UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DE PARTES AÉREAS DE *Portulaca pilosa* L. (PORTULACACEAE).

Fabrício Alexopulos Ferreira

BELÉM - PA
2012

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DE PARTES AÉREAS DE *Portulaca pilosa* L. (PORTULACACEAE).

Autor: Fabrício Alexopulos Ferreira
Orientador: Prof. Dr. Pergentino José da Cunha Sousa
Co-orientador: Profª. Dra. Maria Fani Dolabela

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos e Medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

BELÉM – PA
2012

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca do Instituto de Ciências da Saúde – UFPA

Ferreira, Fabrício Alexopulos

Avaliação das atividades antinociceptiva e anti-inflamatória do extrato hidroetanólico de partes aéreas de *Portulaca pilosa* L. (PORTULACACEAE) / Fabrício Alexopulos Ferreira ; orientador, Pergentino José da Cunha Sousa, co- orientadora, Maria Fani Dolabela - 2012.
121 fls.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde, Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF). Belém, 2012.

1. Atividade anti-inflamatória. 2. Atividade antinociceptiva. 3. Plantas medicinais. 4. *Portulaca pilosa*. I. Título.

CDD: 22.ed. : 615.321

FOLHA DE APROVAÇÃO

Fabrício Alexopulos Ferreira

AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DE PARTES AÉREAS DE *Portulaca pilosa* L. (PORTULACACEAE).

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos e Medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em 30 de Agosto de 2012

Banca Examinadora

Prof. Dr. Pergentino José da Cunha Sousa (Orientador)
Instituição: ICS/UFPA Assinatura:_____

Profª Drª Marta Chagas Monteiro – UFPA (Examinador)
Instituição: ICS/UFPA Assinatura:_____

Profª. Dra. Gilmara de Nazareth Tavares Bastos- UFPA (Examinador)
Instituição: ICB/UFPA Assinatura:_____

Dedico a todas as pessoas que me impulsionaram e acreditaram que tudo daria certo no curso de sua realização. Em especial, dedico à minha esposa, filhos, meus pais e irmãos.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, pelo seu favor imerecido em conceder-me vida, saúde e todas as demais condições necessárias para eu realizar este trabalho.

À minha esposa por todo carinho, incentivo, amizade, dedicação e ajuda dispensada a mim, inclusive me auxiliando nos experimentos aos finais de semana e feriados.

Aos meus queridos filhos Clara Sophia e Petrus, os quais, sem necessitar proferir uma só palavra, me impulsionam a crescer no conhecimento e na humanidade.

Ao meu pai (*in memorian*) e minha mãe pela criação que me proporcionaram e por todo esforço despendido para que eu pudesse galgar patamares mais elevados.

Ao meu prezado orientador Prof. Dr. Pergentino José da Cunha Sousa, pela orientação e confiança dispensados, além dos conhecimentos compartilhados e por sua amizade.

Ao colega e amigo João Borges, pessoa indispensável à realização deste trabalho. Obrigado por toda consideração e amizade.

Ao colega Reginaldo, diretor do Biotério do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará.

Ao senhor Amarildo por toda a consideração para conseguir animais necessários aos experimentos.

À Profª Dra. Maria Fani Dolabela pela co-orientação e inclusão no projeto, bem como pelo apoio sempre disponível para que este trabalho fosse realizado.

Ao colega da Pós-graduação Ademar Soares pela ajuda nos experimentos e pela amizade.

Aos colegas Karen Maciel e Gedeão também pela ajuda na realização de alguns experimentos e pelo coleguismo.

Aos colegas Bruno Pinheiro e Andressa Santa Brígida, Luís Fábio, Jailton e César Cursino e Anderson Bentes pela amizade e troca de conhecimentos valiosos.

Aos demais colegas da Pós-graduação pelo companheirismo e cordialidade durante esses mais de dois anos.

À Profª Dra. Cristiane Maia e Profº Dr. Flávio Vasconcelos pela participação na banca do exame de qualificação e pelas sugestões, as quais certamente foram de grande valia.

À Universidade Federal do Pará por ter sido “minha casa científica” durante anos e por toda estrutura a mim oferecida para desenvolver este trabalho.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pará (PPGCF) pelo esforço em proporcionar condições para formação de profissionais com padrão de excelência.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de incentivo, que muito contribuiu para a realização deste projeto.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Pará (FAPESPA) pelo financiamento do projeto ao qual este trabalho está vinculado.

Ao instituto Evandro Chagas (IEC) pelo fornecimento dos animais experimentais utilizados.

E a todas as pessoas que de maneira direita ou indireta contribuíram para o desenvolvimento desta dissertação.

.

'"*Há verdadeiramente duas coisas diferentes: saber e crer que se sabe. A ciência consiste em saber; em crer que se sabe reside a ignorância".*

Hipócrates

RESUMO

FERREIRA, F.A. **AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DO EXTRATO HIDROETANÓLICO DE PARTES AÉREAS DE *Portulaca pilosa* L. (PORTULACACEAE)**. 121f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém-PA, 2012.

Este estudo investigou a toxicidade aguda oral, o efeito antinociceptivo em modelos de nocicepção química e térmica, bem como a atividade anti-inflamatória em modelos de carragenina e óleo de cróton do extrato hidroetanólico de partes aéreas de *Portulaca pilosa* (EHEPp). Identificou também alguns possíveis mecanismos envolvidos na antinocicepção do extrato, além dos seus efeitos sobre o sistema nervoso central de ratos. No teste de toxicidade aguda oral, o tratamento com EHEPp (2000 mg/kg) não causou óbitos. No teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético, o EHEPp (100, 200, 400 e 600 mg/kg), por via oral (v.o.), reduziu significantemente o número de contorções em 18.18, 33.25, 47.27, 65.81 e 73.94%, respectivamente. No teste da placa quente, o tratamento com EHEPp (200, 400 e 600 mg/kg, v.o.) não alterou a latência ao estímulo térmico de 50 ± 0,5 ºC. No teste da formalina, o tratamento com EHEPp (200,400 e 600mg/kg, v.o.) reduziu de maneira significativa o tempo de lambida nas fases neurogênica (1ª fase) em 38.79, 60.61 e 75.18 %, e inflamatória (2ª fase) em 49.23, 53.03 e 87.53 %, respectivamente. A administração prévia de naloxona reverteu, significativamente, o efeito do EHEPp (600 mg/kg, v.o.) em ambas as fases do teste da formalina. O pré-tratamento com o L-NAME e azul de metileno reverteu o efeito do EHEPp (600 mg/kg, v.o.) de maneira significante em ambas as fases do teste da formalina. O pré-tratamento com o fármaco glibenclamida também reverteu de maneira significativa o efeito do EHEPp (600 mg/kg, v.o.) em ambas as fases do teste da formalina. O EHEPp, na dose 600 mg/kg, v.o., não afetou a atividade locomotora dos ratos submetidos ao teste do campo aberto. No teste de edema de pata induzido por carragenina e edema de orelha induzido pelo óleo cróton, o EHEPp (400 e 600 mg/kg, v.o.) não inibiu a formação de edema de maneira significante em ambos os testes. Os resultados deste estudo mostraram que o HEEPp, oralmente, apresentou baixa toxicidade e sua atuação antinociceptiva observada na fase neurogênica pode envolver interações periféricas com receptores opióides e ativação da via NO/GCs/GMPc/K_{ATP}. Já a atividade antinociceptiva observada na fase inflamatória parece não depender de inibição da via bioquímica fosfolipase A_2/ciclo-oxigenases, mas de interações periféricas com receptores opióides e com a via NO/GCs/GMPc/K_{ATP}.

Palavras-chave: Atividade anti-inflamatória, atividade antinociceptiva, plantas medicinais, *Portulaca pilosa*.

ABSTRACT

FERREIRA, F.A. **EVALUATION OF ANTINOCICEPTIVE AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITIES OF HYDROETHANOLIC EXTRACT FROM AERIAL PARTS OF *Portulaca Pilosa* L. (PORTULACACEAE)**. 121f. Thesis (Master). Post Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Institute of Health Sciences, Federal University of Pará, Belém-PA, 2012.

This study investigated the acute oral toxicity, the antinociceptive effect in chemical and thermal nociception models as such as the anti-inflammatory activity in carrageenan and croton oil models of the hydroethanolic extract from aerial parts of *Portulaca pilosa* (HEEPp). Also identified some possible mechanism involved in antinociception of the extract as such as the effects of HEEPp on central nervous system of rats. In the oral acute toxicity test, the treatment with HEEPp (2000 mg/kg) caused no deaths. In the acetic acid-induced writhing test, the HEEPp (100, 200, 400 and 600 mg/kg) administered by oral route (p.o.) significantly reduced the number of contortions acetic acid-induced in 18.18, 33.25, 47.27, 65.81 e 73.94%, respectively. In the hot plate test, the treatment with HEEPp (200, 400 e 600 mg/kg, p.o.) did not alter the latency to the thermal stimuli of 50 ± 0,5 ºC. In the formalin test, the treatment with HEEPp (200, 400 e 600 mg/kg, p.o.) significantly reduced the licking-time in neurogenic phase (first phase) in 38.79, 60.61 and 75.18 %, and inflammatory phase (second phase) in 49.23, 53.03 e 87.53 %, respectively. The previous naloxone administration, significantly reversed the effect of HEEPp (600 mg/kg, p.o.) in both phases of the formalin test. The pre-treatment with L-NAME and methylene blue significantly reversed the effect of HEEPp (600 mg/kg, p.o.) in both phases of the formalin test. The pre-treatment with glibenclamide also significantly reversed the effect of HEEPp (600 mg/kg, p.o.) in both phases of the formalin test. HEEPp (600 mg/kg, p.o.) did not affect the locomotor activity of rats in the open field test. In the carrageenan-induced paw edema and croton-induced ear edema, the HEEPp (400 and 600 mg/kg, p.o.) did not inhibit significantly the edema formation in both the tests. The results of this study showed that HEEPp, when administered by oral route, presented low toxicity and its antinociceptive actuation observed in neurogenic phase involves peripherals interaction with opioids receptors and activation of the in the NO/GCs/GMPc/K_{ATP} pathway. Already the antinociceptive activity observed in the inflammatory phase does not seem to depend of the inhibition on via phospholipase A_2/cyclooxygenases, but interaction with peripheral opioid receptors and the NO/sGC /cGMP/K_{ATP} pathway.

Keywords: Anti-inflammatory activity, antinociceptive activity, medicinal plants, *Portulaca pilosa*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Imagem ilustrativa da espécie *Portulaca pilosa*..... 28

Figura 2 Representação esquemática das vias neuroanatômicas envolvidas com o processamento da dor..... 30

Figura 3 Diagrama do modelo da teoria de controle do portão sugerida por Melzack e Wall..... 35

Figura 4 Modelo da teoria de controle do portão revisada..... 36

Figura 5 Representação geoespacial da área de coleta da espécie *Portulaca pilosa* L..... 54

Figura 6 Representação esquemática de arena para a realização do teste do campo aberto..... 60

Figura 7 Efeito do EHEPp e da indometacina (v.o.) sobre as contorções abdominais induzidas pela administração intraperitoneal de ácido acético a 0,6%..... 64

Figura 8 Efeito do tratamento com EHEPp e morfina sobre a resposta nociceptiva induzida pela placa quente a 50 ºC ± 0,5 ºC..... 67

Figura 9 Efeitos do tratamento oral com EHEPp (100, 200, 400 e 600 mg/kg) sobre a resposta nociceptiva induzida pela injeção intraplantar de formalina a 1%..... 69

Figura 10 Efeito do pré-tratamento com o antagonista opióide naloxona (0,4 mg/kg, s.c.) sobre o efeito antinociceptivo do EHEPp (600 mg/kg, v.o.) e da morfina (4 mg/kg, s.c.) no teste da formalina em camundongos..... 72

Figura 11 Efeito do pré-tratamento com os inibidores da óxido nítrico sintase (L-NAME 20 mg/kg, i.p.) e da guanilato ciclase solúvel (azul de metileno (AM) 1 mg/kg, i.p.) sobre o efeito antinociceptivo do EHEPp (600 mg/kg, v.o.) no teste da

formalina em camundongos..... 75

Figura 12 Efeito do pré-tratamento com o bloqueador de canais de potássio sensíveis a ATP glibenclamida (GLIB, 10 mg/kg, i.p.) sobre o efeito antinociceptivo do EHEPp (600 mg/kg, v.o.) no teste da formalina em camundongos..... 77

Figura 13 Efeito do tratamento com o EHEPp (400 e 600 mg/kg, v.o.) ou indometacina (10 mg/kg, v.o.) sobre a resposta inflamatória induzida pela injeção intraplantar de carragenina a 1% em ratos..... 81

Figura 14 Efeito do pré-tratamento com o EHEPp (400 e 600 mg/kg, v.o.) ou dexametasona (10 mg/kg, v.o.) sobre o processo inflamatório induzido pela aplicação tópica de óleo de cróton em orelha de camundongos..... 83

Figura 15 Representação esquemática da base molecular da antinocicepção periférica do EHEPp..... 86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Efeito do EHEPp e da indometacina sobre as contorções abdominais induzidas pela injeção de ácido acético (i.p.) em camundongos..... 113

Tabela 2 Efeito do EHEPp (v.o.) e da morfina (s.c.) sobre a nocicepção induzida termicamente em camundongos..... 114

Tabela 3 Efeito do EHEPp (v.o.) sobre a nocicepção induzida pela injeção de formalina (i.pl.) a 1% em camundongos..... 115

Tabela 4 Efeito do EHEPp (v.o.) e da morfina (s.c.) no teste da formalina a 1% em camundongos pré-tratados com o antagonista opióide naloxona (s.c.)..... 116

Tabela 5 Efeito do EHEPp no teste da formalina a 1% em camundongos pré-tratados com os inibidores da NO sintase e guanilato ciclase solúvel (L-LAME e Azul de metileno (AM), respectivamente)..... 117

Tabela 6 Efeito do EHEPp no teste da formalina a 1% em camundongos pré-tratados com o bloqueador de canais de potássio sensíveis a ATP Glibenclamida (Glib)..... 118

Tabela 7 Efeito do EHEPp (v.o.) e da indometacina (v.o.) sobre o edema de pata induzido pela injeção intraplantar de carragenina a 1% em ratos..... 119

Tabela 8 Efeito do EHEPp (v.o.) e da dexametasona (v.o.) sobre o edema de orelha em camundongos induzido pela aplicação tópica de óleo de cróton..... 120

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

5-HT	Serotonina
AA	Ácido araquidônico
ACP	Área cinzenta periaquedutal
AM	Azul de metileno
AMPc	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
ANOVA	Análise de variância
ATP	Adenosina trifosfato
ATPi	Adenodina trifosfato intracellular
Bk	Bradicinina
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
COX-1	Ciclooxigenase 1
COX-2	Ciclooxigenase 2
DE_{50}	Dose Efetiva Mediana
DL_{50}	Dose Letal Mediana
EHEPp	Extrato Hidroetanólico de *Portulaca pilosa*
eNOS	Óxido nítrico sintase endotelial
E.P.M	Erro padrão da média
FAINES	Fármacos antiinflamatórios não-esteroidais
GABA	Ácido gama-aminobutírico
GC	Guanilato ciclase
GCs	Guanilato ciclase solúvel
GMPc	Guanosina-3'-5'-monofosfato cíclico
HIS	Histamina
IASP	*International Association for the Study of Pain*- AssociaçãoInternacional para o Estudo da Dor
ICAM-1	Moléculas de adesão intercelular-1
IEC	Instituto Evandro Chagas
IL-1	Interleucina 1
IL- 1β	Interleucina 1beta

iNOS	óxido nítrico sintase induzida
i.p	Via intraperitoneal
i.pl	Via intraplantar
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
IUPHAR	Do inglês *International Union of Pharmacology*- União internacional de farmacologia
JAKs	Janus Kinase
K_{CA}	Canais de potássio ativados por
K_{ir}	Canais de potássio retificadores de entrada
K_v	Canais de potássio operados por voltagem
K_{ATP}	Canais de potássio sensíveis a ATP
K_{2p}	Canais de K^+ de dois poros
LTB_4	Leucotrieno B_4
LTs	Leucotrienos
LXs	Lipoxinas
NG	Núcleo gingantocelular
NGF	Fator de Crescimento Neural
NMDA	N-metil-D- aspartato
MRVM	Medula rostral ventromedial
NPG	Núcleo paragigantocelular
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintase
OECD	Organization for Economic Cooperation and Development- Organização para a Cooperação Econômica e o Desenvimento.
OMS	Organização Mundial de Saúde
PGD_2	Prostaglandina D_2
PGE_2	Prostaglandina E_2
$PGF_{2\alpha}$	Prostaglandina $F_{2\alpha}$
PGI_2	Prostaciclina
PGs	Prostaglandinas
PLA_2	Fosfolipase A_2

PKC	Proteína quinase C
PKG	Proteína quinase dependente de GMP cíclico
RENISUS	Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS.
RMN	Ressonância magnética nuclear
s.c.	Via subcutânea
SNC	Sistema Nervoso Central
STAT	*Signal transducers and activators of transcription*- Transdutores de sinal e ativadores transcricionais
SUS	Sistema Único de Saúde
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral Alfa
v.o.	Via oral
VCAM	Molécula de adesão celular vascular

LISTA DE SÍMBOLOS E UNIDADES

α	Alfa
β	Beta
δ	Delta
κ	Kappa
µL	Microlitro
ºC	Graus Celsius
cm	Centímetro
g	Grama
h	Hora
L	Litro
mg	Miligrama
mL	Mililitro
m.s	Metros por segundo
v/v	Volume por volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO ... 20
1.1 Plantas medicinais e produtos naturais: contexto histórico e usos 20
2 REVISÃO DA LITERATURA 23
2.1 Plantas medicinais e fitoterápicos no contexto do Sistema Único de Saúde Brasileiro-SUS..... 23
2.2 A Família Portulacaceae 24
2.3 O gênero Portulaca..... 25
2.4 A espécie *Portulaca pilosa* L..... 26
2.5 Fisiopatologia da dor..... 28
2.5.1 A DOR 28
2.5.2 NOCICEPÇÃO: OS NOCICEPTORES E A VIA NOCICEPTIVA..... 31
2.5.3 MODULAÇÃO DA VIA NOCICEPTIVA 34
2.5.3.1 Modulação à nível espinhal: a teoria do controle do portão 34
2.5.3.2 Modulação central das vias nociceptivas: as vias descendentes inibitórias..... 36
2.5.4 A DOR INFLAMATÓRIA..... 37
2.6 Vias bioquímicas moduladores do processamento nociceptivo 38
2.6.1 A VIA ÓXIDO NÍTRICO/GUANILATO CICLASE/GMPc 38
2.6.2 CANAIS DE POTÁSSIO SENSÍVEIS A ATP..... 40
2.7 Inflamação: Aspectos gerais..... 43
2.7.1 COMPONENTES CELULARES E VASCULARES DAS RESPOSTAS INFLAMATÓRIAS 43
2.7.2 ALGUNS MEDIADORES E EFETORES DAS RESPOSTAS INFLAMATÓRIAS 45
2.7.2.1 Histamina 45
2.7.2.2 Serotonina..... 46
2.7.2.3 Bradicinina..... 46
2.7.2.4 Eicosanóides 47
2.7.2.5 Citocinas..... 48
3 OBJETIVOS..... 50
3.1 Objetivo geral 50

3.2 Objetivos específicos..... 50
4 MATERIAL E MÉTODOS..... 51
4.1 Materiais e reagentes utilizados..... 51
4.1.1 EQUIPAMENTOS E MATERIAIS NECESSÁRIOS..... 51
4.1.2 REAGENTES E SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS..... 52
4.2 Coleta do material botânico e obtenção do extrato 52
4.3 Animais experimentais 54
4.4 Avaliação de toxicidade aguda 55
4.5 Avaliação da atividade antinociceptiva..... 56
4.5.1CONTORÇÕES ABDOMINAIS INDUZIDAS PELA
INJEÇÃO INTRAPERITONEAL DE ÁCIDO ACÉTICO A 0,6%..... 56
4.5.2 TESTE DA PLACA QUENTE 56
4.5.3 TESTE DA FORMALINA 57
4.6 Estudo do mecanismo de ação do EHEPp..... 58
4.6.1 AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DO SISTEMA OPIÓIDE 58
4.6.2 AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DE CANAIS DE POTÁSSIO
SENSÍVEIS A ATP 59
4.6.3 AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DA VIA ÓXIDO
NÍTRICO/GUANILATO CICLASE/GMPc..... 59
4.7 Avaliação dos efeitos do EHEPp sobre o sistema nervoso
central de ratos..... 60
4.8 Avaliação da atividade anti-inflamatória 61
4.8.1 EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA 61
4.8.2 DERMATITE INDUZIDA PELA APLICAÇÃO TÓPICA DE ÓLEO
DE CRÓTON..... 61
4.9 Análise estatística 62
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 63
5.1 Toxicidade aguda oral..... 63
5.2 Avaliação da atividade antinociceptiva..... 64
5.2.1 TESTE DE CONTORÇÕES ABDOMINAIS INDUZIDAS POR
ÁCIDO ACÉTICO 0,6%..... 64
5.2.2 TESTE DA PLACA QUENTE 66
5.2.3 TESTE DA FORMALINA 68
5.3 Estudo do mecanismo de ação do EHEPp..... 71

5.3.1 AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DO SISTEMA OPIÓIDE 71
5.3.2 AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DA VIA ÓXIDO NÍTRICO/GUANILATO CICLASE/GMPc..... 74
5.3.3 AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DE CANAIS DE POTÁSSIO SENSÍVEIS A ATP 77
5.4 Avaliação dos efeitos do EHEPp sobre o sistema nervoso central (SNC)..... 79
5.5 Avaliação da atividade anti-inflamatória do EHEPp..... 80
5.5.1 EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA 80
5.5.2 DERMATITE INDUZIDA PELO ÓLEO DE CRÓTON..... 83
6 CONCLUSÕES..... 85
7 REFERÊNCIAS..... 87
APÊNDICES-TABELAS 112
Parecer Técnico do Comitê de Ética 124

1 INTRODUÇÃO

1.1 Plantas medicinais e produtos naturais: contexto histórico e usos

O uso de plantas pelo homem para aliviar ou curar seus males data de tempos extensamente antigos, estimando-se que, desde a pré-história, o homem já aproveitava os princípios ativos existentes nas plantas, embora o emprego desses elementos como ferramenta terapêutica tenha sido altamente empírico e intuitivo, e as descobertas derivadas de tais usos, ocorressem ao acaso (MORS, 1982; BERG, 1987; KIRBY, 1996; PINTO, SANTIAGO e LAMEIRA, 2002). Nesse contexto, acredita-se que a utilização de plantas medicinais pelo homem seja tão antiga quanto a própria civilização (YAMADA, 1998).

É possível que o registro mais antigo do uso de plantas medicinais seja na China, por volta do ano 5000 a.C., onde os chineses já possuiam listagens de drogas de origem vegetal. O chinês Sheu-ing, em 3000 a.C., dedicava-se ao cultivo de plantas medicinais, além do que o imperador Cho-Chin-Kei, o “Hipócrates chinês”, possuía a mais destacada obra da farmacognosia chinesa antiga, na qual é destacada a cura de todos os males pela raiz de ginseng (MARTINS et al. 1995). Vários textos dessa época tratam de documentos religiosos, denotando a tradicional associação entre aspectos filosóficos e espirituais aplicados às medicinas chinesa, islâmica e ayurvédica (BOTSARIS, 1995).

Já nas antigas civilizações ocidentais, os primeiros registros datam de 1500 a.C., quando foi escrito o manuscrito egípcio “Papiro de Ebers”, considerado um dos mais importantes livros da cultura médica. A partir desse manuscrito, o velho mundo tomou ciência de uma farmacopéia egípcia contendo diversas espécies vegetais, o qual continha aproximadamente 800 receitas e referências a mais de 700 drogas (ALMEIDA, 2000). Além disso, foram encontrados alguns textos antigos caldeus, babilônicos e egípcios que já relatavam o uso de algumas plantas em rituais religiosos. Vários outros papiros foram encontrados por pesquisadores contendo receituários médicos que incluíam plantas em mistura com outras substâncias (BERG, 1993; LOW, RODD e BERESFO, 1999).

Nos tempos modernos, por sua vez, os produtos naturais extraídos de plantas passaram a exercer um importante papel no processo de descoberta de fármacos, seja como modelos estruturais para a síntese de moléculas novas ou pelas suas propriedades farmacológicas. Tradicionalmente, acredita-se que produtos formulados com essas matérias-primas, especialmente plantas, produzem ação desejada causando menos efeitos tóxicos que os de origem sintética, levando ao emprego crescente dos mesmos tanto como medicamentos quanto cosméticos (YAMAMOTO et al. 2004).

No contexto brasileiro, por sua vez, os órgãos governamentais, inicialmente, recomendaram a implementação da fitoterapia como um sólido recurso terapêutico no atendimento de algumas necessidades básicas dos serviços de saúde, mas que deveria ocorrer segundo parâmetros de qualidade, eficácia e segurança (SOUZA et al. 2003). Dessa maneira, tornou-se essencial o estudo de plantas medicinais em seus contextos farmacognósticos e fitoquímico por meio do uso de ferramentas fundamentais como os diversos métodos cromatográficos (cromatografia em camada delgada, cromatografia líquida de alta eficiência, cromatografia gasosa, etc.), para garantir a qualidade de seus extratos, pois grande parte do conhecimento relativo à utilização de plantas medicinais no Brasil ainda é fundamentado no uso popular (YUNES, PEDROSA e CECHINEL FILHO, 2001).

O uso de plantas medicinais como agentes analgésicos e anti-inflamatórios é uma prática comum entre várias comunidades no Brasil e no mundo inteiro, além do que essas têm sido alvo de estudos em vários modelos experimentais de dor e inflamação como os testes de contorções abdominais, formalina, placa quente e edema induzido por carragenina (SOUSA et al. 2007b; SILVÉRIO et al. 2008), ferrramentas que podem ser usadas como estratégia para a descoberta de novos fármacos de origem vegetal (PATWARDHAN, VAIDYA e CHORGHADE, 2004; SAMY e GOPALAKRISHNAKONE, 2008).

Assim, uma vez que dados etnomédicos mostram que *P. pilosa* é usada na medicina popular como analgésico e para tratamento de inflamações; em função da carência e insubsistência de estudos científicos tecnicamente seguros sobre a espécie e inclusão de *P. pilosa* na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS), este estudo buscou avaliar os efeitos do extrato hidroetanólico de partes aéreas de *Portulaca pilosa* (EHEPp) em modelos animais de nocicepção e inflamação no intuito contribuir com dados que subsidiem seu uso

racional, seguro e eficaz, parâmetros de importância fundamental para a operacionalização da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos do Sistema Único de Saúde brasileiro (SUS).

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Plantas medicinais e fitoterápicos no contexto do Sistema Único de Saúde Brasileiro-SUS.

No que se refere ao uso de plantas medicinais no contexto da saúde pública, nas discussões da Conferência Internacional sobre Atenção Primária à Saúde de Alma-Ata, a Organização Mundial de Saúde (OMS) recomendou aos governos, médicos e autoridades sanitárias dos países em desenvolvimento que levassem em consideração os muitos recursos da medicina popular, incorporando essas formas culturalmente aceitas pelo povo. A OMS, preocupada com as doenças endêmicas, e com o crescimento da incidência de doenças crônicas e degenerativas, mostrava a importância das medicinas regionais como excelentes recursos auxiliares dos sistemas organizados de saúde (OLIVEIRA, 1985).

O Brasil, por sua vez, foi sensibilizado com as recomendações da OMS, passando a desenvolver um crescente interesse popular e institucional no sentido da inserção de plantas medicinais na saúde pública brasileira, o que levou a realizações de conferências que pautavam sobre o assunto, cujas deliberações estavam voltadas ao desenvolvimento de uma política brasileira de plantas medicinais e medicamentos fitoterápicos, bem como a inserção desses elementos na atenção à saúde no âmbito do SUS. Dessa forma, como consequência desse processo, o relatório da **8ª Conferência Nacional de Saúde** já preconizava a introdução de práticas alternativas no SUS e ao acesso democrático de escolher a terapêutica preferida (CONFERÊNCIA NACIONAL DE SAÚDE, 1986). E, como resultado direto desse evento, dez anos mais tarde, a **10ª Conferência Nacional de Saúde** já contemplava a fitoterapia e o uso de plantas medicinais como práticas alternativas dentro da Assistência Farmacêutica Pública Brasileira, bem como incentivava o fomento à pesquisa na área por parte das agências oficiais (CONFERÊNCIA NACIONAL DE SAÚDE, 1996).

Foi, entretanto, com a **1ª Conferência Nacional de Medicamentos e Assistência Farmacêutica** que foram aprovadas inúmeras propostas dentro da área de **Fitoterápicos/Biodiversidade/Homeopáticos**, entre as quais a

institucionalização do apoio e incentivo financeiro de pesquisas e desenvolvimento de práticas de cultivo de plantas medicinais; apoio à criação de pólos regionais para a produção de fitoterápicos, com ênfase nas espécies regionais; inserção dos fitoterápicos na RENAME com vistas à normatização desses na **Política Nacional de Assistência Farmacêutica** (CONFERÊNCIA NACIONAL DE MEDICAMENTOS E ASSISTÊNCIA FARMACÊUTICA, 2005).

Além desses instrumentos legais para incentivo da implantação de uma política de plantas medicinais e fitoterápicos, foi editada também a **Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares do SUS**, instituída por meio da portaria nº 971 de 4 de maio de 2006, a qual, no domínio das plantas medicinais e fitoterapia, propôs várias diretrizes importantes tangentes à consolidação do uso de produtos vegetais na saúde pública, como é o exemplo da elaboração na **Relação nacional de Plantas Medicinais de interesse ao SUS (RENISUS)** e **Relação Nacional de Fitoterápicos**; incentivo à pesquisa e desenvolvimento de plantas medicinais e fitoterápicos com atenção à biodiversidade do país; promoção do uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos no SUS (BRASIL, 2006).

Finalmente, em 22 de Junho de 2006 foi assinado o decreto que aprovou a **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**, dotada de um caráter bem mais abrangente que as normativas anteriores, alcançando o assunto de plantas medicinais e fitoterápicos dentro de um contexto econômico, referente à toda cadeia produtiva; em um contexto intelectual, calcado no incentivo à pesquisa e produção de conhecimento científico, bem como, também, tendo um alcance social, onde remete à valorização do conhecimento popular e culturas regionais (BRASIL, 2006).

2.2 A família Portulacaceae

A família Portulacaceae inclui cerca de 30 gêneros e 500 espécies, que se distribuem principalmente no oeste da América do Norte, América do Sul e África, com alguns poucos representantes sendo encontrados na Europa e Ásia. É constituída por plantas perenes ou anuais de hábito herbáceo e arbustivo, muitas vezes suculentas e, frequentemente, contendo mucilagem nas células

parenquimáticas do caule e das folhas (METCALFE e CHALK, 1985). Outras características incluem a presença de dois sepalóides, presença de frutos capsulares consistindo de três carpelos fundidos com poucas à numerosas sementes (CAROLIN, 1993; TAKHTAJAN, 1997 e 2009). São vegetais que apresentam folhas alternadas ou raramente opostas, inflorescências terminais, flores sésseis à pediculadas, numerosos estames (no mínimo 4), ovário semi-inferior unifolicular e óvulos numerosos (NYFFELER e EGGLI, 2010).

Essa família distribui-se largamente nos trópicos e subtrópicos, sendo rara em climas temperados, ocorrendo no Brasil, aproximadamente, 30 espécies, pertencentes aos gêneros *Portulaca* e *Talinum* (SOUZA e LORENZI, 2005).

2.3 O gênero *Portulaca*

O gênero *Portulaca* inclui plantas de hábito herbáceo, de consistência carnosa, anuais ou perenes, dependendo da espécie, com folhas alternas, inflorescências em cimeira, 2 sépalas, de quatro a cinco pétalas livres, estames geralmente numerosos, ovário ínfero e cápsula com deiscência longitudinal ou transversal. Está amplamente distribuído nos neotrópicos tropicais e subtropicais da África, ocorrendo, também, algumas poucas espécies na Austrália, Ásia e Europa (COELHO et al. 2010).

O trabalho mais amplo sobre este gênero reconheceu 62 espécies para as Américas, 21 das quais eram referidas para o Brasil (LEGRAND, 1962). Apesar dessa grande variação morfológica ao nível das espécies, o gênero com um todo é de fácil reconhecimento em relação aos outros da família, sendo considerado monofilético quando submetido a análises moleculares filogenéticas (APPLEQUIST e WALLACE, 2001).

Poucos estudos referentes à família Portulacaceae, em especial ao gênero *Portulaca*, têm sido realizados no Brasil e, ainda, a base para a classificação taxonômica no país, para o gênero, são os dados extraídos da "*Flora Brasiliensis*", os quais reconhecem oito espécies (RORHBACH, 1872). Além disso, foram realizados vários levantamentos regionais sobre o gênero, como para o Rio de Janeiro (TEIXEIRA, 1959), para o município de São Joaquim, Rio Grande do Sul

(MATTOS, 1961), para o estado de Pernambuco (LIMA e LIMA, 1968), para o estado de São Paulo (RODRIGUES e FURLAN, 2002) e para a Bahia (COELHO e GIULIETTI, 2006).

Alguns membros desse gênero exibem marcantes atividades biológicas, como a espécie *Portulaca oleracea*, a qual demonstrou ser eficaz no tratamento cognitivo de camundongos senescentes e exibiu atividade antioxidante frente a dano oxidativo induzido por D-galactose (WANG e YANG, 2010). Outros estudos mostraram que essa espécie exerce atividade antinociceptiva e anti-inflamatória em modelos animais experimentais (CHAN et al. 2000). Foi demonstrado também que outras espécies desse gênero como *Portulaca hirsutissima* e *Portulaca Wedermannii* exercem efeitos anti-leishmanicida e atividades imunomoduladoras em ensaios *in vivo* e *in vitro* (COSTA et al. 2007). Além desses efeitos, a literatura também descreve muitas outras propriedades de espécies desse gênero, entre as quais o efeito broncodilatador (MALEK et al. 2004), ações mio-relaxantes sobre músculo esquelético (OKWUASABA, EJIKE e PARRY, 1986 e 1987) e músculo liso intestinal (PARRY et al. 1987), e abertura de canais de potássio (HABTEMARIAM, HARVEY e WATERMAN, 1993).

Entre os constituintes isolados a partir de espécies desse gênero destacam-se ácidos graxos, como o ômega-3 (SIMOPONLOS et al. 1992), ácido α-linolênico e β-caroteno (LIU et al. 2000), compostos fenólicos (XU, YU e CHEN, 2006), e até mesmo alcalóides têm sido relatados (XIANG et al. 2005).

2.4 A espécie *Portulaca pilosa* L.

Portulaca pilosa é conhecida popularmente como “amor crescido” (BERG, 1969), a qual apresenta perfil de ampla distribuição na América tropical e sub-tropical (STEYEMARK, 2004) e, tratando-se do Brasil, é encontrado principalmente na região norte do país (PIO-CORRÊA, 1969).

Botanicamente, é uma erva que possui muitos ramos prostrados, com pêlos longos e esbranquiçados, folhas de formato cilíndrico, consistência carnosa, medindo cerca de 2 centímetros; suas flores localizam-se no ápice dos ramos,

sendo rodeadas por pêlos longos; suas pétalas são de coloração que varia da púrpura à amarelada e, seus frutos, quando maduros, são arredondados e de cor marrom, os quais se abrem por uma fenda circuncisa e com muitas sementes (BAILEY, 1949; STEYEMARK, 2004). É uma espécie com muitas subespécies, variedades e formas devido à sua plasticidade fenotípica. É utilizada também como planta ornamental (BAILEY, 1949).

Essa espécie tem sido utilizada popularmente em todo o Brasil, principalmente na região norte do país, para as mais diversas finalidades terapêuticas, por exemplo, como estomáquico, diurético, analgésico, doenças hepáticas, malária, úlceras (DA SILVA et al. 1998), diarréia, disenteria, cólicas, hemoptises, nefrites e como vermífugo (REVILLA, 2002). Suas folhas são usadas como cicatrizante na forma de compressas aplicadas topicamente para o tratamento de queimaduras e erisipelas (MORS, RIZZINI e PEREIRA, 2000), feridas, eritemas e icterícia (REVILLA, 2002).

Estudos com o extrato hidroalcoólico de *P. pilosa* verificaram que essa espécie possui efeitos sobre o sistema renal como a excreção de íons potássio, mas não apresenta ação diurética ou mudança na excreção de sódio como acreditado popularmente (ROCHA et al. 1994). A atividade de inibição de tirosinase de cogumelo *in vitro* pode tornar a espécie passível de ser utilizada no tratamento de melanomas, se essa atividade for confirmada em testes que utilizem melanócitos humanos (BAURIN et al. 2002).

Além dos efeitos anteriormente citados, a espécie em estudo também é utilizada, no Brasil, na formulação de xampus para queda de cabelo e como fortalecedor do crescimento capilar, sendo por isso encontrada no mercado do Ver-o- Peso na forma de cremes e loções (MORS, RIZZINI e PEREIRA, 2000). Nesse contexto, relata-se que o xampú de “amor-crescido” apresenta propriedades para o fortalecimento das raízes dos cabelos, estimulando seu crescimento, além de conferir brilho e maciez, o que facilita a escovação (UFPA, 2010).

Uma vez que dados etnomédicos indicam a espécie *P. pilosa* para o tratamento de ferimentos, traumatismo e dor, este trabalho propôs-se a verificar os efeitos do extrato hidroetanólico dessa espécie em modelos experimentais de nocicepção e inflamação e verificar possíveis mecanismos envolvidos nessas ações.

Figura 1: Imagem ilustrativa da espécie *Portulaca pilosa.* Fonte: Disponível em http://www.tropicos.org/Image/100023995.

2.5 Fisiopatologia da dor

2.5.1 A DOR

Como uma das mais importantes sensações, a dor tem sido extensivamente estudada ao longo dos anos. A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP- *International Association for the Study of Pain*) a define como "*uma experiência sensorial e emocional desagradável associada com dano tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de tal dano*" (LOESER e TREEDE, 2008), sendo um fenômeno de natureza multidimensional, o qual apresenta o envolvimento de componentes discriminativos-sensoriais, afetivos-motivacionais e cognitivos-emocionais, sendo mediada por diferentes mecanismos e processados dentro de uma rede neural altamente complexa (MELZACK, 1999; SEWARDS e SEWARDS, 2002). Assim, não é uma tarefa fácil estudar fenômenos relacionados à dor, pois esta é fortemente influenciada por fatores diversos, sejam eles de natureza fisiológica, como intensidade e duração do estímulo (PERTOVAARA, KAUPPILA E

HÄMÄLÄINEN, 1996; NIELSEN e ARENDT-NIELSEN, 1998 a e b; PERTOVAARA, 1999), sejam de natureza psicológica como a atenção (MIRON, DUNCAN e BUSCHNELL, 1989; JONES e DERBYSHIRE, 1997; BROOKS et al. 2002) e a empatia (KAKIGI et al. 2004).

De acordo com a etiologia, a dor pode ser classificada como **dor nociceptiva**, resultante da ativação ou sensibilização de nociceptores periféricos; **dor inflamatória**, desencadeada pela liberação de mediadores químicos a partir de células tumorais e inflamatórias, bem como pelos tecidos periféricos, os quais ativam ou modificam as propriedades de resposta dos aferentes nociceptivos ao estímulo; e **dor neuropática**, a qual surge em virtude de injúria ou anormalidades adquiridas por parte de estruturas neurais centrais ou periféricas (ZHU e LU, 2010).

Além disso, a dor também pode ser classificada quanto à sua duração. Nesse sentido, pode apresentar-se como **aguda**, ocorrendo quando há ativação direta dos nociceptores, em virtude de uma lesão real ou potencial capaz de sensibilizar o neurônio nociceptivo; pode ser também do tipo **crônica**, quando a dor persiste por semanas a meses, podendo prolongar-se mesmo após a recuperação da lesão e reparação tecidual. Esta última modalidade de dor também se caracteriza pela incapacidade do organismo de restabelecer suas funções fisiológicas (LOESER e MELZACK, 1999).

A via neuroanatômica envolvida no processamento da dor é composta de duas partes: o sistema nervoso periférico, no qual a dor ou nocicepção são iniciados quando os nociceptores são ativados por estímulos nóxicos de natureza química, térmica ou mecânica de intensidade suficiente para alcançar o limiar de excitabilidade neuronal e, então, transmitidos por axônios aferentes primários à neurônios localizados no corno dorsal da medula espinhal e, daí, para os núcleos hipotalâmicos, os quais projetam interneurônios em direção ao córtex cerebral; e pelo sistema nervoso central, o qual permite o desencadeamento da sensação de dor por meio de mecanismos moduladores da atividade de regiões facilitatórias e inibitórias (Figura 2).

Estudos relativamente recentes demonstraram que algumas estruturas do córtex cerebral como o córtex cingulado anterior, o córtex insular e o córtex orbital ventrolateral influenciam substancialmente o processamento neural da dor, modulando-a (TALBOT et al. 1991; CASEY, 1999; TREEDE et al. 1999; VOGT e

SIKES, 2000; PLONNER e SCHNITZLER, 2004; GARCIA-LARREA e PEYRON, 2007; LIMA e FREGNI 2008; TANG et al. 2008).

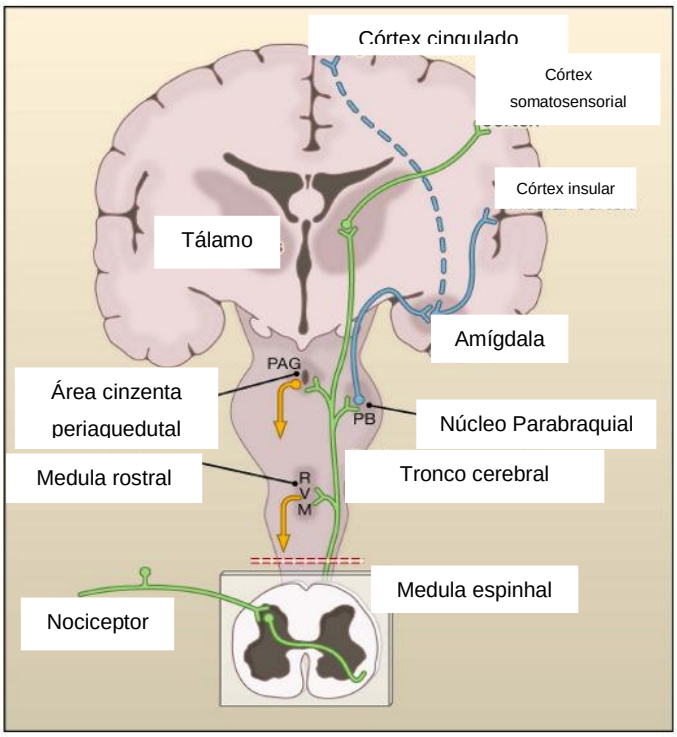

Figura 2: Representação esquemática das vias neuroanatômicas envolvidas com o processamento da dor. Fonte: Adaptado de Basbaum et al. (2009).

Os estudos que tratam da modulação central da dor são relativamente recentes, e tais abordagens têm mostrado o quanto o processamento da dor é influenciado por componentes sensoriais, cognitivos e afetivos integrados em nível de áreas do córtex cerebral (VOGT e SIKES, 2000; SEWARDS e SEWARDS, 2002; PLONNER e SCHNITZLER, 2004) e evidenciado os múltiplos neurotransmissores como opióides, glutamato, ácido gama aminobutírico (GABA), dopamina e noradrenalina, que modulam as estruturas responsáveis por tal regulação, os quais, em última instância, também influenciam os impulsos dolorosos gerados nos órgãos e tecidos periféricos, modulando, dessa forma, as vias que conduzem as sensações da periferia para os centros superiores dos núcleos talâmicos e corticais, determinado, dessa forma, a dinâmica do processamento da dor (OHARA et al. 2003; LOPEZ-AVILA et al. 2004; COFFEEN et al. 2008; TANG, 2008; WOOD, 2008).

2.5.2 NOCICEPÇÃO: OS NOCICEPTORES E A VIA NOCICEPTIVA

A nocicepção é percepção ou detecção de um estímulo de natureza nociva (ou nóxica), constituindo um mecanismo protetor, o qual está direcionado a evitar que o organismo sofra injúria, pelo desencadeamento de comportamentos reflexos de esquiva ao estímulo e atuando como uma sensação desagradável que resulta em comportamentos para evitar maior contato com o estímulo nociceptivo desencadeante (SHERRINGTON, 1906). Além disso, configura-se como um componente fisiológico de uma sensação de dano orgânico que resulta da ativação e sensibilização de vias sensitivas periféricas por estímulos de intensidade suficiente para causar dano tecidual (WOOLF e MA, 2007).

Deve-se assinalar que nocicepção e dor são conceitos diferentes, sendo a nocicepção relativa aos mecanismos neurofisiológicos e neurobiológicos de proteção desencadeados por estímulos nocivos ao organismo, ao passo que a dor corresponde à percepção desses estímulos por áreas específicas do córtex cerebral no intuito de elaborar uma resposta adequada ao estímulo desencadeante (CESARE e MCNAUGHTON, 1997; CATERINA e JULIUS, 1999; MILLAN, 1999; JULIUS e BASBAUM, 2001; BROOKS e TRACEY, 2005).

Para que a via nociceptiva seja ativada é necessário ocorrer sensibilização dos neurônios envolvidos na nocicepção por estímulos nocivos, ou potencialmente nocivos, de natureza química, física ou mecânica (JULIUS e BASBAUM, 2001). Esses elementos receptores são chamados nociceptores, ou receptores da dor, que são os primeiros elementos na série de neurônios relacionados ao processo nociceptivo (SHERRINGTON, 1906).

Esses componentes projetam fibras que inervam várias partes do corpo, as quais se originam de corpos celulares localizados, principalmente, no gânglio da raiz dorsal (JULIUS e BASBAUM, 2001). Eles transduzem estímulos químicos, térmicos ou mecânicos em correntes iônicas, ou seja, em potenciais de ação neuronais, os quais desencadearão a despolarização das membranas dos axônios, ocasionado a propagação do sinal periférico em direção ao sistema nervoso central através da liberação de neurotransmissores nos terminais sinápticos (MCCLESKEY e GOLD, 1999).

Os nociceptores podem ser classificados em pelo menos três classes principais distintas, levando-se em consideração critérios anatômicos e funcionais (JULIUS e BASBAUM, 2001): aqueles de grande diâmetro, que originam fibras ricamente mielinizadas e de rápida condução chamadas fibras sensoriais primárias A-α e A-β, a maioria das quais não estão implicadas na dor, mas na percepção de estímulos inócuos aplicadas à pele, músculos e outros órgãos (DJOUHRI, BLEAZARD e LAWSON, 1998); e as chamadas fibras fracamente mielinizadas A-δ e as fibras não-mielinizadas chamadas fibras- C (MEYER, CAMPBELL e RAJA, 1994), de médio e pequeno diâmetro, respectivamente, configurando-se essas últimas como os principais tipos de nociceptores do organismo (BASBAUM e JESSELL, 2000).

De um modo geral, as fibras A-δ são de médio diâmetro apresentam velocidade de condução relativamente alta (12-30 $m.s^{-1}$), ao passo que as fibras-C são de pequeno diâmetro e suas velocidades de condução são relativamente mais lentas de que as anteriores, em torno de 0,5-2 $m.s^{-1}$ (HARPER e LAWSON, 1985; MILLAN, 1999). Dessa forma, observa-se que a velocidade de condução está relacionada ao diâmetro e presença ou ausência de mielinização da fibra (JULIUS e BASBAUM, 2001).

Além desses, há também os chamados nociceptores silenciosos (*silent nociceptors*, do inglês), que em geral estão inativos (WATANABE et al. 2002), mas que, sob condições inflamatórias ou injúria tecidual, tornam-se ativados por uma variedade de mediadores químicos, tendo grande importância na fisiopatologia da dor inflamatória (SIDDAL e COUSINS, 1997); têm implicação, mediante condições patológicas, na somação temporal e espacial, que ocasiona progressiva diminuição no limiar de excitabilidade neuronal em fibras-C no corno dorsal e, portanto, aumenta as descargas aferentes em direção aos neurônios de transmissão que se projetam para os eixos talâmicos, tendo, dessa forma, função fundamental no surgimento e estabelecimento de hiperalgesia (SCHMIDT et al. 1995 e 2000)

Conceitualmente, a hiperalgesia refere-se a um aumento na resposta a determinado estímulo doloroso em decorrência de um aumento na sensibilidade nociceptiva, onde seu componente primário está relacionado ao sítio da injúria e o secundário à sensibilidade dos tecidos adjacentes (LOESER e TREEDE, 2008).

De acordo com a resposta a diferentes estímulos, os nociceptores podem ser adicionalmente classificados como mecanoreceptores de alto limar,

quimioreceptores, receptores termosensíveis (frio/calor), nociceptores polimodais e nociceptores mecanoinsensíveis (ZHU e LU, 2010). Nesse contexto, alguns estudos mostraram que as fibras nociceptivas do tipo C são as principais fibras responsáveis pela polimodalidade do sistema nociceptivo, respondendo a estímulos frios, quentes, mecânicos e químicos (ARENDT-NIELSEN e CHEN, 2003). As fibras A-δ e C estão envolvidas, exclusivamente, com a transmissão da informação nociceptiva, com as fibras A promovendo uma resposta mais rápida, resultante na dor aguda ou de primeira fase que, frequentemente, desencadeia um reflexo de retirada, cuja integração neuronal ocorre em nível medular, ao passo que as fibras C são responsáveis por uma dor mais difusa, geralmente, persistente à dor aguda (JULIUS e BASBAUM, 2001).

Por sua vez, os terminais centrais de fibras aferentes primárias terminam no corno dorsal da medula espinhal, que está organizada em diferentes lâminas. Na superfície destas lâminas, principalmente nas lâminas I e II, são encontradas células especificas nociceptivas que realizam sinapses exclusivamente com fibras A-δ e C. Nessa região também existem células que recebem somente inervação de fibras A-β (proprioceptivas), as quais respondem ao toque e outras, chamadas de neurônios de amplas faixas dinâmicas, que inervam as 3 fibras nociceptivas, recebendo qualquer estímulo. Esses neurônios, juntamente com os neuropeptídeos, facilitam o fenômeno de amplificação e transmissão da dor, que ativam receptores glutamatérgicos e interneurônios inibitórios GABAérgicos, que podem inibir o impulso nervoso (D`MELLO e DICKENSON, 2008).

Os neurônios inibitórios estão presentes na substância gelatinosa da medula espinhal, onde predominam as fibras de segunda ordem que cruzam a medula espinhal para ascender ao trato espinotalâmico (via ascendente), projetando seus corpos celulares ao tálamo. No tálamo, os neurônios de terceira ordem emitem axônios à matriz da dor (principalmente ao córtex somatosensorial), onde a somatização do estímulo nocivo ocorre, ou emitem axônios ao giro cingulado anterior (componente do sistema límbico), o qual está envolvido com os aspectos emocionais relacionados à da dor (RUSSO e BROSE, 1998).

As funções essenciais dos nociceptores dependem da presença de canais iônicos localizados na superfície da membrana do neurônio, os quais de forma seletiva transportam determinados íons ao longo da membrana, causando alterações no potencial elétrico da célula, de modo a desencadear potenciais de

ação neuronais (CATERINA e JULIUS, 1999). Dessa maneira, quando um estímulo nóxico é aplicado a um nociceptor, o correspondente canal iônico sofre abertura, a qual, por sua vez, induz uma corrente iônica transmembrana, que ocasiona a alteração na diferença de potencial na membrana axonal. Assim, exemplificando, quando um estímulo térmico é aplicado a um nociceptor, o canal iônico correspondente ativado por calor sofre abertura (ZHU e LU, 2010).

Por sua vez, a nocicepção que resulta de injúria tecidual altera marcadamente a experiência dolorosa em virtude do aumento da sensibilidade dos nociceptores tanto a estímulos térmicos como mecânicos. Este fenômeno resulta, em parte, da produção de mediadores químicos derivados dos terminais sensoriais primários e de células não neuronais do ambiente como fibroblastos, mastócitos, neutrófilos e plaquetas (BEVAN, 1999). Além disso, alguns componentes da resposta inflamatória como prótons, adenosina trifosfato (ATP), serotonina (5-HT) e mediadores lipídicos alteram a excitabilidade neuronal por interagir diretamente com canais iônicos na superfície dos nociceptores, enquanto outros, como a bradicinina (BK) e o fator de crescimento derivado do nervo (NGF) modulam cascatas sinalizadoras de segundos mensageiros por interagir com receptores metabotrópicos (WOOLF e SALTER, 2000).

2.5.3 MODULAÇÃO DA VIA NOCICEPTIVA

2.5.3.1 Modulação a nível espinhal: a teoria do controle do portão

Em 1965 foi apresentada uma teoria para a modulação da dor, denominada teoria do controle do portão, fundamentada em um trabalho realizado por Mendell e Wall (1964), onde demonstrou-se que a estimulação de pequenas terminações nervosas aferentes resultava em um potencial positivo nos gânglios da raiz dorsal, enquanto que a estimulação de mesma intensidade de grandes fibras resultara em um potencial negativo na raiz dorsal. Essas observações foram interpretadas como indícios de facilitação pré-sináptica e inibição pré-sináptica neuronal, respectivamente (MENDEL e WALL, 1964; MELZACK e WALL, 1965).

Segundo o modelo proposto pela teoria, há um balanço entre dois tipos de influências exercidas sobre neurônios nociceptivos espinhais não-específicos, cujos axônios constituem os tratos ascendentes espinotalâmico e espinoreticular. Influências ativadoras são transmitidas por fibras de pequeno calibre A-δ e C, enquanto que influências inibitórias são exercidas por fibras de grande calibre das vias não-nociceptivas e a partir de neurônios supraespinhais. Ou seja, caso a atividade de fibras de pequenos diâmetros predomine, ocorre facilitação pré-sináptica e aumento da atividade de células centrais, o que resulta em fenômenos dolorosos (portão aberto). O inverso se aplica a atividade de fibras de grande diâmetro, predominando, assim, o portão fechado (CALVINO e GRILO, 2006).

As implicações dessa teoria conduzem à compreensão de que a ativação de fibras não-nociceptivas de baixo limiar (A-α e A-β) aumenta a atividade inibitória de interneurônios inibitórios presentes na substância gelatinosa, fechando, dessa forma o portão e bloqueando os impulsos nociceptivos, tendo como resultado, em última análise, a analgesia, enquanto que, a ativação de fibras nociceptivas A-δ e C, por inibir a atividade de interneurônios inibitórios da substância gelatinosa, leva à abertura do portão e, portanto, promove a facilitação da transmissão sináptica para estruturas supraespinhais de processamento da dor (NATHAN e RUDGE, 1974; CALVINO e GRILO, 2006). Essa é a clássica compreensão do modelo da teoria do controle do portão (Figura 3).

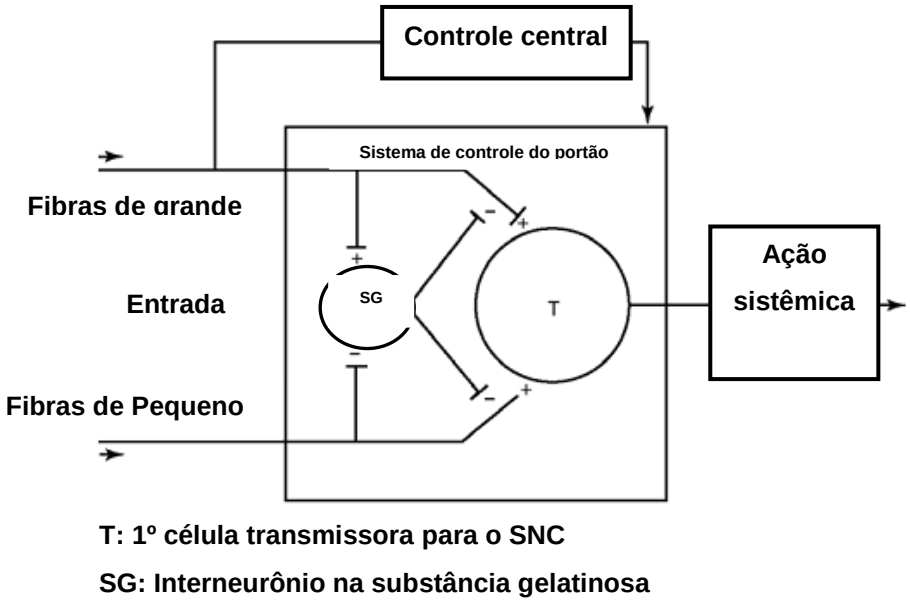

Figura 3: Diagrama do modelo da teoria de controle do portão sugerida por Melzack e Wall em 1965. Fonte: Adaptado de MELZACK e WALL (1965).

Entretanto, essa teoria não explicava todos os dados experimentais e, além disso, alguns trabalhos da época contradizem alguns componentes da teoria, por admitirem a existência de outros componentes que não teriam sido demonstrados. Por isso, a teoria foi reformulada, por assumir a existência de duas famílias de interneurônios, sendo um inibitório, ativado por fibras A-α e β, e outro excitatório, ativado por fibras A-δ e C (Figura 4). Segundo ele, ambas as famílias seriam controladas por vias descendentes de origem supraespinhais (WALL, 1978).

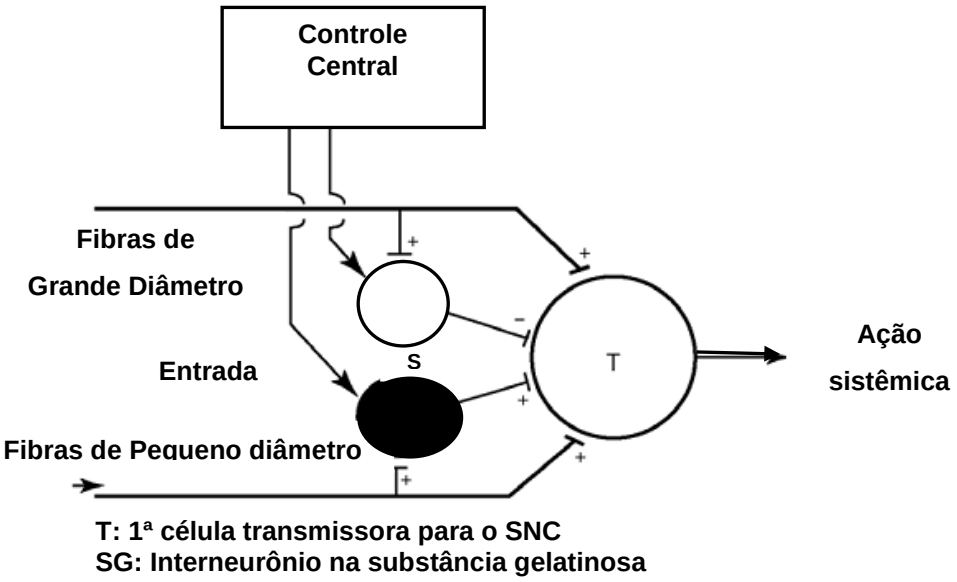

Figura 4: Modelo da teoria de controle do portão revisada. O sistema de controle da dor envolve duas famílias de interneurônios. Fonte: Adaptado de WALL (1978).

2.5.3.2 Modulação central das vias nociceptivas: as vias descendentes inibitórias

Influências inibitórias descendentes são oriundas principalmente da área cinzenta periaquedutal (ACP) no mesencéfalo e da medula rostral ventromedial (MRVM), a qual compreende o núcleo magno da rafe (NMR) (ver Figura 2) e os núcleos gingantocelular (NG) e paragigantocelular (NPG) (KWIAT e BASBAUM, 1992). A estimulação dessas regiões induz analgesia, que está relacionada a efeitos inibitórios de vias serotoninérgicas sobre neurônios nociceptivos espinhais, como resultado do bloqueio da transmissão nociceptiva periférica, mecanismo que seria mediado por ativação das vias GABAaérgicas e glicinérgicas inibitórias em nível

medular (CUI et al. 1999; DOLY et al. 2005; CALVINO e GRILO, 2006; BRENCHAT, 2009). Os axônios de neurônios serotoninérgicos vindos do NMR projetam-se, em cada segmento espinhal, diretamente sobre a medula espinhal e o corno dorsal, ocasionado efeitos inibitórios (BASBAUM E FIELDS, 1984). A administração intratecal de agonistas serotoninérgicos também induz analgesia através, possivelmente, desse mecanismo (YAKSH e WILSON, 1979).

Além dessa via, também tem sido estudada a função inibitória descendente que envolve a transmissão noradrenérgica, a qual tem origem a partir dos *locus ceruleus* e *subceruleus* (PROUDIFT e CLARK, 1991).

Alguns estudos identificaram receptores α-2 adrenérgicos nas lâminas II e IV do corno dorsal, onde esses receptores seriam ativados por noradrenalina liberada a partir das vias noradrenérgicas inibitórias descendentes, o que explicaria o mecanismo de ação analgésico de determinados fármacos, como os agonistas de receptores α-2 adrenérgicos como a clonidina (BONNET e VÉZINET, 1997). Além disso, há uma forte correlação entre estimulação da ACP e MRVM e aumento dos níveis de noradrenalina no líquido cerobroespinhal, o que indica uma contribuição das vias noradrenérgicas para o mecanismo antinociceptivo associado com a via inibitória serotoninérgica, uma vez que a antinocicepção foi revertida quando foi utilizado antagonista adrenérgico espinhal (HAMMOND e YAKSH, 1984; HAMMOND, TYCE e YAKSH, 1985; CUI et al. 1999).

2.5.4 A DOR INFLAMATÓRIA

A dor corresponde a um dos sinais clássicos do processo inflamatório, processos que compartilham um componente comum, ou seja, a capacidade de sensibilizar ou ativar nociceptores. Em modelos animais, essas estruturas não são capazes de discriminar o componente emocional, apenas a sensação nociceptiva (MILLAN, 1999), a qual ocorre mediante uma lesão tecidual, que, por sua vez, induz à formação de mediadores químicos envolvidos na dor inflamatória local, ocasionando danos celulares. Tais mediadores compreendem a histamina (HIS), bradicinina, a 5-HT, o óxido nítrico (NO), o ATP, produtos da ativação da via de ácido aracdônico (AA)/fosfolipase A_2 (PLA_2), que leva à biossíntese de

prostaglandinas (PGs) e leucotrienos (LTs), íons (K^+ e H^+), recrutamento de células imunes que liberam mediadores, tais como citocinas e fatores de crescimento. Parte desses mediadores atuam perifericamente de maneira direta, produzindo dor espontânea, e outros agem indiretamente via estimulação de células inflamatórias, induzindo a liberação de agentes algogênicos, podendo, assim, modificar a propriedade da resposta de neurônios nociceptivos periféricos, amplificando assim percepção da dor (KIDD e URBAN, 2001).

2.6 Vias bioquímicas moduladoras do processamento nociceptivo

2.6.1 A VIA ÓXIDO NÍTRICO/GUANILATO CICLASE/GMPc

O óxido nítrico (NO) é um importante mensageiro biológico que está envolvido na transmissão sináptica tanto no sistema nervoso central quanto no periférico (FERREIRA, SANTOS e CALIXTO, 1999). Esse gás inorgânico é biossintetizado enzimaticamente a partir do aminoácido L-arginina pela ação catalítica de três isoformas da enzima óxido nítrico sintase (NOS): a neuronal (nNOS), a endotelial (eNOS) e a induzida (iNOS). As enzimas nNOS e eNOS são constitutivas, enquanto a iNOS é induzida por vários estímulos. Contrariamente às NOS constitutivas, que dependem do cálcio (Ca^{2+}), a atividade da iNOS não depende do influxo desse íon na célula e a sua expressão é aumentada por estímulos inflamatórios (MELLER e GEBHAR, 1993). Depois de sintetizado, o NO ativa a enzima guanilato ciclase (GC), tida como seu receptor fisiológico, que por sua vez converte a guanosina-5’-trifosfato em guanosina-3’-5’-monofosfato cíclico (GMPc). O GMPc, como segundo mensageiro, pode ativar proteínas quinases, canais iônicos e fosfodiesterases (MOORE et al. 1991).

O NO pode ser liberado após a estimulação direta de fibras aferentes primárias de pequeno diâmetro, contribuindo para sua excitabilidade após o estímulo nociceptivo, além de sensibilizar nociceptores (MOORE et al. 1991; HALEY, DICKENSON e SCHACHTER, 1992; BABBEDGE, HART e MOORE, 1993; MELLER e GEBHART, 1993; YAMAMOTO, SHIMOYAMA e MIZUGUCHI, 1993). Tem sido

sugerido o uso de inibidores da síntese de NO em casos nos quais a dor ou hiperalgesia são mediadas por receptores de glutamato do subtipo N-metil-D-aspartato (NMDA), já que o NO é um dos principais mediadores produzidos após o aumento da concentração de cálcio intracelular causada pela ativação desse receptor (MALMBERG e YAKSH, 1993; RIVOT et al. 1999).

Por outro lado, uma característica marcante do NO é sua dualidade, ou seja, sua capacidade de apresentar efeitos antagônicos em estados patológicos diversos, como por exemplo, na dor. De fato, quando se utiliza ativadores ou inibidores da cascata L- arginina/NO/GMPc, o NO pode agir como um agente pró-nociceptivo ou antinociceptivo, tanto em sítios periféricos quanto em supraespinhais (ALEY, MCCARTER e LEVINE, 1998). Por exemplo, tanto inibidores da NOS e/ou da guanilato ciclase solúvel (GCs) quanto substratos da NOS exibem atividade antinociceptiva (DUARTE, LORENZETTI e FERREIRA, 1990; MOORE et al. 1991; KAWABATA, UMEDA e TAKAGI, 1993; ABACIOGLU et al. 2000; SOUZA e PRADO, 2001).

Contribuindo para a controvérsia sobre a dualidade de efeitos do NO, diversos estudos mostram que a administração de inibidores da NOS e da guanilato ciclase reduzem o efeito antinociceptivo causado por várias drogas, como por exemplo, a dipirona, o sildenafil, o diclofenaco, a nimesulida, o meloxicam, a morfina, entre outras e, possivelmente, esse efeito deva-se à inibição da via NO/Guanilato Ciclase/GMPc (LORENZETTI e FERREIRA, 1996; GRANADOS-SOTO et al. 1997; ISLAS-CADENA, AGUIRRE-BAÑUELOS e GRANADOS-SOTO, 1999; AGUIRRE-BAÑUELOS e GRANADOS-SOTO, 2000; JAIN et al. 2001; ORTIZ et al. 2003a e 2006).

Por outro lado, existem drogas e/ou fármacos que exibem atividade antinociceptiva por inibição da síntese de NO, pois quando um precursor do NO é administrado em animais, a atividade desses agentes é revertida (MEOTTI et al. 2003; SANTOS et al. 2005). Assim, uma explicação para esses efeitos contraditórios do NO pode ser devido a diferenças dos modelos de dor experimental utilizados, pois diferentes tipos de neurônios sensoriais primários podem estar envolvidos, como também dos níveis de NO teciduais, o conteúdo intracelular de GMPc, as diferenças de drogas e doses utilizadas e também ao uso de diferentes espécies animais (SAVEGNAGO et al. 2007).

2.6.2 CANAIS DE POTÁSSIO SENSÍVEIS A ATP

Esses canais foram descobertos pela primeira vez no músculo cardíaco e, posteriormente, em uma variedade de outros tecidos, incluindo as células β-pancreáticas, músculo-esqueléticas, músculo-lisas, células dos túbulos renais e no sistema nervoso central. Os canais de potássio sensíveis a ATP (K_{ATP}) são pertencentes ao grupo dos canais iônicos retificadores de entrada fracos, que têm suas atividades bioquímicas inibidas pelo ATP intracelular (ATP_i) e ativadas pelos difosfatos nucleosídicos intracelulares. Dessa forma, esses canais fornecem um elo entre o metabolismo e a excitabilidade celular (FUJITA e KURACHI, 2000).

Dependendo dos tecidos onde são encontrados, os K_{ATP} estão associados a diversas funções celulares, tais como na regulação da secreção de insulina a partir das células β do pâncreas, relaxamento de músculo liso, regulação da excitabilidade muscular esquelética e liberação de neurotransmissores. No sistema cardiovascular, os K_{ATP} desempenham uma função fisiológica na modulação da função cardíaca, particularmente sob condições de estresse metabólico como hipóxia, eventos isquêmicos e inibição metabólica quando o metabólito adenosina trifosfato intracelular (ATP_i) está reduzido. Farmacologicamente, esses canais podem ser seletivamente inibidos pelos fármacos antidiabéticos orais glibenclamida e dolbutamida, entre outros, e ativados por certas classes de vasorelaxantes como o pinacidil, o cromacalim e nicorandil, os quais são coletivamente denominados de abridores de canais de potássio (FUJITA e KURACHI, 2000).

Por sua vez, canais de potássio neuronais, de maneira seletiva, permitem um fluxo difusivo extremamente rápido de íons ao longo da membrana plasmática neuronal, promovendo alteração em seu gradiente eletroquímico e, dessa forma, desempenham uma importante função no controle da atividade neuronal e na propagação de sinais elétricos ao longo do sistema nervoso central (SHIEH et al. 2000; MACKINNON, 2003). Nesse contexto, numerosos estímulos regulam a abertura de canais de K^+, tais como as alterações na voltagem da membrana ou nos níveis intracelulares de certos íons, pequenas moléculas orgânicas e proteínas (como o Ca^{++}, ATP, adenosina monosfosfato cíclico (AMPc) ou subunidades de proteínas G) (MACKINNON, 2003; ROOSILD, LÊ e CHOE, 2004).

Para padronizar a nomenclatura dos canais de K^+, a União Internacional de farmacologia (IUPHAR- do inglês *International Union of Pharmacology*) propôs uma classificação baseada em critérios estruturais e filogenéticos de proteínas que compõem esses canais (GUTMAN et al. 2003). Nessa classificação foram distinguidos diferentes tipos de canais de K^+, conhecidos como operados por voltagem (K_v), ativados por cálcio (K_{Ca}), retificadores de entrada (K_{ir}) e canais de K^+ de dois poros (K_{2p}). Neste estudo, é dado ênfase somente aos canais de retificadores de entrada, particularmente ao K_{ATP}.

Os K_{ir} compreendem um grupo numeroso de canais de K^+. Eles são constituídos de sete diferentes famílias ($K_{ir}1$- $K_{ir}7$) e várias dessas famílias compreendem diferentes subtipos de canais de K^+ ($K_{ir}3.1$- $K_{ir}3.4$) (NICHOLS e LOPATIN, 1997; GUTMAN et al. 2003). Estruturalmente, são mais simples que os K_v e K_{Ca}, uma vez que contém somente o motivo formador de poro do canal K^+, isto é, dois domínios transmembrana e uma região P. As porções carboxi e amino terminais desses canais estão localizadas no citoplasma e o canal funcional é um tetrâmero dessas subunidades formadores do poro (NICHOLS e LOPATIN, 1997; GUTMAN et al. 2003).

Duas famílias desses canais de K_{ir} têm particular relevância para o estudo da nocicepção: os canais de K^+ retificadores de entrada regulados por proteína G (GIRF ou $K_{ir}3$) e o canal de K^+ sensível a ATP (K_{ATP}-formado com $K_{ir}6$) (MARK e HERLITZE, 2000).

Os canais K_{ATP} funcionais são constituídos por duas subunidades, o canal $K_{ir}6$ e a subunidade denominada SUR (do inglês *Sulfunylurea receptor*-receptor de sulfoniluréias), um domínio protéico transmembrana, que contém duas alças ligadoras de nucleotídios (AGUILAR-BRYAN et al. 1998). Vários subtipos de subunidades $K_{ir}6$ ($K_{ir}6.1$ e $K_{ir}6.2$) e SUR (SUR1, 2A e 2B) foram identificadas. Isso permite várias combinações para construir o canal de K_{ATP} funcional, os quais, estruturalmente, são tetrâmeros de complexos $K_{ir}6$-SUR. As proteínas SUR permitem o bloqueio dos canais de K_{ATP} por sulfoniluréias como a glibenclamida, bem como sua abertura mediada por vários tipos de abridores de K_{ATP} como o cromacalim, pinocidil, minoxidil e nicorandil (AGUILAR-BRYAN et al. 1998) e a regulação da atividade dos canais de K_{ATP} por proteínas G (WADA et al. 2000).

Os K_{ATP} clássicos são regulados principalmente pelo ATP intracelular (ATP_i), o qual apresenta basicamente duas funções: o fechamento do canal e a manutenção

da atividade do canal na presença dos íons Mg^{2+} (TRUBE e HESCHLER, 1984; OHNO-SHOSAKU et al. 1987; TAKANO, QIN e NOMA, 1990; FINDLAY e DUNNE, 1996).

A primeira ação do ATP_i é referida como ação ligante, uma vez que a ligação do ATP_i ao canal é considerada ser necessária para a ação e persiste enquanto o ATP_i estiver ligado ao canal. Tipicamente, os canais de K_{ATP} tem baixa probabilidade de serem abertos em concentrações fisiológicas de ATP. Por outro lado, a segunda ação do ATP_i é referida como dependente de hidrólise, uma vez que este, aparentemente, requer a hidrólises de ATP na presença de Mg^{2+} e pode durar até dezenas de minutos após a remoção do ATP_i. O efeito do ATP_i sobre os canais de K_{ATP} depende do estado da proteína do canal e, dessa forma, quando o canal está ativo, os níveis intracelulares de ATP inibem a abertura do canal. Por outro lado, quando os canais não estão ativos, o tratamento com complexo ATP-Mg^{2+} restaura a abertura do canal (FUJITA e KURACHI, 2000).

Durante as décadas de 1970 e 1980 numerosos estudos demonstraram que agonistas de vários receptores acoplados à proteína G (como μ e δ-opóides, α-2 adrenérgicos e receptores $GABA_B$) promoviam abertura de canais de K^+ específicos em neurônios, produzindo antinocicepção (NORTH, 1989). Assim, esses antecedentes levaram à hipótese de que a abertura de certos tipos de canais de potássio está envolvida no efeito antinociceptivo de certos agonistas de receptores acoplados à proteína G; como consequência, especulou-se que bloqueadores de canais de K^+ específicos revertessem a antinocicepção induzida por tais agonistas (OCAÑA et al. 1990).

No final de década de 1990, novas estratégias experimentais foram utilizadas na identificação de canais K^+ envolvidos na antinocicepção. Dessa forma, os efeitos antinociceptivos de fármacos foram testados em animais que sofreram supressão da expressão gênica de canais de K^+ particulares por meio de infra-regulação com sequências antisenso ou deleção gênica, e os resultados obtidos mostraram que os efeitos antinociceptivos dos agonistas foram significativamente reduzidos (CLARK e TEMPEL, 1998).

Assim, nos últimos anos, tornou-se evidente que a abertura de canais de potássio está envolvida na antinocicepção induzida por vários agentes. Portanto, esses canais têm, progressivamente, se tornado importantes alvos para o desenvolvimento de novos agentes analgésicos, e fármacos que se ligam aos canais

de maneira direta (abridores diretos) têm sido usados em vários modelos de dor acuda e crônica (OCAÑA et al. 2004). Dessa forma, uma vez que esses tipos de canais iônicos têm sido implicados no desencadeamento de analgesia e antinocicepção, este estudo propôs-se a avaliar o seu envolvimento no efeito de *P. pilosa* em modelo de nocicepção induzida quimicamente (formalina).

2.7 Inflamação: aspectos gerais

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 e LINDBOM, 2010). Nesse contexto, o sucesso na remoção do estímulo desencadeante leva ao término da resposta aguda, ensejando o processo de reparação completo (JÚNIOR et al. 2011).

Por outro lado, a inflamação pode ocasionar graves complicações orgânicas, como resultado de lesões teciduais e descompensações fisiológicas, ou mesmo morte, se houver cronificação do processo, como ocorre na artrite reumatóide, no lúpus eritematoso sistêmico e na asma, por exemplo, estados caracterizados pela alta prevalência de incapacitação funcional (SHERWOOD e TOLIVER-KINSKY, 2004).

2.7.1 COMPONENTES CELULARES E VASCULARES DAS RESPOSTAS INFLAMATÓRIAS

Eventos vasculares relacionados com a fase aguda da inflamação incluem vasodilatação das pequenas arteríolas com aumento do fluxo sanguíneo, aumento da permeabilidade e extravasamento de líquido. A vasodilatação pode ser mediada por histamina, prostaglandinas (PGE_2) e prostaciclina (PGI_2), que podem agir juntamente como citocinas na produção de aumento da permeabilidade vascular. O extravasamento de fluidos durante o processo origina-se a partir de cascatas

proteolíticas (sistema complemento, sistema de coagulação, sistema fibrinolítico e sistema de cininas). Esse exsudato inflamatório local é constituído de proteínas plasmáticas e leucócitos (predominantemente neutrófilos), que normalmente ficam restritos aos vasos sanguíneos e, com o aumento da permeabilidade, têm acesso, através de vênulas pós-capilares, ao sítio da infecção ou lesão (ROCK e KONO, 2008).

A ativação endotelial vascular permite a transmigração de neutrófilos, ao passo que hemácias não conseguem atravessar o endotélio (EMING, KRIEG E DAVIDSON, 2007), os quais deslocam-se para o tecido inflamado através de um processo que envolve seis etapas: 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) (LEY et al. 2007).

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 na superfície endotelial, bem como nos espaços extravasculares (EMING et al, 2007). Mediadores quimiotáticos e certas citocinas medeiam o processo regulando a expressão superficial das moléculas de aderência. Os receptores de aderência envolvidos pertencem a quatro famílias moleculares: selectinas, imunoglobulinas, integrinas e glicoproteínas. As selectinas são lectinas que interagem com açúcares e/ou glicoproteínas, são responsáveis pela adesão de leucócitos ao endotélio vascular na cascata precoce de eventos que levam aos processos de inflamação. Compreendem a E-selectina que é confinada ao endotélio; a P-selectina presente no endotélio e nas plaquetas; e L-selectina presentes em muitos tipos de leucócitos (KAKKAR, 2004).

As glicoproteínas de membrana tais como a molécula de adesão vascular-1 (VCAM-1) e a molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) são exemplos de moléculas de adesão que fazem parte da superfamília das imunoglobulinas. VCAM-1 é expressa em células endoteliais ativadas por citocinas, como fator de necrose tumoral-alfa (TNF-α), por exemplo, enquanto ICAM-1 é expresso por uma variedade de células hematopoiéticas e não hematopoiéticas, incluindo células T e B, células dendríticas, macrófagos, fibroblastos, queratinócitos e células endoteliais. Integrinas constituem o principal grupo de moléculas de adesão, presentes em muitas células, cujo domínio citoplasmático se liga ao citoesqueleto. Elas são proteínas

heterodiméricas compostas de duas cadeias polipeptídicas, α e β, ligadas de forma não covalente (SIMON e GREEN, 2005).

No tecido alvo, os neutrófilos tornam-se ativados 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 e nitrogênio, proteinase 3, catepsina G e elastase. Tais efetores são altamente potentes, não discriminando entre o agente agressor e células do hospedeiro, causando, inevitavelmente, danos ao tecido hospedeiro (NATHAN, 2002).

2.7.2 ALGUNS MEDIADORES E EFETORES DAS RESPOSTAS INFLAMATÓRIAS

O processo inflamatório envolve uma série de mediadores, além de células e enzimas, responsáveis pelo desenvolvimento da resposta inflamatória. Dentre eles, pode-se destacar a histamina, serotonina, cininas, óxido nítrico, neuropeptídeos, produtos do ácido araquidônico, etc. (WARD, 2004).

2.7.2.1 Histamina

A histamina é um dos mediadores pré-formados liberados primeiramente no processo inflamatório através da desgranulação de mastócitos e basófilos por ação de mediadores inflamatórios como substância P, interleucina-1 (IL-1) e fator de crescimento neural (NGF). A histamina, uma vez liberada, ativa receptores histaminérgicos promovendo aumento da permeabilidade a íons cálcio (Ca^{++}) em neurônios sensoriais e a consequente liberação de neuropeptídeos, bem como de prostaglandinas por células endoteliais, levando à hiperalgesia e outros efeitos pró-inflamatórios (DRAY, 1995).

A histamina desempenha um papel importante em doenças alérgicas e autoimunes. 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).

2.7.2 .2 Serotonina

Serotonina ou 5-hidroxitriptamina (5-HT) é uma amina sintetizada a partir do aminoácido triptofano por ação da enzima triptofano sintetase. Esta reação ocorre principalmente em células enterocromafins intestinais, mas pode ocorrer em plaquetas humanas, mastócitos de ratos, mas não de humanos, e sistema nervoso central (BISCHOFF et al. 2009).

Em tecidos periféricos, 5-HT é liberada a partir de mastócitos e plaquetas simultaneamente à histamina por desgranulação induzida por mediadores, como substância P. Esta amina é hiperalgésica por ação direta em receptores de 5-HT localizados em neurônios aferentes sensoriais primários, sendo dotada, também, de ações semelhantes as da histamina, ou seja, vasoconstrição inicial, e juntamente com outros mediadores, vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular (KOPP, 1998).

2.7.2.3 Bradicinina

A bradicinina é peptídio formado durante um processo inflamatório em função da ativação da cascata proteolítica de produção deste mediador, na qual há a liberação de bradicinina a partir de α-globulinas denominadas cininogênios por ação de calicreínas sobre estes. A bradicinina é um importante mediador envolvido tanto na etapa inicial quanto no progresso de um processo inflamatório (AHLUWALIA e PERRETTI, 1999).

Este peptídio é considerado um autacóide (hormônio local), produzindo dor, vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e síntese de prostaglandinas. Seus efeitos endógenos estão relacionados com dois receptores, o receptor B_1, que é induzido durante processo inflamatório e o receptor B_2, expresso

constitutivamente. Na inflamação, os receptores B_1 presentes em macrófagos desencadeiam a produção de IL-1 e de TNF-α. Além disso, podem levar a hipersensibilização de fibras nociceptivas e à hiperalgesia, com estimulação da liberação de substância P e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina por neurônios nociceptivos (GOODMAN e GILMAN, 2006).

2.7.2.4 Eicosanóides

São os mediadores e moduladores mais importantes da reação inflamatória e regulam diversos processos celulares, tendo como principal precursor, em mamíferos, o ácido araquidônico, que é liberado por ação da enzima fosfolipase A_2 sobre fosfolipídeos de membrana. O ácido araquidônico pode ser metabolizado por diversas vias, mas duas são as principais: via das ciclooxigenases e via das lipoxigenases (FUNK, 2001).

Pela via das ciclooxigenases, o ácido araquidônico é convertido nos endoperóxidos PGH_2 ou PGG_2 pela ação das ciclooxigenases (COX-1 e COX-2). Esses intermediários sofrem rápida isomerização para formar as prostaglandinas PGE_2, PGI_2, PGD_2, $PGF_{2\alpha}$ e troboxanos por ação enzimática de isomerases ou sintases (SCHOLICH e GEISSLINGER, 2006).

Existe no organismo humano, duas principais isoformas de ciclooxigenase, a COX-1 que é expressa constitutivamente e age como regulador homeostático e a COX-2 que é induzida principalmente por estímulos inflamatórios (RANG et al. 2007).

As prostaglandinas da série E (PGEs) são as mais importantes no processo inflamatório. Esses mediadores lipídicos são moléculas pequenas que agem localmente, sendo rapidamente inativadas. O papel de PGE_2 como mediador pró-inflamatório inclui o aumento da permeabilidade vascular, hiperalgesia, vasodilatação e edema. A PGD_2 está envolvida com a resolução do processo inflamatório por ativar a regulação transcricional de enzimas que degradam eicosanóides e estimula a produção de lipoxinas (SERHAN, CHIANG e VAN DIKE, 2008).

Outros mediadores lipídicos importantes do processo inflamatório são os leucotrienos (LTs), os quais são sintetizados a partir do ácido araquidônico por enzimas chamadas lipoxigenases, principalmente a 5-lipoxigenase. O principal leucotrieno envolvido com a resposta inflamatória aguda é o leucotrieno B_4 (LTB_4), o qual está relacionado com o controle do fluxo sanguíneo, vasodilatação e aumento da permeabilidade, além de ter ações quimiotáticas para neutrófilos e macrófagos (FUNK, 2001).

Outro mediador produzido pela via das lipoxigenases são as lipoxinas (LXs), as quais são sintetizadas a partir da ação enzimática da 15-lipoxigenase. Estas representam um grupo de derivados do ácido araquidônico que agem interferindo com ações na microvasculatura, tendo propriedades vasorreguladoras, antagonizando o efeito do LTB_4. Além desses efeitos, elas diminuem a adesão de leucócitos por moléculas de adesão (HEDQVIST, GAUTAM e LINDBOM, 2000), e infiltração de eosinófilos, portanto, tendo propriedades anti-inflamatórias (SERHAN, CHIANG e VAN DIKE, 2008).

2.7.2.5 Citocinas

Citocinas são proteínas de baixo peso molecular produzidas por diferentes tipos de células do sistema imune como as células T, macrófagos e células dendríticas. Sua produção ocorre por diferentes estímulos, como agentes infecciosos, tumores ou estresse. Essas agem em comunicação com outras células, promovendo a indução ou regulação da resposta imune (ROCHMAN, SPOLSKI e LEONARD, 2009).

O efeito das citocinas ocorre após a ligação a receptores específicos expressos na superfície da célula-alvo, desencadeando a transdução de sinais no interior da célula. Estes receptores quando ligados à citocinas ativam proteína JAKs (*Janus kinase*) que fosforilam resíduos de tirosina, gerando sítios para a ligação dos fatores de transcrição STAT (*signal transducers and activators of transcription*). Após a fosforiliação da tirosina, STAT é dissociado das subunidades do receptor e sofre translocação para o núcleo, onde induz a transcrição de genes específicos (RANG at al. 2007).

As atividades fisiológicas das citocinas são inúmeras, porém se destacam a ativação da resposta imune celular e humoral, regulação da hematopoiese e controle da proliferação e diferenciação celular. As citocinas também desempenham papel fundamental na diferenciação de linfócitos T e na ativação de seus diferentes subtipos (BILATE, 2007).

Dentre as principais citocinas que participam ativamente do processo inflamatório, destacam-se o fator de necrose tumoral α (TNF-α) e a interleucina 1- β (IL-1β). O TNF-α é uma citocina produzida e liberada principalmente por macrófagos e é considerada um dos principais mediadores inflamatórios (BROWN et al. 2010). A IL-1β é a principal citocina envolvida na inflamação, sendo sintetizada principalmente por monócitos e macrófagos. IL-1β age sinergicamente com TNF-α ativando a resposta inflamatória, aumentando a expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais e nos leucócitos e promovendo a diapedese leucocitária na resposta inflamatória aguda (BARKSBY et al. 2007).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- Avaliar os efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório do extrato hidroetanólico das partes aéreas de *Portulaca pilosa* L. (EHEPp).

3.2 Específicos

- Avaliar a toxidade aguda oral do extrato hidroetanólico de partes aéreas de *P. pilosa* L. (EHEPp) em camundongos;
- Avaliar a atividade antinociceptiva preliminar do EHEPp no modelo de contorções abdominais induzidas pela injeção intraperitoneal de ácido acético a 0,6%;
- Avaliar a atividade antinociceptiva mediada centralmente do EHEPp na nocicepção induzida pelo estímulo térmico da placa quente;
- Avaliar a atividade antinociceptiva do EHEPp no modelo de nocicepção química induzida pela injeção intraplantar de formalina a 1%;
- Investigar o envolvimento de receptores opióides no efeito do extrato;
- Investigar o envolvimento da via NO-Guanilato ciclase-GMP cíclico na antinocicepção induzida por EHEPp;
- Investigar o envolvimento de canais de potássio sensíveis a ATP (K_{ATP}) na antinocicepção induzida por EHEPp;
- Verificar a ocorrência de alterações locomotoras induzidas pelo EHEPp no teste do campo aberto (Open Field);
- Verificar o efeito antiedematogênico do EHEPp em modelos experimentais induzidos por carragenina em ratos e óleo de cróton em camundongos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Materiais e reagentes utilizados

4.1.1 EQUIPAMENTOS E MATERIAIS NECESSÁRIOS

- Aparelho de GPS ETREX H (GARMIN, USA)
- Arena em madeira medindo 100x100x40 cm
- Balança analítica eletrônica Modelo 802- BIOPRECISA
- Balança para pesagem de animais mod. Id-1500 -FILIZOLA
- Beckers
- Erlen Meyer
- Estufa MEDICATE, modelo MD 12
- Funis de Vidro (d= 22 cm)
- Kitasato
- Luvas de procedimento
- Moinho de facas (MARCONI)
- Placa quente modelo 35100- UGO BASILE
- Pletismômetro mod. 7140- UGO BASILE
- Papel de filtro
- Pipetadores automáticos GILSON, EPPENDORF e DIGIPET (10-100 µL, 100-1000 µL.).
- "*Punch*" de biópsia
- Rota-evaporador modelo 802- FISATOM
- Tubos de ensaio
- Tubos tipo Falcon
- Aparelho de Ultrason modelo 1450/2210- MAXICLEAN/BRASON

4.1.2 REAGENTES E SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS

- Ácido acético Glacial P.A - VETEC-QUÍMICA FINA®
- Álcool Comercial 96º GL (92,8º INPM) - SANTA CRUZ®
- Álcool n-butílico P.A.-VETEC-SYNTH®
- Acetona comercial -FARMAX®
- Água destilada
- Azul de Metileno - MERCK-SCHUCHART ®
- Carragenina Lambida - SIGMA®
- Cloridrato de Ketamina - VETANARCOl®
- Cloridrato de Naloxona 0,4 mg/Ml - CRISTÁLIA®
- Cloridrato de Xilazina - ROMPUN®
- Dexametasona - ACHÉ®
- Formaldeído P.A - IMPEX®
- Glibenclamida - DAONIL-SANOFI®
- Indometacina - SIGMA®
- N^G L-Nitro arginina metil ester (L-NAME) - SIGMA®
- Óleo de cróton - SIGMA®
- Polioxietilensorbitanmonoleato (Tween 80)- MERCK-SCHUCHART®
- Soro fisiológico comercial - HEMAFARMA®
- Sulfato de morfina 10mg/mL - CRISTÁLIA®

4.2 Coleta do material botânico e obtenção do extrato

As amostras frescas das partes aéreas do vegetal foram coletadas no mês de Fevereiro de 2011 na comunidade Santa Helena, Município de Acará, estado do Pará, às proximidades de Belém (Figura 6). A área da coleta caracteriza-se por ser de terra firme, de vegetação típica amazônica.

Posteriormente, uma fração da planta foi destinada à identificação botânica por meio de comparação autêntica com um exemplar do Herbário “João Murça Pires” Museu Paraense Emílio Goeldi (MG 131457).

Foram coletados cerca de 12 Kg de material fresco, o qual foi pesado e, em seguida, lavado em água corrente para retirada dos resíduos sólidos, seguido de lavagem com álcool a 70% (v/v). Após esse procedimento, o material foi deixado secar à sombra por algumas horas e novamente pesado, correspondendo a uma massa de 10,5 kg de material. Esse material foi submetido à secagem em estufa a 40 ºC durante 7 dias. Após essa etapa o material seco foi triturado em moinho de facas. O material obtido, 1.4 kg, foi submetido à extração por meio de percolação em etanol/água a 70% (v/v), submetendo-se todo o material a um volume de 4 litros de líquido extrator. Nesse processo, o material fora agitado diariamente para otimizar a extração, onde cada extração durou 3 dias. Após 3 dias, o material era filtrado e o extrato fluido coletado e armazenado em frascos de cor âmbar de 5 litros de volume.

Foram realizadas quatro extrações no total, rendendo aproximadamente 4,5 de extrato fluido. Em seguida, o extrato fluido obtido foi concentrado em rota-evaporador para eliminação do conteúdo de etanol, seguido de evaporação de água com auxílio de álcool n-butílico, sendo em seguida submetido à liofilização para obtenção do extrato seco, que rendeu 30 g (2,14 %).

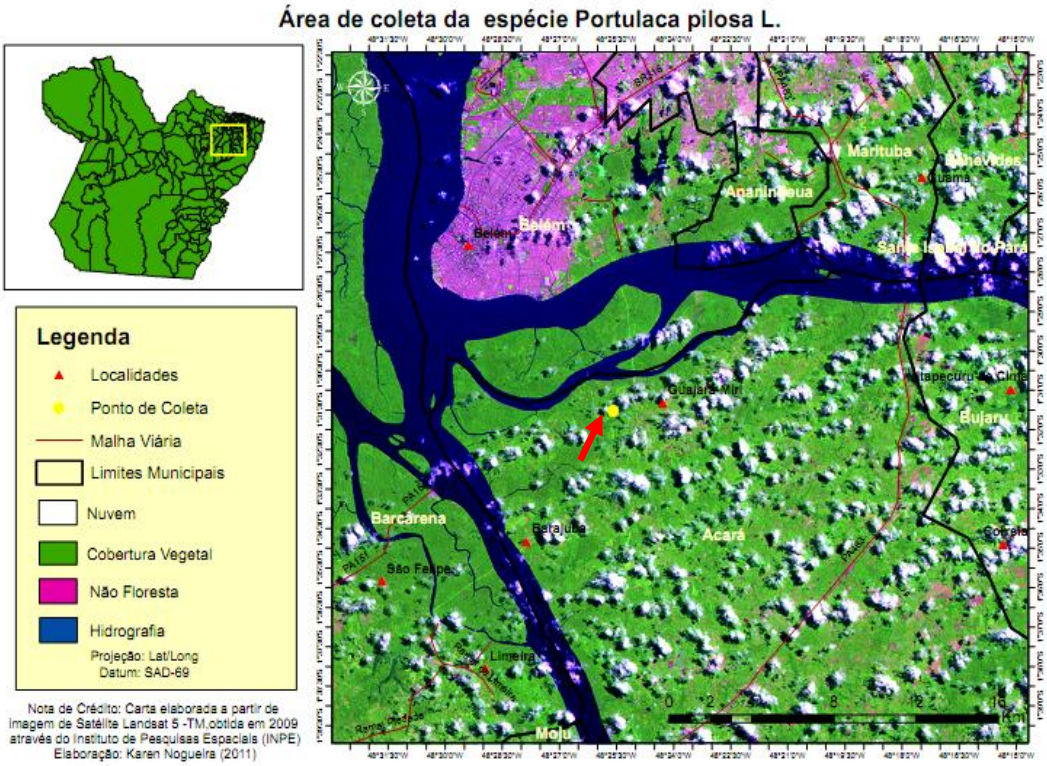

Figura 5: Representação geoespacial da área de coleta da espécie *Portulaca pilosa* L. obtida com auxílio de aparelho de GPS.

4.3 Animais Experimentais

Foram utilizados camundongos albinos machos e fêmeas da espécie *Mus musculus* adultos, pesando entre 25 e 35 g. Também utilizou-se ratos albinos machos da espécie *Rattus norvergicus* pesando entre 130 e 180 g. Os animais, provenientes do biotério do Instituto Evandro Chagas-IEC-(Belém) e do Biotério da Faculdade de Ciências Biológicas da UFPA, foram alojados no Biotério Setorial da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Pará (UFPA), sendo mantidos em gaiolas em número máximo 10 (camundongos) e 5 (ratos) animais por gaiola e acondicionados sob condições controladas de temperatura (25ºC) e ciclo de claro/escuro de 12h com a fase clara iniciando-se às 6h e terminando às 18h, com livre acesso à água e ração. Antes da realização de cada teste, os animais foram submetidos a jejum por um período de 12 horas. O manuseio dos animais obedeceu às normas institucionais aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais-CEPAN- do Instituto Evandro Chagas por meio do Parecer de Aprovação Nº

014/2010/CEPAN/IEC/SVS/MS referente ao Projeto “Contribuição para a Ampliação do Conhecimento acerca de Plantas Medicinais da RENISUS”. Todos os experimentos foram realizados na fase clara do ciclo no intervalo entre às 07:00 h e 16:00 h.

4.4 Avaliação de Toxicidade Aguda

Na avaliação da toxicidade aguda oral utilizou-se as diretrizes de guias para testes de substâncias químicas da Organização de Cooperação e de Desenvolvimento Económico (OECD) número 423, onde foram utilizados camundongos albinos fêmeas *Mus muscullus* pesando entre 20-30 g. Este grupo (n=3) foi mantido em jejum noturno sendo, em seguida, tratado com a dose de 2000 mg/kg do extrato diluído em Tween 80 a 5% em solução salina 0,9% (v/v) por meio da utilização de cânula de administração orogástrica. Em seguida, os animais foram observados por um período de 4 h para avaliação de possíveis alterações comportamentais, como: atenção, alerta, analgesia, atividade motora espontânea, locomoção, falta de apetite, apatia, resposta ao tato, secreção nasal, piloereção, estereotipia, agressividade, ataxia, sudorese, micção, diarréia e convulsão (MALONE e ROBICHAUD 1962). Após esse período, os animais foram tratados com ração e água livre e observados por um período adicional de 24, 48 e 72 h, seguidos de observação por um período de até 14 dias com o intuito de verificar ocorrência de óbito (OECD, 2001).

4.5 Avaliação da atividade antinociceptiva

4.5.1 CONTORÇÕES ABDOMINAIS INDUZIDAS PELA INJEÇÃO INTRAPERITONEAL DE ÁCIDO ACÉTICO A 0,6%

As contorções abdominais foram induzidas em camundongos machos através da administração intraperitoneal de solução ácido acético a 0.6% (v/v) em volume de 0.1 mL para cada 10 g de peso corpóreo do animal segundo o método estabelecido por Koster et al. (1959). Nesse ensaio, a reação do animal ao estímulo algogênico é o desenvolvimento de movimentos repetidos de contração da parede abdominal, rotação do corpo e extensão das patas traseiras. Esse conjunto de reações é denominado contorções abdominais e a intensidade da nocicepção é quantificada como o número total de contorções abdominais durante o período de observação de 20 minutos, iniciando-se a contagem 10 minutos após a administração do ácido acético. Os animais, durante o tempo de observação, foram contidos em funis de vidro com diâmetro de aproximadamente 22 centímetros. O extrato *P. pilosa* (50, 100, 200 e 400 e 600 mg/kg, por via oral (v.o.) foi administrado uma hora antes da administração do estímulo nociceptivo. O grupo controle recebeu oralmente o veículo (tween 80 a 5% em salina (v/v). Outro grupo recebeu o fármaco de referência indometacina (5 mg/kg, v.o.), administrado 60 minutos antes do ácido acético. Antes da realização de cada série experimental, os animais foram aclimatizados durante o período de uma hora.Todos os grupos foram constituídos de 7-10 animais.

4.5.2 TESTE DA PLACA QUENTE

Neste teste, foi utilizado o modelo estabelecido por MacDonald et al. (1946). Um dia antes da avaliação, os animais foram pré-selecionados aleatoriamente, onde o tempo de resposta de corte considerado foi de 20 segundos, de maneira que animais que apresentam tempo de resposta superior a 20 segundos foram

descartados. Assim, os camundongos foram colocados sobre uma placa de alumínio aquecida a temperatura fixa (50 ± 0.5º C), registrando-se o tempo, em segundos, para que o animal manifestasse alguma reação em resposta ao estímulo térmico. Esta reação é esterotípica, consistindo no ato de pular ou lamber as patas posteriores, bem como sapatear na placa. Os experimentos foram iniciados imediatamente após a administração EHEPp (200 e 400 e 600 mg/kg, v.o.), do grupo controle (tween 80 a 5% em salina, v.o.) e da administração subcutânea (s.c.) do fármaco morfina (10 mg/kg), no volume de 0,1 mL/kg de peso de animal, consistindo então, esse início ao tempo 0 (T0). Registros da latência dos animais ao estímulo térmico foram realizados subsequentemente nos tempos T30, T60, T90 e T120, os quais correspondem, respectivamente, a 30, 60, 90 e 120 minutos após o tratamento. Todos os grupos foram constituídos de 7-10 animais.

4.5.3 TESTE DA FORMALINA

Para confirmação do efeito antinociceptivo de *P. pilosa* foi utilizado o teste de nocicepção induzido pela injeção subcutânea intraplantar de 20 µL uma solução de formalina a 1% (HUNSKAAR, BERGE e HOLE, 1985). Após administração desse agente, o camundongo desenvolve respostas comportamentais típicas de nocicepção, que consistem em lamber as patas posteriores injetadas com formalina. Dessa forma, o tempo em que o animal passou lambendo a pata traseira foi cronometrado em duas fases distintas e tomado como parâmetro indicativo de nocicepção (ABBOTT, FRANKLIN e WESTBROOK, 1995), com a 1º fase de 0-5 minutos e a segunda de 15-30 minutos após o estímulo. O EHEPp (100, 200, 400 e 600 mg/kg, v.o.) foi administrado 60 minutos antes da injeção de formalina. O grupo controle recebeu apenas veículo (Tween 80 a 5% em salina v/v, v.o.) uma hora antes da administração de estímulo. Antes da realização dos experimentos, os animais foram submetidos a um período de aclimatização de 1 h. Todos os grupos foram constituídos de 7-10 animais.

4.6 Estudo do mecanismo de ação do EHEPp

Para investigar alguns mecanismos pelos quais o EHEPp inibe a nocicepção induzida pela administração de formalina intraplantar, os camundongos foram tratados com diferentes fármacos. A escolha das doses de cada fármaco foi baseada em dados consultados na literatura. O modelo da formalina foi escolhido com esse objetivo em função da especificidade e sensibilidade que oferece no estudo do mecanismo de ação de fármacos analgésicos (LE BARS et al. 2001).

4.6.1 AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DO SISTEMA OPIÓIDE

Com o objetivo de verificar o envolvimento do sistema opióide no efeito do extrato, foi realizada a co-administração do EHEPp (600 mg/kg, v.o., 60 minutos antes da formalina, n=07) juntamente com o fármaco antagonista opióide não seletivo naloxona (0,4mg/kg, s.c.) 15 minutos antes do extrato (FEINBERG, CREESE e SNYDER, 1976). Após 60 minutos da administração do EHEPp os animais foram submetidos ao estímulo da formalina por via subplantar. Outro grupo animal recebeu o fármaco de referência morfina (4 mg/kg, s.c.) 30 minutos antes da formalina.

Além disso, um grupo recebeu o antagonista opióide naloxona (0,4 mg/kg, s.c.) isoladamente 45 minutos antes da formalina e outro grupo recebeu o co-tratamento de naloxona/morfina (0,4 mg/kg s.c. /4mg/kg s.c./,respectivamente, 45 e 30 minutos antes da formalina). Todos os grupos foram constituídos de 7-10 animais.

4.6.2 AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DE CANAIS DE POTÁSSIO SENSÍVEIS A ATP

Para este objetivo, camundongos machos foram pré-tratados por via intraperitoneal (i.p.) com glibenclamida (10 mg/kg), um bloqueador do canal de potássio sensível a ATP, 30 minutos antes do extrato (600 mg/kg v.o.). Uma hora após a administração do EHEPp, os animais foram submetidos ao estímulo químico da formalina. Outro grupo de animais recebeu a glibenclamida isoladamente (10 mg/kg, i.p.) e, após 30 minutos, recebeu o estímulo nociceptivo. Os procedimentos e doses foram usados, essencialmente, de maneira similar a descrita previamente na literatura (EDWARDS e WESTON, 1993; MOHAMAD et al. 2010).

4.6.3 AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DA VIA ÓXIDO NÍTRICO/GUANILATO CICLASE/GMPc

Nesta série de experimentos, camundongos machos foram pré-tratados com o inibidor não seletivo da óxido nítrico sintase L-NAME (20 mg/kg i.p.) e com o inibidor não seletivo da guanilato ciclase solúvel Azul de metileno (1 mg/kg i.p.), ambos administrados 30 minutos antes do extrato (600 mg/kg v.o.). Após 1 hora da administração do EHEPp, os animais foram submetidos à injeção intraplantar da formalina. Outros grupos de animais receberam os fármacos inibidores isoladamente, bem como o extrato, sendo as respostas à formalina registradas 30 e 60 minutos após a administração dos inibidores e do extrato, respectivamente. Os procedimentos e doses utilizadas do azul de metileno (MONCADA, PALMER e HIGGS, 1991; JAIN et al. 2001; JESSE, SAVEGNAGO e NOGUEIRA, 2007) e L-NAME (REES et al. 1990; JESSE, SAVEGNAGO e NOGUEIRA, 2007) foram baseadas em estudos anteriores descritos na literatura.

4.7 Avaliação dos efeitos do EHEPp sobre o sistema nervoso central de ratos

Para avaliar alguns efeitos mio-relaxantes e sedativos não-específicos associados ao tratamento oral com EHEPp, ratos machos receberam a dose de 600 mg/kg do extrato de *P. pilosa* e (volume de 1mL/kg) e, após uma hora, foram submetidos ao teste do campo aberto. O grupo controle recebeu apenas o veículo por via oral, ou seja, Tween 80 a 5% diluído em solução salina 0,9% (1 mL/kg) por via oral.

Para este teste, utilizou-se uma arena em madeira medindo 100x100x40 cm, pintada com tinta impermeável de cor preta, com assoalho dividido por linhas brancas em 25 quadrantes iguais de 20x20 cm (Figura 6). Os animais foram colocados no quadrante central do aparato, sendo então permitido o livre deslocamento dos mesmos durante um período de 5 minutos, onde o comportamento explorativo foi avaliado segundo o protocolo padronizado previamente por Pandolfo et al. (2007), consistindo, principalmente, no cruzamento dos quadrantes com as quatro patas, com o objetivo principal de avaliar a atividade locomotora total dos animais submetidos ao tratamento.

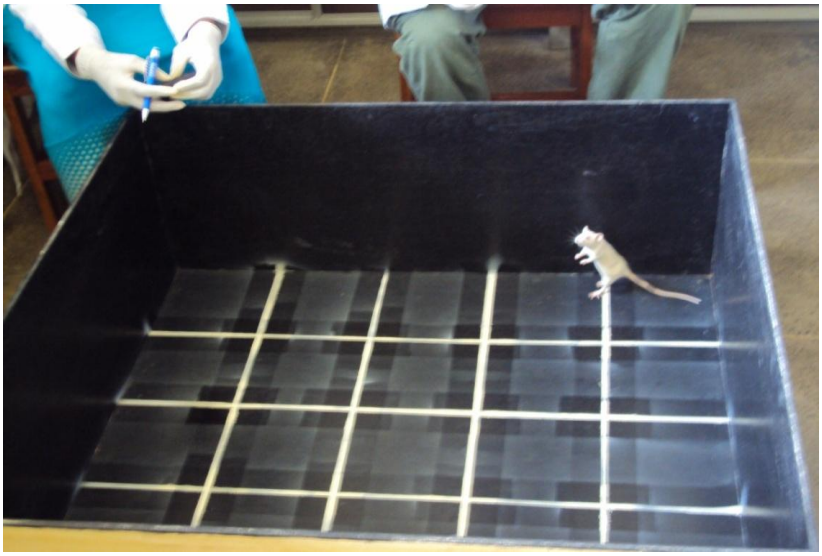

Figura 6: Representação esquemática de arena para a realização do teste do campo aberto.

Nesta série de experimentos comportamentais utilizou-se local próprio e com níveis de ruído e iluminação adequados ao ensaio. Além disso, antes da realização do teste os animais foram submetidos a um período de aclimatização e ambientação de 1 h. E, com o objetivo de evitar influências de variações circadianas nos resultados, os experimentos foram conduzidos entre 08:00 e 12:00 h.

4.8 Avaliação da atividade anti-inflamatória

4.8.1 EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA

O edema de pata baseia-se na variação do volume das patas traseiras dos ratos (*Rattus novergicus*) após a aplicação de algum estímulo inflamatório (WINTER, RISELY e NUSSI, 1962; CARVALHO et al. 1999). Para a realização de tal teste, os animais foram separados em grupos de sete e, uma hora antes da aplicação do agente inflamatório (0,1mL de carragenina 1%, via intraplantar (i.pl.)), foram pré-tratados, por via oral, com o EHEPp nas doses de 400 e 600 mg/kg, com indometacina (10 mg/kg) e com o veículo (Tween 80 5% em salina) em volume final de 0,1 mL/100 g de peso do animal. Na região intraplantar da pata direita foi administrado carragenina e igual volume de solução salina na pata esquerda. O desenvolvimento do edema foi avaliado com o auxílio de pletismômetro, o qual foi medido imediatamente após a administração de carragenina e solução salina, em intervalos regulares de uma hora, durante cinco horas. A diferença entre as patas direita e esquerda em cada tempo correspondeu ao edema formado em mL.

4.8.2 DERMATITE INDUZIDA PELA APLICAÇÃO TÓPICA DE ÓLEO DE CRÓTON

Foi utilizado o método descrito por Tubaro et al. (1985). Este teste consiste em aplicar um volume de 20µL de uma solução de óleo de cróton 2,5 % (v/v) em acetona na superfície interna da orelha direita dos camundongos. Na orelha

esquerda foi aplicado o mesmo volume de acetona. Uma hora antes da aplicação foi realizado o tratamento com EHEPp (400 e 600mg/kg, v.o.) e com o fármaco corticosteóide dexametasona (10 mg/kg, v.o.), e o grupo controle tratado com Tween 80 a 5% em salina também por via oral.

A avaliação da resposta edematogênica foi feita com a utilização de balança analítica, realizada 6 horas após a aplicação do estímulo. Os camundongos foram sacrificados e uma amostra de 6 mm de diâmetro da orelha foi retirada com auxílio de *"punch"* de biópsia e estabelecida a diferença do peso entre a amostra da orelha controle (esquerda) e orelha estimulada (direita), e os resultados obtidos foram expressos em miligramas (mg). Os animais que constituíram os grupos (n=07) pesavam entre 20 e 30 g.

4.9 Análise estatística

Os resultados são apresentados como a média ± erro padrão da média (E.P.M.), onde n representa o número de animais. Para comparação das médias utilizou-se teste *t* não-paramétrico e análise de variância (ANOVA) de uma ou duas vias seguido de um teste de múltiplas comparações (Teste de Bonferroni). Os valores que apresentaram probabilidade de ocorrência de hipótese de nulidade menor que 5% foram considerados significantes (valor de $p < 0,05$). A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa estatístico Graphpad Prisma® versão 5.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Toxicidade aguda oral

Neste estudo não houve óbitos entre camundongos que receberam a dose de 2000 mg/kg de EHEPp, por via oral, no transcurso de 14 dias subsequentes à administração da droga vegetal. Dessa forma, é possível classificar o EHEPp como pertencente aos agentes xenobióticos de baixa toxicidade (OECD, 2001). Entretanto, foram observadas algumas alterações comportamentais como piloereção e ptose palpebral. Por outro lado, como não foram observados sinais evidentes de toxicidade aguda oral, como de morte dos animais tratados, não foi possível calcular o valor da dose letal mediana (DL_{50}) para o EHEPp (TAÏWE et al. 2012).

O teste de toxicidade aguda é uma etapa que antecede a realização de testes farmacológicos, sendo desenvolvido com a intenção de se obter dados preliminares sobre as propriedades tóxicas de uma substância e seus efeitos adversos num organismo submetido a um tratamento de curta duração (LITCHFIELD e WILCOXON, 1949). Além disso, é de importância fundamental o estabelecimento da toxicidade experimental de produtos fitoterapêuticos com o objetivo de se evitar ou prevenir dano orgânico ao organismo humano (LAPA et al. 1983), além de contribuir para a determinação de doses para a elaboração de perfis dose-resposta em estudos farmacológicos (BRITO, 1994; OECD, 1999).

Silva e colaboradores (2001) estudaram o efeito de um extrato de *P. pilosa* sobre a reatividade uterina em ratos à ocitocina, e seus resultados evidenciam que a espécie promove relaxamento da musculatura lisa uterina via antagonismo do tipo misto com a ocitocina, resultados que refutam a indicação popular de *P. pilosa* como abortivo (SILVA, PETROVICK e LANGELOH, 2001), o que subsidia os resultados deste estudo na garantia de uma baixa toxicidade oral para o EHEPp.

5.2 Avaliação da atividade antinociceptiva

5.2.1 TESTE DE CONTORÇÕES ABDOMINAIS INDUZIDAS POR ÁCIDO ACÉTICO 0,6 %

Os resultados apresentados (Figura 7 e tabela 1 - apêndice) mostram que o EHEPp, administrado oralmente uma hora antes do estímulo pelo ácido acético, reduziu o número de contorções abdominais em camundongos de maneira significativa em comparação ao grupo controle nas doses de 100, 200, 400 e 600 mg/kg, cujos percentuais de inibição foram de 18.18, 33.25, 47.27, 65.81 e 73.94%, respectivamente. O valor de DE_{50} calculado foi de 295,52 mg/kg. Apenas a dose de 50 mg/kg não reduziu as contorções de maneira significante em comparação ao grupo controle. A indometacina (5 mg/kg, v.o.), um fármaco anti-inflamatório não-esteroidal, foi utilizado como fármaco de referência, promovendo redução no número de contorções em torno de 65,81% em comparação ao grupo controle.

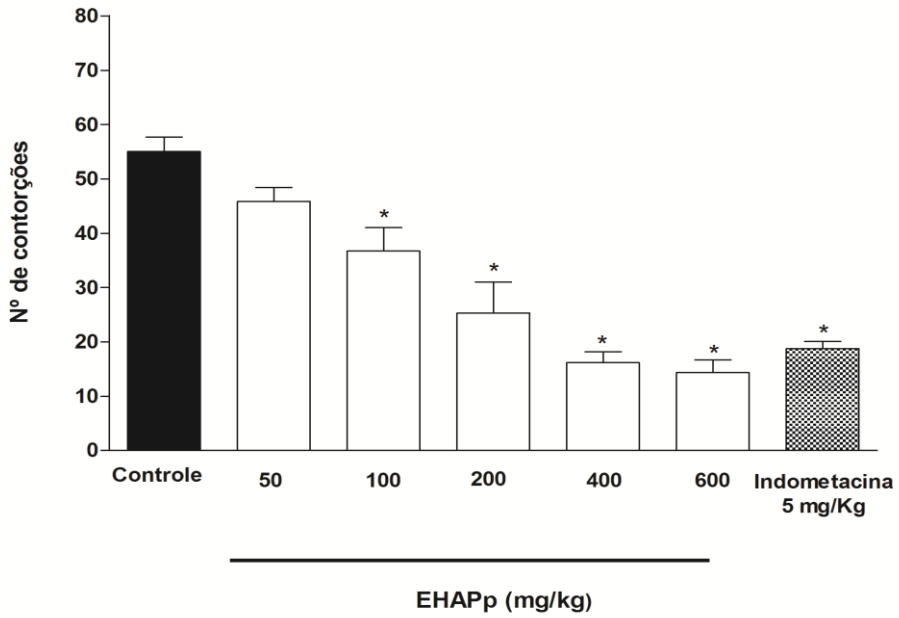

Figura 7: Efeito do EHEPp (50, 100, 200, 400 e 600 mg/kg) e da indometacina, por via oral, sobre as contorções abdominais induzidas pela administração intraperitoneal de ácido acético a 0,6%. No eixo das ordenadas é expresso o número de contorções abdominais durante 20 min.; no eixo das abscissas estão representados os grupos experimentais utilizados. Os valores são apresentados como média ± E.P.M. de 7-10 animais. * denota significância estatística (p < 0,05) dos grupos tratados em comparação ao grupo controle. ANOVA de uma via seguido de teste de Bonferroni.

As contorções abdominais induzidas pela administração intraperitoneal de ácido acético consistem em um modelo experimental clássico de dor inflamatória visceral bastante útil para avaliar as propriedades antinociceptivas e anti-inflamatórias de novos agentes farmacológicos (KOSTER, ANDERSON e DEBEER, 1959; COLLIER et al. 1968; LE BARS et al. 2001; SAVEGNAGO et al. 2007), na qual as ações estimulatórias do ácido acético desencadeiam alterações comportamentais esterotípicas em ratos e camundongos, que consistem em fortes contrações abdominais, contrações da musculatura principalmente das patas traseiras e músculos da região dorso-abdominal, entre outras alterações, que podem ser consideradas como reflexos resultantes de uma dor de ordem inflamatória ocasionada pelo desenvolvimento de uma peritonite aguda (VINEGAR, 1979; TJØLSEN e HOLE 1997; LE BARS et al. 2001).

Este método tem particular interesse na descoberta de drogas ou fármacos que exerçam efeito analgésico de natureza preferencialmente periférica (GENEE et al. 1998), embora o método seja sensível a fármacos que agem tanto periférica quanto centralmente, como a morfina e compostos relacionados (FUKAWA et al. 1980; PIETROVSKI, 2004), a anti-histamínicos e anticolinérgicos de ação central e periférica (PERAZZA et al. 2007) e tenha como uma característica marcante a sua baixa especificidade, uma vez que as contorções abdominais podem ser suprimidas por outros agentes não analgésicos, como agentes mio-relaxantes, bloqueadores adrenérgicos, entre outros (PEARL, ACETO e HARRIS, 1968; LOUX, SMITH e SALÉM, 1978), podendo, dessa forma, conduzir o experimentador à interpretações equivocadas (LE BARS et al. 2001). Apesar disso, este método ainda é uma ferramenta experimental que demonstra boa sensibilidade, pois permite avaliar os efeitos de fármacos analgésicos fracos (LE BARS et al. 2001).

Estudos fitoquímicos com *P. pilosa* mostraram que entre outros contituintes, esta apresentou em sua composição alguns tipos de moléculas de natureza diterpênica, os diterpenos undecanos e clerodano pilosanonas A/B e C, respectivamente (OHSAKI et al. 1987 e 1995), os quais são estruturalmente semelhantes ao diterpeno alucinógeno da sálvia salvinorina A, um composto reconhecido por sua forte atividade agonista sobre receptores opióides do tipo κ (JOHN, FRENCH e ERLICHMAN, 2006; MCCURDY et al. 2006). Por sua vez, agonistas de receptores κ demonstraram efetiva atividade antinociceptiva em modelos de dor visceral (HERRERO e HEADLEY, 1991; BURTON e GEBHART,

1995), como este modelo de estudo, cuja eficácia demonstrou ser dependente tanto de mecanismos periféricos quanto supraespinhais (DIOP et al. 1994; DANZEBRINK, GREEN e GEBHART, 1995).

Assim, os resultados obtidos neste ensaio sugerem uma ação antinociceptiva do EHEPp que pode ser mediada pela ativação de receptores κ, possivelmente de origem periférica, pois a ativação central desses receptores leva à alucinação, sedação e disforia (SHANNON et al. 2007; VANDERAH et al. 2008), efeitos que não foram observados no estudo dos efeitos do extrato em modelo experimental de comportamento. Além disso, foram realizados testes adicionais, utilizando outros modelos experimentais, no intuito elucidar melhor o efeito antinociceptivo do EHEPp.

5.2.2 TESTE DA PLACA QUENTE

Os resultados apresentados (Figura 8 e tabela 2-apêndice) mostram que o EHEPp (200, 400 e 600 mg/kg, v.o.) não alterou a latência dos animais submetidos ao estímulo da placa aquecida a 50 ± 0,5 ºC nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 minutos quando comparado ao grupo controle. Por outro lado, o fármaco de referência morfina (10 mg/kg, s.c.) prolongou significativamente a latência dos animais ao estímulo térmico quando comparado ao grupo controle nos tempos de 30, 60, 90 e 120 minutos.

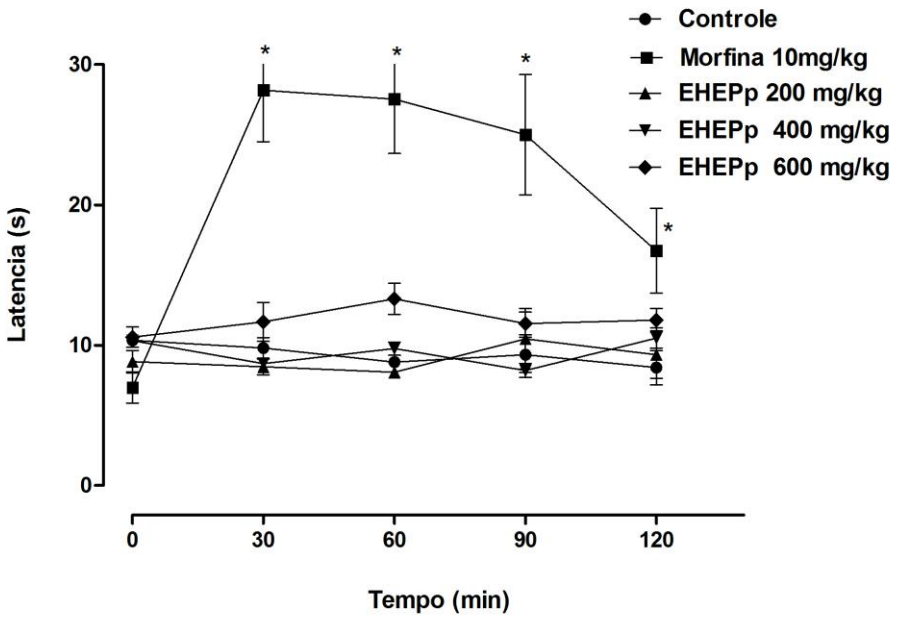

Figura 8: Efeito do tratamento com EHEPp nas doses de 200, 400 e 600 mg/kg, por via oral, e da morfina, via subcutânea, sobre a resposta nociceptiva termicamente induzida pela placa quente a 50 ºC ± 0,5 ºC. No eixo das ordenadas é representada a latência em segundos e no eixo das abscissas são expressos os tempos de avaliação em minutos. Os valores representam a média ± E.P.M. de 7-10 animais. * denota significância estatística ($p < 0,05$) dos grupos tratados em comparação ao grupo controle. ANOVA de duas vias seguido de teste de Bonferroni.

O teste da placa quente tem a propriedade de permitir a avaliação de antinocicepção mediada centralmente, uma vez que as respostas comportamentais dos animais submetidos à avaliação nesse aparato (lambidas das patas, sapateio e saltos na placa), são integradas em centros neuronais supraespinhais, sendo o tempo necessário para responder à estimulação térmica altamente sensível à ação de fármacos que exercem efeitos centrais, como o faz a morfina (LE BARS et al. 2001).

O calor é um agente nóxico frequentemente utilizado em modelos de dor aguda (ANTONIOLLI e VILLAR, 2003), a qual é mediada pela ativação de fibras nociceptivas (Fibras C e A-δ), que conduzem o impulso da periferia até o corno dorsal da medula espinhal, e posteriormente aos centros corticais (PIETROVSKI, 2004). Assim, neste modelo, o EHEPp não foi capaz de alterar os movimentos estereotipados dos animais (saltar ou lamber as patas) nos períodos de tempos avaliados. Por outro lado, a morfina, um fármaco analgésico narcótico, reconhecidamente dotado de atividade analgésica periférica e central, elevou significativamente a latência dos camundongos nos tempos de 30, 60, 90. Esse efeito da morfina é mediado pela sua atuação sobre receptores opióides,

ocasionando hiperpolarização neuronal, que leva a um aumento do limiar de excitabilidade do neurônio e maior resistência para a iniciação de um potencial de ação (HAESELER, 2006).

Portanto, os resultados deste teste sugerem que o efeito antinociceptivo do EHEPp, observado em outros testes do estudo, pode não envolver mecanismos centrais, o que é reforçado pela ausência de efeitos depressores sobre o sistema nervoso central pelo extrato quando o efeito do EHEPp foi avaliado no teste do campo aberto (dados não apresentados).

Por outro lado, a avaliação antinociceptiva do extrato hidroetanólico de partes aéreas de *Portulaca oleracea* var. *sativa*, uma planta do mesmo gênero de *P. pilosa*, e que compartilha algumas características botânicas com esta, mostrou-se eficaz em prolongar a latência dos animais experimentais tanto no modelo da placa quente quanto no teste de retirada de cauda (CHAN et al. 2000), demonstrando, portanto, antinocicepção através de um mecanismo de ação central, resultado que mostra que atividades biológicas similares nem sempre são compartilhadas entre espécies de mesmo gênero (KAHIYA, MUKARATIRWA e THAMSBORG, 2003), uma vez que, nem sempre a constituição fitoquímica entre espécies mostra um perfil de regularidade dentro do gênero (MORO et al. 2010), o que, portanto, pode acarretar diferenças nas ações sobre o mesmo sistema biológico.

5.2.3 TESTE DA FORMALINA

Os resultados deste estudo (Figura 9 e tabela 3-apêndice) mostram que o EHEPp, por via oral, reduziu de maneira significativa o tempo médio de lambida dos camundongos nas duas fases do teste da formalina em comparação ao grupo controle. Os percentuais de inibição na 1ª e 2ª fases foram de 38.79 e 49.23 % (200 mg/kg, v.o.), 60.61 e 53.03% (400 mg/kg, v.o.) e 75.18 e 87.53 % (600 mg/kg, v.o.), e os valores de DE_{50} foram 347,49 e 307,80 mg/kg para a 1ª e 2ª fases, respectivamente. A dose de 100 mg/kg não reduziu de maneira significante o tempo de lambida em relação ao grupo controle em ambas as fase do teste.

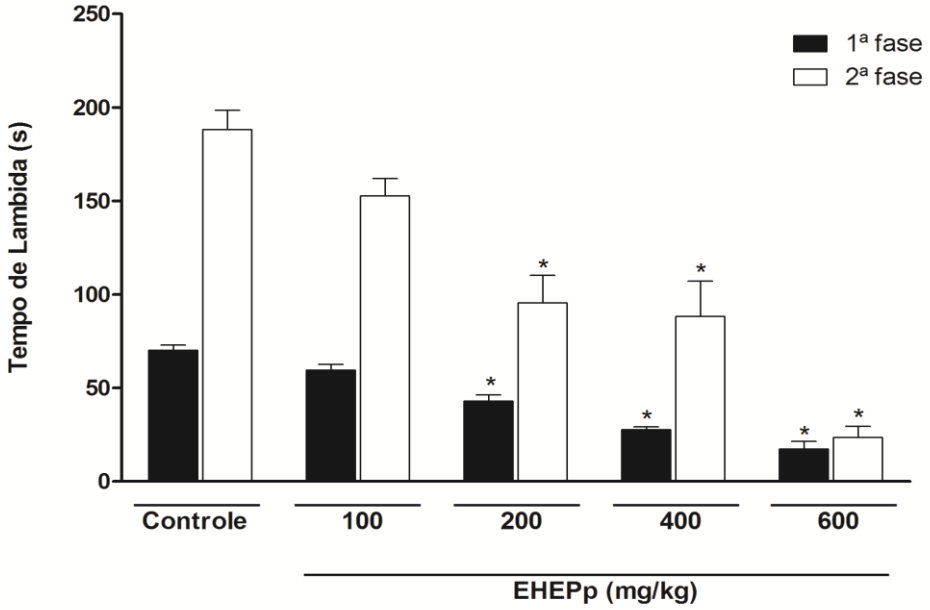

Figura 9: Efeitos do tratamento oral com EHEPp (100, 200, 400 e 600 mg/kg) sobre a resposta nociceptiva induzida pela injeção intraplantar de formalina a 1%. No eixo das ordenadas é representado o tempo de lambida em segundos e no eixo das abscissas são expressos os grupos experimentais utilizados. Os valores representam a média ± E.P.M. de 7 animais. * denota significância estatística (p < 0,05) dos grupos tratados comparados ao grupo controle. ANOVA de uma via seguido de teste de Bonferroni.

O teste da formalina é um modelo clássico de dor induzida por injúria tecidual em roedores (DUBUISSON e DENNIS 1977; FRANKLIN e ABBOTT, 1989; TJØLSEN et al. 1992), o qual permite avaliar a resposta comportamental dos animais à injeção subcutânea de solução de formalina diluída (ADER, 1968), embora haja diferenças na sensibilidade à formalina entre as várias espécies experimentais (ABBOTT, FRANKLIN e WESTBROOK, 1995).

A resposta nociceptiva à formalina mostra um perfil bifásico dividido em 1ª e 2ª fases, onde a primeira compreende o tempo de 0-5 minutos após a aplicação formalina, sendo resultado da estimulação direta química das fibras nociceptivas não-mielinizadas (Fibras C) e mielinizadas (A-δ), respectivamente, ocorrendo liberação de neuropeptídios como a substância P (SP) e o peptídio relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e de bradicinina (SHIBATA et al. 1989; VENEGAS e SCHAIBLE, 2000), os quais causam vasodilatação, extravasamento plasmático, ativação de fibras simpáticas, processo que irá induzir a biossíntese e liberação de

mais mediadores químicos pro-inflamatórios, como prostaglandinas e citocinas, importantes na fase inflamatória do teste (CORREA e CALIXTO,1993).

A 2ª fase do teste compreende o período entre 15-30 minutos, sendo caracterizado por intensa reação inflamatória deflagrada pela produção tecidual periférica de vários mediadores pró-inflamatórios como PGs, 5-HT, HIS e bradicinina, os quais induzem alterações nas propriedades eletrofisiológicas das estruturas nociceptivas, levando ao aumento da sensibilidade dos neurônios sensitivos periféricos e do corno dorsal, permitindo o estabelecimento de fenômenos de facilitação central (somação temporal) na transmissão dos impulsos para os centros superiores de integração dos processos dolorosos (TJØLSEN et al. 1997), o que é traduzido num aumento significativo do número de lambidas observadas na 2ª fase relativamente à 1ª fase, bem como inchaço das patas injetadas (HUNSKAAR, BERGE e HOLE, 1985; CORREA e CALIXTO, 1993; FRANÇA et al. 2001; OLIVEIRA, SOUSA e ALMEIDA, 2008).

Uma das características de fármacos e substâncias que causam antinocicepção na 1ª fase do teste da formalina e em outros modelos de dor, como a nocicepção induzida por glutamato e capsacina, é a sua capacidade de atuarem sobre um ou mais sistemas moduladores da dor neurogênica, como o fazem agentes como morfina e a dipirona (HUNSKAAR e HOLE, 1985; BEIRITH et al. 1998; RODRIGUES e DUARTE, 2000; JESSE, SAVEGNAGO e NOGUEIRA, 2007; CUNHA et al. 2010). Dessa maneira, uma vez que o EHEPp exerceu antinocicepção na 1ª fase, é possível que tal ação ocorra via mecanismos semelhante a esses fármacos.

Por outro lado, a maioria dos compostos que demonstram antinocicepção na 2ª fase do teste da formalina, o fazem pela atuação sobre um ou mais componentes da resposta inflamatória observada nessa fase do teste, de maneira que, seu efeito antinociceptivo resulta, provavelmente, de uma ação anti-inflamatória, que por sua vez, reduz a sensibilização dos terminais nociceptivos periféricos, bem como as trasmissões de potenciais de ação à raiz dorsal da medula espinhal, consequentemente, reduzindo a hiperalgesia resultante (FERREIRA, 1972).

Nesse contexto, embora os efeitos antinociceptivos do EHEPp observados na 2ª fase do teste da formalina e no modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético sugiram fortemente que essa ação ocorra sobre componentes da resposta inflamatória (FRANÇA et a. 2001; VANEGAS e SCHAIBLE, 2000), essa

hipótese não é sustentada pelos resultados obtidos com o estudo dos efeitos do extrato às respostas inflamatórias induzidas por carragenina e pelo óleo de cróton (Figuras 13 e 14, respectivamente). Esses modelos experimentais permitem avaliar, entre outros componentes, o envolvimento de eicosanóides, particularmente de metabólitos prostaglandínicos, os quais têm importância fundamental no processamento nociceptivo tanto no modelo de contorções abdominais quanto na 2ª fase do teste da formalina e que atuam como os principais alvos finais da ação de fármacos anti-inflamatórios não-esteroidais, os agentes mais amplamente utilizados para o tratamento da dor leve e moderada (ISRAF et al. 2007; LU et al. 2007; KIM et al. 2008; RAO, FANG e TZENG, 2009).

Assim, uma vez que os dados deste estudo sugerem que antinocicepção do EHEPp pode não resultar de uma ação inibitória sobre o sistema de mediadores eicosanóides, particularmente sobre os mediadores prostaglandínicos, realizou-se testes adicionais para a elucidação dos possíveis mecanismos envolvidos no efeito do extrato.

5.3 Estudo do mecanismo de ação do EHEPp

5.3.1 AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DO SISTEMA OPIÓIDE

A administração prévia do antagonista opióide naloxona (0,4 mg/kg, s.c.) reverteu, de maneira significante, o efeito do EHEPp (600 mg/kg, v.o.) em ambas as fases do teste da formalina (Figura 10). O fármaco opióide morfina (4 mg/kg, s.c.), administrado 30 minutos antes da formalina também reduziu, significativamente, o tempo de lambida em ambas as fases do teste. A naloxona, administrada isoladamente 45 minutos antes do estímulo, não apresentou diferença estatisticamente significante comparada ao grupo controle (NORTH, 1978; LIN et al. 1989). O tratamento prévio com naloxona reverteu completamente a antinocicepção desencadeada pela morfina nas duas fases.

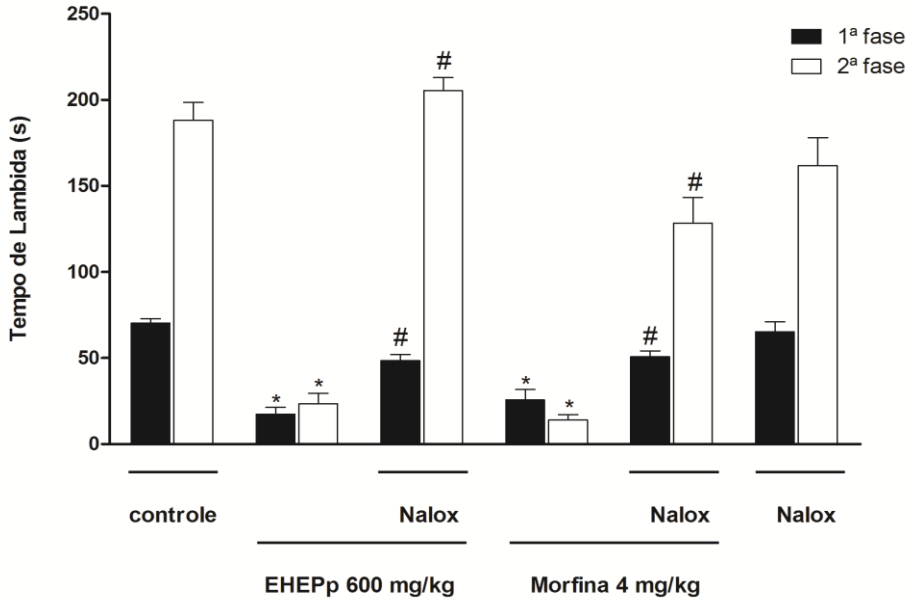

Figura 10: Efeito do pré-tratamento com o antagonista opióide naloxona (0,4 mg/kg, s.c.) sobre o efeito antinociceptivo do EHEPp (600 mg/kg, v.o.) e da morfina (4 mg/kg, s.c.) no teste da formalina em camundongos. O eixo das ordenadas representa o número de lambidas em segundos e no eixo das abscissas são expressos os grupos utilizados. Os valores representam a média ± E.P.M. de 7-10 animais. * denota significância estatística ($p < 0,05$) dos grupos tratados comparados ao grupo controle. # denota significância estatística ($p < 0,05$) dos grupos tratados na presença do antagonista versus o grupo tratado isoladamente. ANOVA de uma via seguido de teste de Bonferroni.

Clinicamente, os fármacos opióides como a morfina permanecem como ferramentas padrão para o tratamento da dor severa (GUTSTEIN e AKIL, 2001; MCNALLY e AKIL, 2002). A morfina, como fármaco de referência na maioria dos estudos envolvendo opióides, também é efetiva em inibir a resposta nociceptiva em vários modelos animais experimentais de dor severa, como no estudo de alodinia térmica e mecânica mediada por injúria do nervo ciático e em muitos modelos de dor neuropática (HERVERA et al. 2011). Devido às suas ações em vários sítios no SNC e na periferia, a morfina e fármacos relacionados causam inibição da resposta nociceptiva à formalina em ambas as fases do teste, refletindo sua capacidade de interferir em diferentes aspectos fisiopatológicos relacionados à dor e nocicepção, uma vez que cada etapa desse ensaio envolve mecanismos neurofisiológicos distintos, embora a resposta comportamental seja a mesma (HUNSKAAR, BERGE e HOLE, 1985; ABBOTT, FRANKLIN E WESTBROOK, 1995).

Por sua vez, os efeitos analgésicos dos opióides dependem da ligação dos fármacos aos seus receptores, os receptores opióides (principalmente do tipo μ), os quais pertencem à classe dos receptores acoplados às proteínas G, principalmente

a do subtipo inibitório $\mathbf{G_i}$ (STEIN et al. 2009). Uma vez ativados, esses receptores induzem uma cascata sinalizadora que culmina com a dissociação do trímero em duas unidades sinalizadoras, a subunidade $\mathbf{G_\alpha}$ e o complexo $\mathbf{G_{\beta\gamma}}$, as quais, respectivamente, inibem a ação da enzima adenilato ciclase, reduzindo os níveis intracelulares AMPc, e interagem com canais iônicos de cálcio e potássio na membrana, modulando a atividade desses canais (HERLITZE et al. 1996).

Todos os três tipos de receptores opióides (μ, δ e κ) promovem modulação da atividade de vários tipos de canais de cálcio (N, T, P/Q), suprimindo o influxo neuronal deste íon, tendo como consequência a inibição pré-sináptica via supressão da liberação de neurotransmissores, ocasionado interrupção da propagação de potenciais de ação, como por exemplo, a inibição da liberação de substância P, um neuropeptídio que apresenta função central na fase neurogênica do teste da formalina (YAKSH, 1988; JULIUS e BASBAUM, 2001; KONDO et al. 2005; STEIN, 2009). Pós-sinapticamente, a ativação de receptores opióides também ativa alguns tipos de canais de potássio, resultando em hiperpolarização celular e, portanto, em inibição da excitabilidade neuronal, dificultando, dessa forma a propagação de potenciais de ação (ZÖLLNER AND STEIN, 2007).

Por sua vez, os efeitos dos opióides em modelos experimentais de nocicepção podem ser bloqueados ou diminuídos pela utilização de antagonistas contra seus receptores. Por isso, neste estudo utilizou-se o antagonista não seletivo de receptores opióides naloxona, o qual, mesmo sendo dotado de ação antagonista não-seletiva, tem-se mostrado efetivo em competir com os opióides pelos sítios de ligação nos seus respectivos receptores (MAXWELL et al. 2005).

Não obstante a falta de dados espectroscópicos sobre a composição do EHEPp, é possível que a atividade antinociceptiva exibida pelo EHEPp seja devido à presença dos diterpenos bicíclicos em sua composição reportada por Ohsaki et al. (1987 e 1995). Esses tipos de diterpenos têm exibido atividade agonista sobre receptores opióides, principalmente do tipo κ (BÉGUIN et al. 2008; PRISINZANO e ROTHMAN, 2008), causando antinocicepção, que pode ser bloqueada pelo uso de antagonistas seletivos κ (JOHN, FRENCH e ERLICHMAN, 2006; MCCURDY et al. 2006) ou pela utilização de camundongos transgênicos (*"knockout")* para esses receptores (ANSONOFF et al. 2006).

De fato, estudos têm evidenciado que agonistas de receptores opióides periféricos do tipo κ têm se mostrado eficazes em desencadear antinocicepção em

modelos experimentais (KIVELL e PRISINZANO, 2010), bem como têm surgido como fármacos analgésicos promissores na terapia de alguns estados dolorosos, como ocorre na artrite reumatóide, por exemplo (BINDER e WALKER, 1998).

Por sua vez, demonstrou-se que diterpenos bicíclicos do tipo clerodano, a exemplo da salvinorina A (ANSONOFF et al. 2006), também atuam como agonistas de receptores κ em modelos de dor, a qual é estruturalmente relacionada aos diterpenos encontrados por Ohsaki et al. (1987 e 1995), os quais podem constituir os princípios ativos de *P. pilosa* responsáveis pelo efeitos neste estudo.

Além disso, também foi demonstrado que agonistas de receptores κ ativam perifericamente a via NO-GC-GMPc na produção de antinocicepção (CUNHA et al. 2012), de maneira que, os resultados obtidos no estudo dos possíveis mecanismos de ação do EHEPp são compatíveis com a presença de diterpenos neste extrato relatados por aquele autor, sugerindo que o EHEPp possa atuar de maneira inespecífica sobre mais de um tipo de receptor opióide (HERVERA et al. 2011), pois na presença de naloxona o extrato teve seu efeito revertido (Figura 10), o que requereria a utilização de antagonistas específicos para elucidar os tipos de receptores envolvidos. Por outro lado, o EHEPp também pode está inibindo a função de um ou mais subtipos de canais de cálcio, possibilidade que necessitaria ser avaliada através da ampliação deste estudo.

5.3.2 AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DA VIA ÓXIDO NÍTRICO/GUANILATO CICLASE/GMPc

O pré-tratamento experimental com os inibidores inespecíficos da óxido nítrico sintase L-NAME (20 mg/kg, i.p.) e da guanilato ciclase solúvel azul de metileno (1 mg/kg, i.p.) reverteu o efeito do EHEPp (600 mg/kg, v.o.) de maneira significante em ambas as fases do teste da formalina (Figura 11). Além disso, o tratamento com os inibidores isoladamente não alterou de maneira significante a resposta comportamental à formalina em comparação ao grupo controle, demonstrando que esses agentes, quando isoladamente, não são capazes de promover alterações na resposta basal dos animais à estimulação nociceptiva pela formalina.

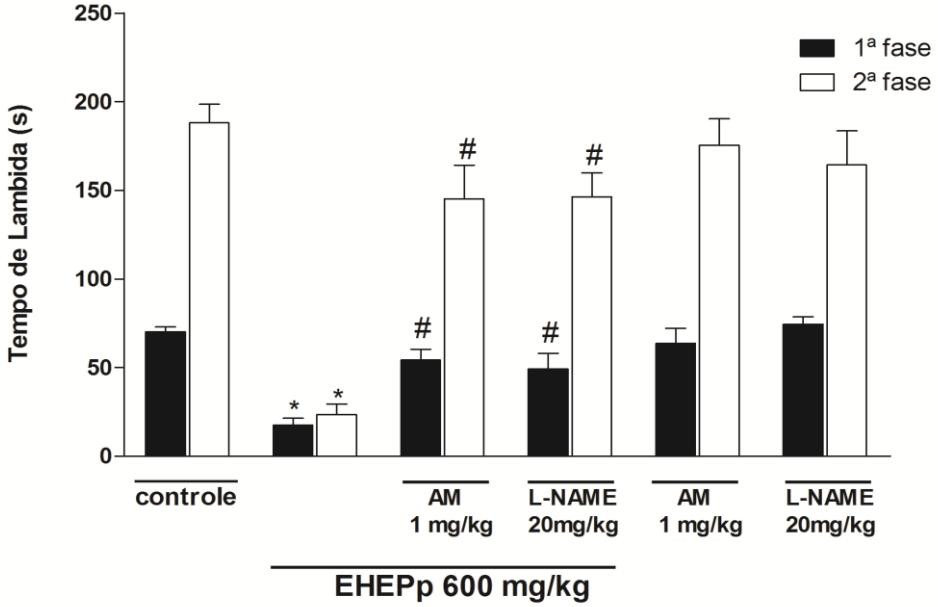

Figura 11: Efeito do pré-tratamento com os inibidores da óxido nítrico sintase (L-NAME 20 mg/kg, i.p.) e da guanilato ciclase solúvel (azul de metileno (AM) 1 mg/kg, i.p.) sobre o efeito antinociceptivo do EHEPp (600 mg/kg, v.o.) no teste da formalina. O eixo das ordenadas representa o número de lambidas em segundos e no eixo das abscissas são expressos os grupos experimentais utilizados. Os valores representam a média ± E.P.M. de 7 animais. * denota significância estatística ($p < 0,05$) dos grupos tratados comparados ao grupo controle. # denota significância estatística ($p < 0,05$) dos grupos tratados na presença do antagonista versus o grupo tratado isoladamente. ANOVA de uma via seguido de teste de Bonferroni.

Há evidências experimentais de que o efeito analgésico periférico do fármaco opióide morfina assim como de outros agentes analgésicos tradicionalmente utilizados na prática clínica como a dipirona (LORENZETTI e FERREIRA, 1985) e o diclofenaco (TONUSSI e FERREIRA, 1994) está associado com a estimulação periférica da via óxido nítrico-guanilato ciclase solúvel-GMP cíclico (NO-GCs-GMPc).

A participação da via NO-guanilato ciclase-GMPc no efeito antinociceptivo de opióides é sustentada por várias observações, entre as quais a reversão do efeito antinociceptivo periférico da morfina tanto por inibidores da síntese de NO (L-NAME e N^{W}-nitro-monometil-L-arginina, L-NMMA) quanto por inibidores da guanilato ciclase solúvel (Azul de metileno ou H-[1,2,4] oxadiazolo [4,3,-alquinoxalín-1-ona, OQD), além da observação da potencialização do efeito da morfina pela administração periférica de inibidores da fosfodiesterase do GMPc como o sildenafila, capazes de aumentar as concentrações intracelulares do GMPc e portanto, a transmissão da via (FERREIRA, DUARTE e LORENZETTI, 1991; MIXCOATL-ZECUATL, AGUIRRE-BAÑUELOS e GRANADOS-SOTO, 2000). Além disso, está claramente estabelecido

o fato de o NO ser uma molécula sinalizadora liberada em resposta à ação da morfina (WELTERS et al. 2000; CADET, 2004).

A via NO-GC-GMPc depende da síntese e liberação de NO desencadeada pela ativação da NO sintase, que pode ser inibida experimentalmente pelo L-NAME (FERREIRA, DUARTE e LORENZETTI, 1991), o que leva à ativação da enzima guanilato ciclase, resultando na formação do mais importante mensageiro do sistema, o GMPc (SOARES DE MOURA et al. 2004). As concentrações intracelulares de GMPc são reguladas tanto pela ação da guanilato ciclase quanto pela taxa de degradação do GMPc pela ação de fosfodiesterases específicas para esse mensageiro (JAIN et al. 2001). Nessa transmissão, o NO ativa a GC, que catalisa a formação de GMPc a partir de GTP, ao passo que as fosfodiesterases catalisam a hidrólise do GMPc e, dessa forma, finalizam a transdução do sinal (PYNE, ARSHAVSKY e LOCHHEAD, 1996).

Por sua vez, o azul de metileno (AM) é um inibidor inespecífico da GCs, o qual, de maneira indireta, oxida o ferro hêmico desta enzima, inativando-a (MARUNA, MASEK e SCHREIBER, 1994; HOLTHUSEN, 1997) o qual tem sido aplicado frequentemente em investigações do envolvimento do GMPc nos efeitos do NO sobre os mecanismos da dor (ZAKARIA et al. 2006), de maneira que uma diminuição no acúmulo de GMPc produzida pelo AM consiste em forte indício de possível envolvimento da via NO/GC/GMPc no processo (HOLTHUSEN, 1997).

Além disso, demonstrou-se que o NO periférico desempenha uma função dupla na modulação nociceptiva no teste da formalina. Assim, seus resultados podem refletir uma difusão diferencial de concentrações aumentadas de agentes sobre subgrupos de aferentes primários que se projetam para diferentes lâminas do corso dorsal medular (KAWABATA et al. 1994). Por sua vez, na estimulação nociceptiva química que ocorre no teste da formalina, o estímulo se difunde mais para os tecidos cutâneos, determinando, portanto, efeitos marcadamente antinociceptivos (MELLER et al. 1992a,b), ao contrário do que ocorre no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético, onde o estímulo químico se projeta mais predominantemente sobre os nociceptores dos tecidos intradérmicos, de maneira que, neste modelo, o NO atua como transmissor excitatório, causando, portanto, nocicepção ao invés de antinocicepção (ZAKARIA et al. 2006; PERIMAL et al. 2010).

Assim, os dados apresentados indicam a participação da via NO/GC/GMPc na antinocicepção mediada por *P. pilosa*, sugerindo que o EHEPp possa exercer efeito antinociceptivo de origem relativamente mais periférica do que central.

5.3.3 AVALIAÇÃO DO ENVOLVIMENTO DE CANAIS DE POTÁSSIO SENSÍVEIS A ATP

O pré-tratamento com o inibidor seletivo de canais potássio sensíveis a ATP glibenclamida (10 mg/kg i.p.), 30 minutos antes, reverteu completamente e de maneira significativa o efeito do EHEPp (600 mg/kg v.o.) sobre nocicepção induzida pela formalina (Figura 12). A glibenclamida administrada isoladamente não alterou, de maneira significante, a resposta à formalina quando comparada ao grupo controle (RODRIGUES e DUARTE, 2000).

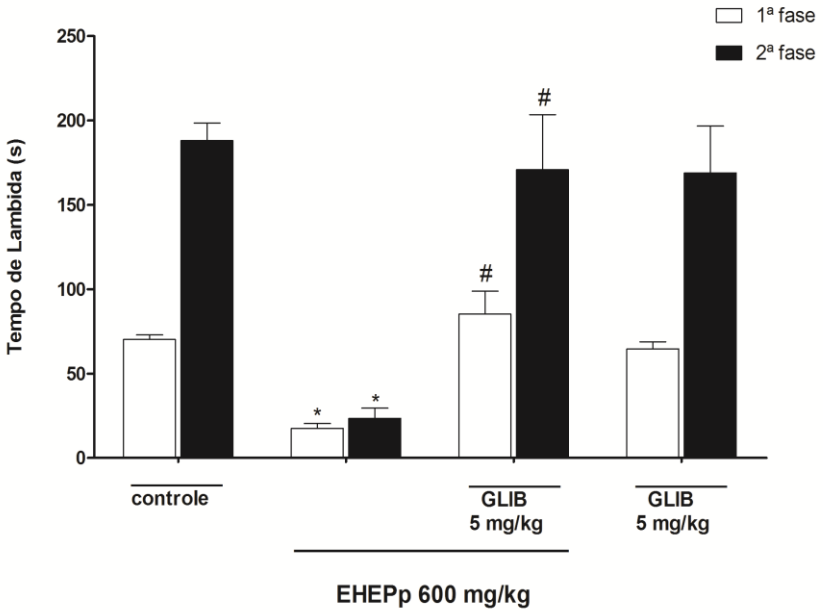

Figura 12: Efeito do pré-tratamento com o bloqueador de canais de potássio sensíveis a ATP glibenclamida (GLIB, 10 mg/kg, i.p.) sobre o efeito antinociceptivo do EHEPp (600 mg/kg, v.o.) no teste da formalina. O eixo das ordenadas representa o número de lambidas em segundos e no eixo das abscissas são expressos os grupos experimentais utilizados. Os valores representam a média ± E.P.M. de 7 animais. * denota significância estatística ($p < 0,05$) do grupo tratado comparado ao grupo controle. # denota significância estatística ($p < 0,05$) do grupo tratado na presença do bloqueador versus o grupo tratado isoladamente. ANOVA de uma via seguido de teste de Bonferroni.

Muitos estudos mostram que a glibenclamida, um fármaco antidiabético pertencente ao grupo das sulfoniluréias, bloqueia seletivamente o subtipo de canal de potássio K_{ATP}, não exercendo efeito sobre outros tipos de canais de potássio, como os canais de potássio ativados por cálcio e os operados por voltagem (AMOROSO et al. 1990; LAZARO-IBANEZ, TORRES-LOPEZ e GRANADOS-SOTO, 2001; ALVES e DUARTE, 2002).

Os canais de potássio sensíveis à ATP (K_{ATP}) estão presentes em quase todos os tipos de células excitáveis e não-excitáveis (AMARANTE, ALVES e DUARTE, 2004). A atividade desses canais exibe, basicamente, correntes inibitórias que regulam a excitabilidade neuronal (RUDY, 1988), propriedade essa que tem sido associada a vários processos fisiológicos, incluindo a dessensibilização neuronal e analgesia (KURIYAMA, KITAMURA e HIROYUKI, 1995; GARCIA et al. 1997).

Outros estudos evidenciaram que os K_{ATP} estão envolvidos no efeito antinociceptivo periférico de uma série de agentes como morfina, codeína, diclofenaco, produtos naturais e muitos outros agentes (RODRIGUES e DUARTE, 2000; ORTIZ, GRANADOS-SOTO e CASTAÑEDA-HERNÁNDEZ, 2003; JESSE, SAVEGNAGO e NOGUEIRA, 2007; ROMERO E DUARTE, 2009; PERIMAL et al. 2010). Por sua vez, sugeriu-se como um dos mecanismos moleculares de ação da morfina a ativação da via NO/GC/GMPc (FERREIRA, DUARTE e LORENZETTI, 1991; DUARTE e FERREIRA, 1992). Adicionalmente a esses achados, demonstrou-se, também, que a antinocicepção periférica da morfina é altamente dependente da ativação de canais de potássio sensíveis a ATP (RODRIGUES e DUARTE, 2000). Por sua vez, estudos mostraram que a antinocicepção periférica do doador de NO nitroprussiato sódico e do análogo do GMPc diburil GMPc está associada com a abertura dos K_{ATP} (SOARES et al. 2000; SOARES e DUARTE, 2001), estabelecendo, assim, um elo entre a participação da via NO/GC/GMPc na analgesia induzida por certos fármacos e a ativação dos canais de potássio K_{ATP} (RODRIGUES et al. 2005).

Demonstrou-se que os mecanismos que levam à analgesia opióide envolvem a via das fosfatidilinositol-3-quinases/ (PI3K/Aκt), cuja ativação ocorre pela atividade do complexo βγ da proteína G acoplada aos receptores opióides (DIMMELER et al. 1999; FULTON et al. 1999), a qual sequencialmente pode ativar a NO sintase neuronal e levar à biossíntese de NO e portanto, à ativação da GC, que uma vez atuando sobre o GTP forma GMPc, o qual ativa a proteína quinase dependente de

GMPc (PKG), que por fim, pode fosforilar os K_{ATP} e ativando-os, ocasionar hiperpolarização neuronal, aumentando, assim, o limiar de excitabilidade, tendo como consequência o bloqueio do disparo de potenciais de ação, produzindo analgesia, principalmente de origem periférica (CUNHA et al. 2010).

Portanto, tomando em conjunto os resultados do envolvimento opióide, do sistema NO/GC/GMPc e de canais de potássio K_{ATP} na antinocicepção do EHEPp, e confrontando-os com dados descritos na literatura, é possível sugerir que o extrato objeto deste estudo pode atuar, pelo menos parcialmente, através dessa via, uma vez o EHEPp teve seu efeito antinociceptivo revertido na presença dos antagonistas e inibidores enzimáticos experimentais utilizados no estudo, assemelhando-se à ação periférica de fármacos como a morfina, dipirona e diclofenaco, por exemplo (ORTIZ, GRANADOS-SOTO e CASTAÑEDA-HERNÁNDEZ, 2003; SACHS, CUNHA e FERREIRA, 2004; CUNHA et al. 2010).

Além disso, essa hipótese é reforçada em virtude de haver descrição na literatura mostrando que diterpenos bicíclicos, como os encontrados em partes aéreas de *P. pilosa* (OHSAKI et al. 1987 e 1995), são capazes de ativar receptores opóides do tipo κ (LEE et al. 2005) e, em conseguência levar à ativação da via sinalizadora PI3Kg/AKT (CUNHA et al. 2012), culminando na formação de NO e ativação da GCs e por fim, formação de GMPc, resultando em ativação de PKG e finalmente abertura de K_{ATP} por meio da atividade quinase dessa enzima (CUNHA et al. 2010). Assim, os resultados aqui apresentados constituem fortes indícios da participação da via NO/GCs/GMPc/K_{ATP} no efeito inibitório do EHEPp sobre a transmissão nociceptiva.

5.4 Avaliação dos efeitos do EHEPp sobre o sistema nervoso central de ratos

Os resultados deste estudo mostram que o EHEPp (600 mg/kg, v.o.) não foi capaz de alterar significativamente a atividade locomotora dos animais tratados em comparação ao grupo controle (dados não mostrados).

O teste do campo aberto é um modelo que permite avaliar a atividade exploratória de animais a um novo ambiente, a ansiedade, atividade estimulante, além da sedação e atividade locomotora (PRUT e BELZUNG, 2003; ENNACEUR,

MICHALIKOVA e CHAZOT, 2006). Assim, neste teste, animais tratados que têm atividade exploratória diminuída constitui forte indício de ação sedativa (PRUT e BELZUNG, 2003; HUANG et al. 2007). Portanto, uma vez que o EHEPp, por via oral, não promoveu alteração na atividade locomotora dos animais tratados, sugere-se que este extrato, por essa via, possa não exercer ação depressora significativa sobre o sistema nervoso central de ratos.

Assim, os dados deste estudo concordam com os resultados obtidos na placa quente na sugestão de que a antinocicepção do EHEPp possa não está relacionada à atividade inibitória inespecífica sobre componentes centrais, mas sendo possível que tal efeito deva-se a uma ação marcadamente periférica.

5.5 Avaliação da atividade anti-inflamatória do EHEPp

5.5.1 EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA

Os resultados deste estudo mostram que o EHEPp (doses de 400 e 600 mg/kg, v.o.) não reduziu a formação de edema induzido por carragenina em nenhum dos tempos avaliados em comparação ao grupo controle. Por outro lado, a indometacina (10 mg/kg, v.o.) reduziu, significativamente ($p < 0,05$), a formação de edema em todos os tempos avaliados (1ª, 2ª, 3ª, 4ª e 5º h) em comparação ao grupo controle (Figura 13).

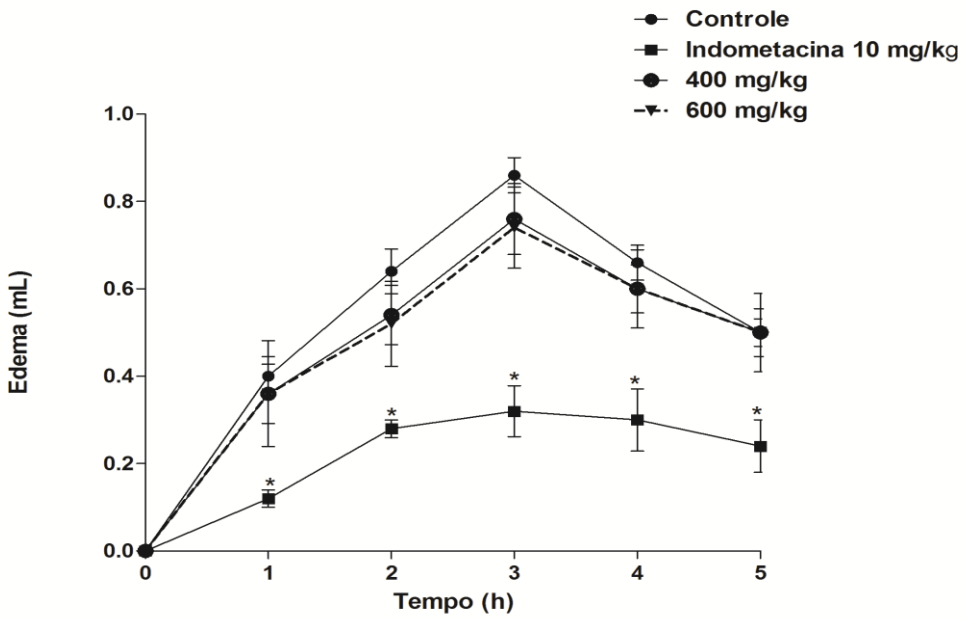

Figura 13: Efeito do tratamento com o EHEPp (400 e 600 mg/kg, v.o.) ou indometacina (10 mg/kg, v.o.) sobre a resposta inflamatória induzida pela injeção intraplantar de carragenina a 1%. O eixo das ordenadas expressa o edema formado (em mL) e o eixo das abscissas representa os tempos de avaliação expressos em horas. Os valores representam a média ± E.P.M. de 7 animais. * denota significância estatística ($p < 0,05$) dos grupos tratados comparados ao grupo controle. ANOVA de duas vias seguido de teste de Bonferroni.

Este ensaio farmacológico, apesar de tradicional, é complexo, pois envolve inúmeros mediadores químicos como as citocinas pró-inflamatórias indutoras como o fator de necrose tumoral alfa (TNF-α) e interleucinas (IL-6, IL-1β e IL-8), bem como mediadores finais ou efetores como as prostaglandinas (PGs) e aminas simpatomiméticas, estas últimas moduladas pelas primeiras (CUNHA et al. 1991 e 1992). Além desse fator, a resposta à carragenina envolve diferentes fases (CUNHA et al. 1991 e 1992), com a fase inicial (1-2 h) tendo envolvimento preponderante de serotonina (5-HT), histamina (HIS) e bradicinina (BK) (DI ROSA e SORRENTINO, 1968), e uma fase tardia (3-5 h), como atuação marcante de PGs, que atuam na sustentação do edema (DI ROSA, WILLOUGHBY e GIROUD, 1971; DI ROSA, 1972).

Por sua vez, o NO têm importância fundamental neste modelo de inflamação aguda como potencializador da resposta inflamatória, seja através de sua potente ação vasodilatadora no aumento do fluxo sanguíneo local (MONCADA e HIGGS, 1993) ou aumentando a produção de prostaglandinas pró-inflamatórias (SAUTEBIN e DI ROSA, 1994), bem como reagindo com ânions superóxido para formar

peroxinitrito, uma potente molécula oxidante capaz de desencadear peroxidação lipídica e dano celular (RUBBO et al. 1994).

Além disso, o NO está envolvido tanto na fase inicial (0-2 h), com predominância da atividade da isoforma constitutiva endotelial da NO sintase quanto na fase tardia (3-5 h), com predomínio da atividade da NO sintase induzida (SALVEMINI et al. 1996), o que, quando comparado aos resultados obtidos neste estudo, leva à compreensão de que o EHEPp, quando testado neste modelo, pode não está inibindo de maneira significante ambas as vias do NO, constitutiva e induzida, no contexto da inflamação, onde o NO exerce ação estimulatória, ao contrário dos efeitos do extrato no teste da formalina (Figura 11), onde o NO apresenta efeitos inibitórios sobre a transmissão sináptica (MELLER et al. 1992a, b), o que pode refletir uma ação diferencial do extrato sobre vias diferentes que levam à formação de NO.

Dessa forma, uma vez que o EHEPp, administrado oralmente, não inibiu de maneira significante o desenvolvimento de edema, sugere-se que essa droga pode não está exercendo efeitos anti-inflamatórios/antiedematogênicos neste modelo de inflamação aguda, de maneira que os dados obtidos neste estudo corroboram com os resultados dos testes nociceptivos preliminares e do estudo do mecanismo de ação na sugestão de que a antinocicepção demonstrada pelo EHEPp possa não está relacionada a efeitos inibitórios sobre componentes inflamatórios, ou seja, é provável que o EHEPp, nas doses e via de administração utilizadas, possa não atuar sobre a biossíntese de mediadores químicos inflamatórios, particularmente sobre derivados do ácido aracdônico como as PGs, como o fazem os anti-inflamatórios não-esteroidais ou sobre citocinas, como o fazem os glicocorticóides (ROCHA et al. 2006); é provável que sua ação ocorra devido à estimulação periférica do sistema opióide e da via NO/GC/GMPc/K_{ATP}, vias essas que tem sido reconhecidas como importantes alvos farmacológicos para ação analgésica de substâncias (CUNHA et al. 2010).

5.5.2 DERMATITE INDUZIDA PELO ÓLEO DE CRÓTON

Neste teste, o EHEPp (400 e 600 mg/kg, v.o.) não foi capaz de inibir o desenvolvimento de edema induzido pelo óleo de cróton em comparação ao grupo controle (Figura 14). Por outro lado, o fármaco de referência do estudo, a dexametasona (10 mg/kg, v.o.), um anti-inflamatório esteroidal, inibiu a formação e o desenvolvimento de edema de maneira altamente significante em comparação ao grupo controle ($p < 0,05$) 6 horas após o estímulo inflamatório do óleo de cróton.

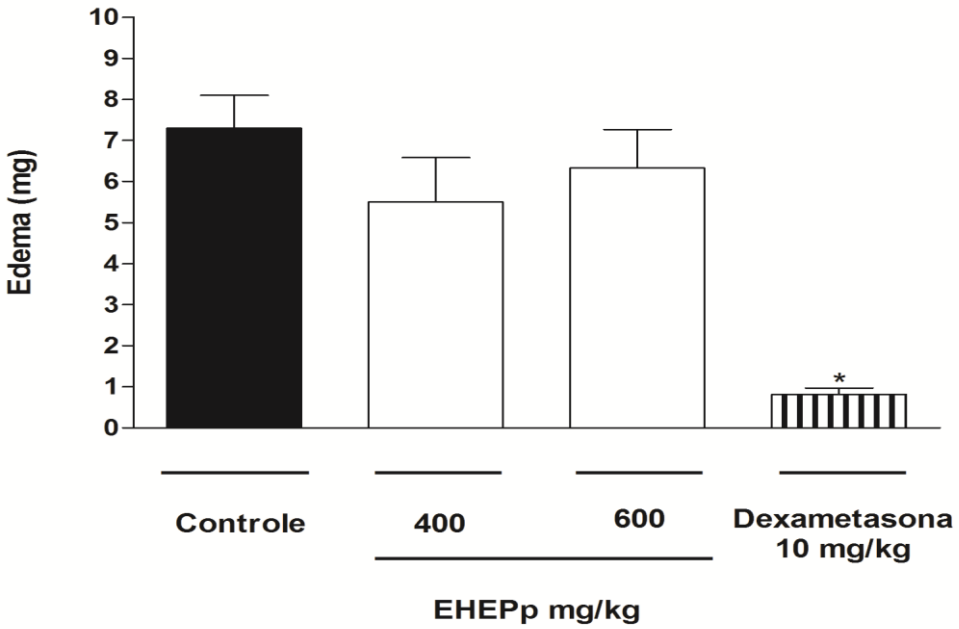

Figura 14: Efeito do pré-tratamento com o EHEPp (400 e 600 mg/kg, v.o.) ou dexametasona (10 mg/kg, v.o.) sobre o processo inflamatório induzido pela aplicação tópica de óleo de cróton em orelha de camundongos. No eixo das ordenadas é expresso o edema formado (em mg) e no eixo das abscissas são representados os grupos experimentais utilizados. Cada coluna representa a média ± E.P.M. de 7 animais. ***** denota significância estatística ($p < 0,05$) dos grupos tratados comparados ao grupo controle. ANOVA de uma via seguido de teste de Bonferroni.

O modelo de indução inflamatória aguda em orelha de camundongos pelo óleo de cróton tem sido amplamente utilizado como ferramenta de avaliação da ação antiedematogênica de vários agentes, entre os quais os fármacos anti-inflamatórios não-esteroidais (FAINEs), bem como os esteroidais, os glicocorticoides (TUBARO, 1985).

A resposta inflamatória gerada pela aplicação tópica deste agente, caracterizada por estresse oxidativo, proliferação e ativação de oncogenes ocorre devido aos efeitos biológicos de seu principal constituinte bioativo, o éster de forbol denominado TPA ou 4ß-12-*O*-tetradecanoilforbol-13-acetato (GARBOR, 2003; GARG, RAMCHANDANI e MARU, 2008).

Os ésteres de forbol têm a propriedade de mimetizar as ações do segundo mensageiro diacilglicerol (DAG) em ativar a proteína quinase C (PKC), desencadeando vários efeitos biológicos como a indução de tumores, migração celular, irritação cutânea, sendo capaz de induzir liberação de HIS, citocinas como IL-2 e proteases (GOEL et al. 2007). Assim, no contexto inflamatório, o TPA, dotado de natureza físico-química anfifílica, promove várias ações, entre as quais alteração da adesão celular bem como indução e liberação de AA, tendo como um dos efeitos finais a produção de PGs (WEINSTEIN et al. 1979), através de um mecanismo dependente da ação da PKC e, principalmente, da ação da enzima fosfolipase A_2 (PL A_2) sobre os lípídios de membrana (FURSTENBERGER et al. 1981).

Portanto, uma vez que a dexametasona foi capaz de inibir o edema resultante da ação do TPA, pois exerce efeito anti-inflamatório através de vários mecanismos, como inibição da formação de citocinas pró-inflamatórias como TNF-α e IL-1β via inibição de fatores transcricionais para proteínas inflamatórias dependentes da ação do NF-κB (UMEZAWA e CHACHARENPONG, 2002), bem como inibe a biossíntese de PGs via mecanismo dependente da ação inibitória da anexina I sobre a PLA_2, com bloqueio da liberação do AA necessário à biossíntese de PGs (SOLITO et al. 1998; KIM, RHEE e KO, 2001), os resultados deste estudo mostram que o EHEPp não exerceu efeito antiedematogênico neste modelo e, portanto, é possível que não atue significativamente sobre os mediadores inflamatórios supracitados envolvidos na resposta ao TPA, o que juntamente com os resultados obtidos no estudo da resposta à carragenina, reforça a sugestão de que a ação antinociceptiva periférica do EHEPp pode não ocorrer devido a inibição de componentes pró-inflamatórios envolvidos nos modelos experimentais estudados.

6 CONCLUSÃO

- O extrato foi considerado de baixa toxicidade;
- O EHEPp (200, 400 e 600 mg/kg, v.o.) demonstrou efeito antinociceptivo preliminar no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético 0,6%;
- O EHEPp (200, 400 e 600 mg/kg, v.o.) não exerceu antinocicepção no teste da placa quente a 50 ºC, sugerindo que seu efeito antinociceptivo possa não relacionar-se a efeitos mediados centralmente;
- O EHEPp, nas mesmas doses, foi eficaz em ambas as fases (neurogênica e inflamatória) do teste da formalina;
- É possível que a antinocicepção mediada pelo EHEPp seja origem periférica e não dependente de uma ação anti-inflamatória sobre a cascata de metabólitos prostaglandínicos ou de efeito inibitório sobre a fosfolipase A_2, sistemas de mediadores predominantes nos modelos inflamatórios avaliados;
- O EHEPp não apresentou efeitos depressores sobre o sistema nervoso central de ratos no teste do campo aberto;
- Há envolvimento de receptores opióides no efeito do EHEPp;
- É provável que ocorra ativação periférica da via NO/GC/GMPc/K_{ATP} na antinocicepção mediada pelo EHEPp.

Com base nesses resultados, aventou-se uma hipótese de mecanismo de ação do EHEPp (Figura 15), mecanismo esse que seria similar à ação antinociceptiva periférica do fármaco opióide morfina descrito na literatura.

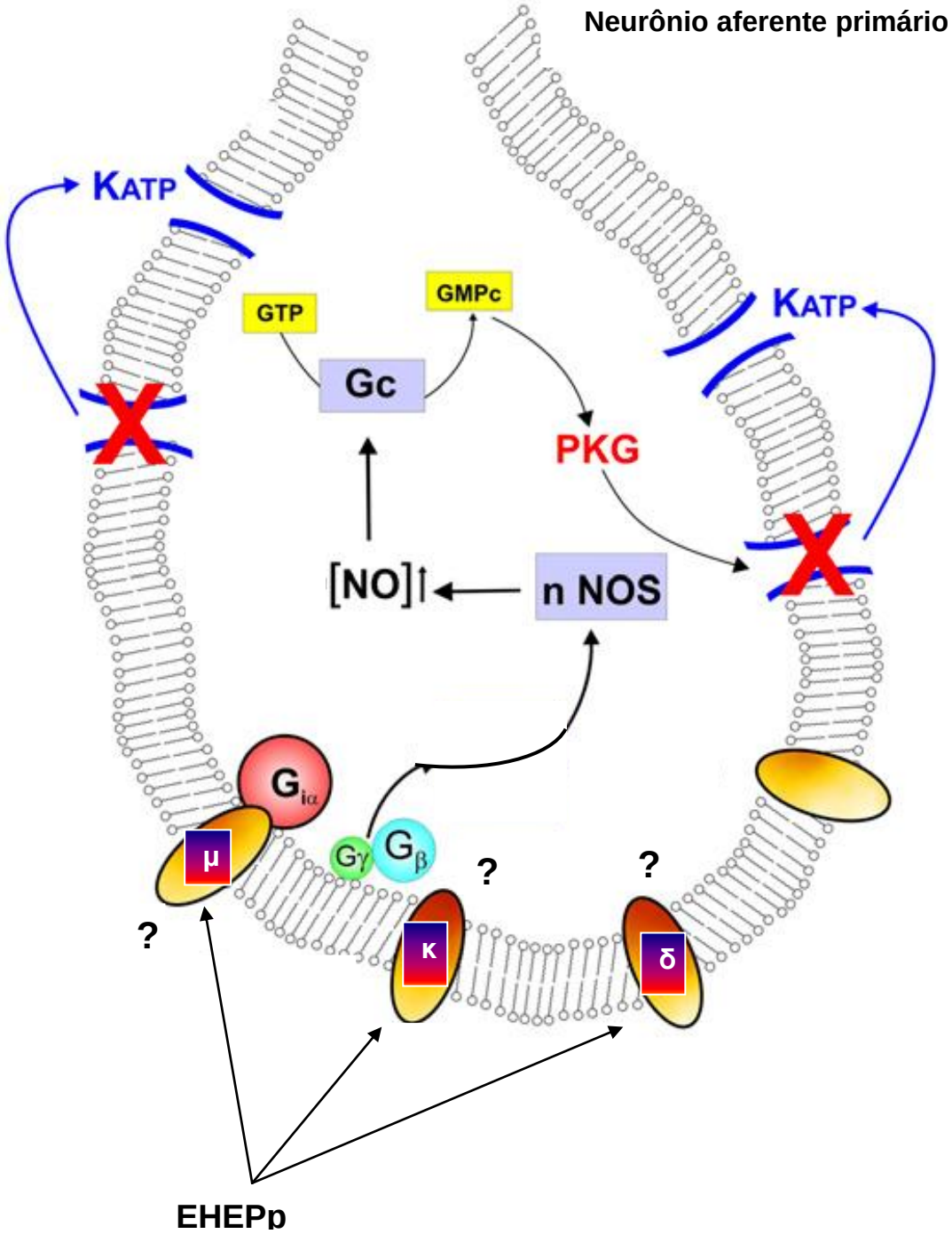

Figura 15: Representação esquemática da base molecular da antinocicepção periférica do EHEPp. A ativação de receptores opióides nos neurônios nociceptivos primários leva à ativação da **nNOS**, culminando com a produção de **NO**. Por sua vez, o NO, indiretamente, ativa o sistema **GMPc/PKG**, ocasionando, por último, abertura dos K_{ATP} e hiperpolarização do neurônio nociceptivo primário. Figura adaptada de CUNHA et al. (2010).

7 REFERÊNCIAS

ABACIOGLU, N.; TUNÇTAN, B.; AKBULUT, E.; CAKICI, I. Participation of the components of L-arginine/nitric oxide/ cGMP cascade by chemically-induced abdominal constriction in the mouse. **Life Sciences**, v. 67, p. 1127 - 1137, 2000.

ABBOTT, F.V.; FRANKLIN, K.B.J.; WESTBROOK, R.F. The formalin test: scoring properties of the first and second phases of the pain response in rat. **Pain**, v. 60, p. 91 - 102, 1995.

ADER, R. Effects of early experiences on emotional and physiological reactivity in the rat. **Journal of Comparative & Physiological Psychology**, v. 6, p. 264 -268, 1968.

AGUILAR-BRYAN, L.; CLEMENT, J.P.; GONZALEZ, G.; KUNJILWAR, K.; BABENKO, A.; BRYAN, J.Toward understanding the assembly and structure of K_{ATP} channels. **Physiological Reviews**, v. 78, p. 227 - 245, 1998.

AGUIRRE-BAÑUELOS, P.; GRANADOS-SOTO, V. Evidence for the participation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway in the antinociceptive action of meloxican in the formalin test. **European Journal of Pharmacology**, v. 395, p. 9 - 13, 2000.

AHLUWALIA, A.; PERRETTI, M. B_1 receptors as a new inflammatory target. Cold this B the 1? **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 20, p. 100 – 104, 1999.

ALEY, K.O.; MCCARTER, G.; LEVINE, J.D. Nitric oxide signaling in pain and nociceptor sensitization in the rat. **Journal of Neuroscience**, v. 18, p. 7008 - 7014, 1998.

ALMEIDA, M.Z. **Plantas Medicinais**. Salvador, BA: Editora da Universidade Federal da Bahia, 2000.

ALVES, D.P.; DUARTE, I.D.G., Involvement of ATP-sensitive K^+ channels in the peripheral antinociceptive effect inducible by dipyrone. **European Journal of Pharmacology**, v. 444, p. 47 - 52, 2002.

AMARANTE, L.H.; ALVES, D.P.; DUARTE, I.D.G. Study of the involvement of K+ channels in the peripheral antinociception of the n-opioid receptor agonist bremazocine. **European Journal of Pharmacology**, v. 494, p. 155 -160, 2004.

AMOROSO, S.; SCHMID-ANTOMARCHI, H.; FOSSET, M.; LAZDUNSKI, M. Glucose, sulfonylureas, and neurotransmitter release: role of ATP-sensitive K+ channels. **Science**, v. 247, p. 852 - 854, 1990.

ANGRINI, M.; LESLIE, J. C.; SHEPHARD, R. A. “Effects of propranalol, buspirone, pCPA, reserpine, and chordiazepoxide on open-field behaviour”. **Pharmacology Biochemistry and Behaviour**, v. 59, p. 387 - 397, 1998.

ANSONOFF, M.A.; ZHANG, J.; CZYZYK, T.; ROTHMAN, R.B.; STEWART, J.; XU, H.; ZJWIONY, J.; SIEBERT, D.J.; YANG, F.; ROTH, B.L.; PINTAR, J.E. Antinociceptive and hypothermic effects of Salvinorin A are abolished in a novel

strain of kappa-opioid receptor-1 knockout mice. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 318, p. 641 - 648, 2006.

APPLEQUIST, W.L.; WALLACE, R.S. Phylogeny of the Portulacaceous Cohort Based on ndhF Sequence Data. **Systematic Botany**, v. 26, p. 406 - 419, 2001.

ARENDT-NIELSEN, L.; CHEN, A. C. N. Lasers and other thermal stimulators for activation of skin nociceptors in humans. **Clinical Neurophysiology**, v. 33, p. 259 - 268, 2003.

BABBEDGE, R.C.; HART, S.L.; MOORE, P.K. Anti-nociceptive activity of nitric oxide inhibitors in the mouse: dissociation between the effect of L-NAME and L-NMMA. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 45, p. 77 - 79, 1993.

BAILEY, L.H. **Manual of Cultivated Plants**. New York. The Macmillan Co. Inc., p. 1116, 1949.

BARKSBY, H. E.; LEA, S. R.; PRESHAW, P. M.; TAYLOR, J. J. The expanding family of interleukin-1 cytokines and their role in destructive inflammatory disorders. **British Society for Immunology: Clinical and Experimental Immunology**, v. 149, p. 217 - 225, 2007.

BASBAUM, A. I.; FIELDS, H.L. Endogenous pain control systems: brainstem spinal pathways and endorphin circuitry. **Annual Review of Neuroscience**, v.7, p. 309 - 38, 1984.

_____.; JESSELL, T. M. In: KANDEL, E. R.; SCHWARTZ, J. H.; JESSELL,T. M. (eds). **Principles of Neuroscience**. New York: McGraw-Hill, 2000. p. 472 -491.

_____.; BAUTISTA, D.M.; SCHERRER, G.; JULIUS, D. Cellular and molecular mechanisms of pain.**Cell**, v.139, p. 267 - 284, 2009.

BAURIN, N.; ARNOULT, E.; SCIOR, T.; DO, G.T.; BERNARD, P. Preliminary screening of some tropical plants for anti-tyrosinase activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 82, p.155 - 158, 2002.

BÉGUIN, C.; POTTER, D.N.;. DINIERI, J.A.; MUNRO, T.A.;. RICHARDS, M.R.; PAINE, T.A.; BERRY, L. ZHAO, Z.; ROTH, B.L.; XU, W.; LIU-CHEN, L.; CARLEZON, W.A.; J.R.; COHEN, J.; COHEN, B. *N*-Methylacetamide Analog of Salvinorin A: A Highly Potent and Selective -Opioid Receptor Agonist with Oral Efficacy. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 324, p. 188 - 195, 2008.

BEIRITH, A.; SANTOS, A.R.S.; RODRIGUES, A.L.S.; CRECZYNSKI-PASA, T. B.; CALIXTO, J. B. 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, p. 233 - 245, 1998.

BERG, M.E. **Plantas medicinais da Amazônia**: contribuição ao seu conhecimento sistemático. 1ed. Belém: Conselho Nacional de desenvolvimento Científico e Tecnológico-Programa Trópico Úmido-Museu Paraense Emílio Goeldi, 1969.

_____. **Plantas medicinais da Amazônia**: contribuição ao seu conhecimento sistemático. 2ed. Belém: Conselho Nacional de desenvolvimento Científico e Tecnológico-Programa Trópico Úmido-Museu Paraense Emílio Goeldi, 1987.

_____. **Plantas medicinais na Amazônia**: Contribuição ao seu conhecimento sistemático. 3ª ed. Belém: Museu paraense Emílio Goeldi, 1993. 207 p.

BEVAN, S. Nociceptive peripheral neurons: cellular properties. IN: WALL, P.D.; MELZACK, R. (Eds). **Text Book of Pain**. MELZACK, R. (eds). **Textbook of Pain**. 4th ed. Edinburgh: Churchill-Livingstone, 1999, p. 85 - 103.

BILATE, A. M. B. Inflamação, proteínas de fase aguda, citocinas e quimiocinas. **Temas de Reumatologia Clínica**, v. 8, p. 86 - 90, 2007.

BINDER, W.; WALKER, J.S. Effect of the peripherally selective κ-opioid agonist, asimadoline, on adjuvant arthritis. **British Journal of Pharmacology**, v. 124, p. 647 - 654, 1998.

BISCHOFF, S. C.; MAILER, R.; PABST, O.; WEIER, G.; SEDLIK, W.; LI, Z.; CHEN, J. J.; MURPHY, D. L.; GERSHON, M. D. Role of serotonin in intestinal inflammation: knockout of serotonin reuptake transporter exacerbates 2,4,6-trinitrobenzene sulfonic acid colitis in mice. **American Journal Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 296, p. 685 - 695, 2009.

BONNET, F.; VÉZINET, C. Propriétés analgésiques des agonistes alpha 2 adrénergiques. In: BRASSEUR, L.; CHAUVIN, L.; GUILBAUD, G. (eds). **Douleurs, bases fondamentales, pharmacologie, douleurs aiguës, douleurs hroniques**, **thérapeutiques**. Maloine: 1997. p. 167 - 173.

BOTSARIS, A. S. **Fitoterapia chinesa e plantas brasileiras**. São Paulo: Ícone, 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria 971, de 03 de Maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. **Diário Oficial da união**, Brasília, DF, 04 de Maio de 2006.

BRASIL. Decreto nº 5813, de 22 de Junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. Publicado no **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 23 de Junho de 2006.

BRENCHAT, A. 5-HT7 receptor activation inhibits mechanical hypersensitivity secondary to capsaicin sensitization in mice. **Pain**, v. 41, p. 239 - 247, 2009.

BRITO, A.S**. Manual de Ensaios Toxicológicos *In vivo***. Campinas-SP: Editora da UNICAMP, 1994.

BRITO, G.A.C.; SACHS, D.; CUNHA, F.Q.; VALE, M.L.; LOTUFO, C.M.C.; FERREIRA, S.H.; RIBEIRO, R.A. Peripheral antinociceptive effect of pertussis toxin: activation of the arginine⁄NO⁄cGMP⁄PKG⁄ ATP-sensitive K+ channel pathway. **Europeam Journal of Neuroscience**, v. 24, p. 1175 - 1181, 2006.

BROOKS, J.C.W.; NURMIKKO, T.J.; BIMSON, W.E.; SINGH, K.D.; ROBERTS, N. fMRI of thermal pain: effects of stimulus laterality and attention. **NeuroImage**, v. 15, p. 293 - 301, 2002.

_____.; TRACEY, I. From nociception to pain perception: imaging the spinal and supraspinal pathways. **Journal of Anatomy**, v. 207, p. 19 - 33, 2005.

BROWN, D. M.; DICKSON, C.; DUNCAN, P.; AL-ATTILI, F.; STONE, V. Interaction between nanoparticles and cytokine proteins: impact on protein and particle functionality. **Nanotechnology**, v. 21, p. 9, 2010.

BURTON, M.B.; GEBHART, G.F. Effects of intracolonic acetic acid on responses to colorectal distension in the rat. **Brain Research**, v. 672, p. 77 - 82, 1995.

CADET, P. Mu opiate receptor subtypes. **Medical Science Monitor**, v. 10, p. 28 - 32, 2004.

CALVINO, B.; GRILO, R. M. Central pain control. **Joint Bone Spine**, v. 73, p. 10 - 16, 2006.

CAROLIN, R.C. Portulacaceae. In: KUBITZKI, K.; ROHWER, J.G.; BITTRICH, V. (eds.). **The families and genera of vascular plants, flowering plants: Dicotyledons; Magnoliid, hamamelid and caryophyllid families**. Berlin: Springer, 1993. p. 544–555.

CARVALHO, J. C. T.; SANTOS, L. S.; VIANA, E. P.; DE ALMEIDA, S. S. M. S.; MARCONATO, E.; RODRIGUES, M.; FERREIRA, L. R.; VAN DE KAMP, A. Anti-inflammatory and Analgesic Activities of the Crude Extracts from Stem Bark of *Bauhinia Guianensis*. **Pharmaceutical Biology**, v. 37, p. 281 - 284, 1999.

CASEY, K.L. Forebrain mechanisms of nociception and pain: analysis through imaging. **Proceedings of the National Academjy of Sciences**, v. 96, p. 7668 - 7674, 1999.

CATERINA, M.J.; JULIUS, D. Sense and specificity: a molecular identity for nociceptors. **Opinion in Neurobiology**, v. 9, p. 525 - 530, 1999.

CESARE, P.; MCNAUGHTON, P. A. Peripheral pain mechanisms. **Current Opinion in Neurobiology**, v. 7, p. 493 - 499, 1997.

CHAN, K.; ISLAM, M.W.; KAMIL, M.; RADHAKRISHNAN, R.; ZAKARIA M.N.; HABIBULLAH, M.; ATTAS, A. The analgesic and anti-inflammatory effects of *Portulaca oleracea* L. subsp. *sativa* (Haw.) Celak. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 73, p. 445 - 451, 2000.

CHRISTOPHER, M. J. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. **Methods in Molecular Biology**, v. 225, p. 115 - 121, 2003.

CLARK, J.D.; TEMPEL, B.L. Hyperalgesia in mice lacking the Kv1.1 potassium channel gene. **Neuroscience Letters**, v. 251, p. 121 - 124, 1998.

COELHO, A.A.O.P.; GIULIETTI, A.M. Flora da Bahia: Portulacaceae. **Sitientibus**: Série Ciências Biológicas, v. 6, 182 - 193, 2006.

_____.; GIULIETTI, A.M.; HARLEY, R.M.; YESILYURT, J.C. Synonymies and typifications in *Portulaca* (Portulacaceae) of Brazil. ***Kew Bulletin,*** v.65, p. 37 -43, 2010.

COFFEEN, U.; LÓPEZ-AVILA, A.; ORTEGA-LEGASPI, J.M.; DEL ANGEL, R.; LÓPEZ-MUÑOZ, F.J.; PELLICER, F. Dopamine receptors in the anterior insular cortex modulate long-term nociception in the rat. **European Journal of Pain**, v. 12, p. 535 - 543, 2008.

COLLIER, H.O.J.; DINNEEN, L.C.; JOHNSON, C.A.; SCHNEIDER, C. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**, v. 32, p. 295, 1968.

CONFERÊNCIA NACIONAL DE MEDICAMENTOS E ASSISTÊNCIA FARAMCÊUTICA: relatório final: efetivando o acesso, a qualidade e a humanização na assistência farmacêutica, com controle social, 2004. **Relatório...** Brasília: Ministério da Saúde/ Conselho Nacional de Saúde, 2005.

CONFERÊNCIA NACIONAL DE SAÚDE, 8., 1986, Brasília. **Relatório...** Brasília: Ministério da Saúde, 1986.

CONFERÊNCIA NACIONAL DE SAÚDE, 10., 1996, Brasília. **Relatório...** Brasília: Ministério da Saúde, 1996.

COSTA, J.F.O. KIPERSTOK, A.C.; DE LIMA DAVID, J.P.; DAVID, J.M; GIULIETTI, A.M.; DE QUEIROZ, L.P.; DOS SANTOS, R.R.; SOARES, M.B.P. Anti-leishmanial and immunomodulatory activities of extracts from Portulaca hirsutissima and *Portulaca werdermannii*. **Fitoterapia**, v. 78, p. 510 - 514, 2007.

CUI, M.; FENG, Y.; MCADOO, D.J.; WILLIS, W.D. Periaqueductal gray stimulation-induced inhibition of nociceptive dorsal horn neurons in rats is associated with the release of norepinephrine, serotonin, and amino acids. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 289, p. 868 - 876, 1999.

CUNHA, F.Q. ; LORENZETTI, B.B.; POOLE, S.;FERREIRA, S.H. Interleukin-8 as a mediator of sympathetic pain. **British Journal of Pharmacology**, v. 104, p. 765 - 767, 1991.

_____.; POOLE, S.; LORENZETTI, B. B.; FERREIRA, S. H. The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. **British Journal of Pharmacology**, v. 107, p. 660 - 664, 1992.

CUNHA, T.M.; ROMAN-CAMPOS, D.; LOTUFO, C.M.; DUARTE, H.L.; SOUZA, G.R.; VERRI, W.A.; FUNEZ, M.I.; DIAS, Q.M.; SCHIVO, I.R.; DOMINGUES, A.C.; SACHS, D.; CHIAVEGATTO, S.; TEIXEIRA, M.M.; HOTHERSALL, J.S.; CRUZ, J.S.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. Morphine peripheral analgesia depends on activation of the PI3Kγ/AKT/nNOS/NO/KATP signaling pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 107, p. 4442 - 4447, 2010.

DA SILVA, F.A.; LANGELOH, A.; GONZALEZ O.G.; PETROVICK, P.R. Obtenção e caracterização de extratos de *Portulaca pilosa* (Amor-crescido). In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 15., 1998, Águas de Lindóia. **Resumos...** Águas de Lindóia: 1998, 185 p.

_____.; PETROVICK, P.R.; LANGELOH, A. Efeito do extrato seco liofilizado de Portulaca pilosa L. (Portulacaceae) sobre a reatividade uterina à oxitocina de ratas Wistar. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 20, p. 47- 52, 2001.

DANZEBRINK, R.; GREEN, S.; GEBHART, G.F. Spinal mu and delta, but not kappa, opioid-receptor agonists attenuate responses to noxious colorectal distension in the rat. **Pain**, v. 63, p. 39–47, 1995.

DIMMELER, S. et al. Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt dependent phosphorylation. **Nature**, v. 399, p. 601- 605, 1999.

DI ROSA, M.; SORRENTINO, L. The mechanism of the inflammatory effect of carrageenan. **European Journal of Pharmacology**, v. 4, p. 340 - 342, 1968.

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

_____.; Biological properties of carrageenan. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 24, p. 89 - 102, 1972.

DIOP, L.; RIVIÈRE, P.; PASCAUD, X.; JUNIEN, J. Peripheral kappa-opioid receptors mediate the antinociceptive effect of fedotozine (correction of fetodozine) on the duodenal pain reflex in rat. **European Journal of Pharmacology**, v. 271, p. 65 - 71, 1994.

DJOUHRI, L.; BLEAZARD, L.; LAWSON, S.N. Association of somatic action potential shape with sensory receptive properties in guinea-pig dorsal root ganglion neurones. **Journal of Physiology**, v. 513, p. 857 - 872, 1998.

DOLY, S.; FISCHER, J.; BRISORQUEIL, M.J.; VERQÉ, D.; CONRATH, M. Pre and postsynaptic localization of the 5-HT7 receptor in rat dorsal spinal cord. immunocytochemical evidence. **Journal of Comparative Neurology**, v. 490, p. 256 - 269, 2005.

D'MELO, R.; DICKENSON, A.H. Spinal cor mechanisms of pain. **British Journal of Anaesthesia**, v. 101, p. 8 - 16, 2008.

DUARTE, I.D.G.; LORENZETTI, B.; FERREIRA, S. Peripheral analgesia and activation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway. **European Journal of Pharmacology**, v. 186, p. 289 - 293, 1990.

_____.; FERREIRA, S.H. The molecular mechanism of central analgesia induced morphyne or carbachol and L-arginine-nitric oxide-cGMP pathway. **European Journal of Pharmacology**, v. 24, p. 171 - 74, 1992.

DRAY, A. Inflammatory mediators of pain. **British Journal of Anaesthesia**, v. 75, p. 125 -131, 1995.

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. 161 - 174., 1977.

EDWARDS, G.; WESTON, A.H. The pharmacology of ATP-sensitive K+ channels. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 33, p. 597 - 637, 1993.

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

ENNACEUR, A.; MICHALIKOVA, S.; CHAZOT, P.L. “Models of anxiety: responses of rats to novelty in an open space and an enclosed space”. **Behaviour Brain Research**, v. 171, p. 26 - 49, 2006.

FEINBERG, A.P.; CREESE, I.; SNYDER, S.H. The opiate receptor: a model explaining structure–activity relationships of opiate agonists and antagonists. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 73, p. 4215 - 4219, 1976.

FERREIRA, S.H. Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia. **Nature new Biology**, v. 20, p. 200 - 203, 1972.

_____.; DUARTE, I.D.; LORENZETTI, B.B. Molecular base of acetylcholine and morphine analgesia. **Agents and Actions Supplement**, v. 32, p. 101 - 106, 1991.

FERREIRA, J.; SANTOS, A.R.S.; CALIXTO, J.B. The role of systemic, spinal and supraspinal L-arginine-nitric oxide-Cgmp pathway in thermal hyperalgesia caused by intrathecal injection of glutamate in mice. **Neuropharmacology**, v. 38, p. 835 - 842, 1999.

FINDLAY, I.; DUNNE, M. J. ATP maintains ATP-inhibited K^+ channels in an operational state. **Pflügers Archiv-European Journal of Physiolgy**, v. 407, p. 238 - 240, 1986.

FRANÇA, D.S.; SOUZA, A.L.; ALMEIDA, K.R.; DOLABELLA, S.S.; MARTINELLI, C.; COELHO, M.M. Vitamins induce an antinociceptive effect in the acetic acid and formaldehyde models of nociception in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 421, p. 157 - 164, 2001.

FRANKLIN, K.B.J.; ABBOTT, F.V. Techniques for assessing the effects of drugs on nociceptive responses. In: BOULTON, A.A.; BAKER, C.B.; GREENSHAW, A.J. (Eds.). **Neuromethods**, Vol. 13: Psychopharmacology I, Humana Press, p. 145 - 216, 1989.

FUJITA, A; KURACHI, Y. Molecular aspects of ATP-sensitive K^+ channels in the cardiovascular system and K^+ channel openers. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 85, p. 39 - 53, 2000.

FUKAWA, O.; OSAMU, K.; MORIHIDE, H.; NORIYUKI, M.; SEIICHI, O.; YOSHIKAZU, H. A method for evaluating analgesic agents in rats. **Journal of Pharmacological Methods,** v. **4**, p. 251 - 259, 1980.

FULTON, D. et al. Regulation of endothelium-derived nitric oxide production by the protein kinase Akt. **Nature**, v. 399, p. 597–601, 1999.

FUNK, C. D. Prostaglandins and Leukotrienes: Advances in Eicosanoid Biology. **Science**, v. 294, p. 1871 - 1875, 2001.

FURSTENBERGER, G.; RICHTER, H.; FUSENIG, N.E.; MARKS, F. Arachidonic and prostaglandin E2 release and hanced cell proliferation induced by the phorbol ester TPA in murine epidermal cell line. **Cancer Letters**, v. 11, p. 191 - 198, 1981.

GARBOR, M. **Mouse Ear Inflammation Models and their Pharmacological Applications**. Protocols inflammation: Methods in Molecular Biology, vol. 225, 129-137, 2003.

GARCIA, M.L.; HAMNNER, M.; KNAUS, A.G.; KACZOROWSKI, G.J. Pharmacology of potassium channels. **Advances in Pharmacology**, v. 39, p. 425 - 471, 1997.

GARCIA-LARREA, L.; PEYRON, R. Motor cortex stimulation for neuropathic pain: From phenomenology to mechanisms. **Neuroimage**, v. 37, p. 71 - 79, 2007.

GARG, R.; RAMCHANDANI, A.G.; MARU, G.B. Curcumin decreases 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced protein kinase C translocation to modulate downstream targets in mouse skin. **Carcinogenesis**, v. 29, p. 1249 - 1257, 2008.

GENEE, R.M.; SEGURA, L.; ADZET, T.; MARIN, E.; IGLESIAS, J. *Heterotheca inuloides* : anti-inflammatory and analgesics effects. **Journal Ethnopharmacology**, v. 60, p. 157 - 162, 1998.

GOEL, G.; MAKKAR, H.P.S.; FRANCIS, G.; BECKER, K. Phorbol Esters: structure, biological activity, and toxicity in animals. **International Journal of Toxicology**, v. 26, p. 279 - 288, 2007.

GOODMAN e GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 11ª edição. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, 2006.

GRANADOS-SOTO, V.; RUFINO, M.O.; LOPES, L.D.G.; FERREIRA, S.H. Evidence for the involvement of the nitric oxide-cGMP pathway in the antinociception of morphine in the formalin test. **European Journal Pharmacology**, v. 340, p.177 - 180, 1997.

GUTMAN, G.A.; CHANDY, K.G.; ADELMAN, J.P.; AIYAR, J.; BAYLISS, D.A.; CLAPHAM, D.E.; COVARRIUBIAS, M.; DESIR, G.V.; FURUICHI, K.; GANETZKY, B.; GARCIA, M.L.; GRISSMER, S.; JAN, L.Y.; KARSCHIN, A.; KIM, D.; KUPERSCHMIDT, S.; KURACHI, Y.; LAZDUNSKI, M.; LESAGE, F.; LESTER, H.A.; MCKINNON, D.; NICHOLS, C.G.; O'KELLY, I.; ROBBINS J.; ROBERTSON, G.A.; RUDY, B.; SANGUINETTI, M.; SEINO, S.; STUEHMER, W.; TAMKUN, M.M.; VANDENBERG, C.A.; WEI, A.; WULFF, H.; WYMORE, R.S. International Union of Pharmacology: XLI. Compendium of voltage-gated ion channels: potassium channels. **Pharmacology Reviews**, v. 55, p. 583 - 586, 2003.

GUTSTEIN, H.B.; AKIL, H. Opioid Analgesics. In: GOODMAN, L.S.; HARDMAN, J.G. LIMBIRD, L.E.; GILMAN, A.G. (eds). **Goodman & Gilman's the pharmacological basis of therapeutics.** New York: McGraw-Hill, 2001. p. 569 - 619.

HABTEMARIAM, S.; HARVEY, A.L.; WATERMAN, P.G. The muscle relaxant properties of *Portulaca oleracea* are associated with high concentrations of potassium ions. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 40, p. 195 - 200, 1993.

HAESELER, G.; FOADI, N.; AHRENS, J.; DENGLER, R.; HECKER, H.; LEUWER, M. Tramadol, fentanyl and sufentanil but not morphine block voltage-operated sodium channels. **Pain**, v. 126, p. 234 - 244, 2006.

HALEY, J.E.; DICKENSON, A.H.; SCHACHTER, M. Electrophysiological evidence for a role of nitric oxide in prolonged chemical nociception in the rat. **Neuropharmacology**, v. 31, p. 251 - 258, 1992.

HAMMOND, D. L.; YAKSH, T. L. Antagonism of stimulation-produced antinociception by intrathecal administration of methysergide or phentolamine. **Brain Research**, v. 298, p. 329 - 337, 1984.

_____.; TYCE, G.M.; YAKSH, T.L. Efflux of 5-hydroxytryptamine and noradrenaline into spinal cord superfusates during stimulation of the rat medulla. **The Journal of Physiology**, v. 359, p. 151 - 162, 1985.

HARPER, A.; LAWSON, S. N. Conduction velocity is related to morphological cell type in rat dorsal root ganglion neurons. **The Journal of Physiology**, v. 359, p. 31 - 46, 1985.

HEDQVIST, P.; GAUTAM, N.; LINDBOM, L. Interactions between Leukotrienes and Other Inflammatory Mediators/Modulators in the Microvasculature. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**, v. 161, p. 117 - 119, 2000.

HERLITZE, S.; GARCIA, D.E.; MACKIE, K.; HILLE, B.; SCHEUER, T.; CATTERALL, W.A. Modulation of Ca2+ channels by G-protein beta gamma subunits. **Nature**, v. 380, p. 258 - 262, 1996.

HERRERO, J.; HEADLEY, P.M. The effects of sham and full spinalization on the systemic potency of mu- and kappa-opioids on spinal nociceptive reflexes in rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 104, p. 166 -170, 1991.

HERVERA, A.; NEGRETE, R.; LEÁNEZ, S.; MARTÍN-CAMPOS, J.M.; POL, O. Peripheral effects of morphine and expression of μ-opioid receptors in dorsal root glanglia during neuropathic pain: nitric oxide signaling. **Molecular Pain**, v. 12, p. 7-25, 2011.

HOLTHUSEN, H. Involvement of the NO/cyclic GMP pathway in bradykinin-evoked pain from veins in humans. **Pain**, v. 69, p. 87 - 92, 1997.

HOLZER, P.; U. HOLZER-PETSCHE. Tachykinins in the gut. I. Expression, release and motor function. ***Pharmacology & Therapeutics,*** *v. 73*, p. *173*, 1997.

HUANG, F.; XIONG, Y.; XU, L.; MA, S.; DOU, C. “Sedative and hypnotic activities of the ethanol fraction from *Fructus schisandrae* in mice and rats”. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, p. 471 - 475, 2007.

HUNSKAAR, S; BERGE, O.G.; HOLE, K. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 14, p. 69 - 76, 1985.

ISLAS-CADENA, M.; AGUIRRE-BAÑUELOS, P.; GRANADOS-SOTO, V. Evidence for the participation of the nitric oxide–cyclic GMP pathway in the antinociceptive effect of nimesulide. **Journal of Pharmacological and Toxicological Methods**, v. 42, p. 87 - 92, 1999.

ISRAF, D.A.; KHAIZURIN, T.A.; SYAHIDA, A.; LAJIS, N.H.; KHOZIRAH, S. Cardamonin inhibits COX and iNOS expression via inhibition of p65NF-kappa B

nuclear translocation and Ikappa-B phosphorylation in RAW 264.7 macrophage cells. **Molecular Immunology**, v. 44, p. 673 - 679, 2007.

JAIN, N.K.; PATIL, C.S.; SINGH, A.; KULKARNI, S.K. Sildenafil-induced peripheral analgesia and activation of the nitric oxide-cyclic GMP pathway. **Brain Research.**, v. 909, p. 170 -178, 2001.

JESSE, C.R.; SAVEGNAGO, L.; NOGUEIRA, C.W. Role of nitric oxide/cyclic GMP/K+ channel pathways in the antinociceptive effect caused by 2,3-bis(mesitylseleno) propenol. **Life Sciences**, v. 81, p. 1694-1702, 2007.

JOHN, T.F.; FRENCH, L.G.; ERLICHMAN, J.S. The antinociceptive effect of Salvinorin A in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 545, p. 129 - 133, 2006.

JONES, A. K.; DERBYSHIRE, S. W. Reduced cortical responses to noxious heat in patients with rheumatoid arthritis. **Annais of the Rheumatic Diseases**, v. 56, p. 601-607, 1997.

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

JÚNIOR, D.M; ARAÚJO, J.A.P; CATELAN, T.T.T; DE SOUZA, A.W.S; DA SILVA, N.P; ANDRADE, L.E.C; CRUVINEL, W.M. Aspectos celulares e moleculares da inflamação. **Revista Brasileira de Medicina**. p: 66-81, 24 de Janeiro de 2011.

KAHIYA, C.; MUKARATIRWA, S.; THAMSBORG, S.M. Effects of *Acacia nicolitica* and *Acacia karoo* diets on Haemonchus contortus infection in goats. **Veterinary Parasitology**, v.115, p. 265 - 274, 2003.

KAKKAR, A.K.; LEFER, D.J. Leukocyte and endothelial adhesion molecule studies in knockout mice. **Current Opnion in Pharmacology**, v. 4, p.154 -158, 2004.

KAKIGI, R.; INUI, K.; TRAN, D.T.; QIU, Y.; WANG, X.; WATANABE, S.; HOSHIYAMA, M. Human brain processing and central mechanisms of pain as observed by electro and magneto-encephalography. **Journal of the Chinese Medcical Association**, v. 67, p. 377 - 386, 2004.

KAWABATA, A.; UMEDA, N.; TAKAGI, H. L-Arginine exerts a dual role in

nociceptive processing in the brain: involvement of the kyotorphin-met-enkephalin pathway and NO-cyclic GMP pathway. **British Journal of Pharmacology**, v. 109, p. 73 - 79, 1993.

_____.; MANABE, S.; MANABE, Y.; TAKAGI, H. Effect of topical administration of l-arginine on formalin-induced nociception in the mouse: a dual role of peripherally formed NO in pain modulation. **British Journal of Pharmacology**, v. 112, p. 547 - 550, 1994.

KHAN, M.T.H.; ATHER, A.; PINTO, A.C.; MACIEL, M.A.M. Potential benefits of the 19-*nor*-clerodane *trans*-dehydrocrotonin on the central nervous system. **Revista Brasileira de Pharmacognosia**, v. 19, p. 07 - 13, 2009.

KIDD, B. L; URBAN, L. A. Mechanisms of inflammatory pain. **British Journal of Anaesthesia**, v. 87, p. 3 -11, 2001.

KIM, J.Y.; PARK, S.J.; YUN, K.J.; CHO, Y.W.; PARK, H.J.; LEE, K.T. Isoliquiritigenin isolated from the roots of *Glycyrrhiza uralensis* inhibits LPS-induced iNOS and COX-2 expression via the attenuation of NF-kappaB in RAW 264.7 macrophages. **European Journal of Pharmacology**, v. 584, p. 175 - 84, 2008.

KIM, S.W.; RHEE, H.J.; KO, J. Inhibition of cytosolic phospholipase A_2 by annexin I: specific interaction model and mapping of the interaction site. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 276, p. 15712 - 5719, 2001.

KIRBY, G. C. Medicinal plants and the control of protozoal disease, with particular reference to malaria. **Transactions of the Royal Society of Tropiocal Medicine and Hygiene**, v. 90, p. 605, 1996.

KIVELL, B.; PRINSINZANO, T.E. Kappa opioids and the modulation of pain. **Psychopharmacology**, v. 210, p. 119 -119, 2010.

KONDO, I.; MARVIZON, J.C.; SONG, B.; SALGADO, F.; CODELUPPI, S.; HUA, X.Y.; YAKSH, T.L. Inhibition by spinal mu and delta-opioid agonists of afferent-evoked substance P release. **Journal of Neuroscience**, v. 25, p. 3651 - 3660, 2005.

KOPP, S. The influence of Neuropeptides, Serotonin, and Interleukin 1-β on Temporomandibular Joint Pain and Inflammation. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 56, p. 189 - 191, 1998.

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

KURIYAMA, H.; KITAMURA, K.; HIROYUKI, N. Pharmacological and physiological significance of ion channels and factors that modulate them in vascular tissues. **Pharmacology Reviews**, v. 47, p. 387 - 431, 1995.

KWIAT, I,G.C.; BASBAUM, A.I. The origin of brainstem noradrenergic and serotonergic projections to the spinal cord dorsal horn in the rat. **Somatosens and Motor Research**, v. 9, p. 157 - 173, 1992.

LAPA, A.J. et al. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: SIMÕES, C. M. O. (editor). **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 2ª Ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. UFRGS/UFSC, 2002, p. 183 - 198.

LÁZARO-IBAÑEZ, G.G.; TORRES-LOPEZ, J.E.; GRANADOS-SOTO, V. Participation of the nitric oxide – cyclic GMP – ATP – sensitive K^+ channel patway in the antinociceptive action of ketorolac. **European Journal of Pharmacology**, v. 426, p. 39 - 44, 2001**.**

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

LEE, D.Y.W.; MA, Z.; LIU-CHEN, L.; WANG, Y.; CHEN, Y.; CARLEZON, W.A.; COHEN, J.; COHEN, B. New neoclerodane diterpenoids isolated from the leaves of Salvia divinorum and their binding affinities for human κ opioid receptors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 5635 - 5639, 2005.

LEGRAND, C.D. IN: Las Especies Americanas de Portulaca. Montevideo. **Anales…** Montevideo: Museo de Historia Natural de Montevideo, 1962, p. 9-147.

LEY, K.; LAUDANNA, C.; CYBULSKY, M. I.; NOURSHARGH, S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. **Nature Reviews Immunology**, v. 7, p. 678 - 689, 2007.

LIMA, D.M.; LIMA, A.M.B. Flora de Pernambuco: Portulacaceae. IN: Congresso Nacional de Botânica, 19, 1968, Fortaleza. **Anais**... Fortaleza: Sociedade Botânica do Brasil,1968, p. 60 - 63.

LIMA, M.C.; FREGNI, F. Motor cortex stimulation for chronic pain: systematic review and meta-analysis of the literature. **Neurology**, v. 70, p. 2329 - 2337, 2008.

LIN, Y.; MORROW, T.J.; KIRITSY-ROY, J.A.; CASS TERRY, L.; CASEY, K.L. Cocaine: evidence for supraspinal, dopamine-mediated, non-opiate analgesia. **Brain Research**, v. 479, p. 306 - 312, 1989.

LITCHFIELD, J.T.; WILCOXON, F.A. Simplifield method of evaluations dose-effect experiments. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 96, p. 99 - 113, 1949.

LIU, L. X.; HOWE, P.; ZHOU, Y. F.; XU, Z. Q.; HOCART, C.; ZHAN, R. Fatty acids and b-carotene in Australian purslane (*Portulaca oleracea*) varieties. **Journal of Chromatography A**, v. 893, p. 207 - 213, 2000.

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

_____.; MELZACK, R**.** Pain: an overview. **The Lancet,** v, 353, p.1607 - 1609,1999.

LOPEZ-AVILA, A.; COFFEEN, U.; ORTEGA-LEGASPI, J.M.; DEL ANGEL, R.; PELLICER, F. Dopamine and NMDA systems modulate long-term nociception in the rat anterior cingulate cortex. **Pain**, v. 111, p. 136 - 143, 2004.

LORENZETTI, B.; FERREIRA, S. Mode of analgesic action of dipyrone: direct antagonism of inflammatory hyperalgesia. **European Journal Pharmacology**, v. 114, p. 375 - 381, 1985.

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

LOUX, J.J.; SMITH, S.; SALEM, H. Comparative analgetic testing of various compounds in mice using writhing techniques. **Arzneimittel-Forsch**, v. 28, p. 1644 - 1647, 1978.

LOW, T.; RODD, T.; BERESFOR, R. **Segredos e virtudes das Plantas medicinais**. Rio de Janeiro: Reader's Digest Brasil, 1999. 416 p.

MCCLESKEY, E. W.; GOLD, M. S. Ion channels of nociception. **Annual Review of Physiology**, v. 61, p. 835 - 856, 1999.

MCCURDY, C.R.; SUFKA, K.J,; SMITH, G.H.; WARNICK, J.E.; NIETO, M.J. Antinociceptive profile of salvinorin A, a structurally unique kappa opioid receptor agonist. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 83, p. 109 - 113, 2006.

MACDONALD, A.D.; WOOLFE, G.; BERGEL, F.; MORRISON, A.L.; RINDERKNECHT, H. Analgesic action of pethidine derivatives and related compounds. **British Journal of** Pharmacology, v. 1, p. 4 -14, 1946.

MACKINNON, R. Potassium channels. **FEBS Letters**, v. 555, p. 62 - 65, 2003.

MCMAHON, S.; KOLTZENBURG, M. The changing role of primary afferent neurones in pain. **Pain**, v. 43, p. 269 - 272, 1990a.

MCNALLY, G.P.; AKIL, H. Opioid peptides and their receptors: overview and function in pain modulation. In: DAVIS, K.L.(ed.). **Neuropsychopharmacology**: the fifth generation of progress. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002. p. 35 - 46.

MALEK, F.; BOSKABADY, M.H.; BORUSHAKI, M.T.; TOHIDI, M. Bronchodilatory effect of *Portulaca oleracea* in airways of asthmatic patients. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 93, p. 57 - 62, 2004.

MALMBERG, A.B.; YAKSH, T.L. Spinal nitric oxide synthesis inhibition blocks NMDA-induced thermal hyperalgesia and produces antinociception in the formalin test in rats. **Pain**, v. 54, p. 291 - 300, 1993.

MALONE, M. H.; ROBICHAUD, R.C. A Hippocratic screen for pure or crude drug materials. **Lloydia**, v. 25, p. 320 - 332, 1962.

MARK, M.D., HERLITZE, S. G-protein mediated gating of inward-rectifier K^+ channels. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, p. 5830 - 5836, 2000.

MARTINS, E. R.; DE CASTRO, D.M.; CASTELLANI, D.C.; DIAS, J.E. **Plantas medicinais**. Viçosa: UFV, 1995. 220 p.

MARUNA, P.; MASEK, Z.; SCHREIBER, V. Methylene blue inhibition of oestradiol-induced increase of ceruloplasmin serum levels in rats. **Physiological Research**, v. 43, p. 219 - 221, 1994.

MATTOS, N.F. **Portulacaceae de São Joaquim**. Sellowia, 1961. cap. 13, p. 133 - 136.

MAXWELL, L.G.; KAUFMANN, S.C.; BITZER, S.; JACKSON, E.V.; MCGREADY, J.; KOST-BYERLY, S.; KOZLOWSKI, L.; ROTHMAN, S.K.; YASTER, M. The Effects of a Small-Dose naloxone infusion on opioid induced side effects and analgesia in children and adolescents treated with intravenous patient-controlled analgesia: a double-blind, prospective, randomized, controlled study. **Anesthesia & Analgesia**, v. 100, p. 953 - 958, 2005.

MELLER, S.T.; DYKSTRA, C.; GEBHART, G.F. Production of endogenous nitric oxide and activation of soluble guanylate cyclase are required for N-methyl-d-aspartate- produced facilitation of the nociceptive tail-flick reflex. **European Journal of Pharmacology**, v. 214, p. 93 - 96, 1992a.

_____.; PECHMAN, P.S.; GEBHART, G.F.; MAVES, T.J. Nitric oxide mediates the thermal hyperalgesia produced in a model of neuropathic pain in the rat. **Neuroscience**, v. 50, p. 7 – 10, 1992b.

_____; GEBHART, G.F. Nitric oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord. **Pain**, v. 52, p. 127 - 136, 1993.

_____.; DYKSTRA, C.; GEBHART, G. F. Acute thermal hyperalgesia in the rat is produced by activation of N-methyl- -aspartate receptors and protein kinase c and productionofnitricoxide. **Neuroscience**, v. 71, p. 327 - 335, 1993.

MELZACK, R.; WALL, P. D. Pain mechanisms: a new theory. **Science**, v. 150, p. 971 - 979, 1965.

_____. From the gate to the neuromatrix. **Pain**, v. 82, p. 121 - 126, 1999.

MENDELL, L. M.; WALL, P. D. Presynaptic hyperpolarization: a role for fine afferent fibres. **Journal of Physiology**, v. 172, p. 274 - 29, 1964.

MEOTTI, F.C., BORGES, V.C., ZENI, G., ROCHA, J.B.T. AND NOGUEIRA, C.W. Potential renal and hepatic toxicity of diphenyl diselenide, diphenyl ditelluride and ebselen for rats and mice. **Toxicology Letters**, v. 143, p. 9 -16, 2003.

METCALFE, C.R.; CHALK, L. **Anatomy of the Dicotyledons: wood structure and conclusion of the general introduction**. 2.ed. London: Oxford Clarendon Press, 1985, v.2.

MEYER, R. A.; CAMPBELL, J.; RAJA, S. Peripheral neural mechanisms of nociception. In: WALL, P. D.; MELZACK. (eds). **Textbook of pain**. London UK: Churchill Livingstone, 1994. p. 13 – 44.

MILLAN, M. J. The induction of pain: an integrative review. **Progress in Neurobiology**, v. 57, p. 1 - 164, 1999.

MIRON, D.; DUNCAN, G. H.; BUSHNELL, M.C. Effects of attention on the intensity and unpleasantness of thermal pain. **Pain**, v. 39, p. 345 - 352, 1989.

MIXCOATL-ZECUATL, T.; AGUIRRE-BAN˜UELOS, P.; GRANADOS-SOTO, V. Sildenafil produces antinociception and increases morphine antinociception in the formalin test. **European Journal of** Pharmacology, v. 400, p. 81 - 87, 2000.

MOHAMAD, A.S.; AKHTAR, M.N.; KHALIVULLA, S.I.; PERIMAL, E.K.; KHALID, M.H.; ONG, H.M.; ZAREEN, S.; AKIRA, A.; ISRAF, D.A.; LAJIS, N.; SULAIMAN, M.R. Possible Participation of Nitric Oxide/Cyclic Guanosine Monophosphate/Protein Kinase C/ATP-Sensitive K+ Channels Pathway in the Systemic Antinociception of Flavokawin B. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 108, p. 400 - 405, 2010.

MONCADA, S.; PALMER, R.M.; HIGGS, E.A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. **Pharmacology Reviews**, v. 43, p. 109 - 42, 1991.

_____.; HIGGS, A. The L-arginine-nitric oxide pathway. **The New England Journal of Medicine**, v. 329, p. 2002 - 2012, 1993.

MOORE, P.K.; OLUYOMI, A.O.; BABBEDGE, R.C., WALLACE, P.; HART, S.L. L-N^G - nitro arginine methyl ester exhibits antinociceptive activity in the mouse. **British Journal of Pharmacology**, v. 102, p. 198 - 202, 1991.

MORO, G.V.; SCHEFFER-BASSO, S.M.; ABDALLA, A.L.; REGINATTO, F.H.; PEÇANHA, M.R.; COSTA, G.M. Aspectos químicos do gênero *Lotus* L. com ênfase em metabólitos secundários. **ARS Veterinaria**, v.26, p. 113 - 116, 2010.

MORS, W. Plantas Medicinais. Rio de Janeiro: **Revista Ciência Hoje**, v.1, 1982.

MORS, B.W; RIZZINI, T.C; PEREIRA. A.N. **Medicinal Plants of Brazil**. EUA: Reference Publications, 2000. 289 p.

NAKA, T.; NISHIMOTO, N.; KISHIMOTO, T. The paradigm of IL-6: from basic science to medicine. **Arthrits Research**, v. 4, p. 233 - 242, 2002.

NARITA, M.; SUZUKI, T.; MISAWA, M.; NAGASE, H.; NABESHIMA, A.; ASHIZAWA, T.; OZAWA, H.; SAITO, T.; TAKAHATA, N. Role of central ATP-sensitive potassium channels in the analgesic effect and spinal noradrenaline turnover-enhancing effect of intracerebroventricularly injected morphine in mice. **Brain Research**, v. 596, p. 209 - 214, 1992.

NATHAN, P.W; RUDGE, P. Testing the gate-control theory of pain in man. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 37, p. 1366 - 1372, 1974.

NATHAN, C. Catalytic Antibody Bridges Innate and Adaptive Immunity. **Science**, v. 298, p. 2143 - 2144, 2002.NICHOLS, C.G.; LOPATIN, A.N. Inward rectifier potassium channels. **Annual Review of Physiology**, v. 59, p. 171 - 191, 1997.

NIELSEN, J.; ARENDT-NIELSEN, L. he importance of stimulus configuration for temporal summation of first and second pain to repeated heat stimuli. **European Journal of Pain**, v. 2, p. 329 - 341, 1998a.

_____. The influence of rate of temperature change and peak stimulus duration on pain intensity and quality. **Somatosensory and Motor Research**, v. 15, p. 220 - 229, 1998b.

NORTH, M.A. Naloxone reversal of morphine analgesia but failure to alter reactivity to pain in the formalin test. **Life Sciences**, v. 22 p. 295 - 302, 1978.

NORTH, R. A. Drug receptors and the inhibition of nerve cells. **British Journal of Pharmacology**, v. 98, p. 13 - 28, 1989.

NYFFELER, R.; EGGLI, U. Disintegrating Portulacaceae: a new familial classification of the suborder Portulacineae (Caryophyllales) based on molecular and morphological data. **Taxon**, v. 59, p. 227 - 240, 2010.

OCAÑA, M.; DEL POZO, E.; BARRIOS, M.; ROBLES, L.I.; BAEYENS, J.M. An ATP-dependent potassium channel blocker antagonizes morphine analgesia, **European Journal of Pharmacology**, v. 186, p. 377 - 378, 1990.

_____.; BAEYENS, J.M. Differential effects of K^+ channel blockers on antinociception induced by α2-adrenoceptor, GABA-B and κ-opioid receptor agonists. **British Journal of Pharmacology**, v. 110, p. 1049 - 1054, 1993.

_____.; BAEYENS, J.M. Role of ATP-sensitive K^+ channels in antinociception induced by R-PIA, an adenosine A_1 receptor agonist, **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 350, p. 57 - 62, 1994.

_____.; CENDÁN, C.M.; COBOS, E.J.; ENTRENA, J.M.; BAEYENS, J.M. Potassium channels and pain: present realities and future opportunities. **European Journal of Pharmacology**, v. 500, p. 203 - 219, 2004.

OECD - Organization for Economic Co-operation and Development: Modified Up-and-Down Procedure: Acute Oral Toxicity. **Guideline 425**,1999.

OECD – Organization of Economic Co-operation and development: The Revised Up-and-Down Procedure: A Test Method for Determining the Acute Oral Toxicity of Chemicals. **NIH Publication**. Nº 02-4501, p. I-4, 2001 CD-ROM 1-2.

OHARA, P.T.; GRANATO, A.; MOALLEM, T.M.; WANG, B.R.; TILLET, Y.; JASMIN, L. Dopaminergic input to GABAergic neurons in the rostral agranular insular cortex of the rat. **Journal of Neurocytology**, v. 32, p. 131- 41, 2003.

OHNO-SHOSAKU, T.; ZÜNKLER, B.J.; TRUBE, G. Dual effect of ATP on K1 currents of mouse pancreatic beta-cells. **Pflügers Archiv - European Journal of Physiology**, v. 408, p. 133 - 138, 1987.

OHSAKI, A. SHIBATA, K.; TOKOROYAMA, T.; KUBOTA. Structure of pilosanones A and B: novel diterpenoides with a bicyclo[5.4.0] undecane skeleton from *Portulaca pilosa* L. **Journal of the Chemical Society, Chemical Communications**, v.3, p. 151 - 153, 1987.

_____.; KASETANI, Y.; ASAKA, Y.; SHIBATA, K.; TOKOROYAMA, T.; KUBOTA, T. Clerodane diterpenoids from the roots of *Portulaca pilosa*. **Phytochemistry**, v. 30, p. 4075 - 4077, 1991.

_____. ; KASETANI, Y.; ASAKA, Y.; SHIBATA, K.; TOKOROYAMA, T.; KUBOTA, T. The diterpenoid from *Portulaca pilosa*. **Phytochemistry**, v. 40, p. 205 - 207, 1995.

OKWUASABA, F.; EJIKE, C.; PARRY, O. Skeletal muscle relaxant properties of the aqueous extract of *Portulaca oleracea*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 17, p. 139 - 160, 1986.

_____. Comparison of the skeletal muscle relaxant properties of *Portulaca oleracea* extracts with dantrolene sodium and methoxyverapamil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 20, p. 85 - 106, 1987.

OLIVEIRA, E. R. **O que é Medicina Popular**. São Paulo: Ed. Brasiliense, 1985 (Coleção Primeiros Passos).

ORTIZ, M.I.; GRANADOS-SOTO, V.; CASTAÑEDA-HERNÁNDEZ, G. The NO-cGMP-K+ channel pathway participates in the antinociceptive effect of diclofenac, but not of indomethacin. **Pharmacology Biochemistry and Behaviour**, v. 76, p. 187 - 195, 2003.

_____.; TATO, D.A.M.; SARMIENTO-HEREDIA, D.; PALMA-MARTÍNEZ, J.; GRANADOS-SOTO, V. Possible activation of the NO-cyclic GMP –protein kinase G-

K+ channels pathway by gabapentin on the formalin test. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior,** v. 83, p. 420 - 427, 2006.

PANDOLFO, P.; PAMPLONA F.A.; PREDIGER, R.D.; TAKAHASHI, R.N. Increased sensitivity of adolescent spontaneously hypertensive rats, an animal model of attention deficit hyperactivity disorder, to the locomotor stimulation induced by the cannabinoid receptor agonist WIN 55, 212–2. **European Journal of Pharmacology**, v. 563, p. 141 - 148, 2007.

PATWARDHAN, B.; VAIDYA, A.D.B.; CHORGHADE, M. Ayurved and natural products drug discovery. **Current Science**, v. 86, p. 789 - 799, 2004.

PEARL, J.; ACETO, M.D.; HARRIS, L.S. Prevention of writhing and other effects of narcotics and narcotic antagonists in mice. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 160, p. 217 - 230, 1968.

PERAZZA, G.G. et al. O uso de modelos animais para avaliar o potencial dos produtos de origem natural. **Vittale**, v. 19, p. 323 - 333, 2007.

PERIMAL, E.K; AKHTAR, M.N.; MOHAMAD, A.S.; KHALID, M.H.; MING, O.H.; KHALID, S.; TATT, L.M.; KAMALDIN, M.N.; ZAKARIA, Z.A.; ISRAF, D.A.; LAJIS, N.; SULAIMAN, M. R. Zerumbone-Induced ntinociception: Involvement of the L-Arginine-Nitric Oxide-cGMP -PKC-K+ATP Channel Pathways**. Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 108, p. 155 - 162, 2010.

PERTOVAARA, A.; KAUPPILA, T.; HÄMÄLÄINEN, M.M. Influence of skin temperature on heat pain threshold in humans. **Experimental Brain Research**, v. 107, p. 497 - 503, 1996.

_____. The influence of stimulus temperature rise rate, adapting temperature, and stimulus duration on supra-threshold responses evoked by noxious heat in the glabrous skin of the limb—comparison of neuronal discharge in the rat spinal dorsal horn with human sensations. **Experimental Brain Research**, v. 126, p. 482 - 494, 1999.

PIETROVSKI, A. R.; VILLAR, J. C. Atividade antinociceptiva e toxicidade aguda do extrato aquoso de Vitex agnus-castus L. **Anais**... Seminário de Pesquisa FAP-SE, 2003.

PIETROVSKI, E. F. **Avaliação da atividade antinociceptiva do extrato etanólico e de princípios ativos das flores de *Combretum Leprosum* Mart**. 2004. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2004.

PINTO, J.E.B.P.; SANTIAGO, E.J.A.; LAMEIRA, O.A. **Compêndio de plantas medicinais**. Lavras, MG: UFLA-FAEP, 2002 . 215 p.

PIO-CORREA, M. "**Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**". Brasília: Imprensa Nacional. Ministério da Agricultura, 1969.

PLONNER, M; SCHNITZLER, A. Cortical representation of pain. **Nervenarzt**, v. 75, p. 962 - 969, 2004.

PORTULACA PILOSA L. Produzido por George Alfred Yatskievych. Disponível em: < http://www.tropicos.org/Image/100023995> Acesso em: 03 Dez. 2011.

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

PRISINZANO, T. E.; ROTHMAN, R.B. Salvinorin A analogs as probes in opioid pharmacology. **Chemical Reviews**, v. 108, p. 1732 - 1743, 2008.

PROUDIFT, H. K.; CLARK, F.M. The projection of locus coeruleus neurons to the spinal cord. **Progress in Brain Research**, v. 88, p. 123 - 141, 1991.

PRUT, L.; BELZUNG, C. “The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors: a review”. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, p. 3 - 33, 2003.

PYNE, N.J.; ARSHAVSKY, V.; LOCHHEAD, A. cGMP signal termination. **Biochemical Society Transactions**, v. 24, p. 1019 - 1922, 1996.

RAFFA, R.B.; MARTINEZ, R.P. The ‘glibenclamide shift' of centrally-acting antinociceptive agents in mice, **Brain Research**, v. 677, p. 277 - 282, 1995.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. **Farmacologia**, 6ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

RAO, Y.K.; FANG, S.H.; TZENG, Y.M. Synthesis and biological evaluation of 3’,4’,5’-trimethoxychalcone analogues as inhibitors of nitric oxide production and tumor cell proliferation. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 17, p. 7909 -7914, 2009.

REES, D.D.; PALMER, R.M.; SCHULZ, R.; HODSON, H.F.; MONCADA, S. Characterization of three inhibitors of endothelial nitric oxide synthase in vitro and in vivo. **British Journal of Pharmacology**, v. 101, p. 746 - 52, 1990.

REVILLA, J. **Plantas Úteis da Bacia Amazônica**. Manaus: Ed. SEBRAE- AM/INPA, 2002. p. 532.

RIVOT, J.P.; SOUSA, A.; MONTAGNE-CLAVEL, J.; BESSON, J.M. Nitric oxide (NO) release by glutamate and NMDA in the dorsal horn of the spinal cord: na in vivo electrochemical approach in the rat. **Brain Research**, v. 821, p. 101-110, 1999.

ROANE, D.S.; BOYD, N.E. Reduction in food intake and morphine analgesia by central glybenclamide. **Pharmacol Biochem Behav**, v. 46, p. 205 - 207, 1993.

ROCHA, M.J.; FULGENCIO, S.F.; RABETTI, A.C.; NOCOLAU, M.; POLI, A.; SIMÕES, C.M.; RIBEIRO-DO-VALE, R.M. Effects of hidroalcoolic extract of *Portulaca pilosa* L. and *Achyrocline satureioides* on urinary sodium and potassium excretion. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 43, p.179 - 183, 1994.

ROCHA, A. C. C.; FERNANDES, E. S.; QUINTA, N. L. M.; CAMPOS, M. M.; CALIXTO, J. B. Relevance of tumour necrosis factor-α for the inflammatory and nociceptive responses evoked by carrageenan in the mouse paw. **British Journal of Pharmacology**, v. 148, p. 688 - 695, 2006.

ROCHMAN, Y.; SPOLSKI, R.; LEONARD, W. J. New insights into the regulation of T cells by γc family cytokines. **Nature Reviews Immunology**, v. 9, p. 480 - 490, 2009.

ROCK, K. L.; KONO, H. The Inflammatory Response to Cell Death. **Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease**, v. 3, p.99 -126, 2008.

RODRIGUES, M.I.A.; FURLAN, A. **Flora Fanerogâmica do estado de São Paulo**: Portulacaceae. São Paulo: Ed. Hucitec, 2002, 261 - 268 p.

RODRIGUES, A.R.A.; DUARTE, I.D.G. The peripheral antinociceptive effect induced by morphine is associated with ATP-sensitive K+ channels. **British Journal of Pharmacology**, v. 129, p. 110 - 114, 2000.

_____; CASTRO, M.S.A.; FRANCISCHI, J.N.; PEREZ, A.C.; DUARTE, I.D.G. Participation of ATP-sensitive K+ channels in the peripheral antinociceptive effect of fentanyl in rats. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, p. 91 - 97, 2005.

ROHRBACH, P. Portulacaceae. In: MARTIUS, C.F.P.; EICHLER, A.G. (eds.). **Flora Brasiliensis.** 2ed. Munique: Lipsiae, 1872, v. 14, p. 293-306.

ROMERO, T.R.L.; DUARTE, I.D.G. Involvement of ATP-Sensitive K+ Channels in the Peripheral Antinociceptive Effect Induced by the α2-Adrenoceptor Agonist Xylazine. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 111, p. 323 - 327, 2009.

ROOSILD, T.P.; LÊ, K.T.; CHOE, S. Cytoplasmic gatekeepers of K^+- channel flux: a structural perspective. **Trends in Biochemical** Sciences, v. 29, p. 39 - 45, 2004.

RUBBO, H.; RADI, R.; TRUJILLO, M.; TELLERI, R.; KALYANARAMAN, B.; BARNES, S.; KIRK, M.; FREEMAN, B.A. Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid peroxidation. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 269, p. 26066 - 26075, 1994.

RUDY, B. Diversity and ubiquity of K channels. **Neuroscience**, v. 25, p. 729 -749, 1988.

RUSSO, C.; BROSE, W. G. Chronic pain. **Annual Review of Medicine**. v. 49, p. 123 - 133, 1998.

SACHS, D.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. Peripheral analgesic blockade of hypernociception: activation of arginine/NO/cGMP/protein kinase /ATPsensitive K + channel pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, p. 3680 - 3685, 2004.

SALVEMINI, D.; WANG, Z.; WYATT, P.S.; BOURDON, D.M.; MARINO, M.H.; MANNING, P.T.; CURRIE, M.G. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. **British Journal of Pharmacology**, v. 118, p. 829 - 838, 1996.

SAMY, R.P.; GOPALAKRISHNAKONE, P. Therapeutic potential of plants as anti-microbials for drug discovery. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 5, p. 1- 12, 2008.

SANTOS, A.R.S.; GADOTTI, V.M.; OLIVEIRA, G.L.; TIBOLA, D., PASZCUK, A.F.; NETO, A.; SPINDOLA, A.M.; SOUZA, M.M.; RODRIGUES, A.L.S.; CALIXTO, J.B. Mechanisms involved in the antinociception caused by agmatine in mice. **Neuropharmacology**, v. 48, p. 1021 - 1034, 2005.

SAUTEBIN, L.; DI ROSA, M. Nitric oxide modulates prostacyclin biosynthesis in the lung of endotoxin-treated rats. **European Journal of Pharmacology**, v. 262, p. 193 - 196, 1994.

SAVEGNAGO, L.; PINTO, L.G.; JESSE, C.R.; ALVES, D.; ROCHA, J.B.; NOGUEIRA, C.W.; ZENI, G. Antinociceptive properties of diphenyl diselenide: evidences for the mechanism of action. **European Journal of Pharmacology**, v. 555, p. 129 - 38, 2007.

SCHMID-ANTOMARCHI, H.; AMOROSO, S.; FOSSET, M.; LAZDUNSKI, M. K^+ channel openers activate brain sulfonylurea-sensitive K+ channels and block neurosecretion. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 87, p. 3489 - 3492, 1990.

SCHMIDT, R.; SCHMELZ, M.; FORSTER, C.; RINGKAMP, M,; TOREBJORK, E.; HANDWERKER, H.O. Novel classes of responsive and unresponsive C nociceptors in human skin. **Journal of Neuroscience**, v. 15, p. 333 - 341, 1995.

SCHOLICH, K.; GEISSLINGER, G. Is mPGES-1 a promising target for pain therapy?. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 27, p. 399 – 401, 2006.

SERHAN, C. N.; CHIANG, N.; VAN DIKE, T. E. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. **Nature Reviews Imunnology**, v. 8, p. 349 - 361, 2008.

SEWARDS, T.V.; SEWARDS, M.A. The medial pain system: neural representations of the motivational aspect of pain. **Brain Research Bulletin**,v. 59, p. 80 -163, 2002.

SHANNON, H.E.; EBERLE, E.L.; MITCH, C.H.; MCKINZIE, D.L.; STATNICK, M.A. Effects of kappa opioid receptor agonists on attention as assessed by a 5-choice serial reaction time task in rats. **Neuropharmacology**, v. 53, p. 930 - 941, 2007.

SHAW, D.; ANNETT, J. M.; DOHERTY, B.; LESLIE, J.C. “Anxiolytic effects of lavender oil inhalation on open-field behaviour in rats”. **Phytomedicine**, v. 14, p. 613 - 620, 2007.

SHERRINGTON, C.S. Observations on the scratch-reflex in the spinal dog. **Journal of Physiology**, v. 34, p. 1 - 50, 1906.

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

SHIBATA, M. et al. Modified formalin test; characteristic biphasic pain response. **Pain***,* v. 38, p 347 - 352, 1989.

SHIEH, C.C. COGHLAN, M.; SULLIVAN, J.P.; GOPALAKRISHNAN, M. Potassium channels: molecular defects, diseases, and therapeutic opportunities. **Pharmacology Reviews**, v. 52, p. 557 - 594, 2000.

_____. SCHMELZ, M.; TOREBJORK, E.; HANDWERKER, H.O. Mechano-insensitive nociceptors encode pain evoked by tonic pressure to human skin. **Neuroscience**, v. 98, p. 793 - 800, 2000.

SIDDALL, P. J.; COUSINS, M. J. Spinal pain mechanisms. **The Spine Journal**, v. 22, p. 98 - 104, 1997.

SILVÉRIO, M.S.; SOUSA, O.V.; DEL-VECHIO-VIEIRA, G.; MIRANDA, M.A.; MATHEUS, F.C.; KAPLAN, M.A.C. Propriedades farmacológicas do extrato etanólico de *Eremanthus erythropappus* (DC.) McLeisch (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 430 - 435, 2008.

SIMON, S.I.; GREEN, C.E. Molecular mechanics and dynamics of leukocyte recruitment during inflammation. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 7, p. 151 - 185, 2005.

SIMOPONLOS, A. P.; NORMAN, H. A.; GILLASPY, J. E.; DUKE, J. A. Common purslane: a source of omega-3 fatty acid and antioxidants. **Journal of American College of Nutrition**, v. 11, p. 378 - 382, 1992.

SOARES DE MOURA, R.; RIOS, A.A.S.; SANTOS E.J.A.; AMORIM NASCIMENTO, A.B.; DE CASTRO RESENDE, F.F.; LEMOS NETO, M. Role of the NO/cGMP pathway in the systemic antinociceptive effect of clonidine in rats and mice. **Pharmacology Biochemistry and Behaviour**, v. 78, p. 247 - 53, 2004.

SOARES, A.C.; LEITE, R.; TATSUO, M.A.; DUARTE, I.D.G. Activation of ATP-sensitive $K^{(+)}$ channels: mechanism of peripheral antinociceptive action of the nitric oxide donor, sodium nitroprusside. **European Journal of Pharmacology**, v. 400, p. 67 - 71, 2000.

_____.; DUARTE, I.D.G. Dibutyryl-cyclic GMP induces peripheral antinociception via activation of ATP-sensitive K+ channels in the rat PGE2-induced hyperalgesic paw. **British Journal of Pharmacology**, v. 134, p. 127 - 133, 2001.

SOEHNLEIN, O.; LINDBOM, L. Phagocyte partnership during the onset and resolution of inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 10, p. 427 - 439, 2010.

SOLITO, E.; DE COUPADE, C.; PARENTE, L.; FLOWER, R.J.; RUSSO-MARIE, F. IL-6 stimulates annexin-1 expression and translocation and suggests a new biological role as class II acute phase protein. **Cytokine**, v.10, p. 514 - 521, 1998.

SOUSA, O.V.; DEL-VECHIO-VIEIRA, G.; ALMEIDA, B.H.; MIRANDA, M.A.; FILGUEIRAS, R.C.; CAMPOS, A.C.; SILVÉRIO, M.S. Efeitos farmacológicos e toxicológicos do extrato de *Posoqueria acutifolia* Mart. (Rubiaceae) em roedores. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 28, p. 51- 56, 2007b.

SOUZA, M. M.; CRUZ, A. B.; SCHUMACHER, M. B.; KREUGER, M. R. O.; FREITAS, R. A.; CRUZ, R. C. B. Métodos de avaliação de atividade biológica de produtos naturais e sintéticos. In: BRESOLIN, T. M. B.; CECHINEL FILHO, V. **Ciências farmacêuticas:** contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos. Itajaí: Univali, 2003.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APGII. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2005.

SOUZA, A.M.; PRADO, W.A. The dual effect of nitric oxide donor in nociception. **Brain Research**, v. 897, p. 9 - 19, 2001.

STEIN, C.; CLARK, J.D.; OH, U.; VASKOD, M.R.; WILCOXE, G.L.;. OVERLANDE, A.C.; VANDERAHF, T.W.; SPENCERG, R.H. Peripheral mechanisms of pain and analgesia. **Brain Research Reviews**, v. 60, p. 90 - 113, 2009.

STEYEMARK, J.A. Portulacaceae. In: STEYEMARK, J.A.; BERRY, P.E.; YATSKIEVYCH, K.; HOLST, B.K. **Flora of the Venezuelan Guayana**.: St. Louis: The Missouri Botanical Garden Press, 2004. p. 874.

TAKANO, M.; QIN, D.Y.; NOMA, A. ATP-dependent decay and recovery of K1 channels in guinea pig cardiac myocytes. **American Journal of Physiology**, v. 258, p. 45 - 50, 1990.

TAÏWE, G.S.; BUM, E.N.; TALLA, E.; DIMO, T.; SIDIKI, N.; DAWE A.; NGUIMBOU, R.M.; DZEUFIET, P.D.; DE WAARD, M. Evaluation of antinociceptive effects of *Crassocephalum bauchiense* Hutch (Asteraceae) leaf extract in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 141, p. 234 - 241, 2012.

TAKHTAJAN, A. **Diversity and classification of flowering plants**. New York: Columbia Univ. Press, 1997.

_____. **Flowering plants**, 2nd ed. Dordrecht: Springer Science + Business Media, 2009.

TALBOT, J. D.; MARRETT, S.; EVANS, A.C.; MEYER, E.; BUSHNELL, M.C.; DUNCAN, G.H. Multiple representations of pain in human cerebral cortex. **Science**, v. 251, p. 1355 - 1358, 1991.

TANG, J.S. The Role of Thalamic Nucleus Submedius and Ventrolateral Orbital Cortex in Modulation of Nociception. In: HU, F. (ed.): **migraine, fibromyalgia and related pain**. Pain research progress-NOVA Publishers, 2008. p. 25 - 69.

TEIXEIRA, L. **Portulacaceae da cidade do Rio de Janeiro**. Rio de janeiro: Rodriguesia, 1959, 299 - 316 p.

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

_____. HOLE K. Animal models of analgesia. In: DICKENSON, A.; BESSON, J.M. (eds). **The Pharmacology of Pain**. Berlin: Springer-Verlag, 1997. p. 1–20.

TONUSSI, C.R.; FERREIRA, F.H. Mechanism of diclofenac analgesia: direct blockade of inflammatory sensitization. **European Journal of Pharmacology**, v. 45, p. 308 - 311, 1994.

TREEDE, R.D.; KENSHALO, D.R.; GRACELY, R.H.; JONES, A.K. The cortical representation of pain. **Pain**, v. 79, p. 105 - 111, 1999.

TRUBE, G.; HESCHLER, J. Inward-rectifying channels in isolated patches of the heart cell membrane: ATP-dependence and comparison with cell-attached patches. **Pflügers Archiv-European Journal of Physiology**, v. 401, p. 178 - 184, 1984.

TUBARO, A.; DRI, P.; DELBELLO, G.; ZILLI, C., DELLA LOGGIA, R. The Croton oil ear test revisited. **Agents and Actions**, v. 17, p. 347 - 349, 1985.

UMEZAWA, K.; CHAICHAROENPONG, C. Molecular Design and Biological Activities of NF-κB Inhibitors. **Molecular and Cells**, v. 14, p. 163 - 167, 2002.

UFPA: Universidade Federal do Pará, site oficial. Disponível em: <http://www.ufpa.br/portalufpa/ interna_farmacia.php> Acesso em: 08/05/2010.

VANDERAH, T.W.; LARGENT-MILNES, T.; LAI, J.; PORRECA, F.; HOUGHTEN, R.A.; MENZAGHI, F.; WISNIEWSKI, K.; STALEWSKI, J.; SUEIRAS-DIAZ, J.; GALYEAN, R.; SCHTEINGART, C.; JUNIEN, J.L.; TROJNAR, J.; RIVIERE, P.J. Novel D-amino acid tetrapeptides produce potent antinociception by selectively acting at peripheral kappa-opioid receptors. **European Journal of Pharmacology**, v. 583, p. 62 - 2, 2008.

VENEGAS, H.; SCHAIBLE H. Effects of antagonists to high-threshold calcium channels upon spinal mechanisms of pain, hyperalgesia and allodynia. **Pain**, v. 85, p. 9 - 18, 2000.

VINEGAR, R. Antagonism of pain and hyperalgesia. Anti-inflammatory drugs. In: Vane, J.R.; FERREIRA, S.H. (Eds.). **Handbook of experimental pharmacology**. **vol. 50/II**. Berlin: Springer-Verlag, 1979. p. 208 - 222.

VOGT, B.A; SIKES, R.W. The medial pain system, cingulate cortex, and parallel processing of nociceptive information. **Progress in Brain Research**, v. 122, p. 223 - 235, 2000.

WADA, Y.; YAMASHITA, T.; IMAI, K.; MIURA, R.; TAKAO, K.; NISHI, M.; TAKESHIMA, H.; ASANO, T.; MORISHITA, R.; NISHIZAWA, K.; KOKUBUN, S.; NUKADA T. A region of the sulfonylurea receptor critical for a modulation of ATP-sensitive K+ channels by G-protein hg-subunits. **The EMBO Journal**, v. 19, p. 4915 - 4925, 2000.

WALL, P. D. The gate control theory of pain mechanisms: a re-examination and re-statement. **Brain**, v. 101, p. 1 - 18, 1978.

WANG, C.Q.; YANG, G. Q. Betacyanins from Portulaca oleracea L. ameliorate cognition deficits and attenuate oxidative damage induced byD-galactose in the brains of senescent mice. **Phytomedicine**, v. 17, p. 527 - 532, 2010.

WARD, P. A. The Dark Side of C5a in Sepsis. **Nature Reviews Immunology**, v. 4, p. 133 - 142, 2004.

WATANABE, M.; THOMA, S.; MURAKAMI, M.; NAKAGIMA, Y.; MORIYA, H. Assessment of mechanical and thermal thresholds of human C nociceptors during increasesin skin sympathetic nerve activity. **Clinical Neurophysiology**, v. 113, p. 1485 -1490, 2002.

WEINSTEIN, I. B.; LEE, L.S.; FISHER, P.B.; MUFSON, A.; YAMASAKI, H. Action of phorbol esters in cell culture: mimicry of transformation, altered differentiation, and effects on cell membranes. **Journal of Supramolar Structure**, vol. 12, p. 195 - 208, 1979.

WELCH, S.P.; DUNLOW, L.D. Antinociceptive activity of intrathecally administered potassium channel openers and opioid agonists: a common mechanism of action? **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 267, p. 390 - 399, 1993.

WELTERS, I.D.; MENZEBACH, A.; GOUMON, Y.; LANGEFELD, T.W.; TESCHEMACHER, H.; HEMPELMANN, G. Morphine suppresses complement receptor expression, phagocytosis, and respiratory burst in neutrophils by a nitric oxide and mu(3) opiate receptor-dependent mechanism. **Journal of Neuroimmunology**, v. 111, p. 139 - 45, 2000.

WILD, K.D.; VANDERAH, T.; MOSBERG, H.I.; PORRECA, F. Opioid δ receptor subtypes are associated with different potassium channels. **European Journal of Pharmacology**, v. 193, p. 135 - 136, 1991.

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

WOOD, P. B. Role of central dopamine in pain and analgesia. **Expert Review of Neurotherapeutics**, v. 8, p. 781 - 797, 2008.

WOOLF, C.J.; MA, Q. Nociceptors: noxious stimulus detectors. **Neuron**, v. 55, p. 353 - 364, 2007.

_____.; SALTER, M. W. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. **Science**, v. 288, p. 1765 - 1769, 2000.

XIANG, L.; XING, D.; WANG, W.; WANG, R.; DING, Y.; DU, L. Alkaloids from *Portulaca oleracea* L. **Phytochemistry**, v. 66, p. 2595 - 2601, 2005.

XU, X.; YU, L.; CHEN, G. Determination of flavonoids in *Portulaca oleracea* L. by capillary electrophoresis with electrochemical detection. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis,** v. 41, p. 493 - 499, 2006.

YAKSH, T.L.; WILSON, P.R. Spinal serotonin terminal system mediates antinociception. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 208, p. 446 - 453, 1979.

_____. Substance P release from knee joint afferent terminals: modulation by opioids. **Brain Research**, v. 458, p. 319 - 324, 1988.

YAMADA, C. S. B. **Fitoterapia**: sua história e importância. Racine, 1998. 505 p.

YAMAMOTO, D. C. H.; PINTO, T. J. A.; MEURER, V. M.; CARVALHO, A. M.; REZENDE, P. Controle de Qualidade Microbiológico de Produtos farmacêuticos, cosméticos e Fitoterápicos Produzidos na Zona da Mata, MG. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE EXTENSÃO UNIVERSITÁRIA, 2004, Belo Horizonte. **Anais...** Belo Horizonte, 2004.

YAMAMOTO, T.; SHIMOYAMA, N.; MIZUGUCHI, T. Nitric oxide synthase inhibitor blocks spinal sensitization induced by formalin injection into the rat paw. **Anesthesia & Analgesia**, v. 77, p. 886 - 890, 1993.

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

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. Polymorphisms in human histamine receptor H4 gene are associated with atopic dermatitis. **British Journal of Dermatology**, v. 162, p. 1038 - 1043, 2010.

ZHU, Y.J; LU, T.J. A multi-scale view of skin thermal pain: from nociception to pain sensation. **Philosophical Transactions of the Royal Society**, v. 368, p. 521 - 559, 2010.

ZAKARIA, Z.A.; SULAIMAN, M.R.; JAIS, A.M.M.; SOMCHIT, M.N.; JAYARAMAN, K.V.; BALAKHRISNAN, G.; ABDULLAH, F.C.; The antinociceptive activity of Muntingia calabura aqueous extract and the involvement of L-arginine/nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate pathway in its observed activity in mice. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 20, p. 365 - 372, 2006.

ZÖLLNER, C.; STEIN, C. Opioids. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 177, p. 31 - 63, 2007.

APÊNDICE - TABELAS

Tabela 1: Efeito do EHEPp (v.o.) e da indometacina (v.o.) sobre as contorções abdominais induzidas por ácido acético intraperitoneal a 0,6% em camundongos.

Grupos (n=7-10)	Dose mg/kg	Nº de contorções (20min)	% de inibição
Controle (v.o.)		55 ± 2,712	-------
EHEPp (v.o.)	50	45,88 ± 2,53	16,58
EHEPp (v.o.)	100	36,71 ± 4,35	33,25*
EHEPp (v.o.)	200	25,33 ± 5,65	53,94*
EHEPp (v.o.)	400	16,14 ± 2,05	70,65*
EHEPp (v.o.)	600	14,33 ± 2,36	73,94*
Indometacina (v.o.)	5	18,80 ± 1,28	65,01*

Os valores representam a média ± erro padrão da média (E.P.M), onde * denota significância estatística ($p < 0,05$) comparado ao grupo controle. ANOVA de uma via seguido de teste de Bonferroni. n representa o número de animais utilizados por grupo.

Tabela 2: Efeito do EHEPp (v.o.) e da morfina (s.c.) sobre a nocicepção induzida termicamente (placa quente a 50 ± 0,5 ºC) em camundongos.

Grupos (n=7-10)	Dose mg/kg	Tempo 0	Tempo 30	Tempo 60	Tempo 90	Tempo 120
Controle (v.o.)	-	10,34 ± 0,12	9,8 ± 0,74	8,8 ± 0,33	9,31 ± 1,26	8,4 ± 1,21
EHEPp (v.o.)	200	8,83 ± 0,78	8,45 ± 0,56	8,07 ± 0,34	10,45 ± 2,15	9,32 ± 1,67
EHEPp (v.o.)	400	10,32 ± 0,28	8,68 ± 0,31	9,75 ± 0,46	8,2 ± 0,50	10,5 ± 0,72
EHEPp (v.o)	600	10,57 ± 0,72	11,67 ± 1,39	13,30 ± 1,11	11,53 ± 0,80	11,78 ± 0,82
Morfina (s.c.)	10	6,98 ± 1,11	28,16* ± 3,65	27,52* ± 3,87	25,00* ± 4,28	16,72* ± 3,02

Os valores representam a média ± erro padrão da média (E.P.M), onde * denota significância estatística ($p < 0,05$) comparado ao grupo controle. ANOVA de duas vias seguido de teste de Bonferroni. n representa o número de animais utilizados por grupo.

Tabela 3 - Efeito do EHEPp (v.o.) sobre a nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina a 1% em camundongos.

Grupos (n=7)	Dose mg/Kg	Nº de lambidas (1ª fase)	% inibição (1ª fase)	Nº de lambidas (2ª fase)	% inibição (2ª fase)
Controle (v.o.)	-	70,25 ± 2,66	-	188,1 ± 10,48	-
EHEPp (v.o.)	100	59,43 ± 3,18	15,40	152,6 ± 9,41	18,82
EHEPp (v.o.)	200	43 ± 3,27	38,79 *	95,43 ± 14,72	49,27 *
EHEPp (v.o.)	400	27,66 ± 1,56	60,62 *	88,28 ± 18,74	53,06*
EHEPp (v.o.)	600	17,42 ± 3,98	75,18*	23,43 ± 6,05	87,54*

Os valores representam a média ± erro padrão da média (E.P.M), onde * denota significância estatística ($p < 0,05$) comparado ao grupo controle. ANOVA de uma via seguido de teste de Bonferroni. n representa o número de animais utilizados por grupo.

Tabela 4: Efeito do EHEPp (v.o.) e da morfina (s.c.) no teste da formalina a 1% em camundongos pré-tratados com o antagonista opióide naloxona (s.c.).

Grupos (n=7-10)	Dose mg/kg	Nº de lambidas (1ª fase)	Nº de lambidas (2ª fase)
Controle (v.o.)	-	70,25 ± 2,66	188,1 ± 10,48
EHEPp (v.o.)	600	17,42 ± 3,98*	23,43 ± 6,05*
Nalox (s.c.)/EHEPp (v.o.)	0,4/600	48,50 ± 3,59#	205,33 ± 7,60#
Morfina (s.c.)	4	25,66 ± 6,14*	14,12 ± 2,98*
Nalox (s.c.)/Morfina (s.c.)	0,4/4	50,70 ± 3,53#	128,33 ± 14,99#
Naloxona (s.c.)	0,4	65,30 ± 5,79	161,66 ± 16,37

Os valores representam a média ± erro padrão da média (E.P.M), onde * denota significância estatística ($p < 0,05$) comparado ao grupo controle e # denota significância estatística ($p < 0,05$) do grupo tratado na presença do antagonista versus o grupo tratado isoladamente. ANOVA de uma via seguido de teste de Bonferroni. n representa o número de animais utilizados por grupo.

Tabela 5: Efeito do EHEPp (v.o.) no teste da formalina 1% em camundongos pré-tratados com inibidores da NO sintase e guanilato ciclase solúvel (L-NAME (i.p.) e Azul de metileno (AM, i.p.), respectivamente).

Grupos (n=7)	Dose mg/kg	Nº de lambidas (1ª fase)	Nº de lambidas (2ª fase)
Controle (v.o.)	-	70,25 ± 2,66	188,1 ± 10,48
EHEPp (v.o.)	600	17,42 ± 3,98*	23,43 ± 6,05*
AM (i.p.)/EHEPp (v.o.)	1/600	54,22 ± 6,14#	145,28 ± 18,98#
L-NAME (i.p.)/EHEPp (v.o.)	20/600	49,33 ± 8,60#	146,33 ± 13,58#
AM (i.p.)	1	63,60 ± 8,56	175,40 ± 14,85
L-NAME (i.p.)	20	74,50 ± 4,13	164,40 ± 19,17

Os valores representam a média ± erro padrão da média (E.P.M), onde * denota significância estatística ($p < 0,05$) comparado ao grupo controle e # denota significância estatística ($p < 0,05$) do grupo tratado na presença do antagonista versus o grupo tratado isoladamente. ANOVA de uma via seguido de teste de Bonferroni. n representa o número de animais utilizados por grupo.

Tabela 6: Efeito do EHEPp (v.o.) no teste da formalina a 1% em camundongos pré-tratados com o bloqueador de canais de potássio sensíveis a ATP Glibenclamida (Glib, i.p.).

Grupos (n=7)	**Dose mg/kg**	**Nº de lambidas (1ª fase)**	**Nº de lambidas (2ª fase)**
Controle (v.o.)	-	70,25 ± 2,66	188,1 ± 10,48
EHEPp (v.o.)	600	17,42 ± 3,98*	23,43 ± 6,05*
Glib (i.p.)/EHEPp (v.o.)	10/600	85,28 ± 13,59#	170,80 ± 32,67#
Glib (i.p.)	10	64,71 ± 4,18#	169,00 ± 27,70#

Os valores são a média ± erro padrão da média (E.P.M), onde * denota significância estatística ($p < 0,05$) comparado ao grupo controle e # denota significância estatística ($p < 0,05$) do grupo tratado na presença do antagonista versus o grupo tratado isoladamente. ANOVA de uma via seguido de teste de Bonferroni. n representa o número de animais utilizados por grupo.

Tabela 7: Efeito do EHEPp (v.o.) e da indometacina (v.o.) sobre o edema de pata induzido pela injeção de carragenina (i.pl.) a 1% em ratos.

Grupos (n=7)	Dose mg/kg	1ª hora	2ª hora	3ª hora	4ª hora	5ª hora
Controle (v.o.)	-	0,40 ± 0,045	0,640 ± 0,051	0,86 ± 0,040	0,66 ± 0,040	0,50 ± 0,032
EHEPp (v.o.)	400	0,36 ± 0,068	0,54 ± 0,068	0,76 ± 0,08	0,60± 0,08	0,50 ± 0,09
EHEPp (v.o.)	600	0,36 ± 0,12	0,52± 0,09	0,74 ± 0,09	0,60 ± 0,05	0,50 ± 0,05
Indometacina (v.o.)	10	0,12 ± 0,02*	0,28* ± 0,02	0,32* ± 0,06	0,30* ± 0,07	0,24* ± 0,06

Os valores representam a média ± erro padrão da média (E.P.M), onde * denota significância estatística ($p < 0,05$) comparado ao grupo controle. ANOVA de duas vias seguido de teste de Bonferroni. n representa o número de animais utilizados por grupo.

Tabela 8: Efeito do EHEPp (v.o.) e da dexametasona (v.o.) sobre o edema de orelha em camundongos induzido pela aplicação tópica de óleo de cróton.

Grupos (n=7)	Dose mg/kg	Edema (mg)
Controle (v.o.)		7,30 ± 0,80
EHEPp (v.o.)	400	5,50 ± 1,07
EHEPp (v.o.)	600	6,32 ± 0,93
Dexametasona (v.o.)	10	0,81 ± 0,15*

Os valores representam a média ± erro padrão da média (E.P.M), onde * denota significância estatística ($p < 0,05$) comparado ao grupo controle. ANOVA de uma via seguido de teste de Bonferroni. n representa o número de animais utilizados por grupo.

Parecer Técnico do Comitê de Ética em Pesquisa com Animas- CEPAN- Instituto Evandro Chagas

MS - SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE
INSTITUTO EVANDRO CHAGAS

Parecer de Aprovação Nº 014/2010/**CEPAN**/IEC/SVS/MS
Registro CEPAN - **045/2009**

Ananindeua/PA, 02 de agosto de 2010.

Projeto: **"Contribuição para a ampliação do conhecimento acerca de plantas medicinais da RENISUS".**

Pesquisador Responsável: MARIA FANI DOLABELA

Conforme decisão do Comitê de Ética em Pesquisa com Animais-CEPAN do Instituto Evandro Chagas, cientificamos que o projeto acima **foi aprovado.**

Recomendamos ao coordenador responsável que mantenha atualizados todos os documentos pertinentes ao projeto.

Os relatórios parciais deverão ser encaminhados a este Comitê, anualmente, a partir do início do projeto.

Atenciosamente,

Nelson Antonio Bailão Ribeiro

NELSON ANTONIO BAILÃO RIBEIRO
Coordenador do CEPAN/IEC

AV. ALMIRANTE BARROSO, 492 – BAIRRO: MARCO – CEP: 66090-000 – BELÉM-PA – C.N.P.J.: 26.989.350/0489-09 FONE: (091) 246-6422 – FAX: (091)664669RODOVIA BR 316 – KM 07, SNº - BAIRRO - LEVILÂNDIA – CEP: 67.030-000 – ANANINDEUA-PA – FONE: (091) 214-2000
http://www.iec.pa.gov.br