



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

Mayra Arouck Barros

**INVESTIGAÇÃO DA TOXICIDADE ORAL AGUDA E
PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS DE UMA ESPÉCIE
DO GÊNERO *CASSYTHA*.**

BELÉM – PA

2019



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

**INVESTIGAÇÃO DA TOXICIDADE ORAL AGUDA E
PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS DE UMA ESPÉCIE
DO GÊNERO *CASSYTHA*.**

Autora: Mayra Arouck Barros
Orientador: Prof^a. Dr. Enéas de Andrade Fontes Júnior

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Avaliação Biológica de Produtos Naturais e Sintéticos, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

BELÉM – PA
2019

FOLHA DE APROVAÇÃO

Mayra Arouck Barros

INVESTIGAÇÃO DA TOXICIDADE ORAL AGUDA E PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS DE UMA ESPÉCIE DO GÊNERO *CASSYTHA*.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Avaliação Biológica de Produtos Naturais e Sintéticos, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em: ____ / ____ / ____

Banca examinadora:

Orientador - Prof. Dr. Enéas de Andrade Fontes Júnior

Prof^a. Dr^a. Carolina Heitmann Mares Azevedo

Prof^a. Dr^a. Luanna de Melo Pereira Fernandes

DEDICATÓRIA

Á minha amada família,
por todo incansável apoio, companheirismo
e paciência durante esta jornada.
Vê-los felizes e orgulhosos é a minha maior recompensa!

AGRADECIMENTOS

À Deus, que sempre me amparou nos momentos mais difíceis, me dando força e bênçãos todos os dias da minha vida.

Aos meus pais Simone e José Raimundo, por todo amor, ajuda, dedicação e incentivo para que eu chegasse até aqui. É tudo por vocês, sempre!

À minha irmã Mayara, minha gêmea, minha metade, que é minha companheira nessa luta todos os dias, desde o maternal até o mestrado (e mais tudo o que vier pela frente). Estamos vencendo mais uma etapa juntinhas!

Ao meu irmão João Victor, por ser minha fonte diária de sorrisos e alegria. Você chegou para mudar nossas vidas e estarei ao seu lado para sempre.

Ao meu noivo Leandro por me apoiar e me incentivar todos os dias, por entender eu estresse e minha ausência, quando necessário. Com você, essa caminhada foi mais fácil. Palavras nunca serão suficientes para te agradecer.

Às minhas amigas/irmãs de coração pelas inúmeras demonstrações de apoio e vibrações com as conquistas uma das outras. É uma honra partilhar esse momento tão especial com vocês.

Ao meu querido orientador Prof. Dr. Enéas de Andrade Fontes Júnior, por todos os conselhos, ajudas, ensinamentos e palavras que acalmam. Aprendi demais com você em todos esses anos desde a iniciação científica. Sempre serei grata a você.

Aos colegas do Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Comportamento (LAFICO), por toda ajuda e companheirismo nas intermináveis horas trabalhando juntos. Vocês foram fundamentais para a realização deste trabalho.

Aos parceiros do Laboratório de Bromatologia pelo fornecimento do extrato para avaliação biológica.

Aos parceiros do Laboratório de Hematologia, por toda ajuda e colaboração na realização deste trabalho.

Aos parceiros do Laboratório de Ensaio in vitro, Imunologia, Estresse Oxidativo e Microbiologia, em especial Prof. Dra. Marta Chagas Monteiro, pela colaboração e utilização de equipamentos necessários.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Pará, pela oportunidade e apoio nesses dois anos.

Ao CNPQ pelo auxílio financeiro para realização deste trabalho.

Ao Instituto Evandro Chagas, pelo fornecimento dos animais utilizados na realização deste trabalho.

EPÍGRAFE

*“Posso, tudo posso, naquele que me fortalece
Nada e ninguém no mundo vai me fazer desistir
Quero, tudo quero, sem medo estragar meus projetos
Deixar-me guiar nos caminhos que Deus desejou pra mim”.*
Celina Borges

*“Os que desprezam os pequenos acontecimentos nunca farão grandes descobertas.
Pequenos momentos mudam grandes rotas”.*
Augusto Cury

RESUMO

INVESTIGAÇÃO DA TOXICIDADE ORAL AGUDA E PROPRIEDADES FARMACOLÓGICAS DE UMA ESPÉCIE DO GÊNERO *CASSYTHA*.

As plantas têm estado presentes na cultura humana desde sua origem, sendo utilizadas para diversos fins, inclusive para o tratamento de doenças. Prática que foi transmitida de geração em geração. A evolução do conhecimento, no entanto, demanda abordagens mais amplas sobre as espécies vegetais com potencial terapêutico, visando garantir a segurança e validar seu uso tradicional. A *Cassytha filiformis* (Cas01), espécie do gênero *Cassytha*, é utilizada na medicina popular para tratar câncer, tripanossomíase, doenças renais e gonorreia. Dentre suas atividades comprovadas, destacam-se os efeitos antiagregante plaquetário, relaxante vascular, antioxidante, citotóxico, anti-hipertensivo, hepatoprotetor, antiepilético, diurético e antagonista do receptor alfa-adrenérgico. Entre seus metabólitos secundários, têm sido identificados alcaloides com proveito terapêutico. Até o momento, no entanto, inexistem estudos que subsidiem a segurança de sua aplicação terapêutica ou que explorem possíveis propriedades anti-inflamatórias como base para suas ações terapêuticas. Portanto, a toxicidade oral aguda foi avaliada de acordo com a OECD 425. Partindo de uma administração de 2.000 mg/kg (v.o.) do extrato em ratos, foram avaliados nas primeiras 4 h e nos 14 dias seguintes, sinais hipocráticos de toxicidade, atividade locomotora espontânea, ganho de peso, consumo de água e alimento, além de peso relativo dos órgãos e os padrões hematológicos ao final do período. A atividade antinociceptiva foi avaliada em camundongos, sendo aplicados o teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético e o teste da formalina (CEUA nº 1050140817). A dose limite do extrato não promoveu sinais hipocráticos de toxicidade ou mortes. Também não houveram alterações nos padrões de consumo de ração e água ou no ganho ponderal. A avaliação do peso relativo dos órgãos (fígado, rins, estômago e coração) e do hemograma evidenciaram padrões equivalentes entre os animais tratados e controles. O Cas01 também não prejudicou a atividade locomotora dos animais. O Cas01 demonstrou não ter influência sobre as contorções induzidas pelo ácido acético, bem como não promoveu alterações significativas sobre a nocicepção bifásica induzida pela formalina. Tais achados demonstram pela primeira vez que o Cas 01 é um xenobiótico de baixa toxicidade oral aguda. Demonstram ainda

que suas ações terapêuticas não envolvem mecanismos nociceptivos ou inflamatórios.

Palavras-chave: *Cassytha filiformis*; dor; inflamação; nocicepção; toxicidade.

ABSTRACT

Plants have been present in human culture since its inception, being used for several purposes, including for the treatment of diseases. This practice has been handed down from generation to generation. The evolution of knowledge, however, demands broader approaches on plant species with therapeutic potential, in order to ensure safety and validate its traditional use. *Cassytha filiformis*, a species of the genus *Cassytha*, is used in folk medicine to treat cancer, trypanosomiasis, kidney disease and gonorrhoea. Among its proven activities, the antiplatelet, vascular relaxing, antioxidant, cytotoxic, antihypertensive, hepatoprotective, antiepileptic, diuretic and alpha-adrenergic receptor antagonist effects stand out. Among its secondary metabolites, alkaloids have been identified for therapeutic benefit. To date, however, there are no studies that support the safety of its therapeutic application or that explore possible anti-inflammatory properties as the basis for its therapeutic actions. Acute oral toxicity was assessed according to OECD 425. Starting from an administration of 2000 mg / kg (v.o) of extract in rats, the hippocratic signs of toxicity, spontaneous locomotor activity, weight gain, water and food consumption, as well as relative body weight and hematological patterns at the end of the period. The antinociceptive activity was evaluated in mice, using the acetic acid induced writhing test and the formalin test (CEUA nº 1050140817). The cutoff dose of the extract did not promote hippocratic signs of toxicity or death. There were also no changes in feed and water consumption or weight gain patterns. The evaluation of the relative weight of organs (liver, kidneys, stomach and heart) and hemogram showed equivalent standards between treated and control animals. Cas01 also did not impair the locomotor activity of the animals. Cas01 was shown to have no influence on the contortions induced by acetic acid, nor did it promote significant alterations on formalin-induced biphasic nociception. These findings demonstrate for the first time that Cas 01 is a xenobiotic of low acute oral toxicity. They also demonstrate that their therapeutic actions do not involve nociceptive or inflammatory mechanisms.

Key words: *cassytha filiformis*; inflammation; nociception; pain; toxicity.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Relação de parasitismo da espécie *Cassytha filiformis* com *Mangifera indica* (Fonte: Nelson, 2008).....22
- Figura 2. Efeitos da Cas01 (2.000 mg/kg) sobre a atividade locomotora espontânea de animais tratados, comparado ao grupo controle, através do parâmetro de número de rearing, distância total percorrida, tempo na periferia e distância percorrida na periferia, respectivamente, no 1° e 15° dia pós tratamento. Os valores representam média \pm e.p.m (n= 5). ANOVA de uma via seguido de pós – teste de Tukey.....40
- Figura 3. Efeitos do Cas01 (2.000 mg/kg) sobre o consumo de água e ração, comparado ao grupo controle. Os valores representam média \pm e.p.m (n= 5). Teste-t.41
- Figura 4. Efeitos do Cas01 (2.000 mg/kg) sobre o ganho de peso ponderal, comparado ao grupo controle. Os valores representam média \pm e.p.m (n= 5). Teste-t.42
- Figura 5. Efeitos da Cas01 (2.000 mg/kg) sobre a contagem de células diferenciais no sangue de animais tratados, comparado ao grupo controle. Os valores representam média \pm e.p.m (n= 5). Teste-t.44
- Figura 6. Efeitos da Cas01 (200, 400 e 800 mg/kg) sobre as contorções abdominais induzidas por ácido acético 0,6% (i.p), em camundongos. Os valores representam média \pm e.p.m (n=6). *** P < 0,001, quando comparado ao controle. ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey45
- Figura 7. Efeitos da Cas01 (400 mg/kg) na primeira e segunda fase do teste de formalina, em camundongos. Os valores representam média \pm e.p.m (n=6). **P < 0.01 e *** P < 0,001, quando comparado ao controle. ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey.....47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Efeitos da Cas01 (2.000 mg/kg) sobre o peso dos órgãos, comparado ao grupo controle. Os valores representam média \pm e.p.m (n= 5). Teste-t.43

Tabela 2 – Efeitos da Cas01 (2.000 mg/kg) sobre o hemograma, comparado ao grupo controle. Os valores representam média \pm e.p.m (n= 5). Teste-t.44

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Divisão dos grupos para o teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético	37
Quadro 2 – Divisão dos grupos para o teste da formalina.....	37

LISTA DE ABREVIATURAS

AINES	Anti-inflamatórios não-esteroidais
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APC	Células Apresentadoras de Antígeno
Aδ	Fibras A Delta
CEPAE	Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação
cGMP	Monofosfato de Guanosina Cíclico
COX	Ciclo-oxigenase
CAS01	Cassytha filiformis
DE₅₀	Dose Efetiva Mediana
DMSO	Dimetilsulfóxido
EPM	Erro Padrão da Média
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
γ-GT	Gama glutamil transferase
I.P	Via intraperitoneal
IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor
IL-1	Interleucina 1
IL-2	Interleucina 2
kATP	Canais de potássio sensíveis ao ATP
LABOPAT	Laboratório de Patologia
LPS	Lipopolissacarídeo
NK-kB	Fator de Transcrição Nuclear Kappa Beta
NO	Óxido nítrico
OECD	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAMPS	Padrões Moleculares Associados aos Patógenos
PGI₂	Prostaciclina
PGE₂	Prostaglandina E2
PGH₂	Prostaglandina H2
SNC	Sistema Nervoso Central
STAT 3	Sinal de Transdução e Ativação de Transcrição 3
TGO	Transaminase Glutâmico-Oxalacética

TGP	Transaminase Glutâmico-Pirúvica
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral α
UFPA	Universidade Federal do Pará
UFRA	Universidade Federal Rural do Pará
V.O	Via Oral

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REFERENCIAL TEÓRICO	20
2.1	<i>Cassytha filiformis</i> L. - aspectos botânicos	20
2.1.1	CLASSIFICAÇÃO	20
2.1.2	FAMÍLIA LAURACEAE	20
2.1.3	GÊNERO CASSYTHA L.	21
2.1.4	ESPÉCIE <i>CASSYTHA FILIFORMIS</i> L.	21
2.2	Toxicidade de Produtos Naturais	23
2.3	Dor	24
2.4	Inflamação	26
2.4.1	MECANISMOS DA INFLAMAÇÃO	27
2.5	Anti-inflamatórios não esteroidais (AINES)	29
3	OBJETIVOS	31
3.1	Objetivo geral	31
3.2	Objetivos específicos	31
4	METODOLOGIA	32
4.1	Fitoquímica	32
4.1.1	COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL	32
4.1.2	SECAGEM E PROCESSAMENTO DO MATERIAL VEGETAL	32
4.1.3	OBTENÇÃO DO EXTRATO	32
4.2	Animais de Experimentação	33
4.3	Avaliação da Toxicidade Oral Aguda	33
4.3.1	TRATAMENTO	34
4.3.2	AVALIAÇÃO HIPOCRÁTICA	34
4.3.3	TESTE DA ATIVIDADE LOCOMOTORA ESPONTÂNEA (CAMPO ABERTO)	34
4.3.4	ACOMPANHAMENTO DIÁRIO	35
4.3.5	COLETA DE TECIDOS	35
4.3.6	AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA E HISTOPATOLÓGICA DOS ÓRGÃOS	35
4.3.7	AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA	36
4.4	Avaliação da Atividade Antinociceptiva	36
4.4.1	CONTORÇÕES ABDOMINAIS INDUZIDAS POR ÁCIDO ACÉTICO	36
4.4.2	ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO - TESTE DA FORMALINA	37
4.5	Análise Estatística	38

5	RESULTADOS	39
5.1	Avaliação da Toxicidade Oral Aguda	39
5.1.1	AVALIAÇÃO HIPOCRÁTICA E LETALIDADE	39
5.1.2	ATIVIDADE LOCOMOTORA ESPONTÂNEA	39
5.1.3	CONSUMO DE ÁGUA E RAÇÃO	41
5.1.4	GANHO DE PESO PONDERAL	42
5.1.5	PESO RELATIVO DOS ÓRGÃOS	42
5.1.6	AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA	43
5.1.7	AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA	43
5.2	Avaliação da Atividade Antinociceptiva	45
5.2.1	CONTORÇÕES ABDOMINAIS INDUZIDAS POR ÁCIDO ACÉTICO	45
5.2.2	TESTE DA FORMALINA	45
6	DISCUSSÃO	48
7	CONCLUSÃO	52
	REFERÊNCIAS	53
	APÊNDICE A – Parecer do CEUA/UFPA	59
	APÊNDICE B – Artigo Publicado	60

1 INTRODUÇÃO

Desde o início da vida humana, as plantas estão presentes em diferentes culturas, sendo utilizadas para diversos fins, inclusive para o tratamento de doenças. Este conhecimento tem sido preservado através da transmissão oral ou escrita e passado de geração em geração (EDEWOR et al, 2016). No mundo, estima-se que mais de 80% da população faz uso de algum tipo de tratamento fitoterápico (RIBEIRO et al, 2014).

A maioria das drogas aprovadas clinicamente são produtos naturais ou derivadas de compostos naturais (XIN et al, 2016). Diante disto, as plantas medicinais vêm historicamente reafirmando seu valor como fonte de moléculas bioativas com potencial terapêutico, representando uma reserva importante para a descoberta de novos fármacos. Apesar de a indústria investir na descoberta de novos compostos sintéticos, tem sido encontrada uma tendência de queda no número de medicamentos inovadores, evidenciando a relevância da pesquisa a partir de fontes naturais (ATANASOV et al, 2015).

Neste contexto, o Brasil se destaca pela sua ampla variedade de espécies vegetais, representando a maior biodiversidade do planeta. Muitas dessas plantas são utilizadas pela população nativa para tratar enfermidades, prática fortemente influenciada pela tradição, por crenças ou ainda pela dificuldade de acesso ao sistema de saúde. Portanto, junto a essa biodiversidade amazônica, há também uma rica fonte de conhecimentos tradicionais, oriundos dos grupos étnicos preservados que nela residem (RIBEIRO et al, 2014; SANTOS et al, 2008).

Esta cultura de inserção de produtos naturais na cultura medicinal junto a tendência crescente de uso de plantas medicinais como estratégias terapêuticas alternativa ou complementares aos medicamentos industrializados demandam o estabelecimento de um elo entre a medicina popular e a pesquisa científica, dada a necessidade de garantir a segurança de sua aplicação. Tal relação tem inspirado também inúmeras pesquisas no mundo inteiro, que buscam verificar as propriedades farmacológicas presumidas popularmente em diversos produtos naturais aplicados ao tratamento de doenças (ATANASOV et al, 2015, BABAYI et al, 2017).

Uma grande diversidade de doenças que afetam os seres humanos envolve mecanismo nociceptivos e inflamatórios, sendo cada vez mais explorada a utilização

de drogas que tenham a capacidade de modular estes processos. De fato, diferentes classes de fármacos, são capazes de modular processos nociceptivos e inflamatórios envolvendo mecanismos neurais, imunológicos e hormonais periféricos e centrais. Os Anti-Inflamatórios Não Esteroidais (AINES) estão entre os medicamentos mais utilizados em todo o mundo, fornecendo importantes contribuições para a melhoria da qualidade de vida das pessoas. Apesar disto, estas drogas são frequentemente vinculadas a reações adversas graves, resultando em toxicidade renal e/ou hepática, discrasias sanguíneas e lesão gastrintestinal, o que limita seu uso (MENDES et al, 2012). Tal contexto reafirma a necessidade da busca por novas drogas que figurem como alternativas efetivos, mas principalmente mais seguras.

Entre as espécies de ocorrência amazônica com potencial proveito terapêutico, a espécie *Cassytha filiformis*, pertencente ao gênero *Cassytha*, da família *Lauraceae* (MORAES, 2005), inserida na cultura medicinal local, sendo aplicada ao tratamento de câncer, tripanossomíase, doenças renais e gonorreia. Sua prospecção fitoquímica tem revelado a presença de alcaloides com potencial terapêutico voltado a modulação de processos inflamatórios. Outras atividades desta espécie já foram alvo de investigação, revelando ações antiagregante plaquetária, vasorrelaxante, diurética, antagonista do receptor alfa-adrenérgico (MYTHILI et al, 2011; SHARMA et al, 2009; TSAI et al, 2008), antioxidante (MYTHILI et al, 2011), citotóxica (STEVIGNY et al, 2002; HOET et al, 2004), antiepilética (GOVARDHAN et al, 2011), hepatoprotetora (RAJ et al, 2013) e anti-hipertensiva (YORI YULIANDRA e ARMENIA, 2017). Apesar disto, não há, até o presente momento, dados que subsidiem a segurança de sua utilização por via oral ou sua eficácia sobre processos nociceptivos ou inflamatórios.

Desta forma, o presente estudo se propõe avaliar em modelos pré-clínicos a toxicidade oral aguda e as possíveis propriedades farmacológicas ligadas ao processo da dor e da inflamação de uma espécie do gênero *Cassytha*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Cassytha filiformis* L. - aspectos botânicos

2.1.1 CLASSIFICAÇÃO

Reino: Plantae

Divisão: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Ordem: Laurales

Família: Lauraceae

Gênero: *Cassytha* L.

Espécie: *Cassytha filiformis* L.

2.1.2 FAMÍLIA LAURACEAE

A família Lauraceae é um das famílias mais importantes das angiospermas e compreende cerca de 50 gêneros e 2500 espécies (AMBI et al, 2017; LENTA et al, 2015). Possui distribuição pantropical, sendo encontrada nas regiões tropicais da América, Ásia, assim como Austrália e Madagascar. No Brasil, já foram identificados 23 gêneros e 434 espécies desta família (SANTOS e ALVES, 2013; MORAES, 2005).

Suas espécies são tipicamente árvores lenhosas ou arbustos, com folhas alternas, flores pequenas, unissexuadas ou bissexuadas, actinomorfas, com frutos do tipo bacáceo ou núcula. O gênero *Cassytha* mostra-se uma exceção, visto que é composto por espécies trepadeiras parasitas e sem folhas. A plantas da família Lauraceae são frequentemente utilizadas na indústria madeireira, no setor de perfumaria, cosmetologia e na indústria farmacêutica (SANTOS e ALVES, 2013; MORAES, 2005). Muitas espécies de plantas pertencentes a esta família mostraram ser ricas em alcalóides e lignanas bioativas, assim como flavonóides e terpenóides (LENTA et al, 2015).

2.1.3 GÊNERO CASSYTHA L.

O gênero *Cassytha* (*gr.* - '*cuscuta*') é caracterizado por plantas trepadeiras perenes parasitas e sem folhas (AMBI et al, 2017). A região formadora de haustório está localizada no caule, de forma que as mudas desenvolvem raízes, que captam água e nutrientes do solo, sustentando a planta por mais de um mês antes de parasitar. Se desenvolvem geralmente em praias de regiões tropicais e subtropicais, mas também estão presentes em campos. Parasitam árvores com caules altamente lignificados (FURUHASHI et al, 2016, NELSON, 2008).

Este gênero contém cerca de 20 espécies cosmopolitas e já foram identificados inúmeros componentes químicos, como alcaloides aporfínicos (actinodafininas, isoboldina, cassameridina, cassamedina e lisicamina), e flavonoides, como leucoantocianidinas (MURAI et al, 2008; WU et al, 1997).

2.1.4 ESPÉCIE *CASSYTHA FILIFORMIS* L.

Trata-se de uma das principais espécies do gênero *Cassytha*, sendo cosmopolita e amplamente distribuída na América do Sul, presente na Amazônia, Mata Atlântica e Matas Ciliares do Cerrado. Popularmente é conhecida como cipó-chumbo, cordão-de-ouro e erva-de-chumbo. Estabelece relação de parasitismo com plantas *Acácia*, *Azadirachta* e *Mangifera indica* (Figura 1), além de herbáceas, ervas daninhas, arbustos pequenos e árvores baixas (EDEWOR et al, 2016; SANTOS e ALVES, 2013).



Figura 1. Relação de parasitismo da espécie *Cassytha filiformis* com *Mangifera indica* (Fonte: Nelson, 2008).

É caracterizada por apresentar troncos semelhantes a um fio, caule verde alaranjado, folhas reduzidas e dispostas em espiral, glabras e pubescentes, inflorescência reduzida, frutas bagas, pretas e arredondas, sendo a floração e frutificação encontradas durante todo o ano. Quanto aos seus constituintes fitoquímicos, estudos demonstraram a presença de fenóis, alcaloides e flavonoides. No Brasil foram identificados treze alcaloides. Em Taiwan, foram identificados alcaloides aporfínicos como catafilina, cataformina, actinodafinina, N-metil-actinodafinina, predicentrina e ocoteína (MYTHILI et al, 2011, NELSON, 2008).

Inserida na cultura medicinal popular, esta espécie apresenta grande diversidade de indicações terapêuticas, como vermífuga; supressão da lactação (AMBI et al, 2017); tratamento de doenças renais, incluindo infecções do trato urinário e como diurético; tratamento de gonorreia e malária (EDEWOR et al, 2016; WU et al, 1997). Na Nigéria, também é utilizado no tratamento da diabetes, úlceras e hemorroidas (BABAYI et al, 2007). Segundo Govardhan et al (2011) também é utilizada como indutor da menstruação nas Ilhas Fiji, e na Micronésia o caule da planta é empregado para tratar a queimadura de água viva.

Durante a investigação destas alegações foram verificadas ações antitumorais e citotóxicas (STEVIGNY et al, 2002; HOET et al, 2004), também como antiagregante

plaquetário e vasorelaxante (MYTHILI et al, 2011; RAJ et al, 2013; SHARMA et al, 2010; TSAI et al, 2008; CHANG et al, 1997).

Entre outras propriedades farmacológicas comprovadas, destacam-se atividades antioxidante (MYTHILI et al, 2011), hepatoprotetor (RAJ et al, 2013), antiepilético (GOVARDHAN et al, 2011), anti-hipertensivo (YORI YULIANDRA e ARMENIA, 2017), diurético (SHARMA et al, 2009) além de bloqueador alfa adrenérgico (CHANG et al, 1997).

Ademais, a espécie também é explorada nas indústrias de tinturas para a produção de corantes, devido ao pigmento que dá coloração característica ao seu caule (AMBI et al, 2017).

2.2 Toxicidade de Produtos Naturais

O uso de produtos naturais no tratamento de diversas doenças aumentou significativamente nas últimas três décadas e é descrito que até 80% da população mundial, geralmente de países em desenvolvimento, dependem da medicina tradicional para cuidados primários de atenção à saúde, segundo Ekor (2014). Diversos fatores podem ser responsáveis por este dado, como alto custo e elevada incidência de reações adversas dos medicamentos industrializados e alegação da eficácia dos produtos naturais (AOUACHRIA et al, 2017). Além disto, por serem baseados em uso de geração em geração, geralmente os fitoterápicos são considerados como seguros ou de baixa toxicidade (UGWAH-OGUEJIOFOR et al, 2019).

Apesar disto, é um equívoco categorizar os fitoterápicos como seguros, apenas por serem derivado de produtos naturais. Paracelso, médico e alquimista dos anos 1500 é o dono da frase que revolucionou a história da medicina e toxicologia: “Todas as substâncias são venenos, não existe nada que não seja veneno. Somente a dose correta diferencia o veneno do remédio” (SALEEM et al, 2017).

As plantas, assim como medicamentos industrializados, podem apresentar o mesmo potencial de causar reações adversas prejudiciais. Ressaltando então, a importância dos estudos toxicológicos para avaliar a segurança advindas do uso de possíveis candidatos à fármaco (MENEGATI et al, 2016).

Diante disto, estudos foram realizados a fim de verificar a segurança de extratos do gênero *Cassytha* e segundo Babayi e colaboradores (2007) quando administrado nas doses terapêuticas normais, o extrato aquoso não causou efeitos tóxicos graves nos parâmetros hematológicos, bioquímicos e relacionado ao peso dos órgãos.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) e Food and Drug Administration (FDA), essa validação da eficácia e segurança se dá através de estudos de base científica, categorizados em diversas classes (SALEEM et al, 2017). De acordo com os órgãos regulamentadores como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), para caracterizar o perfil toxicológico de qualquer substância é necessário seguir o Guia para a Condução de Estudos Não Clínicos de Toxicologia e Segurança Farmacológica Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos, sendo este guia baseado em documentos de agências regulamentadoras como FDA e instituições como Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD).

Segundo a OECD 425, é preconizado o uso de ratos fêmeas, por serem mais sensíveis, estas devem estar na idade de adultos jovens (entre 8 e 12 semanas) e devem ser nulíparas e não grávidas.

2.3 Dor

A dor, segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (*International Association for Study of Pain – IASP*), é definida como “uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada a um dano tecidual real ou potencial ou descrita como se o dano estivesse presente”. Ela atinge cerca de 30% da população brasileira, ou seja, a todo o momento esta faixa percentual tem sua capacidade laboral e/ou qualidade de vida prejudicada pela incidência de processos álgicos. Por ser de natureza extremamente subjetiva e englobar componentes sensoriais, emocionais, cognitivos e sociais, possui difícil definição (ELLISON, 2017; BOLL et al, 2017).

O processo pelo qual a dor se torna uma experiência consciente é denominado nocicepção, sendo definido como “o processo neural de codificação de estímulos nocivos”, ou ainda, o mecanismo responsável pela codificação e processamento dos

eventos neurais provocados pelos estímulos nocivos detectados na periferia (YEZIERSK e HANSSON, 2017). Desta forma, as terminação nervosas livres especializadas na percepção destes estímulos são chamados de nociceptores. São eles um subconjunto altamente especializado de neurônios sensoriais primários que respondem apenas a estímulos de lesivos e os converte em impulsos nervosos, que o Sistema Nervoso Central (SNC) interpreta elaborando a sensação de dor (ELLISON, 2017).

As fibras nervosas nociceptoras são classificadas como mielinizadas (A δ) ou não-mielinizadas (fibras C), ou ainda de acordo com tipo de estimulação a que são sensíveis, podendo ser química, mecânica ou térmica (LACAGNINA et al, 2017; SNEDDON, 2017).

Para dar origem a experiência da dor, é necessário um circuito complexo de processamento de informações, sendo dividido em quatro fases: transdução, transmissão, percepção e modulação (KHALID e TUBBS, 2017).

A transdução é a conversão de um estímulo nocivo em atividade elétrica nos terminais periféricos de fibras sensoriais nociceptoras. A segunda fase, transmissão, é a passagem de potenciais de ação do terminal periférico ao longo do axônio, para as terminações centrais dos nociceptores no SNC. A terceira fase, designada percepção, refere-se à “decodificação/interpretação” da entrada aferente no cérebro, que dá origem à experiência sensorial específica de cada indivíduo. Essa percepção é muito variável, pois pode ser influenciada por vários fatores, como genética, cultura, idade, gênero, estado de saúde, entre outros. A quarta e última fase da nocicepção é a modulação, que é a alteração (aumento ou supressão) da entrada sensorial. Esta modulação dos estímulos de dor antes de sua percepção é de acordo com a inibição ou aumento através das influências supra espinhais, decorrentes da medula e do mesencéfalo (ELLISON, 2017).

De acordo com seus mecanismos fisiopatológicos, a dor pode ser classificada como nociceptiva, neuropática ou inflamatória. A dor nociceptiva se origina da ativação aguda de fibras nervosas primárias nociceptivas, incluindo dor somática e visceral. Possui papel iminentemente fisiológico, na proteção contra o dano de tecidos (ZEILHOFER, 2007).

A dor neuropática é causada por uma lesão ou doença no sistema somatossensorial e leva a mudanças em longo prazo nas estruturas da via da dor e processamento anormal das informações sensoriais, causando amplificação da dor

mesmo sem estimulação por lesão ou inflamação, chamado de dor espontânea, caracterizada por ser a forma de dor de mais difícil tratamento. A dor neuropática pode ainda ser subdividida em dor simpaticamente mediada, central ou periférica (ELLISON, 2017; ZEILHOFER, 2007).

A dor inflamatória, por sua vez, é originária de todas as formas de inflamação e geralmente ocorre após danos nos tecidos e infiltração de células imunes no local da lesão. As dores neuropáticas e inflamatórias podem ultrapassar a causa primária de dor, se transformando em crônica e fazendo então com que ocorram mudanças plásticas no processamento nociceptivos, não sendo mais facilmente reversíveis com tratamento farmacológico (ELLISON, 2017; SEGAL et al, 2017).

2.4 Inflamação

A inflamação é uma resposta imune do organismo a agressões, como lesões teciduais, infecções bacterianas ou virais, exposição à alérgenos, radiação, produtos químicos tóxicos, doenças autoimunes, obesidade, consumo de álcool, tabaco ou dieta hipercalórica (REUTER et al, 2010). Seu mecanismo tem por objetivo eliminar o agente lesivo e garantir a manutenção da homeostase no corpo, através de eventos vasculares, celulares e linfáticos. As fases de indução e resolução da resposta inflamatória são altamente dependentes de mudanças funcionais e estruturais na microcirculação (KVIETYZ e GRANGER, 2012).

A inflamação pode ser induzida por agentes exógenos microbianos, como os padrões moleculares associados aos patógenos (PAMPs) e fatores de virulência, ou não-microbianos, como alérgenos, irritantes, corpos estranhos e compostos tóxicos. Agentes endógenos, como sinalizadores produzidos por estresse e tecidos danificados, também podem desencadeá-la (MEDZHITOV, 2008).

De acordo com a velocidade de instalação e duração, o processo inflamatório pode ser classificado como agudo ou crônico. Na resposta de fase aguda, que persiste apenas por um curto período, está geralmente relacionada com a resposta imune, cicatrização de feridas e reparo tecidual, que ocorrem logo após a agressão. Seu desencadeamento é iniciado pela ativação do sistema imunitário, que eleva o fluxo

sanguíneo e a permeabilidade vascular, com recrutamento de leucócitos para o foco da lesão e liberação de mediadores inflamatórios. Quando bem-sucedida, a inflamação aguda promove a eliminação do patógeno, dando lugar ao processo de resolução e reparo, mediado principalmente por macrófagos residentes de tecidos e recrutados, sendo em geral benéfico para o hospedeiro (MEDZHITOV, 2008; REUTER et al, 2010; ROSS, 2017).

Alternativamente, a inflamação pode evoluir para uma fase crônica, caracterizada pelo desenvolvimento da resposta humoral específica e da resposta imune celular. Sua persistência por longos períodos pode predispor o organismo a doenças crônicas, incluindo o câncer, artrite, diabetes, doenças cardiovasculares e neurológicas (KUNNUMAKKARA et al, 2018).

Tais consequências têm sido relacionadas a desregulação de importantes vias de sinalização, como a do fator de transcrição nuclear Kappa-B (NK-kB) e do sinal de transdução e ativação de transcrição 3 (STAT 3). Como consequência podem ocorrer danos teciduais, em longo prazo, ligados a eventos de hipóxia, morte celular, necrose, autofagia, entre outros (KUNNUMAKKARA et al, 2018).

Tanto na resposta de fase aguda quanto na crônica, mediadores inflamatórios agem de maneira local ou sistêmica, ativando outras células envolvidas com o processo inflamatório (células endoteliais, fibroblastos e células do sistema fagocítico mononuclear), ampliando, assim, a resposta inicial ao agente lesivo (KHOVIDHUNKIT et al, 2004; KUMAR, 2004).

2.4.1 MECANISMOS DA INFLAMAÇÃO

A partir da agressão tecidual, tem início a produção local de mediadores inflamatórios, os quais promovem aumento da permeabilidade capilar e quimiotaxia, atraindo células de defesa (polimorfonucleares, neutrófilos e macrófagos) para o foco da lesão. Estas células, por sua vez, realizam a fagocitose dos elementos que estão na origem da inflamação e produzem mais mediadores químicos, dentre os quais estão as citocinas, como o fator de necrose tumoral α (TNF- α), as interleucinas, quimiocinas, bradicinina, prostaglandinas e leucotrienos. Como consequência de suas atuações são produzidos os sinais cardinais da inflamação, designados como dor, calor, rubor, edema e perda de função (MEDZHITOV, 2010; ROSS, 2017).

Apesar de a resposta inflamatória ser um processo normal e necessário, na presença de uma infecção, dano ou estresse celular. Por outro lado, pode ser inadequado, patológica e prejudicial quando se torna prolongada e sem regulação, quando reage desproporcionalmente a um determinado estímulo ou quando reage a estímulos errados, causando assim, efeitos indesejáveis. A inflamação pode causar também potenciais efeitos deletérios, independentemente da adequação da resposta, como alterações no humor, no sono, na energia, na cognição e na motivação (ROSENBLAT et al, 2014; MILLER et al, 2009).

O processo inflamatório envolve componentes inatos e adaptativos. O componente inato é ativado pelas PAMPs, componentes relacionados a sobrevivência e patogenicidade de microrganismos. As PAMPs são reconhecidas pelos receptores *Toll-like*, que são expressos na superfície das células apresentadoras de antígeno (APC), células dendríticas e macrófagos. A interação *Toll-like* com PAMPs ativa a produção e liberação de mediadores pró-inflamatórios, como histamina, bradicinina, prostaglandina, serotonina e leucotrienos. Estes fatores químicos produzem a resposta inflamatória local e atraem macrófagos, que liberam citocinas, tais como TNF- α , IL-1 e IL-6, promovendo aumento da permeabilidade vascular, exsudação para o espaço extravascular, que leva a produção de mais mediadores inflamatórios, para prolongar ainda mais a resposta inflamatória sistêmica e iniciar a resposta imune adquirida, através da atração de leucócitos e linfócitos (ROSENBLAT et al, 2014).

A resposta imune adaptativa serve para criar e manter a memória do sistema imunitário, e é altamente específica contra o patógeno invasor. Os linfócitos T produzem a resposta celular que tem um efeito tóxico direto sobre as células identificadas como potencialmente prejudiciais, como por exemplo, os patógenos e células cancerígenas. Além também de manter ainda mais a resposta imunitária através da liberação de citocinas, principalmente, IL-2, para atrair mais macrófagos, neutrófilos e linfócitos. Os linfócitos B são atraídos e estimulados por estas citocinas para induzir uma resposta humoral em que os anticorpos são produzidos contra o agente patogénico identificado (ROSENBLAT et al, 2014; VEZZANI et al, 2010).

Em contextos em que o agente agressor não é eliminado ou não se consegue reestabelecer a homeostasia, o processo inflamatório acaba por adquirir conotação prejudicial, envolvendo leucocitose e hiperprodução de mediadores humorais (MEDZHITOV, 2010). Nestes casos, para promover o estabelecimento da homeostase, muitas das vezes é necessária a intervenção farmacológica.

Dependendo da origem e da gravidade do processo inflamatório, podem ser usados fármacos anti-inflamatórios esteroidais e/ou fármacos anti-inflamatórios não esteroidais (SHARMA, 2013).

2.5 Anti-inflamatórios não esteroidais (AINES)

Os AINES têm como função comum a inibição da ciclo-oxigenase (COX), impedindo a conversão dos fosfolipídios de membrana em ácido araquidônico. Tanto a COX-1 como a COX-2 formam um endoperóxido de prostaglandina instável, a Prostaglandina H₂ (PGH₂), a partir do ácido araquidônico. A PGH₂ é transformada por várias enzimas e também por mecanismos não enzimáticos em tromboxano e nas séries de prostaglandinas D, E, F e I, que são compostos coletivamente conhecidos como prostanoides. A COX é, portanto, responsável pelos dois primeiros passos na síntese de prostanoides, e as etapas posteriores são dependentes de enzimas tecido-específica. Os prostanoides são importantes mediadores inflamatórios, destacando-se as Prostaglandinas E₂ (PGE₂) e a Prostaciclina (PGI₂), por se apresentarem como potentes agentes vasodilatadores além de potencializarem o aumento de permeabilidade induzido por mediadores como bradicinina e histamina. Além disso, por essa potencialização do efeito da bradicinina e da histamina, essas prostaglandinas também estão envolvidas na hiperalgesia. Os prostanoides exercem seus efeitos por meio de receptores acoplados a proteína G, ativando diferentes vias de sinalização intracelular (MENDES et al, 2012).

A COX tem duas isoformas, a COX-1, expressa constitutivamente sob uma condição fisiológica normal, e a COX-2, que é geralmente induzida sob um estado inflamatório. Os inibidores da COX-2 incluem o rofecoxibe, celecoxibe, valdecoxibe, parecoxibe, etoricoxibe e lumaricoxibe. Os AINES que inibem tanto a COX-1 quanto a COX-2 são conhecidos como não seletivos e tem como exemplo o diclofenaco, naproxeno, ibuprofeno, indometacina e piroxicam (PIRLAMARLA e BOND, 2016). Os AINES representam uma das classes de maior diversidade de fármacos clinicamente disponíveis no Brasil. São amplamente utilizados por suas propriedades analgésica, antipirética e anti-inflamatória para tratar doenças inflamatórias e degenerativas crônicas (MENDES et al, 2012; HARIRFOROOSH et al, 2013). Apesar disto,

diferentes mecanismos já foram envolvidos em suas atividades, como o sistema opióide e a via NO/cGMP/kATP podem estar envolvidos (SILVA et al, 2016).

Os inibidores de COX-2 são altamente específicos para enzima COX-2, preservando assim a propriedade anti-inflamatória, enquanto teoricamente reduz o efeito adverso relacionado à inibição da isoforma COX-1. Portanto, o uso de inibidores da COX-2 está associado com uma menor incidência de complicações associadas com a inibição da COX-1, tais como úlcera péptica e hemorragia gastrointestinal (VONKEMAN et al, 2010; HARIRFOROOSH et al, 2013).

Por outro lado, o uso desses fármacos pode aumentar o risco de efeitos adversos cardiovasculares, pela exacerbação da produção de tromboxano A2 (UNGPRASERT et al, 2015). Teoricamente, os AINES não-seletivos são os mais seguros, pois há menos seletividade para a COX-2, no entanto, esses AINES, em particular o diclofenaco, ainda parecem conferir risco cardíaco significativo. Atualmente, estudos sugerem que o naproxeno pode ser o único AINE seguro para o uso na maioria da população, no entanto, seu mecanismo ainda não é claro, porém sugere-se que seja pela capacidade de causar supressão completa da síntese de tromboxano das plaquetas (PIRLAMARLA e BOND, 2016).

Os AINES estão disponíveis em apresentações para administração oral, intramuscular, oftálmica e tópica. A formulação tópica pode proporcionar alívio eficaz em articulações superficiais, como mãos e joelhos e podem reduzir a exposição sistêmica quando comparado com formulações orais. A forma intramuscular pode oferecer uma via alternativa de administração em pacientes incapazes de tolerar AINES orais, porém há uma falta de dados sugerindo qualquer vantagem clínica adicional para a administração intramuscular (BARKIN et al, 2010).

O uso dos AINES, no entanto, é limitado por suas reações adversas, como riscos gastrintestinais, cardiovascular, renal, hematológico e hepático. O risco de eventos adversos com os AINES é uma preocupação séria, principalmente nos idosos. A prevalência de úlceras pépticas, doenças renais e doenças cardiovasculares aumentam com a idade e pacientes idosos tem um risco muito maior de mortalidade do que pacientes mais jovens (UNGPRASERT et al, 2015; HARIRFOROOSH et al, 2013; MENDES et al, 2012; BARKIN et al, 2010).

Diante desta limitação ao uso de AINES por conta da incidência de reações adversas, houve a necessidade da busca por novas alternativas de fármacos mais seguros, destacando-se então, os produtos naturais.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a toxicidade oral aguda de um extrato etanólico de *Cassytha filiformis* L. (Cas01) e suas ações sobre o processo de nocicepção e inflamação.

3.2 Objetivos específicos

- Estimar o nível de letalidade do extrato quando administrado agudamente por via oral em ratos;
- Investigar manifestações comportamentais de toxicidade;
- Avaliar os efeitos do extrato sobre os padrões hematológicos;
- Avaliar os efeitos do extrato sobre as características macroscópicas de órgãos de alta perfusão;
- Investigar os efeitos do extrato sobre processos nociceptivos e inflamatórios.

4 METODOLOGIA

4.1 Fitoquímica

4.1.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

O material vegetal (planta integral) foi coletado em 30 de agosto de 2016, no município de Marapanim, no estado do Pará, pela equipe do Laboratório de Bromatologia da Universidade Federal do Pará (UFPA). A identificação botânica da espécie foi realizada por especialista do Herbário do Museu Paraense Emílio Goeldi e comparada a uma exsicata depositada no herbário da instituição (Registro: MG n° 171757).

4.1.2 SECAGEM E PROCESSAMENTO DO MATERIAL VEGETAL

O material coletado foi submetido à lavagem em água corrente a fim de retirar as impurezas. Posteriormente o material foi seco à temperatura ambiente durante 24 horas, e em seguida levado para a estufa de circulação de ar ($t=45\text{ }^{\circ}\text{C}$) durante cinco dias. Após a secagem, o material foi triturado em moinho de martelos e facas.

4.1.3 OBTENÇÃO DO EXTRATO

O material pulverizado foi submetido à maceração em etanol à temperatura ambiente por três semanas. A cada semana o material foi filtrado e o resíduo remacerado. A solução resultante foi concentrada sob vácuo em evaporadores rotativos, a fim de separar o extrato do solvente.

4.2 Animais de Experimentação

O projeto aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Animais de Experimentação (CEPAE) da UFPA, sob o número 1050140817 (Anexo A), obedecendo-se aos critérios de Guias de Cuidado e Uso de Animais Laboratoriais (HUBRECHT e KIRKWOOD, 2010). Os experimentos foram realizados no Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Comportamento da Faculdade de Farmácia da UFPA.

Foram utilizadas fêmeas das espécies *Rattus norvegicus* (Wistar; n = 10), com massa corporal de 150-200 g, e machos da espécie *Mus musculus* (Swiss; n= 48), com massa corporal de 25-35 g, sendo todos animais adultos (8-12 semanas). Os animais foram cedidos pelo Instituto Evandro Chagas, sendo alocados no Biotério da Faculdade de Farmácia da UFPA. Foram mantidos em gaiolas plásticas (39x32x16 cm), com 2 ratos ou 4 camundongos por gaiola, forração de serragem, sob condições padronizadas de temperatura ($22\pm 1^{\circ}\text{C}$), exatidão e ciclo de luz claro/escuro de 12h. A alimentação e água foram disponibilizadas *ad libitum*.

Nos procedimentos que exigiram anestesia, foi administrado por via intraperitoneal (i.p) cetamina + xilazina nas doses de 91 mg/kg + 9,1 mg/kg para ratos e 87,5 mg/kg + 12,5 mg/kg para camundongos, de acordo com o protocolo do Centro Cornell de Recursos Animais e Educação.

4.3 Avaliação da Toxicidade Oral Aguda

Seguindo os protocolos propostos pela diretriz 425 da OECD e a Resolução nº 90 da ANVISA, foram utilizadas ratas (Wistar) fêmeas, não-isogênicas, nulíparas, com peso médio de 180 g. A espécie *Rattus norvegicus* foi escolhida para garantir a obtenção das quantidades de tecidos (2,5ml de sangue e órgãos), sendo esse volume necessário para a realização de diversos testes, com o menor número de animais possível.

4.3.1 TRATAMENTO

Os animais foram submetidos a jejum prévio de 6h, sendo levados ao local de realização do teste com antecedência mínima de 1 h para ambientação.

Os mesmos foram divididos em dois grupos, a saber:

- Grupo TESTE (n = 5) – tratado com 2.000 mg/kg de Cas01;
- Grupo CONTROLE (n = 5) – tratado com o veículo de dissolução da droga teste (Salina + Dimetilsulfóxido (DMSO) 2%).

Os tratamentos foram administrados por via oral (v.o.) com o uso de cânula orogástrica, obedecendo-se um volume máximo de 0,1 mL/100 g de massa corpórea.

4.3.2 AVALIAÇÃO HIPOCRÁTICA

Nas primeiras 4 horas após a administração dos grupos e no biotério, uma vez ao dia durante 14 dias, foram avaliadas alterações comportamentais como agressividade, apatia, ataxia, atenção, convulsões, desorientação, força ao agarrar, frêmito vocal, lacrimação, locomoção, piloereção, respiração, resposta ao toque, tremores, além de cianose, defecação, micção, secreção nasal, sudorese e também ocorrência de óbitos (MALONE, 1977).

4.3.3 TESTE DA ATIVIDADE LOCOMOTORA ESPONTÂNEA (CAMPO ABERTO)

O teste do Open Field é amplamente utilizado para avaliar locomoção, exploração e comportamento do tipo ansioso, através da atividade locomotora espontânea (WALSH e CUMMINS, 1976). O aparato consiste de uma arena preta de 100 x 100 cm x 40 cm (Largura x Profundidade x Altura), sendo o fundo do aparato dividido em 25 quadrantes virtuais de 20 x 20 cm pelo software de análise de vídeo Any-maze™, versão 4.99 (Stoelting Co., USA).

Uma hora após a administração, os animais foram colocados no centro da arena, permitindo exploração livre durante 5 minutos. Com intuito de avaliar a atividade locomotora, foi contabilizado o número de levantamentos exploratórios, chamado de rearing (exploração vertical), distância total percorrida (exploração horizontal), tempo na periferia e distância percorrida na periferia (BAHI, 2013; ACEVEDO et al, 2014).

4.3.4 ACOMPANHAMENTO DIÁRIO

Após a avaliação hipocrática inicial, os animais retornaram para o biotério, sendo monitorados durante 14 dias. Neste período foram avaliadas diariamente a ocorrência de alterações comportamentais e a incidência de óbitos, de acordo com o descrito no item 4.3.2.

Além disto, os animais foram pesados em balança semianalítica (Prix/9094 Plus) 1 hora antes do tratamento inicial e tiveram seu peso verificado diariamente, a fim de registrar o ganho ponderal, definido como a diferença entre o peso do dia e o peso inicial ($\text{Ganho} = P_x - P_i$). Adicionalmente foram registrados o consumo de rações (g) e o volume de água consumido (mL) a cada 24 h.

4.3.5 COLETA DE TECIDOS

No 14º dia pós-tratamento os animais sobreviventes foram anestesiados e eutanasiados por deslocamento cervical. A partir de então procedeu-se a coleta de órgãos vitais (coração, estômago, rins e fígado), para avaliação macroscópica e histopatológica, e sangue, por punção cardíaca, para análise hematológica.

4.3.6 AVALIAÇÃO MACROSCÓPICA E HISTOPATOLÓGICA DOS ÓRGÃOS

Logo após a coleta, os órgãos foram pesados em balança analítica (Bioprecisa/FA-2104N) para o cálculo de seus respectivos pesos relativos (Pr), definido como a razão entre a massa do órgão (M_o) e a massa corpórea do animal (M_a) ($Pr = M_o/M_a$).

Em seguida os órgãos foram submetidos a desidratação em séries crescentes de etanol (70-100%), diafanização em xilol e, finalmente, inclusão em parafina. A partir dos blocos de inclusão foram obtidas secções de 5 μ m, em micrótomo convencional. Todas as secções foram montadas diretamente em lâminas histológicas durante a microtomia, e posteriormente coradas com hematoxilina e eosina para avaliação histopatológica em microscópico óptico (MARTEY et al, 2010).

A avaliação histopatológica, foi realizada no Laboratório de Patologia da Universidade Federal Rural da Amazônia (LABOPAT- UFRA), sob supervisão do Prof. Dr. Washington Luiz Assunção Pereira.

4.3.7 AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA

O sangue foi coletado para realização da avaliação hematológica (hemograma) e contagem de células diferenciais. Para o hemograma, o sangue foi coletado em tubo contendo EDTA e a análise realizada no aparelho Hematoclin 2.8 VET (Bioclin®), onde foram analisados parâmetros como glóbulos brancos, glóbulos vermelhos e plaquetas. Para a contagem diferencial de células, foi realizado a extensão sanguínea, a lâmina foi corada com corante de Leishman e lida em microscópio óptico, na objetiva de 100.

4.4 Avaliação da Atividade Antinociceptiva

4.4.1 CONTORÇÕES ABDOMINAIS INDUZIDAS POR ÁCIDO ACÉTICO

O modelo proposto por Koster et al (1959) apresenta elevada sensibilidade para a avaliação de drogas com atividade antinociceptiva. Para isto, foram utilizados

camundongos machos (Swiss; n = 6/grupo). Inicialmente os animais, em jejum prévio de 6 h, foram divididos em grupos de acordo com o tratamento, como descrito abaixo (Quadro 1).

Quadro 1 – Divisão dos grupos para o teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético

GRUPO	TRATAMENTO
CONTROLE	Tratados com o veículo de dissolução da droga teste.
CAS01 – DOSE1	Tratados com Cas01 - dose correspondente a 10% da DL ₅₀ estimada
CAS01 – DOSE2	Tratados com Cas01 - dose correspondente a 20% da DL ₅₀ estimada
CAS01 – DOSE3	Tratados com Cas01 - dose correspondente a 40% da DL ₅₀ estimada
PADRÃO	Tratados com o padrão farmacológico – Indometacina 10 mg/kg

Os animais foram então tratados por v.o. de acordo com os grupos e após 60 minutos foi administrado o ácido acético (0,6%; i.p). Passados 10 minutos, os animais foram individualmente posicionados em câmara de observação e o número de contorções foi contabilizado por 20 minutos.

De acordo com o padrão de efeito observado a dose efetiva mediana (DE50) é determinada por regressão linear dos percentuais de inibição das contorções produzidas pelos grupos Cas01 em função do logaritmo da respectiva dose do extrato. A determinação da DE50 está subordinada a existência de um padrão de efeito dependente da dose.

4.4.2 ESTUDO DO MECANISMO DE AÇÃO - TESTE DA FORMALINA

De acordo com o modelo proposto por Dubuisson e Dennis (1977), camundongos machos (Swiss; n = 6/grupo) foram divididos como apresentado abaixo (Quadro 2).

Quadro 2 – Divisão dos grupos para o teste da formalina.

GRUPO	TRATAMENTO
CONTROLE	Tratados com o veículo de dissolução da droga teste.
CAS01	Tratados com a Cas01 400mg/kg
PADRÃO	Tratados com o padrão farmacológico – morfina 4 mg/kg.

Os animais foram tratados v.o. de acordo com seu grupo e, após 60 minutos, receberam 20 μ L de formalina 1%, por via intraplantar, na pata traseira direita. Foi então cronometrado o tempo que o animal passou lambendo a pata injetada. A avaliação foi feita em duas fases, a primeira compreendendo os primeiros 5 minutos (fase neurogênica) e segunda fase compreendendo o intervalo de 15-30 minutos após a injeção da formalina (fase inflamatória). O grupo controle positivo foi tratado 30 minutos antes da formalina por via subcutânea.

4.5 Análise Estatística

Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão da média (e.p.m). Inicialmente os dados foram submetidos ao teste de Kolmogorov-Sminov para verificação de sua normalidade. A comparação entre os grupos foi realizada através do teste T de Student ou Análise de Variância (ANOVA) de uma via, seguido de pós-teste de Tukey. Foram consideradas significativas as diferenças com valores de $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação da Toxicidade Oral Aguda

5.1.1 AVALIAÇÃO HIPOCRÁTICA E LETALIDADE

Diante do *screening* hipocrático aplicado, manifestações comportamentais indicativas de toxicidade como agressividade, apatia, ataxia e falta de atenção estiveram ausentes, assim como não foi observada cianose, lacrimação, piloereção, secreção nasal ou tremores. Além disto, os animais não apresentaram diarreia, hematúria, movimentos descoordenados ou dificuldade respiratória, conservando um padrão de comportamento, secreções e excreção equivalentes ao grupo controle em todo o período de avaliação.

Adicionalmente, a administração oral aguda de 2.000 mg/kg de Cas01 não promoveu nenhum óbito durante os 14 dias de avaliação.

5.1.2 ATIVIDADE LOCOMOTORA ESPONTÂNEA

A atividade locomotora dos animais foi testada no 1° e 15° dias pós-tratamento. A administração de Cas01 na dose de 2.000 mg/kg não promoveu alteração na mobilidade dos animais, visto que não mostrou diferença significativa no número de rearings (Figura 2, painel A), distância total percorrida (Figura 2, painel B), tempo na periferia (Figura 2, painel C) e distância percorrida na periferia (Figura 2, painel D), quando comparados ao grupo controle.

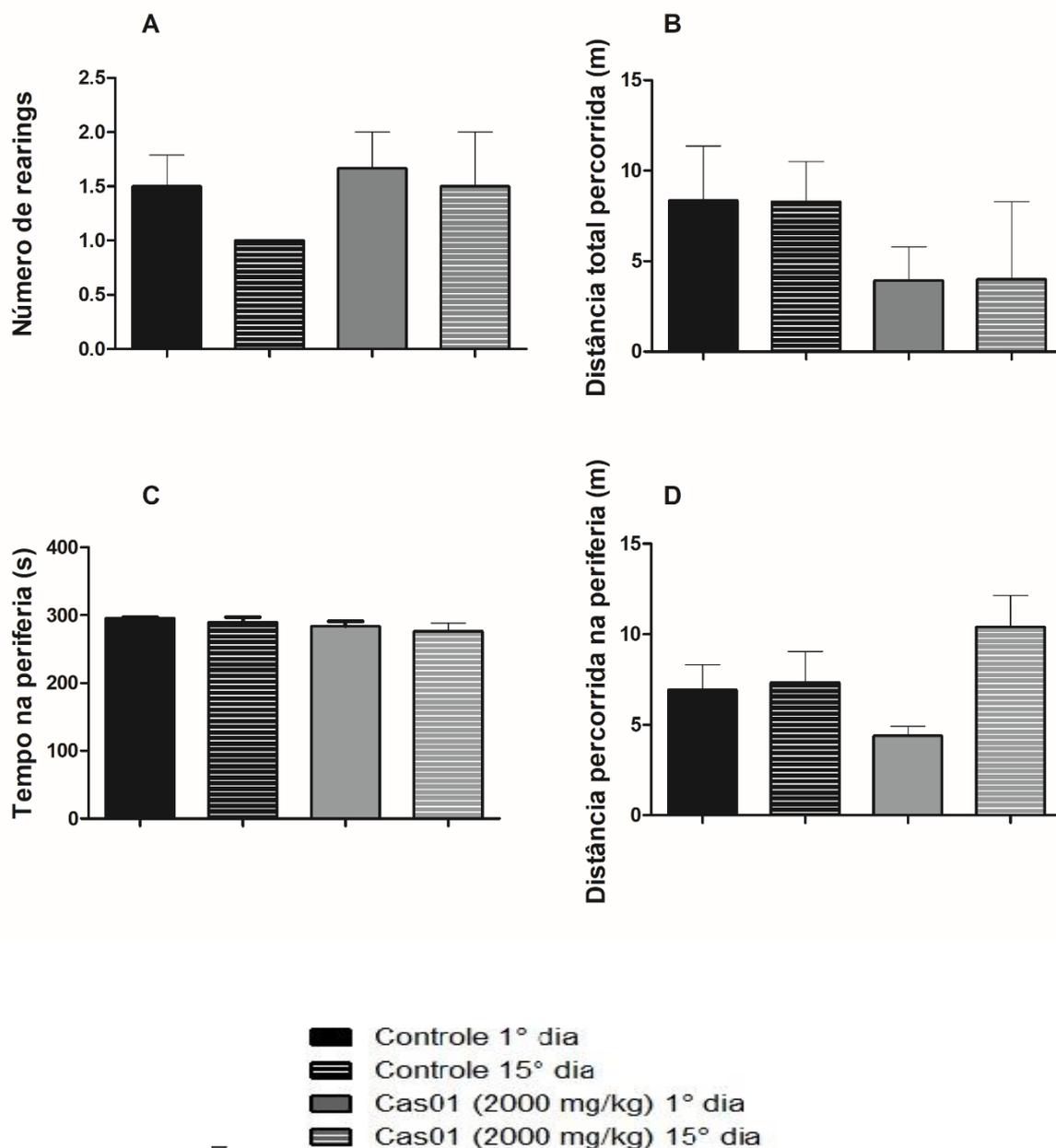
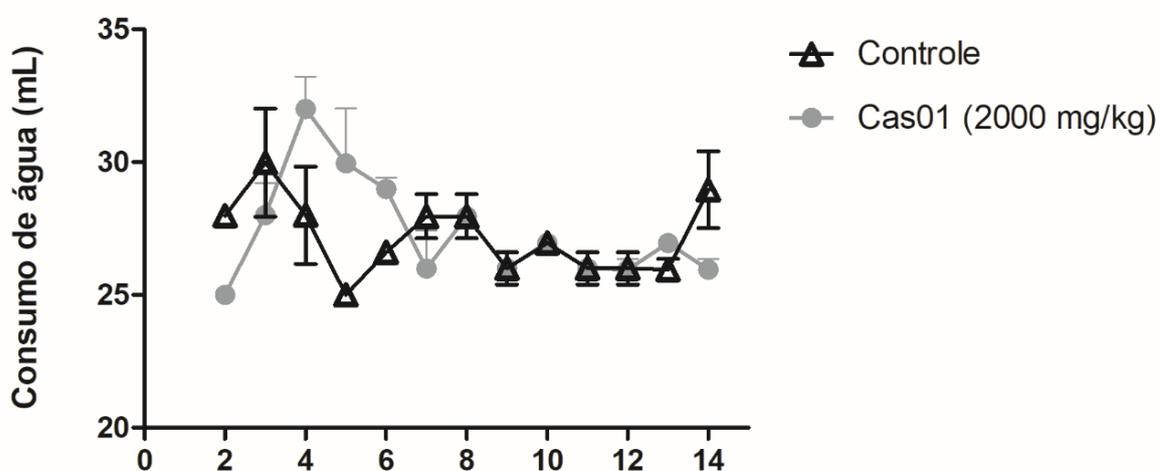


Figura 2. Efeitos da Cas01 (2.000 mg/kg) sobre a atividade locomotora espontânea de animais tratados, comparado ao grupo controle, através do parâmetro de número de rearing, distância total percorrida, tempo na periferia e distância percorrida na periferia, respectivamente, no 1^o e 15^o dia pós tratamento. Os valores representam média \pm e.p.m (n= 5). ANOVA de uma via seguido de pós – teste de Tukey.

5.1.3 CONSUMO DE ÁGUA E RAÇÃO

Durante os 14 dias de avaliação os animais tratados com Cas01 (2.000 mg/kg) mantiveram padrões de consumo alimentar e hídrico diário equivalentes aos animais controle, como mostrado na figura 3, demonstrando que o extrato não interfere neste tipo de comportamento.

A



B

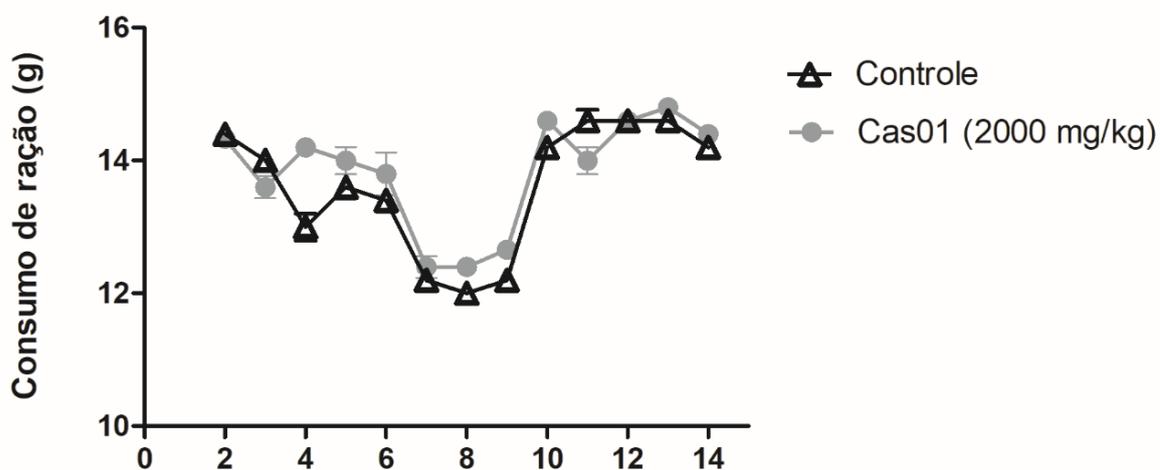


Figura 3. Efeitos do Cas01 (2.000 mg/kg) sobre o consumo de água e ração, comparado ao grupo controle. Os valores representam média \pm e.p.m (n= 5). Teste-t.

5.1.4 GANHO DE PESO PONDERAL

A avaliação diária do peso dos animais demonstrou que os animais tratados oralmente com Cas01 (2.000 mg/kg) não tiveram prejuízo nutricional, conservando um padrão de ganho ponderal equivalente ao grupo controle durante os 14 dias de estudo (Figura 4).

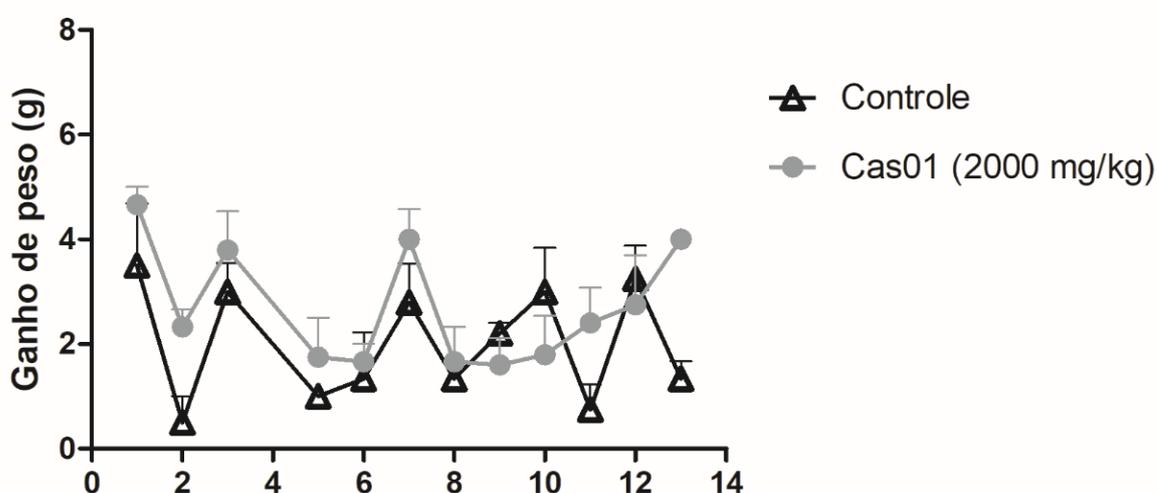


Figura 4. Efeitos do Cas01 (2.000 mg/kg) sobre o ganho de peso ponderal, comparado ao grupo controle. Os valores representam média \pm e.p.m (n= 5). Teste-t.

5.1.5 PESO RELATIVO DOS ÓRGÃOS

Foram avaliados os pesos relativos do fígado, dos rins, do estômago e do coração, verificando-se a manutenção dos aspectos macroscópicos, bem como do peso relativo dos animais tratados com 2.000 mg/kg de Cas01, quando comparados aos órgãos dos animais controle (Tabela 1).

Órgão	Controle	Cas01
Fígado	3,786 ± 0,18	3,693 ± 0,17
Rins	0,723 ± 0,03	0,692 ± 0,02
Estômago	0,769 ± 0,02	0,733 ± 0,03
Coração	0,361 ± 0,01	0,328 ± 0,01

Tabela 1 – Efeitos da Cas01 (2.000 mg/kg) sobre o peso dos órgãos, comparado ao grupo controle. Os valores representam média ± e.p.m (n= 5). Teste-t.

5.1.6 AVALIAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

O resultado da avaliação histopatológica aponta que os órgãos fígado, estômago, coração e rins dos animais do grupo tratado com o extrato não apresentaram diferença estatisticamente significativa quando comparados aos animais do grupo controle. Todos os órgãos dos animais de ambos os grupos apresentaram normalidade histológica.

5.1.7 AVALIAÇÃO HEMATOLÓGICA

Os dados obtidos a partir do sangue coletado no 14º dia pós-tratamento oral demonstram que o Cas01 (2.000 mg/kg) não promoveu prejuízos sobre a contagem de células sanguíneas, não alterando significativamente parâmetros como glóbulos brancos, glóbulos vermelhos e plaquetas. Os resultados não mostraram diferença significativa entre o grupo tratado e grupo controle (Tabela 2).

Ainda, foi realizada a contagem diferencial das células (eosinófilos, bastonetes, segmentados, linfócitos e monócitos), através da extensão sanguínea e o resultado não apontou diferença estatística entre o grupo tratado com o extrato e o grupo controle (Figura 5).

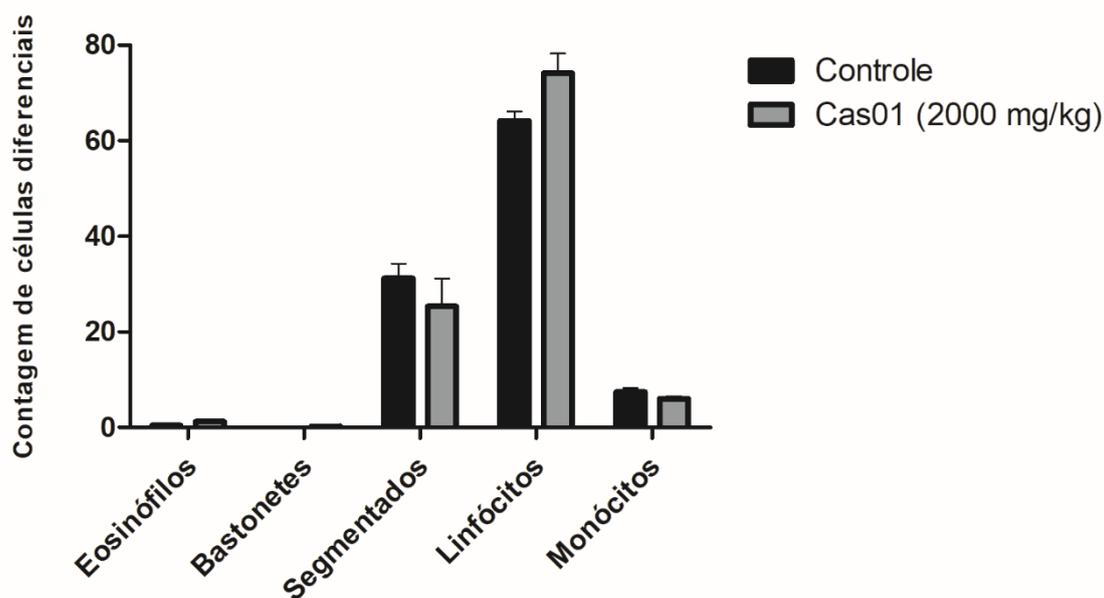


Figura 5. Efeitos da Cas01 (2.000 mg/kg) sobre a contagem de células diferenciais no sangue de animais tratados, comparado ao grupo controle. Os valores representam média \pm e.p.m (n= 5). Teste-t.

Parâmetro	Controle		Cas01	
	n	e.p.m.	n	e.p.m.
Glóbulos Brancos	4,35	0,36	3,25	0,62
Linfócitos	3,0	0,11	2,63	0,16
Monócitos	0,16	0,03	0,10	0,04
Granulócitos	1,45	0,08	1,17	0,11
Linfócitos %	62,80	1,71	64,12	4,06
Monócitos %	4,04	0,33	3,50	0,23
Granulócitos %	34,28	2,09	32,37	4,01
Glóbulos Vermelhos	7,93	0,11	9,04	0,55
Hematócrito	45,51	1,05	49,97	1,89
VCM	58,78	0,54	58,27	0,94
RDW	16,25	0,16	16,47	0,14
Plaquetas	1.121,25	71,46	1.045,0	110,49
VPM	6,16	0,27	6,02	0,25
PDW	17,15	0,181	16,97	0,13
PCT	0,45	0,08	0,60	0,05

Tabela 2 – Efeitos da Cas01 (2.000 mg/kg) sobre o hemograma, comparado ao grupo controle. Os valores representam média \pm e.p.m (n= 5). Teste-t.

5.2 Avaliação da Atividade Antinociceptiva

5.2.1 CONTORÇÕES ABDOMINAIS INDUZIDAS POR ÁCIDO ACÉTICO

O Cas01 foi testado nas doses de 200, 400 e 800 mg/kg, não sendo observada redução significativa das contorções abdominais induzidas por ácido acético ($65,50 \pm 4,31$; $51,14 \pm 4,07$; $55,00 \pm 6,77$, respectivamente), quando comparadas com o grupo controle ($65,60 \pm 3,55$). Como esperado, a Indometacina, fármaco padrão utilizado no teste, foi capaz de reduzir as contorções abdominais em 70,13% ($19,60 \pm 2,69$) em relação ao grupo controle (Figura 6).

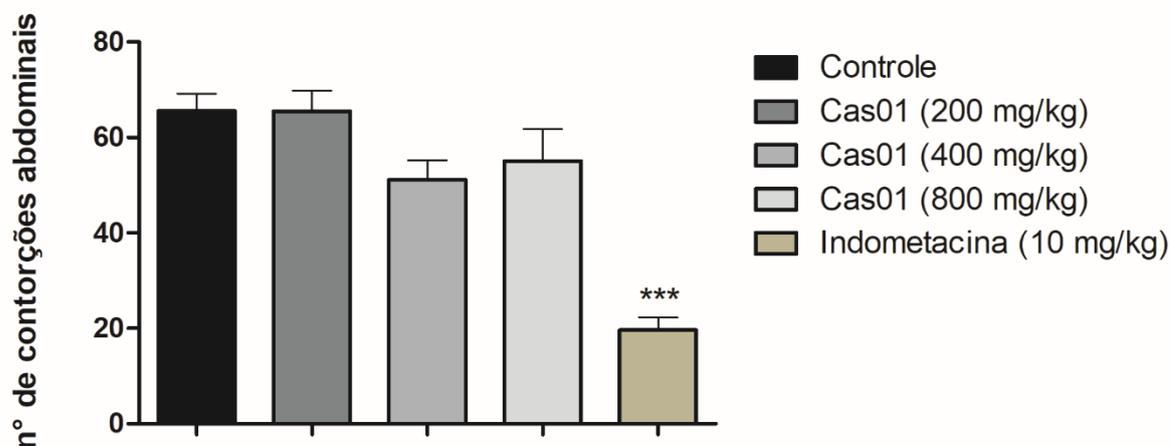


Figura 6. Efeitos da Cas01 (200, 400 e 800 mg/kg) sobre as contorções abdominais induzidas por ácido acético 0,6% (i.p), em camundongos. Os valores representam média \pm e.p.m (n=6). *** P < 0,001, quando comparado ao controle. ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey

5.2.2 TESTE DA FORMALINA

O extrato Cas01 não foi capaz de reduzir significativamente o tempo de lambida da pata, na primeira fase (nocicepção neurogênica), na dose de 400 mg/kg

(82,66±11,16), quando comparado ao grupo controle (69,00±9,10) (Figura 7, painel A).

O mesmo resultado foi observado na segunda fase do teste (nocicepção inflamatória), mostrando que Cas01 também não teve atividade (144,80±16,34), ao ser comparado ao controle (157,60±25,57). Em contrapartida, o fármaco padrão Morfina reduziu o tempo de lambida da pata em 88,70% (7,80±4,23) na primeira fase e em 98,23% (2,80±2,80) (Figura 7, painel B).

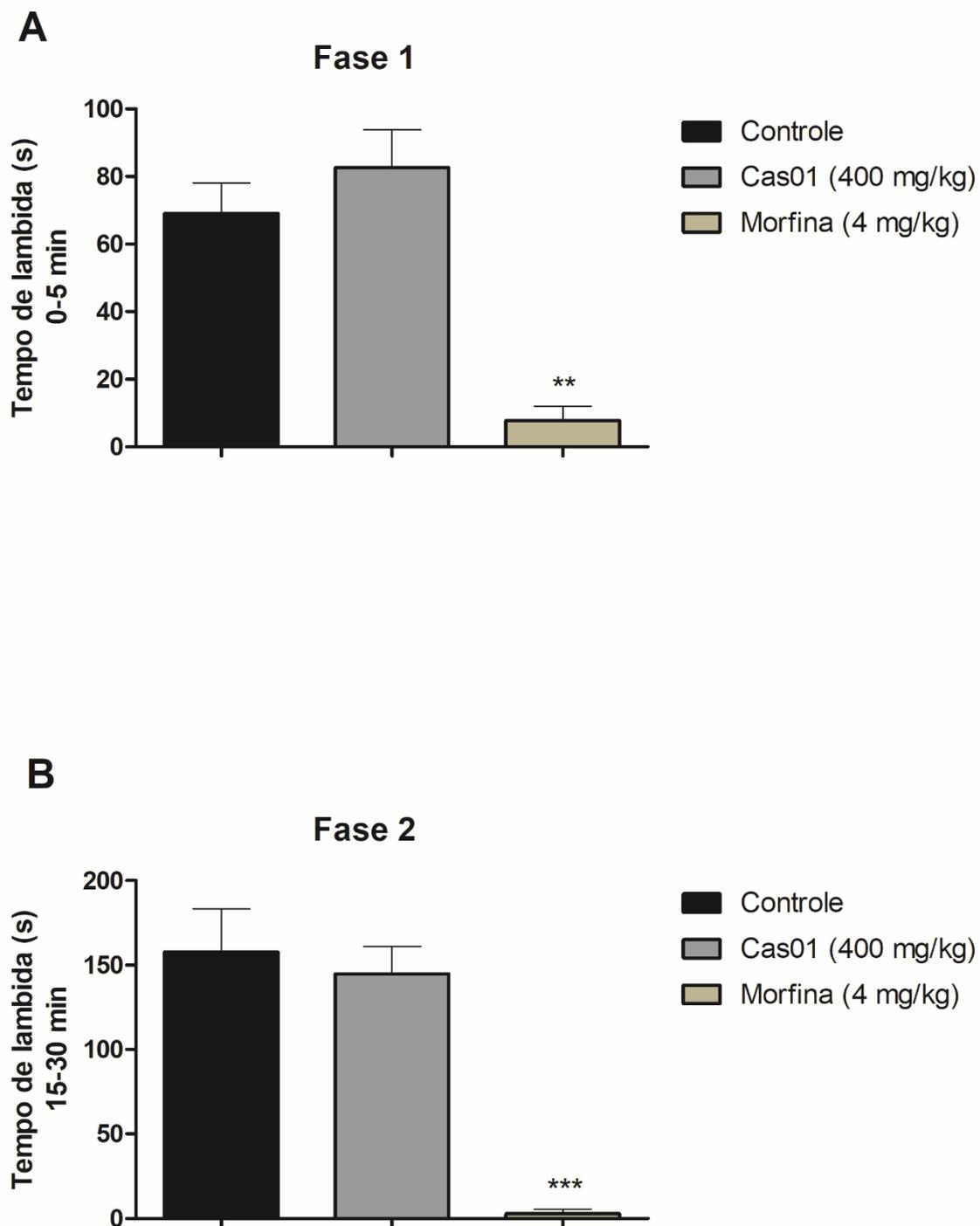


Figura 7. Efeitos da Cas01 (400 mg/kg) na primeira e segunda fase do teste de formalina, em camundongos. Os valores representam média \pm e.p.m (n=6). **P < 0.01 e *** P < 0,001, quando comparado ao controle. ANOVA, seguido de pós-teste de Tukey.

6 DISCUSSÃO

A espécie *Cassythia foliformis* é citada na literatura por apresentar inúmeras indicações terapêuticas populares, como vermífuga, tratamento de gonorreia, malária e diabetes (AMBI et al, 2017; EDEWOR et al, 2016 e BABAYI et al, 2007). Algumas de suas propriedades tem sido alvo de investigações, revelando atividade antioxidante (MYTHILI et al, 2011), citotóxica (STEVIGNY et al, 2002; HOET et al, 2004) hepatoprotetora (RAJ et al, 2013), diurética (SHARMA et al, 2010) e anti-hipertensiva (YORI YULIANDRA e ARMENIA, 2017). Atividades estas que estariam relacionadas aos alcaloides e flavonoides presentes em sua composição (MYTHILI et al, 2011; NELSON, 2008).

O presente estudo, pela primeira vez, investigou a toxicidade oral aguda do extrato etanólico de *Cassythia filiformis* L. (Cas01) e o seus efeitos sobre o processo nociceptivo e inflamatório.

A avaliação da toxicidade deve ser o primeiro passo dado no estudo de uma espécie vegetal com potencial terapêutico, dada a necessidade prioritária de se determinar a segurança da droga teste. Os resultados tóxicos de drogas em órgãos vitais do corpo são expostos claramente como sinais e sintomas clínicos, usados como indicadores de toxicidade em estudos (SALEEM et al, 2017). O Cas01, quando administrado na dose de 2.000 mg/kg em dose única por via oral, não causou morte e não promoveu manifestações clínicas características de toxicidade durante 14 dias de estudo, o extrato pode ser considerado, de acordo com a diretriz 425 da OECD, como um xenobiótico de baixa toxicidade (categoria 5).

Mudanças na ingestão de alimentos e água são amplamente utilizados como indicadores de estado geral de saúde de animais em experimentação. Diante disto, não foi observada diferença entre o consumo de água e ração entre os animais tratados e controle, mostrando que o extrato não altera o consumo hídrico e alimentar, mesmo em altas doses. Este padrão observado é reforçado pelo fato de os animais tratados com Cas01 (2.000 mg/kg) apresentarem ganho de peso equivalente aos animais controle durante os 14 dias de avaliação, com uma média de ganho de 14 g em ambos os grupos.

Quanto aos órgãos fígado, rins, coração e estômago, foram realizadas análises macroscópicas após autópsia no 14º dia pós-tratamento e não foram encontrados

sinais de dano a olho nu. Estes órgãos vitais são os principais alvos de qualquer substância tóxica. O aumento ou diminuição dos órgãos tem sido descrito como indicador sensível de toxicidade (BABAYI et al, 2007; DIOKA et al, 2002). Portanto, foi realizada a pesagem dos órgãos coletados e durante a avaliação do peso relativo, os órgãos fígado ($3,693 \pm 0,17$), rins ($0,692 \pm 0,02$), estômago ($0,733 \pm 0,03$) e coração ($0,328 \pm 0,01$) do grupo tratado não apresentaram diferença em relação aos controles ($3,786 \pm 0,18$; $0,723 \pm 0,03$; $0,769 \pm 0,02$ e $0,361 \pm 0,01$, respectivamente).

Também não foram encontradas alterações histológicas nos órgãos vitais selecionados, mesmo em altas doses, reafirmando a baixa toxicidade do extrato, uma vez que nenhum achado sugestivo de efeito tóxico foi encontrado.

A hematopoese é o processo de formação de células sanguíneas, então, sugere-se que mudanças neste processo são indicativos de alterações fisiológicas. A avaliação dos parâmetros hematológicos é importante para avaliar o estado fisiológico e patológicos dos animais. Estes são marcadores sensíveis da fisiologia em resposta a qualquer mudança, estresse ou exposição tóxica (SALEEM et al, 2017). Neste teste também não foram observadas diferenças significativas nos parâmetros hematológicos de ratos tratados com o extrato e veículo, assim como na contagem diferencial de células. Apesar de o hemograma ser um exame completo, ele é inespecífico, então, para garantir que o extrato não causa hemato, nefro e hepatotoxicidade, são necessários mais testes, como análise bioquímica de TGO, TGP, γ -GT, creatinina, uréia e fosfatase alcalina, pois estes parâmetros podem indicar dano celular em determinados órgãos.

Ainda relacionado à triagem, o *Open Field* é um teste amplamente utilizado para avaliar locomoção e exploração, através da atividade locomotora espontânea na periferia do aparato. Esta atividade, avaliada no 1° e 15° dia pós tratamento, não foi afetada pelo tratamento com 2.000 mg/kg de Cas01, visto que os grupos Cas01 e controle apresentaram comportamentos equivalentes, nos parâmetros de número de rearings (levantamentos exploratórios) e distância total percorrida. Estes parâmetros são padrão ouro na investigação da atividade locomotora espontânea de ratos. Adicionalmente, também foram analisados o tempo na periferia e distância percorrida na periferia, que é a área do aparato que o animal se sente mais seguro para deambular. Estes dados mostram que o extrato não altera a atividade locomotora de ratos tratados, mesmo em altas doses (FERNANDES et al, 2018; WALSH e CUMMINS, 1976; BAHÍ, 2013).

Em seguida, demos início aos testes farmacológicos, com o teste de contorção abdominal induzido por ácido acético, teste de triagem amplamente utilizado para avaliar possíveis efeitos sobre o processo nociceptivo e inflamação, além de identificar possíveis agentes relaxantes musculares ou anti-histamínicos. Embora a dor não possa ser medida diretamente em animais, por ser tratar de características subjetivas e envolver componentes sensoriais e emocionais, porém a nocicepção pode ser avaliada experimentalmente nessa investigação de possíveis drogas analgésicas (SANDKUHLER, 2009 e ELLISON, 2017). O ácido acético é um agente flogístico que, ao ser administrado, provoca uma resposta caracterizada pela contração dos músculos abdominais e alongamento do corpo (ZAREI et al, 2018).

Ao ser injetado, ocorre irritação e estimula a produção de ciclo-oxigenase e lipoxigenase no líquido peritoneal, desencadeando a liberação de uma gama de mediadores pró-inflamatórios, como histamina, bradicinina, serotonina, prostaglandinas (em especial PGE₂ e PGF₂ alfa), entre outros, aumentando a permeabilidade vascular e causando a ativação de neurônios nociceptivos periféricos dentro da cavidade peritoneal (ZAREI et al, 2018; JAIOS et al, 2016 e KAZARIA et al, 2016). No teste realizado com o Cas01, não foi possível observar redução do número de contorções abdominais significativa, quando comparado ao grupo controle. Tal achado é indicativo de que as propriedades terapêuticas do extrato etanólico de *Cassytha filiformis* L. não está relacionado a modulação de síntese, liberação ou ativação de receptores de mediadores pró-inflamatórios nos tecidos periféricos, excluindo-se também propriedades miorrelaxantes sobre o trato intestinal.

Com o propósito de verificar possíveis ações modulatórias sobre os processos neurais de nocicepção e inflamação, a dose que apresentou melhor desempenho no teste das contorções abdominais (400 mg/kg) foi aplicada ao teste da formalina. Este teste é dividido em duas fases, as quais envolvem dois tipos distintos de deflagração nociceptiva. A primeira fase (neurogênica) está relacionada a intensa estimulação de da formalina sobre terminais nociceptores C e A δ , refletindo a dor neuropática, caracterizada pela lesão e/ou disfunção das estruturas neurais de condução da dor. A segunda fase, por sua vez, compreende uma nocicepção de caráter inflamatório associada a liberação de substância P por parte dos neurônios nociceptivos no tecido periférico e à sensibilização de nociceptores. Está sensibilização se dá pela ação de diferentes mediadores inflamatórios, como histamina, serotonina e prostaglandina (PGE₂ e PGF₂ alfa), causando hiperalgesia e edema local, além da infiltração

excessiva e proliferação de leucócitos polimorfonucleares e eventos vasculares (RAJDEV et al, 2018 e ROSA et al, 2018).

A primeira fase é caracteristicamente inibida por drogas opióides e drogas que interfiram no processo de ativação ou condução do estímulo nociceptivo, como bloqueadores de canais de Na^+ e/ou Ca^{2+} ou ainda ativadores de canais de K^+ . A segunda fase, por sua vez, sofre interferência tanto por drogas com atividade sobre os componentes neurais quanto por fármacos de ação periférica, como os AINES, que inibem a COX e impedem a formação de prostaglandinas (RAJDEV et al, 2018).

Nos resultados obtidos com a administração oral do Cas01 não foi possível observar redução significativa do tempo de lambida da pata, manifestação característica de nocicepção, nas duas fases do teste. Este achado reforça a ideia de que as propriedades terapêuticas da espécie não envolvem a modulação da liberação de mediadores pró-inflamatórios, adicionando-se a isto a possível ausência de atividade sobre o processo de ativação e condução neural nociceptiva, bem como suas repercussões inflamatórias (GUEDES et al, 2018; RAJDEV et al, 2018 e CARVALHO et al, 2018).

7 CONCLUSÃO

O presente estudo demonstra, pela primeira vez, que a administração oral aguda do extrato etanólico de *Cassipoupa filiformis* L., não promove óbitos em ratos ou sinais sistêmicos de dano, comportando-se como um xenobiótico de baixa toxicidade. Tais achados apontam o extrato como uma droga potencialmente segura para intervenções terapêuticas agudas pela via oral.

Demonstrou ainda que o extrato não promoveu alterações sobre os processos neuropáticos e inflamatórios de nocicepção, sugerindo que suas propriedades não envolvem estas vias. Estudos adicionais deverão ser conduzidos a fim de elucidar os mecanismos subjacentes às propriedades terapêuticas desta espécie.

REFERÊNCIAS¹

ACEVEDO, M.B. et al. Relationship between ethanol-induced activity and anxiolysis in the open field, elevated plus maze, light-dark box, and ethanol intake in adolescent rats. **Behavioural Brain Research**, v. 265: p. 203-215, 2014.

AMBI, A. A. et al. Pharmacognostic studies and elemental analysis of *Cassytha filiformis* Linn. **Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy**, v. 9 (8): p. 131-137, 2017.

AOUACHRIA, S. et al. Acute, sub-acute toxicity and antioxidant activities (in vitro and in vivo) of *Reichardia picroide* crude extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 208: p. 105-116, 2017.

ATANASOV, A.G. et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology Advances**, v. 33: p. 1582-1614, 2015.

BABAYI, H.M. et al. Effect of oral administration of aqueous whole extract of *Cassytha filiformis* on haematograms and plasma biochemical parameters in rats. **Journal of Medical Toxicology**, v. 3 (4): p. 146-151, 2007.

BAHI, A. Individual differences in elevated plus-maze exploration predicted higher ethanol consumption and preference in outbred mice. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, v. 105: p. 83-88, 2013.

BARKIN, R.L. et al. Should nonsteroidal anti-inflammatory drugs (nsaids) be prescribed to the older adult?. *Drugs & Aging*, v. 27 (10): p. 775-769, 2010.

BOLL, S. et al. Oxytocin and pain perception: from animal models to human research. **Neuroscience**, 2017.

CARVALHO, A.M.R. et al. Antinociceptive activity of riparin ii from *Aniba riparia*: further elucidation of the possible mechanisms. **Chemico-Biological Interactions**, v. 287: p. 49-56, 2018.

CEZARIN, K. C. C et al. Reduction, refinement and replacement of animal use in toxicity testing: an overview. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40: p. 289-299, 2004.

CHANG, C. et al. Pharmacological evaluation of ocoteine, isolated from *Cassytha filiformis*, as an α -1 adrenoreceptor antagonist in rat thoracic aorta. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 73: p. 207-214, 1997.

¹Associação Brasileira de Normas Técnicas (ABNT) – NBR 6023

DIOKA, C. et al. Investigation into the Haematologic and Hepatotoxic Effects of Rinbacin in Rats. **Journal of Health Science**, v. 48 (5): p. 393-398, 2002.

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.

EDEWOR, T.I. Quantitative determination of the saponin content and GC-MS study of the medicinal plant *Cassytha filiformis* (linn.) leaves. **Journal of Coastal Life Medicine**, v. 4 (2): p. 154-156, 2016.

EKOR, M. et al. The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. **Frontiers in Pharmacology**, v. 4: 177, 2014.

ELLISON, D.L. Physiology of Pain. **Critical Care Nursing Clinics of North America**, v. 29 (4): p. 397-406, 2017.

FERNANDES, L.M.P. et al. Repeated cycles of binge-like ethanol exposure induce immediate and delayed neurobehavioral changes and hippocampal dysfunction in adolescent female rats. *Behavioural Brain Research*, 2018.

FURUHASHI, T. et al. Analysis of metabolites in stem parasitic plant interactions: interaction of *Cuscuta-momordica* versus *Cassytha-ipomoea*. **Plants**, v. 5 (43): 1-14, 2016.

GOVARDHAN, P. et al. In vitro evaluation of effect of *Cassytha filiformis* l. extracts on brain neurotransmitters in albino rats. **Journal of Science**, v. 1 (1), p. 21-25, 2011.

GUEDES, K.M.M. Salicytamide: a New Anti-inflammatory Designed Drug Candidate. **Inflammation**, 2018.

HARIRFOROOSH, S. et al. Adverse effects of nonsteroidal antiinflammatory drugs: an update of gastrointestinal, cardiovascular and renal complications. *Journal of Pharmacy And Pharmaceutical Sciences*, v. 16 (5): p. 821-847, 2013.

HOET, S. et al. Alkaloides from *Cassytha filiformis* and related aporphines: Antitrypanosomal activity, cytotoxicity, and interaction with DNA and topoisomerases. **Planta Medica**, v. 70: p. 407-413, 2004.

JAIOS, E.S et al. Possible mechanisms of antinociception of methanol extract of *Melastoma malabathricum* leaves. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 26: p. 586-594, 2016.

KAZARIA, Z.A et al. Antinociceptive effect of semi-purified petroleum ether partition of *Muntingia calabura* leaves. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 26: p. 408-419, 2016.

KHALID, S; TUBBS, R.S. Neuroanatomy and Neuropsychology of Pain. **Cureus**, v. 9 (10): p. 1-14, 2017.

KHOVIDHUNKIT, W. et al. Effects of infection and inflammation on lipid and lipoprotein metabolism: mechanisms and consequences to the host. **Journal of Lipid Research**, v. 45: p.1169-1196, 2004.

KOSTER, R. et al. Acetic acid analgesic screening. **Federation Proceedings**, v.18: p. 412–420, 1959.

KUMAR, R. The dynamics of acute inflammation. **Journal of Theoretical Biology**, v. 230: p. 145-155, 2004.

KUNNUMAKKARA, A.B. et al. Chronic diseases, inflammation and spices: how are they linked?. **Journal of Translational Medicine**, v. 16 (1): p. 14, 2018.

KVIETYS, P.R; GRANGER, D.N. Role of reactive oxygen and nitrogen species in the vascular responses to inflammation. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 52 (3): p. 556-592, 2011.

LACAGNINA, M. et al. Toll-like receptors and their role in persistent pain. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 184: p. 145-158, 2018.

LENTA, B.N. et al. Endiandric Acid Derivatives and Other Constituents of Plants from the Genera *Beilschmiedia* and *Endiandra* (Lauraceae). **Biomolecules**, v. 5: p. 910-942, 2015.

MALONE, M.H. Pharmacological Approaches to Natural Product Screening and Evaluation. **New Natural Products and Plant Drugs with Pharmacological, Biological or Therapeutical Activity**, p. 22-53, 1977.

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

MEDZHITOV, R. Inflammation 2010: new adventures of an old flame. **Cell**, v. 140: p. 771-776, 2010.

MENDES, R.T. et al. Inibição seletiva da ciclo-oxigenase-2: riscos e benefícios. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 52 (5): p. 767-782, 2012.

MENEGATI, S.E. et al. Acute and subacute toxicity of the aqueous extract of *Alibertia edulis* (Rich.) A. Rich. ex DC. in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 194: p. 1096-1102, 2016.

MILLER, A.H. Inflammation and its discontents: the role of cytokines in the pathophysiology of major depression. **Biological Psychiatry**, v. 65 (9): p. 732-741, 2009.

MORAES, P.L.R. Sinopse das Lauráceas nos estados de Goiás e Tocantins, Brasil. **Biota Neotropica**, v. 5 (2): p. 253-270, 2005.

MURAI, Y. et al. Flavonoids and anthocyanins from six *Cassytha* taxa (Lauraceae) as taxonomic markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 36: p. 745-748, 2008.

MYTHILLI, S. et al. Pharmacological Activities of *Cassytha Filiformis*: A Review. **Asian Journal of Plant Science and Research**, v. 1 (1): p. 77-83, 2011.

NELSON, S. C. *Cassytha filiformis*. **Plant Disease**, v.42: p. 1-10, 2008.

PIRLAMARLA, P; BOND, R.M. FDA labeling of nsaid: review of nonsteroidal anti-inflammatory drugs in cardiovascular disease. *Trends in Cardiovascular Medicine*, v. 26 (8): p. 675-680, 2016.

RAJ, B. et al. Hepatoprotective and antioxidant activity of *Cassytha filiformis* against CCl₄ induced hepatic damage in rats. **Journal of Pharmacy Research**, v. 7: p. 15-19, 2013.

RAJDEV, K. et al. Antinociceptive effect of *Ficus bengalensis* bark extract in experimental models of pain. *Cureus*, v. 10 (3), 2018.

REUTER, S. et al. Oxidative stress, inflammation, and cancer: How are they linked?. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 49: p. 1603-1616, 2010.

RIBEIRO, D.A. Promising medicinal plants for bioprospection in a Cerrado area of Chapada do Araripe, Northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 155: p. 1522-1533, 2014.

ROSA, S.G. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive effects of 2,2'-dipyridyl diselenide through reduction of inducible nitric oxide synthase, nuclear factor-kappa b and c-jun n-terminal kinase phosphorylation levels in the mouse spinal cord. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*, v. 48: p. 38-45, 2018.

ROSENBLAT, J. D. Inflamed moods: A review of the interactions between inflammation and mood disorders. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, v. 53: p. 23-34, 2014.

ROSS, A.C. Impact of chronic and acute inflammation on extra- and intracellular iron homeostasis. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 106: p. 1581S-1587S, 2017.

SALEEM, U. et al. Acute oral toxicity evaluation of aqueous ethanolic extract of *Saccharum munja* Roxb. roots in albino mice as per OECD 425 TG. **Toxicology Reports**, v. 4: p. 580-585, 2017.

SANDKUHLER, J. Models and mechanisms of hyperalgesia and allodynia. **Physiological Reviews**, v. 89 (2): p. 707-758, 2009.

SANTOS, A.O. et al. Antimicrobial activity of Brazilian copaiba oils obtained from different species of the *Copaifera* genus. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103 (3): p. 277-281, 2008.

SANTOS, S.O; ALVES, M. Sinopse taxonômica da família Lauraceae na porção norte da Floresta Atlântica brasileira. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 11 (1): p, 14-28, 2013.

SEGAL, J. et al. Circadian control of pain and neuroinflammation. **Journal of Neuroscience Research**, p: 1-19, 2017.

SHARMA, S. et al. Comparative morphoanatomical and preliminary phytochemical studies of *Cuscuta reflexa* and *Cassytha filiformis*. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 2: p. 59-64, 2010.

SHARMA, S. et al. Comparative study of *Cuscuta reflexa* and *Cassytha filiformis* for diuretic activity. **Pharmacognosy Research**, v. 1: p. 327-330, 2009.

SILVA, L.C.R. et al. k-Opioid receptor participates of NSAIDs peripheral antinociception. **Neuroscience Letters**, v. 622: p. 6-9, 2016.

SNEDDON, L.U. Comparative physiology of nociception and pain. **Physiology**, v. 33: p. 63-73, 2018.

SOUZA, G. E. P.; FERREIRA, S. H. Blockade by antimacrophage serum of the migration of PMN neutrophils into the inflamed peritoneal cavity. **Inflammation Research**, v. 17: p. 97-103, 1985.

STÉVIGNY, C. et al. Cytotoxic aporphine alkaloids from *Cassytha filiformis*, **Planta Medica**, v. 68: p. 1042-1044, 2002.

TSAI, T. Vasorelaxing Alkaloids and Flavonoids from *Cassytha filiformis*. **Journal of Natural Products**, v. 71: p. 289-291, 2008.

UGHAW-OGUEJIOFOR, C.J. et al. Acute and sub-acute toxicity of aqueous extract of aerial parts of *Carraluma dalzielii* N. E. Brown in mice and rats. **Heliyon**, v. 5 (1) : p. e01179, 2019.

UNGPRASERT, P. et al. Non-steroidal anti-inflammatory drugs and risk of heart failure exacerbation: a systematic review and meta-analysis. **European Journal of Internal Medicine**, v. 26 (9): p. 685-690, 2015.

VEZZANI, A. et al. The role of inflammation in epilepsy. **Nature Reviews Neurology**, v. 7: p. 31-40, 2011.

VONKEMAN, H.E. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: adverse effects and their prevention. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 39 (4): p. 294-312, 2010.

WALSH, R. N.; CUMMINS, R. A. The Open-Field Test: a critical review. **Psychological Bulletin**, v. 83 (3): p. 482–504, 1976.

WU, Y. et al. Alkaloides from *Cassytha filiformis*. **Phytochemistry**, v. 46 (1): p. 181-184, 1997.

XIN, Z. et al. Synthesis of (-)-agathic acid and (-)-copalic acid from andrographolide via a regioselective Barton-McCombie reaction. **Tetrahedron**, v. 72: p. 555-562, 2016.

YEZIERSKI, R.P; HANSON, P. Inflammatory and neuropathic pain from bench to bedside: what went wrong?. *The Journal of Pain*, v. 19 (6): p. 571-588, 2018.

YORI YULIANDRA, A; ARMENIA, H.A. Antihypertensive and antioxidant activity of *Cassia filiformis* L.: A correlative study. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 7 (7): p. 614-618, 2017.

ZAREI, M. et al. Antinociceptive activity of *Inula britannica* L. and patuletin: In vivo and possible mechanisms studies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 2019: p. 351-358, 2018.

ZEILHOFER, H.U. Prostanoids in nociception and pain. **Biochemical Pharmacology**, v. 73: p. 165-174, 2007.

APÊNDICE A – PARECER DO CEUA/UFPA



UFPA
Universidade Federal do Pará

Comissão de Ética no
Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "INVESTIGAÇÃO DA TOXICIDADE ORAL AGUDA E DAS PROPRIEDADES ANTINOCEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DE UMA ESPÉCIE VEGETAL DO GÊNERO CASSYTHA", protocolada sob o CEUA nº 1050140817, sob a responsabilidade de **Enéas de Andrade Fontes Júnior** e equipe; **Mayra Arouck Barros**; **Enéas de Andrade Fontes Júnior**; **Ana Cristina Baetas Gonçalves**; **Joni Tetsuo Sakai** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Pará (CEUA/UFPA) na reunião de 24/11/2017.

We certify that the proposal "INVESTIGATION OF ACUTE ORAL TOXICITY AND ANTINOCEPTIVE AND ANTI-INFLAMMATORY PROPERTIES OF A GENUS CASSYTHA PLANT", utilizing 120 Heterogenics mice (120 males), 10 Heterogenics rats (10 females), protocol number CEUA 1050140817, under the responsibility of **Enéas de Andrade Fontes Júnior** and team; **Mayra Arouck Barros**; **Enéas de Andrade Fontes Júnior**; **Ana Cristina Baetas Gonçalves**; **Joni Tetsuo Sakai** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Para (CEUA/UFPA) in the meeting of 11/24/2017.

Finalidade da Proposta: Pesquisa

Vigência da Proposta: de 09/2017 a 03/2019

Área: Farmacologia da Inflamação E do Comportamento - Lafico

Origem:	Biotério Central ICB/UFPA	sexo:	Machos	idade:	5 a 6 semanas	N:	120
Espécie:	Camundongos heterogênicos						
Linhagem:	Swiss				Peso:	25 a 35 g	
Origem:	Biotério Central ICB/UFPA	sexo:	Fêmeas	idade:	7 a 8 semanas	N:	10
Espécie:	Ratos heterogênicos						
Linhagem:	Wistar				Peso:	150 a 200 g	

Local do experimento: Laboratório de Farmacologia da Inflamação e do Comportamento - LAFICO

Belé, 05 de dezembro de 2017

Profa. Dra. Maria Viviana Barros Monteiro
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Pará

Profa. Dra. Vanessa Jola de Mello
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal do Pará

APÊNDICE B – ARTIGO PUBLICADO



Article

Anti-Inflammatory and Antinociceptive Studies of Hydroalcoholic Extract from the Leaves of *Phyllanthus brasiliensis* (Aubl.) Poir. and Isolation of 5-O- β -D-Glucopyranosyljusticidin B and Six Other Lignans

Luziane da C. Borges ¹, Raimundo Negrão-Neto ¹, Sônia Pamplona ¹, Luanna Fernandes ², Mayra Barros ², Enéas Fontes-Júnior ^{2,3}, Cristiane Maia ^{2,3} , Cosmeilo Y. Yoshioka e Silva ^{3,*} and Milton Nascimento da Silva ¹

¹ Programa de Pós-Graduação em Química, Instituto de Ciências Exatas e Naturais, Universidade Federal do Pará, Rua Augusto Corrêa, 01, Belém 66075-110, Pará, Brazil; luziane_borges23@yahoo.com (L.C.B.); negraoneto@yahoo.com.br (R.N.-N.); spamploa@yahoo.com.br (S.P.); yamilton@yahoo.com.br (M.N.d.S.)

² Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacológicas, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Rua Augusto Corrêa, 01, Belém 66075-110, Pará, Brazil; luannafo@hotmail.com (L.F.); mayraarochaufamos@gmail.com (M.B.); efontes@ufpa.br (E.F.-J.); crismaia@ufpa.br (C.M.)

³ Faculdade de Farmácia, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Rua Augusto Corrêa, 01, Belém 66075-110, Pará, Brazil

* Correspondence: yamileyoshioka@yahoo.com.br; Tel: +55-091-3201-7365

Academic Editor: Derek J. McPhee

Received: 23 February 2018; Accepted: 19 March 2018; Published: 18 April 2018



Abstract: The aim of this study was to investigate the chemical composition and the antiinflammatory/antinociceptive properties of the hydroalcoholic extract derived from the leaves of *Phyllanthus brasiliensis* (HEPB) in rodents. A new aryl-naphthalene lignan glycoside, 5-O- β -D-glucopyranosyljusticidin B, together with six known lignans, were isolated from HEPB. 1D and 2D NMR experiments and HRMS were used to elucidate the structure of the new compound. HEPB toxicity and antinociceptive activity were evaluated through acute oral toxicity and formalin models in mice, respectively. The anti-inflammatory effects of HEPB were assessed using carrageenan- and dextran-induced paw edema models in rats. HEPB showed low toxicity. Oral administration of HEPB reduced paw edema induced by carrageenan, but not by dextran. HEPB and its fractions from FR6 to FR10 (FR6-10) inhibited the neurogenic and inflammatory phases of formalin-induced licking, demonstrating its antinociceptive activity. These results indicated that lignans from *Phyllanthus brasiliensis* exerted antinociceptive/anti-inflammatory effects not related to the histaminergic pathway.

Keywords: *Phyllanthus brasiliensis*; 5-O- β -D-glucopyranosyljusticidin B; antinociceptive/anti-inflammatory

1. Introduction

The genus *Phyllanthus* is the largest within the Phyllanthaceae family and one of the most diversified among angiosperm genera, with about 1269 species distributed around the world [1].

In Brazil, the genus *Phyllanthus* is known as ‘quebra-pedra’, ‘erva-pombinha’ and ‘arrebenta-pedra’. In previous ethnopharmacological reports, leaves, stems, and roots of the genus have been used for the treatment of many diseases, such as urinary and intestinal infections, diabetes and hepatitis B [2].

