados, comprovando sua real atividade farmacológica e seus mecanismos de ação.

A *Eugenia dysenterica* DC (ED) é uma espécie arbórea amplamente distribuída no bioma Cerrado brasileiro (LIMA et al., 2017; DONADO-PESTANA et

al., 2017) cujos frutos e folhas são usados como medicina alternativa pelas comunidades da região deste bioma para o tratamento de diversas enfermidades (LIMA et al., 2011).



Figura 3. Fotos da ED que se encontram na Universidade de Brasília. Adaptada de Silva et al., 2015.

A de análise cromatográfica da ED revelou a presença de taninos: ácido elágico e catequina; flavonóides: quercetina e ácido gálico (Figura 3 - A – D). Com esses dados é possível descrever que o extrato de ED é uma mistura rica em polifenóis (MOREIRA et al., 2017).

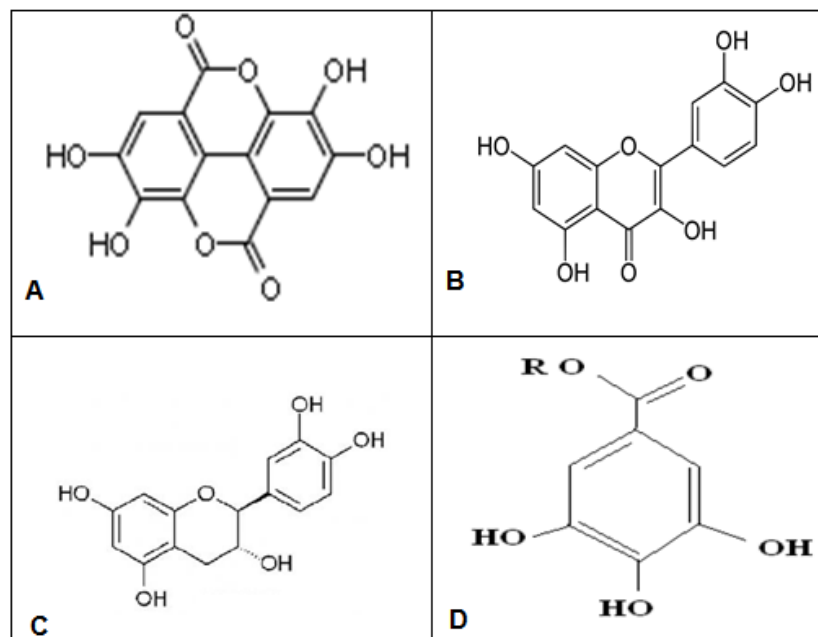


Figura 4. Estruturas moleculares dos polifenóis encontrados na ED. A – D. **Painel A:** ácido elágico; **Painel B:** quercetina; **Painel C:** catequina; **Painel D:** ácido gálico. Adaptadas de Gonçalves, 2012; VICENTINI, 2009; UETA et al., 2014; e BARBOSA, 2010.

A quercetina e catequina, polifenóis encontrados na ED, possuem ação benéfica na saúde humana, particularmente, a catequina, que está relacionada a atividades antioxidantes, anticancerígenas, neuroprotetoras e anti-inflamatórias; a quercetina possui associação com ação neuroprotetora, antioxidante, antidepressivo e atividades anti – inflamatórias (GASCA et al., 2017), de acordo com os efeitos dose-dependentes da catequina, que mostram propriedades antioxidantes. (SUTHERLAND et al., 2006; GASCA et al., 2017).

O comportamento redox do EHFED apresentou características semelhantes às da quercetina, considerado um padrão antioxidante amplamente conhecido. Além disso, marcadores bioquímicos de estresse oxidativo, como catalase, atividade de superóxido dismutase e peroxidação lipídica foram normalizados pelo tratamento com ED (POZZI MALHEIROS et al., 2016).

Descobertas mostraram que o extrato da ED possui efeito protetor contra danos cerebrais induzidas por estresse oxidativo, diminuindo também a quantidade de oxidação lipídica (THOMAZ et al., 2018).

A literatura também demonstra que extrato de ED, rico em polifenóis, melhora a homeostase da glicose de ratos obesos, pois atenua a gliconeogênese hepática devido a uma possível ação no processo inflamatório o tecido hepático (THOMAZ et al., 2018).

A ED possui potente atividade inibidora da tirosina “*in vitro*” (MOREIRA et al., 2017). Outro grupo de pesquisa mostrou que a mistura botânica complexa, baseada no extrato hidroalcoólico de folhas de *Eugenia dysenterica* DC, tem atividade antioxidante “*in vitro*” e efeitos quimeoprotetores associados aos altos níveis de polifenóis, estudos diversos destacaram propriedades antioxidantes, devido à presença de fitoquímicos, mostrando que o extrato de ED é uma mistura botânica complexa, rica em polifenóis, contendo, em particular, flavonoides e taninos, caracterizando-o com atividades de eliminação de radicais livres e também propriedades quimeoprotetores (COUTO e COLS, 2009).

Os frutos de ED são considerados fontes de folatos, carotenoides, vitaminas (A e C) e compostos fenólicos (CARDOSO et al., 2011), apresentando propriedades antioxidantes (GONÇALVES et al., 2010), embora as quantidades encontradas sejam inferiores às encontradas nas folhas (ÁVILA et al., 2016).

Outras atividades biológicas foram associadas à ED, como por exemplo, uma ação com atividade inibidora de α -amilase e α -glicosidase, representando assim,

uma ferramenta potencial para o desenvolvimento de novas estratégias para o tratamento do diabetes. (SOUZA et al., 2012), considerada antidiarreica (GALHEIGO et al., 2016; LIMA et al., 2011) e com efeitos gastroprotetores (PRADO et al., 2014).

Vieira et al. (2012), realizaram um estudo que mostrou um efeito protetor contra a genotoxicidade induzida pela ciclofosfamida em camundongos do EHFED.

Contrariamente às crenças populares, os produtos naturais podem não estar isentos de toxicidade, sendo que ocorre uma necessidade de monitoramento e cautela para seu uso e manejo terapêutico (MOREIRA et al., 2017).

Atividades biológicas foram associadas, pelo menos em parte, à presença de fitoquímicos antioxidantes, em particular ácido elágico, quercetina e ácido gálico, sendo que o EHFED parece ser bem tolerado topicamente, sem quaisquer efeitos tóxicos relevantes a mistura botânica, mostrando um marcante efeito regenerativo celular contra os danos induzidos pela exposição UVA, considerável atividade inibitória de enzimas da pele relacionadas a distúrbios dermatológicos e/ou estéticos (MOREIRA et al., 2017) e um efeito dermoprotetor auxiliando positivamente em cicatrização de feridas (SILVA et al., 2018).

O teor de alcaloides e flavonoides presentes em algumas plantas pode ser responsável pela antinocicepção e efeitos antiinflamatórios de algumas plantas que foram submetidas ao teste de formalina (MANDEGARY et al., 2012).

O teste da formalina é um modelo, *in vivo*, altamente reprodutível comum para a avaliação do potencial analgésico e anti-inflamatório de fármacos e seus possíveis mecanismos (BEIRITH et al., 1998; MANDEGARY et al., 2012; ADEYEMI et al., 2018; BERTOLDI et al., 2018).

Este teste de nocicepção envolve a indução de uma dor moderada e contínua, por meio de um estímulo químico. Desta forma, ele difere da maioria dos testes tradicionais de nocicepção, que se baseiam em breves estímulos para determinar a intensidade do limiar nociceptivo (ADEYEMI et al., 2018), sendo considerado um teste de dor declarada ou também denominada dor tônica (DUBUISSON E DENNIS, 1977; ABBOTT et al., 1995; MANDEGARY et al., 2012; BERTOLDI et al., 2018).

A resposta à formalina é bifásica composta por uma fase inicial e uma fase tardia (DUBUISSON E DENNIS, 1977; ABBOTT et al., 1995).

A fase inicial, que é a primeira fase (0 – 5 minutos), também denominada fase neurogênica, parece ser causada predominantemente por ativação de fibras-C, estando associada ao estímulo periférico, mas que desencadeia uma informação

que é levada via aferente ao sistema nervoso central (ABBOTT et al., 1995; BEIRITH et al., 1998).

A fase tardia (15 – 40 minutos), que ocorre após uma remissão dos comportamentos nociceptivos, denominada fase inflamatória, parece ser dependente da combinação de uma reação inflamatória no tecido periférico e alterações no corno dorsal da medula espinhal (região onde ocorre a primeira sinapse da via ascendente da dor), devido à liberação de mediadores locais que desencadeiam sensibilização de neurônios periféricos e espinhais (DUBUISSON E DENNIS, 1977; ABBOTT et al., 1995; BEIRITH et al., 1998)

É relatado, em estudos, que a injeção intradérmica de formalina, em camundongos, pode produzir comportamentos que são associados à situação dolorosa ou nocicepção, bem como sua exacerbação (hipernocicepção) – favorecimento, elevação, lamber e estremecer / sacudir a pata em que foi administrada –, sendo que a avaliação destes movimentos se torna uma medida confiável para avaliação nociceptiva (ADEYEMI et al., 2018; PASHMFOROSH et al., 2018).

Quando um composto, aplicado anteriormente ao estímulo químico, possui um efeito de prevenção do comportamento associado à nocicepção em ambas as fases (durante 45 minutos após a administração) do teste, pode-se associar este composto com um possível efeito analgésico, porém não se pode descartar o efeito anti-inflamatório (HUNSKAAR & HORLEY, 1987), mas quando esse efeito é observado apenas na segunda fase (após os primeiros 10 minutos), sem interferir com a primeira, é possível sugerir-se ação anti-inflamatória (MANDEGARY et al., 2012; PECIKOZA et al., 2018).

Vários mecanismos moleculares podem contribuir para a sensibilização das vias nociceptivas, incluindo alterações que podem ocorrer em canais iônicos (por exemplo, em canais de sódio voltagem – dependentes) e redução da modulação inibitória descendente (que depende de numerosos neurotransmissores – moduladores como, por exemplo, monoaminas, acetilcolina, opioides endógenos, endocanabinoides entre outros) (PECIKOZA et al., 2018; ZAPATA – MORALES et al., 2018).

A diferença das doses utilizadas no teste de formalina é importante, em termos de volume e concentração, pois as doses estão associadas ao aumento da nocicepção, proporcionalmente, observando que as considerações éticas exigem

que a intensidade e a duração da dor com o número de animais utilizados sejam minimizados, (ABBOTT et al., 1995;) como consta no princípio dos 3R'S.

O comportamento nociceptivo está relacionado à dose de formalina, em roedores, embora ocorra uma diferença nos índices de comportamentos. Evidências são relatadas, demonstrando que a variabilidade do comportamento aumenta com o aumento da dose de formalina, particularmente em vista de que a nocicepção relacionada ao estímulo químico tem duas fases que refletem diferentes processos patológicos, diferindo, portanto, a sensibilidade a agentes analgésicos de atuação central e periférica e, possivelmente, sendo que as diferentes situações dolorosas e os parâmetros utilizados para avaliação da nocicepção em ambas as fases devem ser os mesmos (DUBUISSON E DENNIS, 1977; ABBOTT et al., 1995).

Claramente, do ponto de vista qualitativo (antropocêntrico), parece ocorrer um aumento da quantidade de sofrimento com o aumento da dose de formalina. O local da injeção de formalina também influencia a resposta nociceptiva. Injeções na superfície dorsal produzem menos dor do que injeções plantares, e injeções na região plantar distal produzem menos dor que a área plantar proximal (ABBOTT et al., 1995).

As respostas as injeções intradérmicas (id) são consideradas com menor intensidade do que as injeções por via subcutânea, pois injeções profundas possuem um mecanismo que leva a uma resposta mais intensa à dor. As respostas à dor também parecem diminuir sistematicamente com a idade, desde a infância até a meia-idade. A presença de estressores, incluindo um novo ambiente e procedimentos necessários, é outro fator que pode levar à depressão dos escores de nocicepção em roedores (ABBOTT et al., 1995).

Durante a diminuição da interfase no comportamento nociceptivo, entre 5 e 15 minutos após a administração de formalina, praticamente todos os animais costumam passar por um período em que não apresentaram nenhum comportamento nociceptivo, podendo ser explicado que a depressão interfásica das respostas à dor representa a auto analgesia estimulada pela nocicepção inicial. Uma boa medida de dor também deve ser uma boa medida de analgesia e seria esperado que a dose de um agente analgésico fosse sistematicamente relacionada aos índices dos comportamentos relacionados à sensação dolorosa (ABBOTT et al., 1995).

Moléculas que têm demonstrado um importante papel no processamento para o desenvolvimento da dor inflamatória aguda, em nível central e periférico, são as espécies reativas de oxigênio (ERO) (FERREIRA et al., 2018), possuindo como elementos os radicais superóxido, peróxido de hidrogênio, óxido nítrico e nitroperóxido, que interfere na função celular normal que resulta em dano celular (KO et al., 2012).

Foi observado em um estudo, que a utilização de um sequestrador de ERO foi responsável por diminuir os comportamentos nociceptivos induzidos pelo teste de formalina, demonstrando que as ERO estão profundamente envolvidas na dor aguda e dor tônica, em nível e periférico (KO et al., 2012)

As ERO são moléculas altamente reativas que possuem meia – vida curta São fornecidas por NADPH oxidase, mitocôndrias, óxido nítrico sintase desacoplada e xantina oxidase (GOMES et al., 2018). Tem havido várias evidências que apontam conexões significativas entre a produção de ROS e a progressão de muitas doenças inflamatórias (KO et al., 2012). Durante a inflamação, as ERO podem ativar algumas vias de sinalização intracelular, como as quinases protéicas ativadas por mitógenos (MAPKs), o fator nuclear - κ B (NF- κ B) e a proteína ativadora-1 (AP-1), são cascatas de sinalização que promovem a expressão de citocinas e moléculas responsáveis pela resposta inflamatória (GOMES et al., 2018). As ERO, de alta reatividade, são capazes de danificar ácidos nucleicos, proteínas e lipídios funcionando como importantes sinalizadoras intracelulares e amplificando a resposta inflamatória (MITTAL et al., 2014).

A via Keap1/Nrf2/elementos de resposta antioxidante é um dos principais mecanismos para o combate ao excesso de ERO e em condições fisiológicas. O fator nuclear eritroide 2 (Nrf2) se encontra no citoplasma ligado a um homodímero de Keap1 (Kelch-like ECH-associated protein 1) (LU et al., 2016). Esse mecanismo parece reduzir a intensidade da inflamação aguda e impede a transformação das condições patológicas agudas em doenças crônicas (MA, 2013). Sendo assim, da mesma maneira que existem evidências que indicam o papel de ERO na dor, há estudos que já buscam a modulação da via Keap1/Nrf2/elementos de resposta antioxidante para descoberta de novas formas de tratamento e manejo da dor.

Muitos moduladores desta via são tipicamente metabólitos secundários de plantas e fungos, tais como os derivados do ácido cinâmico, cumarinas, chalconas, flavonóides e terpenóides, entre outros, sendo a bioprospecção de extratos de

plantas e fungos, com ação antioxidante, um fornecedor de uma rica fonte de substâncias com potencial atividade na via Keap1/Nrf2/ARE (LI et al., 2018).

Assim, a modulação dessa via tem se tornado um alvo interessante para o tratamento de diversas doenças, como câncer e doenças neurodegenerativas, onde também há atuação das espécies reativas de oxigênio (AHMED et al., 2017).

01.02. Justificativa

Com a necessidade de formação de recursos humanos e a produção de conhecimentos científicos, tecnológicos e de inovação que possam contribuir para o desenvolvimento sustentável da Região Centro-Oeste, foi instituída a Rede Centro Oeste de Pós-Graduação, Pesquisa e Inovação - Rede PRO-CENTRO-OESTE em 2009. O presente estudo faz parte de um projeto ligado à Rede, envolvendo a padronização de teste nociceptivo, ação que deve fazer parte de estudos de comportamentos em animais experimentais, pois envolve o manejo ético e seguro dos animais, possibilitando redução de erros, preservando vidas animais e acrescentando mais precisão e confiabilidade aos resultados obtidos.

O manejo inadequado da dor e a prolongação de um processo inflamatório pode desencadear a persistência da dor, impossibilitando o indivíduo a realizar atividades do seu cotidiano, podendo até mesmo interferir na economia, já que este indivíduo possuiria mais gasto com o serviço de saúde e estaria impossibilitado de trabalhar, considerando-o como improdutivo.

Apesar da grande variedade de fármacos sintéticos existentes, os efeitos adversos destes são muitas vezes motivos para o abandono do tratamento, e em alguns casos, devido às questões individuais de cada organismo, esses fármacos não possuem os efeitos terapêuticos adequados, correndo o risco do desenvolvimento da persistência da inflamação e desencadeamento da persistência da dor.

Nossa região tem bioma rico, possui potencial para o desenvolvimento de fármacos, neste sentido ocorre à necessidade de uma linha de pesquisa em bioprospecção de analgésicos e antiinflamatórios, que pode ser útil ao desenvolvendo conhecimento científico e tecnológico.

02. OBJETIVOS

02.01. Objetivo Geral

Caracterizar o potencial efeito do extrato hidroalcoólico das folhas de *Eugenia dysenterica* DC sobre o modelo de dor inflamatória e teste comportamental nociceptivo induzido por estímulo químico.

02.02. Objetivos específicos:

- 02.02.01. Padronizar o modelo de dor inflamatória por indução química;
- 02.02.02. Padronizar o teste comportamental nociceptivo químico (teste de formalina);
- 02.02.03. Avaliar o possível efeito do extrato hidroalcoólico das folhas de *Eugenia dysenterica* DC sobre o modelo de dor inflamatória e teste comportamental nociceptivo induzido por estímulo químico.

03. METODOLOGIA

O presente estudo foi submetido ao Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA), do Instituto de Ciências Biológicas da UnB (UnBDoc nº 53/2018 e nº 10100/2014). Abaixo estão descritos detalhadamente os modelos utilizados para o desenvolvimento do presente estudo.

03.01. Animais

Foram utilizados ratos Wistar machos (250 – 350 gramas) para toda a realização do presente estudo. Os animais estavam alojados no biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília. Os protocolos para uso e manejo animal para experimentação do estudo foram seguidos segundo as “Normas Éticas Para Investigação Envolvendo Dor Experimental em Animais Acordados” (ZIMMERMAN, 1983), juntamente com a “Diretriz Brasileira Para O Cuidado E A Utilização De Animais Para Fins Científicos E Didáticos” e as “Diretrizes Da Prática De Eutanásia” do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) (BRASIL, 2013 a/b). Todos os testes foram realizados entre 08H e 17H.

03.02. Fármacos utilizados

Foi utilizado a solução de Formaldeído 37% m/v, da Sigma Aldrich, que foi substrato para a preparação da solução de Formalina a 1%, a qual continha 1 mL da solução de Formaldeído juntamente com 99 mL de solução salina 1%.

Foi utilizado o Acido(2RS)-2-[4-(2-metilpropil)fenil]propanóico, Ibuprofeno, classificado um Antiinflamatório Não - Esteroidal (AINE) e o Metamizol, Dipirona Monohidratada, ambos da Sigma Aldrich, que foram diluídos em água potável (0,8 mL para cada 100 mg de animal), para ser realizada a administração via oral nos animais.

Foi utilizado o extrato hidroalcoólico das folhas de *Eugenia dysenterica* Dc, fornecido pela Professora Pérola Magalhães, da Rede Pró - Centro - Oeste de pesquisa.

03.03. Modelo de dor inflamatória por indução química

Foi realizada a indução da inflamação, em patas de ratos; sendo que eles foram suavemente contidos, enquanto o dorso da pata traseira foi exposto para administração, por via intradérmica, de 50µL de Formalina 1% (DUBUISSON, 1977). Logo após a administração, foi observado e registrado o comportamento dos animais.

03.04. Teste comportamental Nociceptivo Químico

Os animais foram acondicionados, após a administração da formalina, no funil de vidro, não sendo manipulados, com total liberdade de movimento, ficando em observação por 45 minutos.

O tempo de registro foi dividido em 9 (nove) blocos de 5 minutos e um escore de dor foi determinado para cada bloco, medindo-se o número de levantamentos, do membro afetado durante o tempo de observação. Tal comportamento pode variar de levantamento da pata (não associado à locomoção) a um vigoroso tremor do membro, ou por uma ondulação das costas músculo associado ao movimento do membro (*flinch*).

03.05. Avaliação do possível efeito do EHFED

Foi administrado por via oral, por método de gavagem, as doses de 33, 100 e 300 mg/kg de solução aquosa do EHFED ($n= 6-10$), 60 minutos antes da injeção da formalina 1%, para que então fosse avaliado o efeito protetor que o extrato possui, realizando a curva dose resposta dos comportamental dos animais. As doses utilizadas foram previamente, em estudo piloto, avaliadas e mostraram efeitos biológicos.

Como controles, foram administrados, por via oral, por método de gavagem, uma hora antes da administração da injeção intradérmica de Formalina 1%, as doses de 200 mg/kg de solução aquosa de Dipirona (FERREIRA et al., 1990) e 20 mg/kg de solução aquosa de Ibuprofeno (AINE) (GOMES et al, 2018).

03.06. Análise estatística

A análise estatística dos resultados foi realizada com o auxílio do programa “Graph Pad Prism 6.0, San Diego, EUA”. Os resultados estão apresentados como

média \pm erro padrão (epm) nas curvas das fases 1 e 2 de medidas que foram realizadas nos grupos experimentais, mas não foi possível apresentar o erro padrão em busca de melhor visualização dos dados.

Foram utilizadas as análises de variância de duas vias (two-way ANOVA) e de uma via (one-way ANOVA), para análise de dados ao longo do tempo e para a análise das fases do modelo, respectivamente, em seguida às análises de variância, e para comparações pareadas, foi realizado teste de comparações múltiplas de Tukey, o nível de significância estabelecido foi de $p < 0,05$.

04. RESULTADOS E DISCURSSÃO

04.01. Padronização do teste do modelo de dor inflamatória e teste de dor declarada em ratos

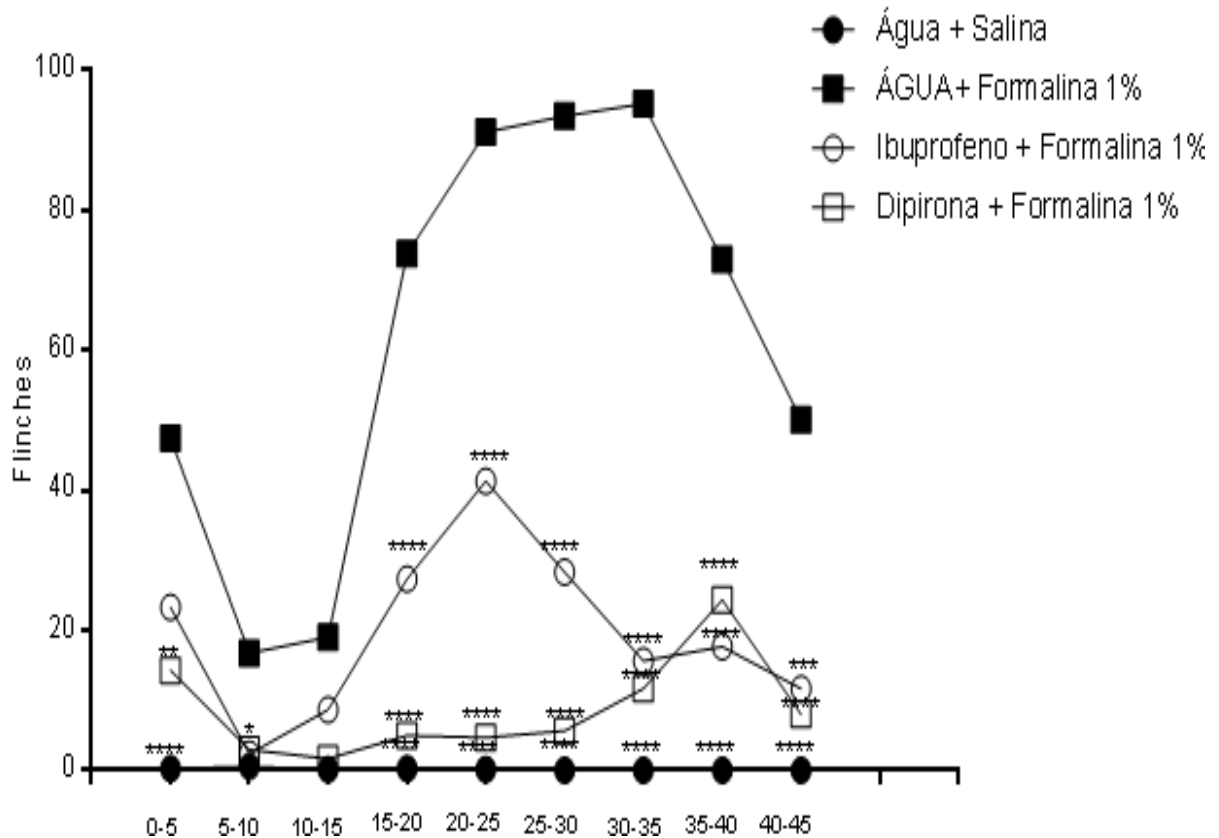


Figura 5. Curva Temporal da Padronização do teste: Uso de um analgésico (Dipirona) e um AINE (Ibuprofeno). * $p > 0,05$; ** $p = 0,0013$; **** $p < 0,0001$, grupo Formalina 1% comparado com os demais grupos. ANOVA de duas vias seguida do teste Tukey, $n = 6-10$ animais.

A administração de formalina induziu comportamento nociceptivo característico, tal comportamento pode variar de levantamento da pata (não associado à locomoção) a um vigoroso tremor do membro, ou por uma ondulação das costas músculo associado ao movimento do membro (*flinch*), sendo considerado a sua quantidade um indicativo de nocicepção, que foi significativamente diferente do grupo salina e grupo Dipirona nos primeiros 10 minutos ($p > 0,0001$, $p = 0,0013$ e $p > 0,05$ respectivamente) e diferente de todos os grupos no intervalo de 15 à 45 minutos ($p < 0,0001$), como demonstrado na Figura 5.

Quando comparado os grupos que foram pré-administrados Dipirona com o grupo que foi administrado a formalina intradérmica, pode-se perceber uma diferença significativa ($p > 0,001$; $p > 0,0001$), em ambas as fases, demonstrando o efeito analgésico esperado da Dipirona, devido a sua ação de dessensibilização dos nociceptores periféricos e centrais, possivelmente atuando via via arginina/cGMP em neurônios sensoriais (LORENZETTI & FERREIRA, 1996).

O grupo pré-administrado com AINE, mostrou uma diferença significativa ($p > 0,0001$) apenas na fase tardia, resultados observados na Figura 2.

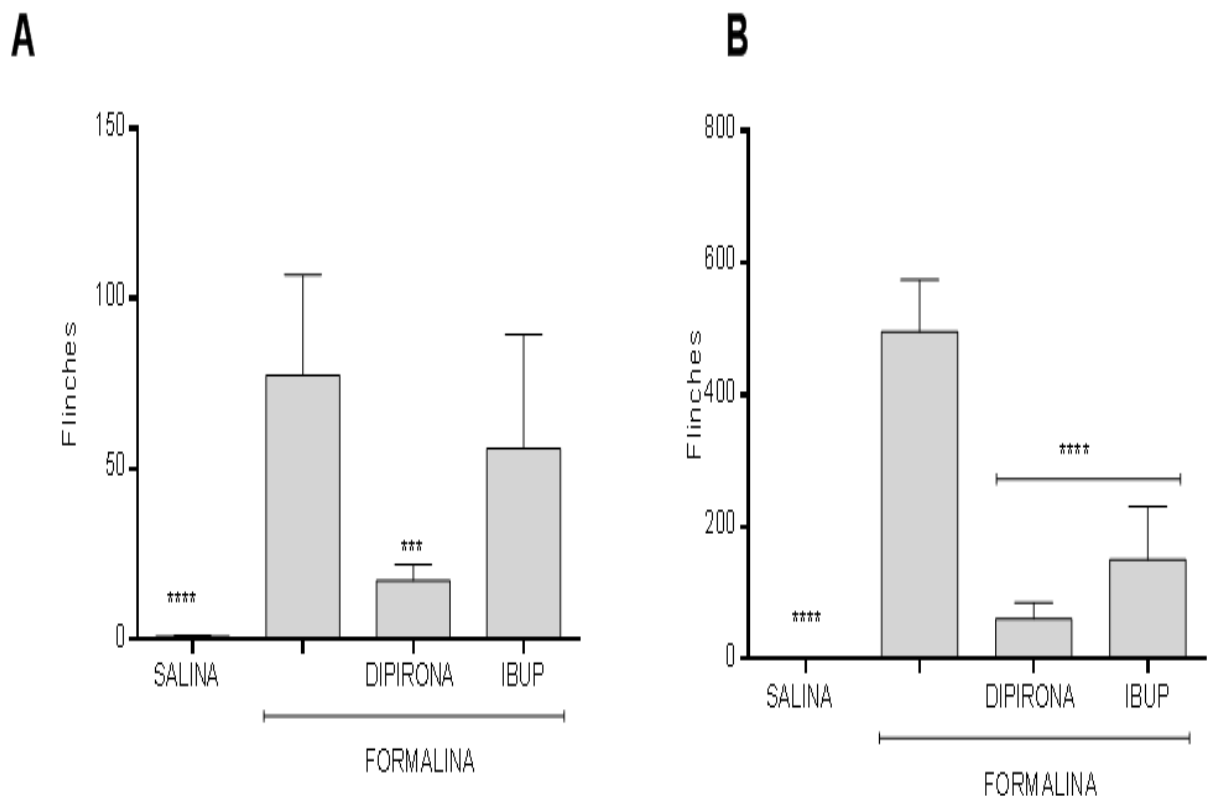


Figura 6. Curva da padronização do teste nociceptivo por indução química: Painel A: fase 1. Painel B: fase 2. * $p > 0,001$; **** $p < 0,0001$, comparação do grupo Formalina 1% com os demais. ANOVA de uma via seguida de Tukey, $n=6-10$ animais.**

Na fase inicial (Figura 2 – Painel A) a Dipirona foi capaz de diminuir a quantidade de *flinchs* em 77,63%, diferente do AINE utilizado, que foi capaz de diminuir 27,78%, o qual não foi significativamente diferente. Já na fase tardia (Figura 6 – Painel B) ambos os pré-tratamentos, Dipirona e o AINE, diminuíram os *flinchs* em 87,67 e 69,69%, respectivamente.

Estudos anteriores trazem que a fase inicial, denominada também como fase neurogênica, estaria sendo causada predominantemente por ativação direta de

fibras – C, associada a um evento periférico que desencadeia uma informação, via aferente, ao sistema nervoso central, que dura cerca de 10 minutos, fase em que apenas fármacos com efeitos analgésicos teriam ação sobre (DUBUISSON E DENNIS, 1977; ABBOTT et al., 1995).

A fase tardia se estabelece após um período de remissão do comportamento nociceptivo, caracterizada como, e também denominada, fase inflamatória, pois é dependente da combinação de uma reação inflamatória no tecido estimulado pela Formalina 1%, que também desencadeia alterações no corno dorsal da medula espinal, região esta que abriga a primeira sinapse da via ascendente da dor, ocorrendo uma sensibilização dos neurônios periféricos e espinhais devido ao estímulo de síntese e liberação de mediadores inflamatórios locais, fase que um fármaco, com efeito anti – inflamatório poderia ter ação, além dos fármacos analgésicos (DUBUISSON E DENNIS, 1977; ABBOTT et al., 1995; BEIRITH et al., 1998)

A Dipirona, que é classificada como um analgésico não – opioide, que possui efeito central e periférico demonstrado, (LORENZETTI & FERREIRA, 1985; LORENZETTI & FERREIRA, 1996; GOMES et al., 2018) atuou na fase inicial e na fase tardia (HUNSKAAR & HORLEY, 1987; PUIG e SORKIN, 1995) e o Ibuprofeno, classificado como um antiinflamatório não – esteroide (AINE)(SEABRA, 2015; GOMES et al., 2018), só demonstrou efeito na segunda fase (HUNSKAAR & HORLEY, 1987; PUIG e SORKIN, 1995).

04.02. Avaliação do efeito do EHFED sobre o modelo de dor inflamatória e teste de dor declarada em ratos

Em relação ao tempo, as doses de 33, 100 e 300 mg/kg foram efetivas em diminuir a quantidade de *flinchs* nos primeiros 5 minutos quando comparadas com o grupo Formalina 1% ($p < 0,05$). O efeito do extrato, para as doses de 33, 100 e 300 mg/kg, no período entre 16 e 45 minutos, apresentou diferença significativa quando comparadas com o grupo Formalina 1% ($p > 0,05$; $p > 0,001$; $p > 0,0001$), como demonstrado na Figura 3

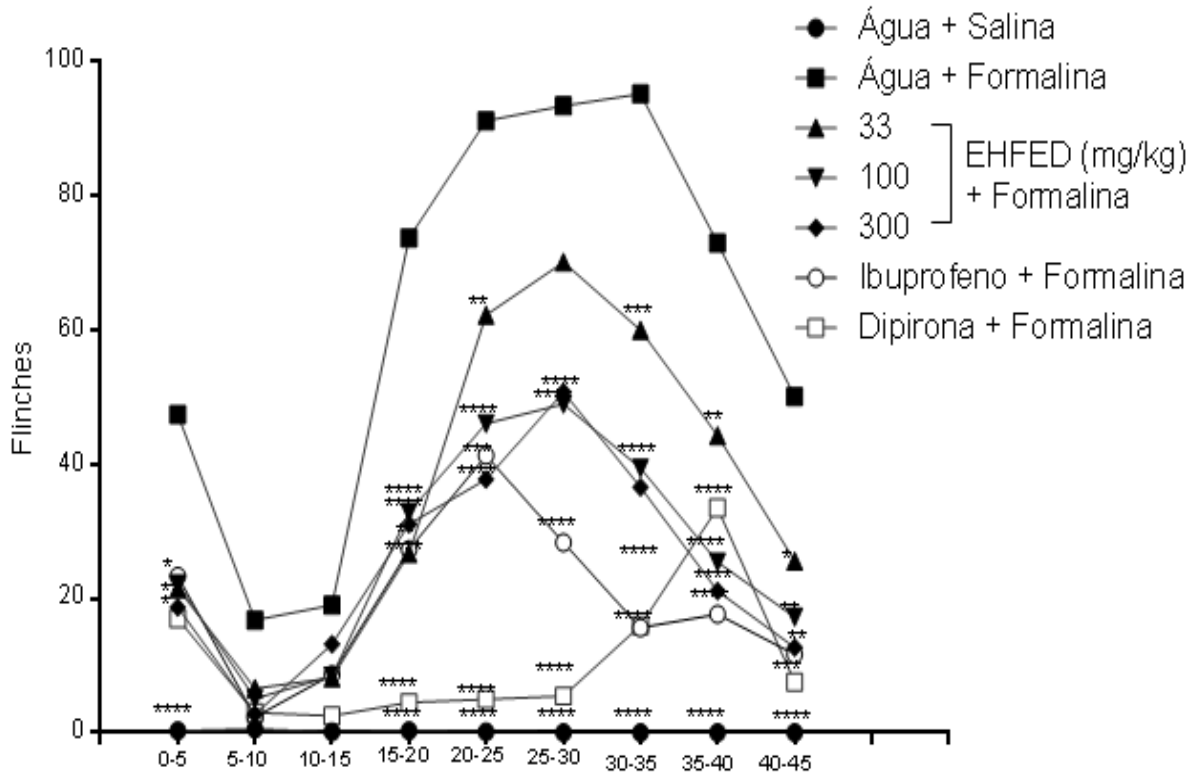


Figura 7. Curva Dose-Resposta e Temporal do efeito do EHFED: efeito pré-tratamento (1H antes da injeção id. de 50 μ L de Formalina 1%) feito por administração, via oral, do EHFED (33, 100 e 300 mg/kg), Dipirona (200mg/kg), Ibuprofeno (20mg/kg) e água potável com administração id. de 50 μ L de salina 0,9%, comparando com o uso de Formalina 1% tratado com água potável. * $p > 0,05$; ** $p > 0,01$; *** $p > 0,001$; **** $p > 0,0001$, grupo Formalina 1% comparado com os demais grupos. ANOVA de duas vias seguida do teste Tukey, $n = 6-10$ animais.

Na fase inicial (Figura 8 – Painel A) o pré – tratamento com as doses de 33, 100 e 300 mg/kg foi capaz de diminuir a quantidade de *flinchs* em 63,85, 64,75 e 73,95%, respectivamente. Já na fase tardia (Figura 8 – Painel B) o pré-tratamento com as doses de 33, 100 e 300 mg/kg diminuíram os *flinchs* em 39,94, 54,54 e 58,92%, respectivamente, demonstrando efeito dependente da dose.

Ressaltando, que a avaliação qualitativa dos animais foi reanalisada, o qual nenhum animal mostrou efeito adverso do tipo letal durante a realização das administração de todos os fármacos utilizados no estudo, demonstrando assim que o EHFED não possui um efeito tóxico letal nas doses de 33, 100 e 300 mg/kg.

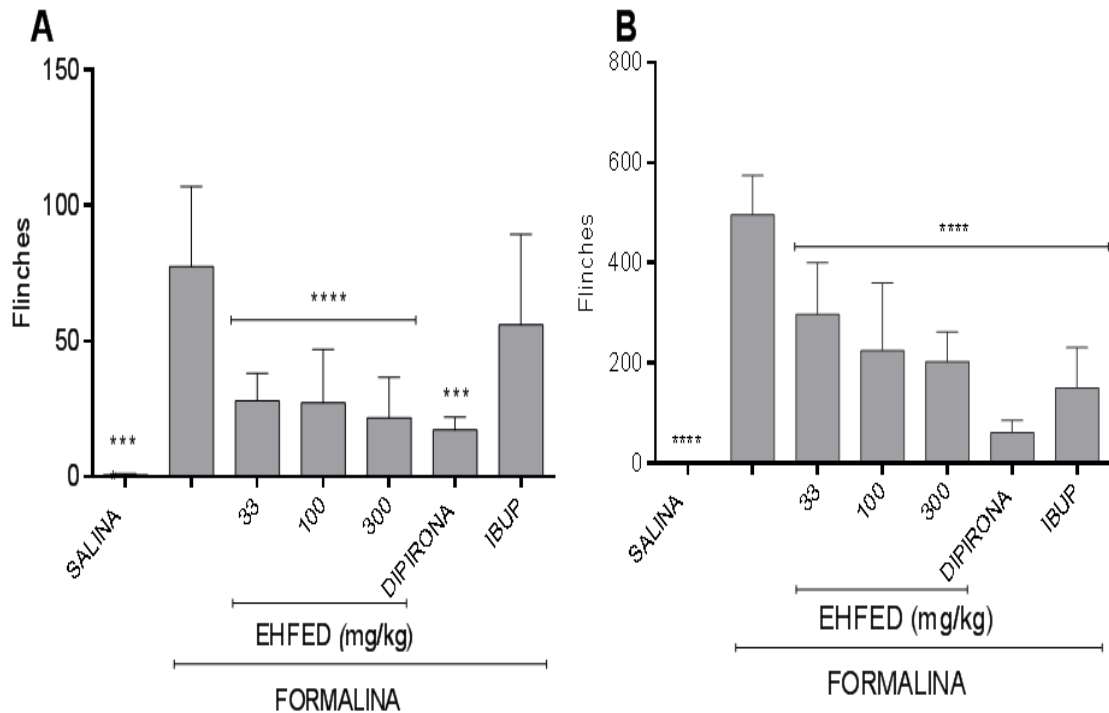


Figura 8. Curva Dose-Resposta Das Fase 1 e Fase 2 do efeito do EHFED (33, 100 e 300 mg/kg) sobre a resposta nociceptiva induzida por formalina: Painel A: fase 1. Painel B: fase 2. ** p < 0,0001 comparação do grupo Formalina 1% com os demais grupos. ANOVA de uma via seguida do teste de Tukey, n=6-10 animais.**

A biodiversidade brasileira é fonte de moléculas que necessitam ser estudadas com o objetivo de descobertas de possíveis fármacos com potencial terapêutico e que possuem efeitos adversos mais brandos (MOREIRA et al., 2017).

É relatado que a atividade antioxidante de alguns produtos possui a capacidade de diminuir a hipernocicepção, ou até mesmo potencializar efeitos analgésicos e anti-inflamatórios quando coadministrados com fármacos com esses efeitos, em algumas patologias, tais como na dor crônica (FERREIRA-CHAMORRO et al., 2018).

Junior et al (2019), comprovaram, pelo modelo da carragenina, a ação anti – hiperalgesica e anti-inflamatória do produto natural *Caryocar brasiliense*, popularmente conhecido como pequi, um fruto natural do bioma cerrado, que já possuía confirmada atividade antioxidante e antimicrobiana.

Santos et al, (2019) ao realizarem o teste de formalina com o pré-tratamento com um produto natural, a *Baccharis dracunculifolia* D.C., popularmente conhecida como “alecrim do campo”, demonstraram efeito em ambas as fases, que ao serem complementadas com outros testes a caracterizou como um produto natural com

efeito anti – nociceptivo e anti – inflamatório, demonstrando que o teste de formalina seria um teste adequado e que consegue avaliar os possíveis efeitos anti – nociceptivos de produtos naturais.

A ED (MOREIRA et al., 2017), possui um efeito antioxidante declarado (POZZI MALHEIROS et al., 2016), com um papel neuroprotetor (THOMAS et al., 2018; GASCA et al., 2017) e possuindo ainda uma atividade anti – inflamatória no tecido hepático (DONATO-PESTANA et al., 2018) é um potencial produto natural que já se imaginava um efeito de diminuição da atividade hipernociceptivo.

O estresse oxidativo é um destaque dentre os vários fatores que estão relacionados aos processos inflamatórios e dolorosos, caracterizando-se pelo surgimento de ERO's, sendo as de alta reatividade, podendo danificar ácidos nucleicos, proteínas e lipídios, atuando como importantes sinalizadoras intracelulares e amplificadoras da resposta inflamatória (RUSKIN et al., 2012; ROESLER et al., 2017), observando por portanto a partir dos resultados obtidos estar envolvido no efeito demonstrado sobre o teste de formalina e sendo o possível alvo do mecanismo de ação do efeito encontrado.

A resposta do organismo ao estresse oxidativo se dá por vários mecanismos, destacando-se a sinalização Keap1/Nrf2/ARE, sistema de sinalização que parece reduzir a intensidade da inflamação aguda e impede a transformação das condições patológicas agudas em doenças crônicas (MA, 2013). Intervenções farmacológicas nesta via estão em investigação para a descoberta de moduladores como potenciais agentes preventivos e terapêuticos, as principais descobertas são de agentes com um potencial antioxidante (VELOSO, 2016).

Por ser considerado um produto com potencial efeito antioxidante, uma via a qual a *Eugenia dysenterica* DC poderia está agindo, que é uma via basal de proteção dos tecidos, e que em situação de lesão é ativada, e por via Keap1/Nrf2/ARE (XIANG et al., 2018; LI et al., 2018; FERREIRA – CHAMORRO, 2018).

Por estar atuando nas duas fases do teste de formalina, a *Eugenia dysenterica* DC demonstrou um possível efeito analgésico, porém seu efeito anti – inflamatório não pode ser descartado. Para caracteriza-la como um produto com efeito anti – inflamatório é necessário a complementar os dados com outros testes, tais como alguns experimentos, como testa o efeito do extrato sobre o modelo de sensibilização por Carragenina (CG) e a sua produção de edema, para demonstrar

seu possível efeito sobre um modelo de indução de um processo inflamatório; testar sobre o modelo de indução de sensibilização por Prostaglandina (PGE2), para realizar a verificação do real efeito analgésico. Outros testes a serem realizados, são testes moleculares, como dosagem de citocinas e de EROs.

05. CONCLUSÃO

Diante dos resultados obtidos, pode-se inferir que foi realizada a padronização do modelo de dor inflamatória induzida por estímulo químico e teste comportamental nociceptivo químico (Teste de Formalina). Sendo possível avaliar o efeito do extrato hidroalcoólico das folhas de *Eugenia dysenterica DC*. Foi observado efeito em ambas as fases do teste de formalina, caracterizando-o com possível efeito analgésico e/ou anti-inflamatório, não possuindo um efeito toxico letal nas doses de 33, 100 e 300 mg/kg.

Como perspectiva futura é necessário a realização de mais testes que possam esclarecer o extrato analgésico e/ou anti-inflamatório. Também deve ser investigado o possível mecanismo de ação, a hipótese seria como uma potencial atividade sobre a via KEAP1/NRF2/ARE que possui papel na inflamação, dor e neuroproteção, já que estudos comprovaram uma correlação da produção de EROs com a via a ser estudada, enfatizando que a *Eugenia dysenterica DC* é um produto natural com ação antioxidante.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBOTT, Frances V.; FRANKLIN, Keith BJ; WESTBROOK, R. Frederick. The formalin test: scoring properties of the first and second phases of the pain response in rats. **Pain**, v. 60, n. 1, p. 91-102, 1995;

ADEYEMI, Olufunmilayo O. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory properties of *Tetracera alnifolia Willd.(Dilleniaceae)* hydroethanolic leaf extract. **Journal of basic and clinical physiology and pharmacology**, 2018;

AHMED, Syed Minhaj Uddin et al. Nrf2 signaling pathway: Pivotal roles in inflammation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*, v. 1863, n. 2, p. 585-597, 2017;

BARBOSA, Vanessa de Frias. Caracterização do perfil da ação do ácido gálico e seus derivados sobre processos oxidativos in vitro e ex vivo. 2010;
BARRERAS-ESPINOZA, Israel et al. The Antinociceptive Effect of a Tapentadol-Ketorolac Combination in a Mouse Model of Trigeminal Pain is Mediated by Opioid Receptors and ATP-Sensitive K⁺ Channels. **Drug development research**, v. 78, n. 1, p. 63-70, 2017;

BARTH, Cristiane R. et al. Carrageenan-induced inflammation promotes ROS generation and neutrophil extracellular trap formation in a mouse model of peritonitis. **European journal of immunology**, v. 46, n. 4, p. 964-970, 2016;

BEIRITH, Alessandra et al. Spinal and supraspinal antinociceptive action of dipyrone in formalin, capsaicin and glutamate tests. Study of the mechanism of action. **European journal of pharmacology**, v. 345, n. 3, p. 233-245, 1998;

BERTOLDI, Karine et al. Antioxidant and Antinociceptive Activities of Methanol Extract of *Muehlenbeckia sagittifolia*. **Current Traditional Medicine**, v. 4, n. 1, p. 43-52, 2018;

COSTA, Cláudio Rodrigues Rezende et al. In vitro evaluation of *Eugenia dysenterica* in primary culture of human gingival fibroblast cells. **Brazilian oral research**, v. 33, 2019;

COUTO, Renê Oliveira do et al. Caracterização físico-química do pó das folhas de *eugenia dysenterica* dc.(myrtaceae). 2009;

DONADO-PESTANA, Carlos M. et al. Cagaita fruit (*Eugenia dysenterica* DC.) and obesity: Role of polyphenols on already established obesity. **Food Research International**, v. 103, p. 40-47, 2018;

DOS SANTOS, Diogo A. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of *Baccharis dracunculifolia* DC (*Asteraceae*) in different experimental models. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 127, n. 2, p. 543-550, 2010;

DUBUISSON, David; DENNIS, Stephen G. The formalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rats and cats. **Pain**, v. 4, p. 161-174, 1977;

FERNÁNDEZ-DUEÑAS, Víctor et al. Synergistic interaction between fentanyl and a tramadol: paracetamol combination on the inhibition of nociception in mice. **Journal of pharmacological sciences**, v. 118, n. 2, p. 299-302, 2012;

FERREIRA, Pablo et al. Sulforaphane inhibited the nociceptive responses, anxiety- and depressive-like behaviors associated with neuropathic pain and improved the anti-allodynic effects of morphine in mice. **Frontiers in pharmacology**, v. 9, p. 1332, 2018;

GASCA, Cristian A. et al. Assessment of anti-cholinesterase activity and cytotoxicity of cagaita (*Eugenia dysenterica*) leaves. **Food and Chemical Toxicology**, v. 109, p. 996-1002, 2017;

GODIN, Adriana M. et al. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of nicotinamide and its isomers in different experimental models. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 99, n. 4, p. 782-788, 2011;

GOMES, Bruna RB et al. Increase of reactive oxygen species in different tissues during lipopolysaccharide-induced fever and antipyresis: an electron paramagnetic resonance study. **Free radical research**, v. 52, n. 3, p. 351-361, 2018;

GONÇALVES, Any Elisa de Souza Schmidt. **Compostos bioativos do camu-camu (*Myrciaria dubia* McVaugh): caracterização e atividade biológica**. 2012. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo;

HUNSKAAR, Steinar; HOLE, Kjell. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v. 30, n. 1, p. 103-114, 1987;

JORGE, A. et al. Analgesic and anti-inflammatory effects of *Caryocar brasiliense*. **Anti-inflammatory & anti-allergy agents in medicinal chemistry**, 2019;

LI, Shan et al. Role of Keap1-Nrf2 signaling in anhedonia symptoms in a rat model of chronic neuropathic pain: improvement with sulforaphane. **Frontiers in pharmacology**, v. 9, 2018;

LORENZETTI, B. B.; FERREIRA, S. H. Activation of the arginine-nitric oxide pathway in primary sensory neurons contributes to dipyron-induced spinal and peripheral analgesia. *Inflammation Research*, v. 45, n. 6, p. 308-311, 1996;

LORENZETTI, Berenice B.; FERREIRA, S. H. Mode of analgesic action of dipyron: direct antagonism of inflammatory hyperalgesia. *European journal of pharmacology*, v. 114, n. 3, p. 375-381, 1985;

LU, M. et al. The Keap1 – Nrf2 – ARE Pathway As a Potential Preventive and Therapeutic Target : An Update. *Medicinal Research Reviews*, v. 00, n. 0, p. 1–40, 2016;

MA, Q. Role of Nrf2 in Oxidative Stress and Toxicity. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 53, n. 1, p. 401–426, 2013.

MANDEGARY, Ali et al. Alkaloid and flavonoid rich fractions of fenugreek seeds (*Trigonella foenum-graecum L.*) with antinociceptive and anti-inflammatory effects. **Food and chemical toxicology**, v. 50, n. 7, p. 2503-2507, 2012;

MIRANDA, Hugo F. et al. Synergism between fentanyl and tramadol in tonic inflammatory pain: the orofacial formalin test. **Inflammation**, v. 35, n. 3, p. 1132-1137, 2012;

MOREIRA, Larissa Cleres et al. In vitro safety and efficacy evaluations of a complex botanical mixture of *Eugenia dysenterica DC. (Myrtaceae)*: Prospects for developing a new dermocosmetic product. **Toxicology in Vitro**, v. 45, p. 397-408, 2017;

- PARADA, C. A. et al. The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin-induced nociception. **Neuroscience**, v. 102, n. 4, p. 937-944, 2001;
- PASHMFOROSH, Marzieh et al. Topical Anti-Inflammatory and Analgesic Activities of *Citrullus colocynthis* Extract Cream in Rats. **Medicina**, v. 54, n. 4, p. 51, 2018;
- PECIKOZA, Uroš et al. Eslicarbazepine acetate reduces trigeminal nociception: Possible role of adrenergic, cholinergic and opioid receptors. **Life sciences**, v. 214, p. 167-175, 2018;
- POZZI MALHEIROS, Rafael; MAPELLI, Ana Maria; LUCAS MACHADO, Luciana. Atividades antioxidante e alelopática de extratos foliares obtidos de *Eugenia dysenterica*. **Ciência e Natura**, v. 38, n. 2, 2016;
- PUIG, S.; SORKIN, L. S. Formalin-evoked activity in identified primary afferent fibers: systemic lidocaine suppresses phase-2 activity. **Pain**, v. 64, n. 2, p. 345-355, 1996;
- ROESLER, Roberta et al. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 53-60, 2007;
- SEABRA, Carolina Isabel Ribeiro. **Farmacocinética do ibuprofeno**. 2015. Tese de Doutorado. [sn];
- SILVA, Sandra Márcia Mazuti et al. *Eugenia dysenterica* Mart. Ex DC.(cagaita): planta brasileira com potencial terapêutico. **Revista Infarma Ciências Farmacêuticas**, v. 27, n. 1, p. 49-95, 2015;
- SILVA, Sandra Márcia Mazutti da. Avaliação da atividade antimicrobiana de espécies vegetais do bioma Cerrado. 2014;
- SOUZA, Paula Monteiro de et al. Inhibitory activity of α -amylase and α -glucosidase by plant extracts from the Brazilian cerrado. *Planta medica*, v. 78, n. 04, p. 393-399, 2012;.
- THOMAZ, Douglas Vieira et al. Antioxidant and Neuroprotective Properties of *Eugenia dysenterica* Leaves. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2018, 2018;

UETA, Beatriz et al. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DA CATEQUINA E ANÁLISE COMPARATIVA COM AS VITAMINAS A E C. **III SIMPÓSIO DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**. 2014;

VELOSO, Juvenal Henrique. O gênero Eugenia: da química à farmacologia. 2016;

VICENTINI, Fabiana Testa Moura de Carvalho. **Efeito fotoquimioprotetor de quercetina incorporada em microemulsão contra os danos na pele causados pela radiação ultravioleta**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo;

XIANG, Yukai et al. Brusatol enhances the chemotherapy efficacy of gemcitabine in pancreatic cancer via the Nrf2 signalling pathway. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2018, 2018;

ZAPATA-MORALES, Juan R. et al. Participation of ATP-sensitive K⁺ channels and μ -opioid receptors in the antinociceptive synergism of the paracetamol–tapentadol co-administration in the formalin-induced pain assay in mice. **Drug development research**, v. 79, n. 8, p. 400-405, 2018;

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

ANEXO

Anexo A - Declarações de aprovação do projeto pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA).



Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso Animal

Brasília, 14 de junho de 2018.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado **"ESTUDO DOS MECANISMOS DE CRONIFICAÇÃO DA DOR PÓS-INCISIONAL: PAPEL DA VIA KEAP/NRF2."** Protocolo n.º 53/2018, sob responsabilidade da Professora Mani Indiana Funez foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) da Universidade de Brasília. Este projeto foi aprovado para utilização de: *Rattus norvegicus* (170 machos). A presente aprovação é válida pelo período de: 29/06/2018 a 29/06/2020.





Prof. Dr. Cássio José da Silva
Coordenador da CEUA – UnB



*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.



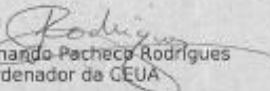
Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comitê de Ética no Uso Animal

Brasília, 19 de março de 2014.


DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado **"DESENVOLVIMENTO DE MODELO EXPERIMENTAL PARA O ESTUDO DOS MECANISMOS DE CRONIFICAÇÃO DA DOR PÓS-OPERATÓRIA"**, UnBDOC n.º 10100/2014, sob responsabilidade da Professora Mani Indiana Funez foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.





Prof. Dr. Fernando Pacheco Rodrigues
Coordenador da CEUA



*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.