



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS NATURAIS DO
SEMIÁRIDO**

JACKSON DE MENEZES BARBOSA

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E DO POTENCIAL ANTINOCICEPTIVO
E ANTI-INFLAMATÓRIO DE *Leonotis nepetifolia* (L.) R. BR.
(Lamiaceae)**

PETROLINA-PE

2018

JACKSON DE MENEZES BARBOSA

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E DO POTENCIAL ANTINOCICEPTIVO
E ANTI-INFLAMATÓRIO DE *Leonotis nepetifolia* (L.) R. BR.
(Lamiaceae)**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Vale do São Francisco como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais do Semiárido para obtenção do título de Mestre em Recursos Naturais do Semiárido.

Área de concentração: Produtos Bioativos do Semiárido

Linha de Pesquisa: Fisiologia e Farmacologia

Orientador: Prof. Dr. Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida

PETROLINA-PE

2018

**AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E DO POTENCIAL ANTINOCICEPTIVO
E ANTI-INFLAMATÓRIO DE *Leonotis nepetifolia* (L.) R. BR.
(Lamiaceae)**

JACKSON DE MENEZES BARBOSA

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Vale do São Francisco como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais do Semiárido para obtenção do título de Mestre em Recursos Naturais do Semiárido.

Aprovada em: ____ de _____ de ____.

Banca examinadora

Prof. Dr. Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida - Orientador
Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF)

Prof. Dr. Irwin Rose Alencar de Menezes - Examinador Externo
Universidade Regional do Cariri (URCA)

Prof. Dr. David Fernandes Lima – Examinador Interno
Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF)

B238a Barbosa, Jackson de Menezes.
 Avaliação da toxicidade e do potencial antinociceptivo e anti-
inflamatório de *Leonotis nepetifolia* (L.) R. BR. (Lamiaceae) /
Jackson de Menezes Barbosa. - - Petrolina, 2018.
 103 f.: il.: 29 cm.

 Dissertação (Mestrado em Recursos Naturais do Semiárido) –
Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus Petrolina,
Petrolina – PE, 2018.

 Orientador: Prof. Dr. Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida.

 1. *Leonotis nepetifolia* (cordão de São Francisco). 2.Planta
medicinal. 3. Nocicepção. 4. Toxicologia. 5. Inflamação. I. Título. II.
Universidade Federal do Vale do São Francisco.

CDD 615.9

Esse trabalho é dedicado a Deus, aos meus pais **Alice Soares de Menezes** e **José Milton Barbosa**, à minha esposa **Rita de Cássia Mendes**, a meu filho **Christian Benjamin** aos meus irmãos, sobrinhos parentes e amigos que estiveram presentes ao longo dessa jornada, incentivando e contribuindo na busca de meus objetivos.

AGRADECIMENTOS

Ao criador do universo, “Deus”, por permitir a nossa existência nesse planeta e por fornecer a energia necessária para enfrentar todos os desafios diários.

Ao meu orientador, Professor Dr. Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida, por ter me aceitado como orientando, permitindo fazer parte de sua equipe. Tive o prazer de conhecê-lo em uma palestra durante minha graduação, desde então decidi pedir sua orientação. Além de ser um excelente pesquisador é uma grande pessoa. Agradeço pela sua contribuição na minha formação.

À Universidade Federal do Vale do São Francisco e ao Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais do Semiárido por possibilitar o crescimento de nossa região formando cidadãos.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), pela bolsa de mestrado concedida.

À Ana Paula de Oliveira, pelas contribuições científicas, cultivando e fornecendo o material botânico para a realização da pesquisa, sempre prestativa quando solicitada.

A Professora Dra. Larissa Rolim, da Central de Análise de Fármacos, Medicamentos e Alimentos (CAFMA), pela colaboração na realização da análise do extrato por HPLC.

À Érica Lavor, por todo suporte científico, contribuindo de forma significativa para a realização dessa pesquisa. Além de ser uma pessoa excepcional e competente traz consigo uma humildade, sempre ajudando o próximo. Agradeço por tudo.

À Ana Ediléia, pelo companheirismo e aprendizado que tive trabalhando juntos. Aprendi a ser um ser humano melhor convivendo com você.

Ao meu amigo Ricardo Lúcio de Almeida pelo companheirismo e momentos de estudos que tivemos durante o mestrado.

À minha prima Célia Maria, por me acolher em sua casa, contribuindo na realização de meu objetivo. Agradeço por tudo.

A todos do Núcleo de Estudos e Pesquisas de Plantas Medicinais (NEPLAME), em especial à Mariana Gama, Alice Miranda, Raimundo Júnior, Layanne Feitosa e Fernanda Pires pelas contribuições e amizade.

À turma do mestrado em Recursos Naturais do Semiárido, em especial Victória Regina, Jorge Lucas, Carlos Alberto, Marcos André, Aldo Luiz e Vinícius Bruno, pela amizade e momentos de descontração.

A todos os professores que fazem parte do Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais do Semiárido, os quais contribuíram na minha formação.

Meus agradecimentos a todos!!!

“Se não puder voar corra. Se não puder correr, ande. Se não puder andar, rasteje, mas continue em frente de qualquer jeito”. (Martin Luther King)

RESUMO

Leonotis nepetifolia (L). R. BR. (Lamiaceae), conhecida popularmente como cordão de São Francisco é uma espécie de origem africana com distribuição pancontinental sendo encontrada no bioma Caatinga. Essa espécie tem sido bastante utilizada como planta medicinal. Estudos têm reportado diferentes atividades biológicas, dentre elas, antifúngica, antibacteriana, antitumoral, antioxidante, antinociceptiva e anti-inflamatória. Nessa perspectiva, esse trabalho teve como objetivo, avaliar o potencial toxicológico, antinociceptivo e anti-inflamatório do extrato etanólico bruto de *Leonotis nepetifolia* (EEB-Ln). O material botânico (folhas) foi processado e o pó foi submetido ao processo de maceração exaustiva com etanol obtendo o EEB-Ln. Para determinar o perfil fitoquímico de EEB-Ln foi realizada a cromatografia em camada delgada (CCD) e cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos (CLAE-DAD). Para verificar o potencial toxicológico realizou-se o teste de toxicidade aguda via oral com 2 g/kg de EEB-Ln. Para verificar o efeito antinociceptivo de EEB-Ln (100, 200 e 400 mg/kg,v.o) foram utilizados os testes de contorções abdominais induzidas por ácido acético, teste da formalina e placa quente. A avaliação das possíveis vias do bloqueio da nocicepção do extrato foi determinada pela utilização de antagonistas específicos para as vias opioide, serotoninérgica 5HT₃, óxido nítrico, colinérgica e canais para potássio sensíveis ao ATP. O teste do rota rod foi utilizado para avaliar a coordenação motora do animais tratados com o EEB-Ln. Para verificar atividade anti-inflamatória de EEB-Ln (100, 200 e 400 mg/kg,v.o), foram utilizados os testes de edema de pata induzido por carragenina e por histamina. A triagem fitoquímica preliminar indicou a presença de várias classes de metabólitos secundários, dentre eles os flavonoides, os quais foram detectados por CLAE DAD. No teste de toxicidade aguda não ocorreu morte em todo o período de avaliação dos animais, indicando um bom perfil de segurança de EEB-Ln. A avaliação dos modelos farmacológicos de nocicepção indicou efeito antinociceptivo de EEB-Ln, por mecanismos de vias centrais e periféricas. O mecanismo de ação de EEB-Ln no efeito antinociceptivo envolve as vias opioide, óxido nítrico, serotoninérgica e canais para potássio sensíveis ao ATP. O teste de coordenação motora (rota rod) não houve alteração da permanência dos animais na barra giratória em todos os tempos avaliados. A avaliação do efeito anti-inflamatório demonstrou que EEB-Ln apresenta redução do edema de pata induzido por carragenina e por histamina, evidenciando um potencial efeito antiedematogênico. Sendo assim, esse estudo demonstrou que EEB-Ln possui atividade antinociceptiva e anti-inflamatória, além de baixa toxicidade, o que contribui para o uso popular da espécie.

Palavra-chave: Nocicepção. Inflamação. Toxicologia. *Leonotis nepetifolia*. Lamiaceae. Planta medicinal.

ABSTRACT

Leonotis nepetifolia (L). R. BR. (Lamiaceae), popularly known as the San Francisco cord is a species of African origin with pancontinental distribution being found in the Caatinga biome. This species has been widely used as a medicinal plant. Studies have reported different biological activities, among them, antifungal, antibacterial, antitumor, antioxidant, antinociceptive and anti-inflammatory. In this perspective, this work aimed to evaluate the toxicological, antinociceptive and anti-inflammatory potential of the crude ethanolic extract (EEB-Ln) of *Leonotis nepetifolia*. The botanical material (leaves) was processed and the powder was subjected to the exhaustive maceration with ethanol obtaining the EEB-Ln. To determine the phytochemical profile of EEB-Ln, thin layer chromatography (TLC) and high-performance liquid chromatography coupled to a diode array detector (HPLC-DAD) were performed. To verify the toxicological potential the acute oral toxicity test was carried out with 2 g/kg EEB-Ln. To assess the antinociceptive effect of EEB-Ln (100, 200 and 400 mg/kg, v.o), the abdominal writhing tests induced by acetic acid, formalin test and hot plate were used. The evaluation of the possible pathways of the nociception blockade of the extract was determined by the use of antagonists specific for the opioid, serotonergic 5HT₃, nitric oxide, cholinergic and potassium channels sensitive to ATP. The test of the rota-rod was used to evaluate the motor coordination of the animals treated with EEB-Ln. To assess the anti-inflammatory activity of EEB-Ln (100, 200 and 400 mg/kg, v.o), carrageenan and histamine-induced paw edema tests were used. Preliminary phytochemical screening indicated the presence of several classes of secondary metabolites, among them flavonoids, which were detected by HPLC DAD. In the acute toxicity test there was no death throughout the evaluation period of the animals, indicating a fine EEB-Ln safety profile. The evaluation of pharmacological models of nociception indicated the antinociceptive effect of EEB-Ln, by central and peripheral pathway mechanisms. The mechanism of action of EEB-Ln in the antinociceptive effect involves the opioid, nitric oxide, serotonergic and potassium channels sensitive to ATP. The motor coordination test (rota-rod) did not change the permanence of the animals in the rotating bar at all evaluated times. The evaluation of the anti-inflammatory effect showed that EEB-Ln presents reduction of paw edema induced by carrageenan and histamine, evidencing a potential anti-edema-like effect. Thus, this study demonstrated that EEB-Ln has antinociceptive and anti-inflammatory activity, in addition to low toxicity, which contributes to the popular use of the species.

Keywords: Nociceção. Inflamação. Toxicologia. *Leonotis nepetifolia*. Lamiaceae. medicinal plant.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Espécie <i>Leonotis nepetifolia</i>	28
Figura 2- Mapa global de distribuição geográfica de <i>Leonotis nepetifolia</i>	29
Figura 3- Esquema de um nociceptor.....	33
Figura 4- Vias de transmissão da dor.....	34
Figura 5- Sinais cardinais do processo inflamatório: calor, rubor, edema, dor e perda da função	38
Figura 6- Exsicata da espécie <i>Leonotis nepetifolia</i> depositada no HVASF	43
Figura 7- Extrato etanólico bruto de <i>Leonotis nepetifolia</i> (A) e evaporador rotatório (B)	44
Figura 8- Contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongo	50
Figura 9- Animal lambendo a pata após aplicação da injeção de formalina na região subplantar na pata posterior direita	51
Figura 10- Animal no teste da placa quente	52
Figura 11- Animal na barra giratória no teste de coordenação motora (rota rod)	55
Figura 12 - Cromatograma das folhas do extrato etanólico bruto de <i>Leonotis nepetifolia</i> (EEB-Ln)	59
Figura 13- Espectros de absorção no UV-Vis dos picos detectados no cromatograma do extrato etanólico bruto de <i>Leonotis nepetifolia</i> (EEB-Ln)	60
Figura 14- Efeito do tratamento com solução salina 0,9% e dose única de EEB-Ln (2 g/kg), por via oral, durante os 14 dias sobre o peso diário dos animais.....	62
Figura 15- Efeito do tratamento com solução salina 0,9% e dose única de EEB-Ln (2 g/kg), por via oral, no consumo de ração, durante os 14 dias	63
Figura 16- Efeito do tratamento com solução salina 0,9% e dose única de EEB-Ln (2 g/kg), por via oral, no consumo de água, durante os 14 dias	64
Figura 17 - Efeito antinociceptivo do extrato etanólico bruto de <i>Leonotis nepetifolia</i> nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg e morfina (Mor, 10 mg/kg), no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético	68
Figura 18- Efeito antinociceptivo do extrato etanólico bruto de <i>Leonotis nepetifolia</i> nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg, indometacina (Indo, 20 mg/kg) e morfina	

(Morf, 10 mg/kg), na primeira e segunda fase do teste da formalina em camundongos	70
Figura 19- Efeito antinociceptivo do extrato etanólico bruto de <i>Leonotis nepetifolia</i> nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg e morfina (Morf, 10mg/kg) no teste da placa quente em camundongos	72
Figura 20 – Influencia do pré-tratamento com naloxona (1,5 mg/kg) no efeito antinociceptivo do extatro etanólico bruto de <i>Leonotis nepetifolia</i> (400 mg/kg) e morfina (10 mg/kg), no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético	75
Figura 21- Influencia do pré-tratamento com glibenclamida (2 mg/kg) e diazóxido (3 mg/kg) no efeito antinociceptivo do extatro etanólico bruto de <i>Leonotis nepetifolia</i> (400 mg/kg) no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético.....	76
Figura 22- Influencia do pré-tratamento com ondansentrona (0,5 mg/kg) no efeito antinociceptivo do extatro etanólico bruto de <i>Leonotis nepetifolia</i> (400 mg/kg) no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético.....	77
Figura 23- Influencia do pré-tratamento com atropina (1,0 mg/kg) no efeito antinociceptivo do extatro etanólico bruto de <i>Leonotis nepetifolia</i> (400 mg/kg) no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético.....	78
Figura 24- Influencia do pré-tratamento com L-arginina (600 mg/Kg) e L-NOARG (50 mg/Kg) no efeito antinociceptivo do extatro etanólico bruto de <i>Leonotis nepetifolia</i> (400 mg/kg) no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético.....	80
Figura 25- Efeito do extrato etanólico bruto de <i>Leonotis nepetifolia</i> (100, 200 e 400 mg/kg) e diazepam (2,5 mg/kg) sobre a coordenação motora de camundongos, no teste de rota rod	81
Figura 26- Efeito anti-inflamatório do extrato etanólico bruto de <i>Leonotis nepetifolia</i> (EEB-Ln 100, 200 e 400 mg/kg) e indometacina (20 mg/kg), sobre o edema de pata induzido por carragenina	83
Figura 27- Efeito anti-inflamatório do extrato etanólico bruto de <i>Leonotis nepetifolia</i> (EEB-Ln 400 mg/kg) e indometacina (20 mg/kg), sobre o edema de pata induzido por histamina.....	84

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1-** Os tipos de fibras responsáveis pela condução de estímulos nociceptivos35
- Tabela 2-** Sistema de eluição e reveladores utilizados para a caracterização dos principais metabólitos secundários presente no extrato etanólico bruto de *Leonotis nepetifolia*.45
- Tabela 3-** Sistema gradiente utilizado nas análises por CLAE-DAD47
- Tabela 4-** Identificação das principais classes de metabólitos secundários presente no extrato etanólico bruto das folhas de *Leonotis nepetifolia*.58
- Tabela 5-** Classe de metabólitos, tempos de retenção e $\lambda_{\text{máx}}$ dos picos detectados no cromatograma do extrato etanólico de *Leonotis nepetifolia* (EEB-Ln).61
- Tabela 6-** Avaliação do peso relativo dos órgãos dos animais tratados com solução salina e EEB-Ln (2 g/kg,v.o), no teste de toxicidade aguda.....65

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A α : Fibras do tipo A- alfa

A β : Fibras do tipo A- beta

A δ : Fibras do Tipo A- delta

AA: Ácido araquidônico

AAS: Ácido acetilsalicílico

Atro: Atropina

IASP: International Association for Study of Pain

AMP_c: Adenosina monofosfato cíclico

ANOVA: Análise de variância

ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ATP: Adenosina trifosfato

ASIC: Canais iônicos sensíveis ao ácido

CEUA: Comissão de Ética no Uso de Animais

COX: Enzima cicloxigenase

CDB: Convenção da diversidade biológica

CGRP: Peptídeo relacionado ao gene calcitonina

DIAZ: Diazóxido

EEB-Ln: Extrato etanólico bruto de *Leonotis nepetifolia*

E.P.M: Erro padrão da média

E: Selectina

GMP_c: Guanosina monofosfato cíclico

GLIB: Glibenclamida

HVASF: Herbário Vale do São Francisco

IL: Interleucinas

i.p: Intraperitoneal

L : Selectina

L-ARG: L-Arginina

L-NOARG: N ω -nitro-L-arginina

MORF: Morfina

mg/Kg: Miligrama por quilograma

NMDA: *N*-metil-*D*-aspartato

NO: Óxido nítrico

ONDA: Ondansetrona

SBED: Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor

TNF: Fator de necrose tumoral

TRVP-1: Receptor de potencial transitório vaniloide

TX: Tromboxano

VR: Receptor vaniloide

v.o: Via oral

5HT₃: 5-didroxitriptamina ou serotonina

α: Alfa

β: Beta

δ: Delta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2 OBJETIVOS	22
2.1 Objetivo geral	22
2.2 Objetivos específicos	22
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	24
3.1 Plantas medicinais	24
3.2 Família Lamiaceae.....	25
3.3 Aspectos gerais sobre o gênero <i>Leonotis</i>	27
3.4 Aspectos sobre a espécie <i>Leonotis nepetifolia</i> (L) R. BR	27
3.5 Aspectos gerais sobre dor	30
3.5.1 Dor e nocicepção	30
3.5.2 Nociceptores	32
3.5.3 Vias nociceptivas	33
3.5.4 Mecanismo da dor central e periférica: inflamatória.....	36
3.6 Aspectos gerais sobre inflamação	37
3.6.1 Eventos vasculares e celulares do processo inflamatório.....	39
3.6.3 Mediadores inflamatórios	40
4 PARTE EXPERIMENTAL.....	43
4.1 Coleta e identificação do material vegetal.....	43
4.2 Obtenção do extrato etanólico bruto das folhas de <i>Leonotis nepetifolia</i>	44
4.3 Análise fitoquímica preliminar do extrato etanólico bruto de <i>Leonotis nepetifolia</i>	45
4.3.1 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD).....	47
4.4 Animais	47
4.5 Toxicidade aguda.....	48
4.5.1 Triagem comportamental.....	48
4.5.2 Análise macroscópica e peso relativo dos órgãos	49
4.6 Atividade antinociceptiva.....	49
4.6.1 Teste de contorções abdominais induzidas pela injeção intraperitoneal de ácido acético 0,9%.....	49
4.6.2 Teste de nocicepção induzida por formalina	50
4.6.3 Teste de nocicepção induzida por calor (placa quente).....	51

4.7 Sistemas envolvidos no mecanismo de ação do extrato etanólico bruto de <i>Leonotis nepetifolia</i>	52
4.7.1 Envolvimento da via opioide	52
4.7.2 Envolvimento dos canais para K ⁺ sensíveis ao ATP.....	53
4.7.3 Envolvimento dos receptores serotoninérgicos 5-HT ₃	53
4.7.4 Envolvimento do sistema colinérgico	53
4.7.5 Envolvimento do sistema L-arginina- óxido nítrico	53
4.8 Teste da coordenação motora (rota rod).....	54
4.9 Teste de atividade anti-inflamatória	55
4.9.1 Edema de pata induzido por carragenina	55
4.9.2 Edema de pata induzido por histamina	56
4. 11 Análise estatística	56
5.1 Triagem fitoquímica.....	58
5. 2 Estudo toxicológico	61
5.2.1 Toxicidade aguda do extrato etanólico de <i>Leonotis nepetifolia</i>	61
5.3 Atividade antinociceptiva do extrato etanólico bruto de <i>Leonotis nepetifolia</i>	65
5.3.1 Teste de contorções abdominais induzidas por injeção intraperitoneal de ácido acético 0,9%.....	66
5.3.2 Teste de nocicepção induzido por formalina.....	68
5.3.3 Teste de nocicepção induzida por calor (placa quente).....	71
5.4 Estudo do mecanismo de ação do efeito antinociceptivo de EEB-Ln	73
5.4.1 Envolvimento da via opioide	73
5.4.2 Envolvimento dos canais para K ⁺ sensíveis ao ATP.....	75
5.4.3 Envolvimento dos receptores serotoninérgicos 5-HT ₃	76
5.4.4 Envolvimento do sistema colinérgico	78
5.4.5 Envolvimento da via L-arginina- óxido nítrico	79
5.5 Avaliação da coordenação motora de animais submetidos ao tratamento com o extrato etanólico bruto de <i>Leonotis nepetifolia</i>	80
5.5.1 Teste do rota rod.....	80
5.6 Atividade anti-inflamatória do extrato etanólico bruto de <i>Leonotis nepetifolia</i> ..	81
5.6.1 Edema de pata induzido por carragenina	82
5.5.2 Edema de pata induzido por histamina	83
6 CONCLUSÕES	86
REFERÊNCIAS.....	88
ANEXO.....	99
APÊNDICE	102

INTRODUÇÃO



1 INTRODUÇÃO

A dor é caracterizada como sendo um grave problema de saúde pública que afeta milhões de pessoas no mundo. É considerada o principal motivo de busca por assistência médica pela população (FORNI et al., 2012). A Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor (SBED) aponta que 30% da população é afetada por algum tipo de dor, levando ao sofrimento emocional e à incapacitação para o trabalho (SEBED, 2009).

A dor envolve um componente emocional e sensorial desagradável desencadeada por uma lesão real ou potencial aos tecidos (MCDOUGALL, 2011). Apesar de a sensação dolorosa ser considerada como algo negativo para o ser humano, a dor possui papel fisiológico importante, servindo como sinal de alerta para evitar danos ao organismo, no entanto a sua persistência pode provocar reações negativas e sofrimentos necessitando, o uso de fármacos para o tratamento (ALMEIDA et al., 2004).

A inflamação é uma resposta fisiológica desencadeada com a finalidade de combater agressões teciduais, invasões de microrganismos ou agentes nocivos, seja ela de natureza infecciosa ou não, potencializando o reparo ao dano tecidual, sendo fundamental para o equilíbrio homeostático (ASHLEY et al., 2012).

A partir de produtos naturais a indústria farmacêutica tem produzido novas formulações para o tratamento de várias doenças. Os extratos de vegetais são a base para obtenção de fármacos ou fitoterápicos disponíveis no mercado, pois apresentam uma diversidade de compostos químicos, como exemplo: os alcaloides, flavonoides, terpenoides e esteroides. Muitas vezes os extratos exibem atividade biológica maior ou diferente de seus componentes isolados (VILLAS-BÔAS; GADELHA, 2007). Além disso, sabe-se que as plantas medicinais são amplamente utilizadas por vários grupos étnicos e comunidades tradicionais como a principal ou a única fonte de recursos terapêuticos (MACIEL et al., 2002).

Esses povos detêm um conhecimento milenar sobre as propriedades biológicas dos produtos naturais, tendo papel fundamental na manutenção e transmissão para as futuras gerações (PHILLIPSON, 2001). Nesse contexto estudos *in vivo* de atividades farmacológicas de plantas medicinais baseados na

etnobotânica, surgem como uma alternativa promissora na busca de novos fitoterápicos para o tratamento da dor e de processos inflamatórios.

Várias espécies da família Lamiaceae são amplamente distribuídas no Brasil, dentre elas *Leonotis nepetifolia* (L). R. BR, conhecida popularmente como cordão de frade ou cordão de São Francisco. Essa espécie possui origem africana, porém, é encontrada no bioma Caatinga bem adaptada às condições climáticas da região (OLIVEIRA et al., 2015).

Leonotis nepetifolia é bastante utilizada em vários países para fins terapêuticos, apresentando propriedades farmacológicas interessantes, surgindo como uma espécie promissora na investigação das suas propriedades medicinais para à busca de novos fármacos e fitoterápicos quem minimize ou não provoquem efeitos colaterais ao organismo (MAREGESI et al., 2007). Os estudos fitoquímicos realizados com *Leonotis nepetifolia* demonstram uma diversidade de substâncias presentes nos extratos do vegetal, sendo eles: terpenoides, flavonoides, alcaloides, fitoesteróis, e saponinas (TRIVEDI et al., 2011). A presença desses metabólitos secundários serve como um indicativo de um possível efeito antinociceptivo e anti-inflamatório dessa espécie.

Um estudo preliminar com o extrato etanólico e aquoso de *Leonotis nepetifolia* demonstrou uma atividade antinociceptiva (250 mg/kg, v.o), apresentando um decréscimo no número de contorções abdominais (MAKAMBILA-KOUBEMBA et al., 2011). Porém, ainda não existe um estudo que apresente de forma mais aprofundada a investigação do feito antinociceptivo e anti-inflamatório do extrato etanólico bruto de *Leonotis nepetifolia* em diferentes modelos farmacológicos e as possíveis vias de atuação. Sabendo da importância do uso dessa espécie na medicina popular e de seu potencial efeito, foi realizado a avaliação do perfil toxicológico do extrato de *Leonotis nepetifolia*, além da investigação do efeito antinociceptivo e anti-inflamatório do extrato etanólico bruto das folhas de *L. nepetifolia* em camundongos em diferentes modelos farmacológicos, além da investigação dos possíveis mecanismos de ação.

OBJETIVOS



2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a toxicidade e o efeito antinociceptivo e anti-inflamatório do extrato etanólico bruto de *Leonotis nepetifolia* em modelos experimentais em camundongos.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Identificar as principais classes de constituintes químicos presentes no extrato etanólico bruto de *Leonotis nepetifolia*.
- ✓ Verificar o perfil de segurança do extrato etanólico bruto por meio do teste de toxicidade aguda de dose única.
- ✓ Avaliar a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do extrato etanólico bruto de *Leonotis nepetifolia*.
- ✓ Investigar os possíveis mecanismos de ação do efeito farmacológico do extrato etanólico bruto de *Leonotis nepetifolia*.

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA



3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Plantas medicinais

A diversidade e abundância das espécies de vegetais vêm conferindo ao longo de muitos anos a utilização de plantas medicinais com fins terapêuticos, possibilitando a cura e o tratamento de várias enfermidades. As comunidades tradicionais, por serem as principais utilizadoras de plantas medicinais, adquiriram uma gama de conhecimentos ao longo dos anos sobre suas propriedades farmacológicas, tendo papel fundamental na manutenção desses conhecimentos transmitindo para as gerações seguintes (PHILLIPSON, 2001).

As plantas medicinais são amplamente utilizadas por diversas comunidades, participando efetivamente no tratamento de várias doenças. Cerca de 80% da população mundial faz uso da medicina popular, principalmente os países em desenvolvimento (MACIEL et al., 2002; GURIB-FAKIM, 2006).

O Brasil é detentor de uma grande biodiversidade de espécies de vegetais concentrando em torno de 13% de toda riqueza mundial, com uma estimativa entre cerca de 170 a 210 mil espécies (LEWINSOHN e PRADO, 2005). De acordo com a convenção da diversidade biológica (CDB), o país é o maior em número de espécies endêmicas no mundo, porém, pouco ainda se conhece da nossa biota (BARREIRO e BOLZANI., 2009).

O conceito de biodiversidade engloba um conjunto de organismos procariontes e eucariontes presentes nos ecossistemas, bactérias, fungos, algas, animais e plantas, ou seja, a riqueza de espécies existente em uma determinada região. Dentre esses organismos os vegetais aparecem como um dos grupos mais estudados no Brasil, com ocorrência de 34. 916 espécies, sendo a maior parte endêmica do país (SIMÕES et al., 2017). Nesse cenário o Brasil aponta como promissor na busca de novos compostos com atividade farmacológica a partir dos recursos naturais.

A natureza vem proporcionando uma quantidade expressiva de substâncias bioativas, servindo de base para a produção de diversas formulações terapêuticas. A prova disso é que um terço dos medicamentos vendidos e prescritos no mundo é produzido a partir de produtos naturais. Um levantamento revelou que, dentre os

fármacos aprovados entre os anos de 1981 e 2014, 65 % deles eram derivados de produtos naturais ou são produtos naturais (NEW-MAN e CRAGG et al., 2014).

A partir de produtos naturais diversos novos fármacos vêm sendo produzidos. Vários fármacos conhecidos na indústria farmacêutica são resultado de sínteses direcionadas, reproduzindo a ação biológica das moléculas obtidas da natureza. O ponto de partida para obtenção de compostos sintéticos são os extratos vegetais os quais exibem uma atividade biológica maior ou diferente de seus componentes isolados. Esses extratos possuem uma diversidade de compostos (alcaloides, flavonoides, terpenoides, esteroides dentre outros) apresentando uma gama de propriedades biológica (VILLAS-BÔAS; GADELHA, 2007).

Dentre os fármacos obtidos a partir dos vegetais podemos destacar a morfina, um analgésico de ação no sistema nervoso central, obtido a partir da espécie *Papaver somniferum*. A quinina, um componente obtido da casca da espécie *Cinchona officinalis*, foi um composto protótipo na descoberta de derivados antimaláricos, como a cloroquina e mefloquina (BARREIRO e FRAGA, 2014; (SIMÕES; PETROVICK, 2010)).

3.2 Família Lamiaceae

Lamiaceae ou Labiatae é uma família botânica encontrada em todo o mundo, apresentando cerca de 230 gêneros e 6900 espécies. Essa família era classificada como Labiatae devido à característica morfológica das flores. Apesar dessa denominação ainda ser aceitável, a maioria dos taxonomistas faz uso frequente da nomenclatura Lamiaceae como classificação atual da família (LEE et al., 2011).

A família Lamiaceae encontra-se distribuída em cinco regiões do Brasil: Norte, Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul, e em seis domínios fitogeográficos, Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal. Atualmente são encontrados 46 gêneros, 524 espécies, 8 subespécies e 18 variedades dessa família no Brasil (FLORA DO BRASIL, 2017).

Estudos de etnofarmacologia apresentam-se como um passo importante na investigação do uso tradicional dos vegetais, possibilitando um melhor direcionamento das possíveis atividades farmacológicas em pesquisas de laboratórios. Espécies da família Lamiaceae são amplamente utilizadas pela população, reportando vários efeitos, com preparação das folhas e caule na forma de decocção, infusão e maceração (WALLER et al., 2017).

Um levantamento do uso tradicional da família Lamiaceae realizado por Sadeghi et al. (2017) relatou vários estudos etnofarmacológicos, apontando as diversas propriedades e o uso de espécies dessa família no tratamento de diabetes mellitus, inflamação, doenças respiratórias, cálculos renais, antibacteriana, hipertensão, câncer, entre outras. As formas de preparação para o uso são diversas, tais como, decocção, infusão, cataplasma e entre outras, sendo que os modelos de preparação predominante para o uso são a decocção e a infusão (SADEGHI et al., 2017). A variedade de constituintes químicos produzida pelo metabolismo secundário das diferentes espécies de plantas da família Lamiaceae vem fornecendo alternativas terapêuticas para as comunidades, despertando o interesse da comunidade científica em investigar tais propriedades e identificar os compostos nelas presentes.

Nessa perspectiva, em estudos realizados foram identificadas diferentes classes de metabólitos secundários nas espécies da família Lamiaceae, dentre eles: saponinas, flavonoides, esteroides, derivados de ácido cinâmico, alcaloides, cumarinas, quinonas e fenóis, justificando a diversidade de efeitos farmacológicos descritos pela população (HAIDA et al., 2007; LEE et al., 2011; TRIVEDI et al., 2011).

Algumas atividades biológicas desses compostos também já foram investigadas por diversos grupos de pesquisa em diferentes países, reportando o efeito dos constituintes químicos em um complexo (extratos e óleos essenciais) e das substâncias isoladas, sendo elas: atividade antiviral, antioxidante, antifúngica, anti-inflamatória, analgésica, antibacteriana, entre outras (DORMAN et al., 2004; SIMÕES et al., 2017., WALLER et al., 2017). A presença de compostos aromáticos é uma das características marcantes da família Lamiaceae, produzindo óleos essenciais voláteis em suas folhas com diferentes constituições químicas (ALONSO-FERNANDEZ; DÍAZ-RIVERA., 2006).

3.3 Aspectos gerais sobre o gênero *Leonotis*

O gênero *Leonotis* pertence à família Lamiaceae e atualmente são descritos nove espécies desse gênero, dentre elas oito são endêmicas da África (*Leonotis leonurus*, *Leonotis mirycifolia*, *Leonotis decadonta*, *Leonotis goetzei*, *Leonotis ocymifolia*, *Leonotis pole evanssii*, *Leonotis myrothamnifolia* e *Leonotis grandis*) e apenas a espécie *Leonotis nepetifolia* possui distribuição pancontinental (IWARSSON; HARVEY, 2003).

A identificação do gênero *Leonotis* é bem marcante devido às características específicas presentes em suas espécies como a coloração das flores laranja, o tipo de caule o florescimento e verticilos. As características morfológicas levadas em consideração para a classificação das espécies desse gênero são: folhas pecioladas ou sésseis, inflorescência composta de 1 a 5 verticilos por broto, corola tubular, 2 lábios, caule quadrangular podendo ser cilíndrico na base e porte arbusto com tamanho de até 8 metros (IWARSSON; HARVEY, 2003).

Diversos estudos farmacológicos com extratos e óleos essenciais tem demonstrado o efeito biológico das espécies do gênero *Leonotis*. A partir do óleo essencial obtido das flores e folhas das espécies *Leonotis leonurus* e *Leonotis ocymifolia* foi demonstrada a inibição do crescimento de bactérias Gram-positivas (*Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus kiristinae*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*) e Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella sonnei*) (OYEDEJI et al., 2005). O extrato aquoso obtido de *Leonotis leonurus* apresentou atividade anticonvulsivante, anti-inflamatória, antinociceptiva e antidiabética (BIENVENU et al., 2002; OJEWOLE et al., 2005). O extrato aquoso de *L. ocymifolia* exibiu atividade anti-helmíntica (EGUALE et al., 2011).

3.4 Aspectos sobre a espécie *Leonotis nepetifolia* (L) R. BR

A espécie *Leonotis nepetifolia* (L). R. BR é a única das espécies do gênero *Leonotis* que se encontra em distribuição geográfica pancontinental (Figura 1). Essa

espécie é de origem africana, podendo ser encontrada em regiões do sul da Índia e em regiões tropicais da América (Figura 2), (OLIVEIRA et al., 2015).

No Brasil a espécie *Leonotis nepetifolia* é conhecida pela população como cordão de frade ou cordão de São Francisco (OLIVEIRA et al., 2015). De acordo com estudos de Harley et al. (2015), a ocorrência dessa espécie no Brasil é em todas as regiões (Norte, Nordeste, Centro-Oeste, Sudeste e Sul) e em cinco domínios geográficos (Caatinga, Amazônia, Cerrado, Mata Atlântica e Pantanal) com adaptação em diferentes condições climáticas.

Figura 1- Espécie *Leonotis Nepetifolia*.

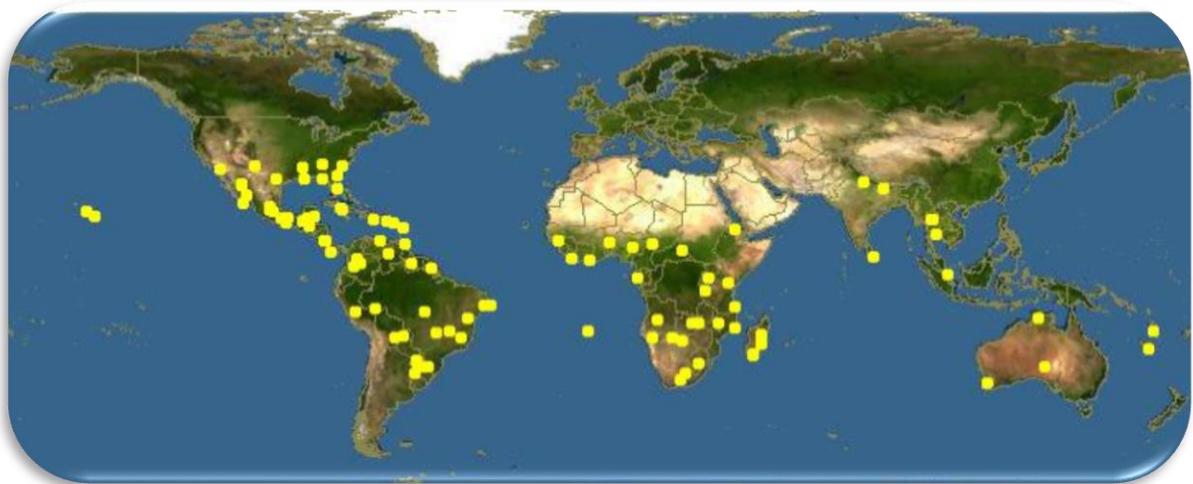


Fonte: <http://www.discoverlife.org>.

Leonotis nepetifolia (L) R. BR ocupa espaço em outros países além de seu continente de origem como uma planta ornamental e medicinal. As exigências mínimas de recursos naturais para sobrevivência, tais como, poucos nutrientes, crescimento em solos arenosos, rochosos, argilosos e em acostamentos e rodovias permitiram a sua introdução em várias partes do mundo (CRUZ et al., 2011).

Diversos países têm reportado o uso medicinal e os efeitos terapêuticos com os extratos de diferentes partes da espécie *Leonotis nepetifolia*. Esse conhecimento produzido coloca a espécie em destaque como promissora na busca de moléculas bioativas e na produção de novos fitoterápicos e fármacos. Para uso popular as partes da planta são preparadas de diferentes formas, infusão, decocção e maceração (MAREGESI et al., 2007).

Figura 2- Mapa global de distribuição geográfica de *Leonotis nepetifolia*.



Fonte: www.discoverylife.org.

Pesquisadores da Índia investigaram o efeito biológico dos diferentes extratos das folhas, caule e flores e o óleo essencial da espécie *Leonotis nepetifolia*, demonstrando a existência de forte atividade contra as seguintes bactérias: *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, além da atividade antioxidante, larvicida e pesticida (PRAKASH et al., 2012; UDAYA et al., 2013), atividade antioxidante e eficiência contra células cancerígenas. O óleo essencial de *Leonotis nepetifolia* também apresentou inibição de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, além de possuir atividade antifúngica (VEERABADRAN et al., 2013; GOPAL et al., 1994).

Na África *Leonotis nepetifolia* é bastante utilizada por comunidades tradicionais como uma planta medicinal. As tribos de índios fazem o uso das folhas em cigarros em seus rituais religiosos devido às propriedades alucinógenas (LI et al., 2012).

A partir de estudos conduzidos com a espécie na África foram apresentadas as seguintes atividades biológicas: Segundo Lacroix et al. (2011) o extrato das fases acetato de etila e metanólica das folhas de *L. nepetifolia* possuem atividade antiplasmodial contra o parasita *Plasmodium falciparum*. O extrato etanólico e aquoso (planta inteira) de *Leonotis nepetifolia* foram testados em camundongos demonstrando, atividade antinociceptiva na dose única de 250 mg/kg, apresentando um decréscimo no número de contorções abdominais induzidas por ácido acético 0,6% (MAKAMBILA-KOUBEMBA et al., 2011). Atividade anti-convulsante, antibacteriana e antifúngica também foram relatadas (AYANWUYI et al., 2009; MAREGESI et al., 2008).

Estudos conduzidos no Brasil com a espécie *Leonotis nepetifolia* apresentaram atividades antibacteriana, anticâncer e antioxidante (DAVID et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2015; SOBOLEWSKA et al., 2012). Além dos estudos das atividades farmacológicas com o extrato e o óleo essencial de *Leonotis nepetifolia*, estudos de fitoquímica com a espécie descreveram a presença de vários constituintes químicos, sendo eles: terpenoides, flavonoides, alcaloides, fitoesteróis e saponinas (TRIVEDI et al., 2011, TAKEDA et al., 1999).

3.5 Aspectos gerais sobre dor

3.5.1 Dor e nocicepção

A dor é caracterizada muitas vezes como um estímulo negativo para o ser humano, porém para nosso corpo a sensação dolorosa provocada por agentes lesivos possui papel fisiológico importante, servindo como um sinal de alerta, desencadeando respostas de defesa a fim de evitar possíveis danos ao organismo (ALMEIDA et al., 2004).

Grande parcela da população é acometida por algum tipo de dor, influenciando na qualidade de vida das pessoas. Dados da Sociedade Brasileira para o Estudo da Dor (SBED) apontam que a dor é uma das principais causas de incapacitação para o trabalho causando sofrimento, afetando tanto o emocional quanto as condições financeiras. Pelo menos 30% da população sofrem com algum

tipo de dor em algum momento da vida, sendo que 10 a 40% dos indivíduos a dor ultrapassa o período de um dia, causando assim um mal estar (SEBED, 2009).

A dor é considerada o principal motivo de procura da população por assistência à saúde. As estimativas indicam que no Brasil 50 milhões de pessoas sofrem com algum tipo de dor, sendo considerada como um grave problema de saúde pública (FORNI et al., 2012).

A Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) conceitua a dor como sendo uma experiência sensorial e emocional desagradável que está relacionada à lesão tecidual real ou potencial, ou descrita em função dessa lesão (MCDUGALL, 2011). Ao contrário da dor que envolve os aspectos emocionais, a nocicepção está relacionada ao processo fisiológico da percepção da dor, referindo-se à ativação de receptores sensoriais (nociceptores) especializados na transdução de estímulos que chegam até o sistema nervoso central, fornecendo informações sobre a possível lesão do tecido (FEIN, 2011).

Devido à dor envolver um componente emocional relacionado com os quadros dolorosos, além do sensorial, geralmente o termo dor é utilizado exclusivamente para os seres humanos (COUTAUX et al., 2005).

Como os animais não conseguem expressar a dor de forma verbal os componentes subjetivos da dor, o termo adequado para avaliação da dor em outros animais é a nocicepção e antinocicepção e em seres humanos é adotado dor e analgesia (JONES, 1996; LOESER e TREEDE, 2008).

A dor pode ser classificada quanto à sua origem, do ponto de vista fisiológico, como sendo nociceptiva, neuropática, neurogênica, inflamatória e psicogênica. A dor nociceptiva está relacionada à lesão dos nociceptores, alterando sua estrutura anatomo-funcional, liberando vários mediadores químicos nos tecidos. A dor neuropática resulta da disfunção de um nervo psicogênico, atribuído a fatores psicológicos. A dor neurogênica ocorre por um dano direto nas inervações. Já a dor inflamatória está relacionada à ativação da cascata de citocinas através da sensibilização de neurônios. Já a dor psicogênica está associada a fatores psicológicos (MILLAN, 2002).

A dor ainda pode ser classificada como aguda e crônica de acordo com tempo de duração. A aguda é um tipo de dor que após a ativação local dos nociceptores, gerada por um estímulo lesivo do tecido, apresenta um curto tempo de duração, desaparecendo antes da restauração do tecido lesado (MILLAN, 2002). A dor crônica persiste por um período prolongado de tempo e está relacionada com processos lesivos do sistema nervoso central (SNC) ou periférico (ALMEIDA et al., 2004).

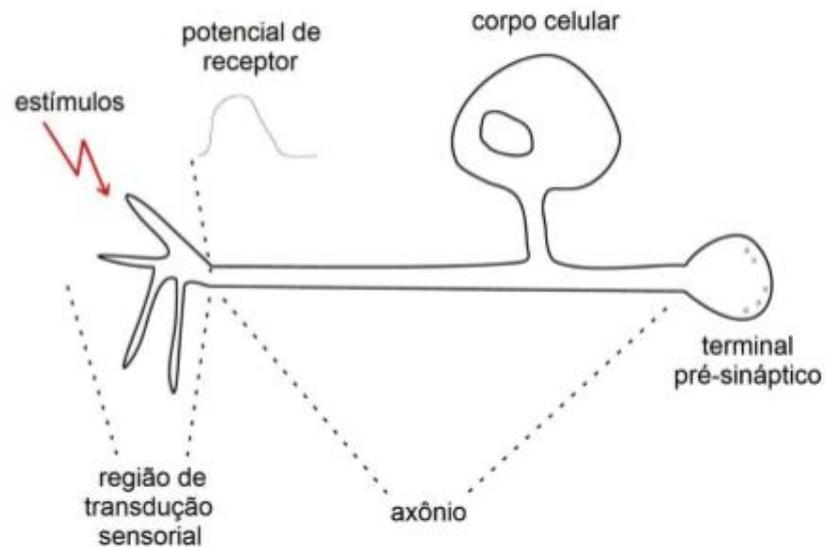
3.5.2 Nociceptores

O termo nociceptor significa um receptor para estímulos nociceptivos, sendo descrito como terminações livres de neurônios aferentes primários (KLAUMANN et al., 2008). Os nociceptores são encontrados dispersos por todo o corpo, innervando órgãos internos, a pele, músculos e articulações (Figura 3), (JULIUS; BASBAUM, 2001). Possui como função básica enviar o fluxo de informações aos neurônios de ordem superior sobre a lesão tecidual ocasionada por estímulos nocivos que podem ser estímulos químicos, térmicos e mecânicos, podendo provocar lesão ao tecido resultando em uma sensação de dor.

Sabendo que diferentes estímulos dos nociceptores resultam na sensação de dor, algumas possibilidades são descritas para explicar como isso é possível. Uma delas é que existem vários tipos de nociceptores, e cada um deles possui sensibilidade a um estímulo específico, outro defende que os nociceptores individuais são sensíveis a todos os estímulos diferentes (FEIN, 2011).

Os nociceptores são classificados segundo o tipo de estímulo que é possível detectar, estando classificados em quatro classes: térmicos, mecânicos, polimodais e silenciosos. Os nociceptores térmicos respondem às temperaturas extremas, quentes ($> 45\text{ }^{\circ}\text{C}$) ou frias ($< 5\text{ }^{\circ}\text{C}$). Os mecânicos respondem à pressão intensa. Os nociceptores polimodais respondem aos diversos estímulos nocivos, químicos, térmicos e mecânicos. Já os nociceptores silenciosos são ativados por estímulos químicos e mediadores inflamatórios e após sua ativação respondem a estímulos térmicos e mecânicos (FEIN, 2011).

Figura 0-1- Esquema de um nociceptor.



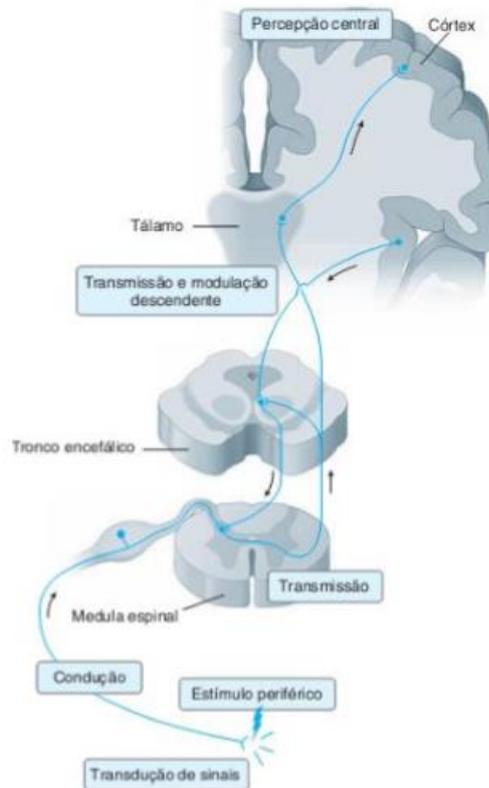
Fonte: FEIN (2011).

3.5.3 Vias nociceptivas

O processo de percepção da dor está relacionado com a ativação de nociceptores envolvendo uma cascata de eventos fisiológicos, os quais iniciam na periferia e são transmitidos ao longo das vias sensoriais (BASBAUM; JESSEL, 2000). A partir do reconhecimento dos estímulos nocivos por receptores específicos, esse sinal é convertido em um potencial de ação, e encaminhado para ser interpretado no sistema nervoso central (MILLAN, 1999).

Os eventos que levam à ativação de uma cascata de eventos até a integração dos sinais da dor envolvem diferentes áreas, sendo elas: nociceptores periféricos, vias acendestes da medula espinhal, projeções corticais e integração no cérebro localizado principalmente no tálamo (Figura 4) (CALVINO; GRILO, 2006).

Figura 4- Vias de transmissão da dor.



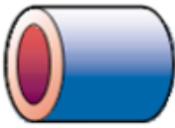
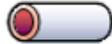
Fonte: Adaptado de GOLAN et al. (2009).

A velocidade de condução do estímulo nociceptivo está relacionada com o tipo de fibras do nociceptor, podendo ser mielinizadas (fibras do tipo A) ou amielinizadas (fibras do tipo C). As fibras podem ser classificadas em três tipos, de acordo com o diâmetro, velocidade de condução e estrutura, sendo elas: fibras do tipo C, fibras A- β e fibras A- δ (Tabela 1) (RANG et al., 2012,).

As fibras mielinizadas do tipo A β possuem maior diâmetro (10 μm), a presença de mielina aumenta a velocidade de condução dos impulsos nervosos (30-100 m/s), porém, a maioria dos nociceptores é do tipo C não mielinizada, as quais são fibras de pequeno (0,4-1,2 μm) e médio diâmetro (2-6 μm). Já as fibras pouco mielinizadas são do tipo A δ (JULIUS; BASBAUM, 2001). Essas fibras conduzem a dor em uma série de eventos neurofisiológicos. As fibras nociceptivas sensoriais primárias realizam conexões com neurônios secundários do corno dorsal da medula espinhal, posteriormente os neurônios do corno dorsal fazem a transmissão dos

estímulos nociceptivos levando a informação até o encéfalo, os neurônios terciários encaminham a informação até o córtex cerebral (ALMEIDA et al., 2004).

Tabela 1- Os tipos de fibras responsáveis pela condução de estímulos nociceptivos.

Tipos de fibras	A α e A β	A δ I e II	C
			
Mielinização	Muita	Pouca	Ausente
Diâmetro (μ m)	10	2 – 6	0,4 – 1,2
Velocidade de condução (m/s)	30 – 100	1,2 – 30	0,5 – 2
Temperatura	Não reconhece	Tipo I > 53°C Tipo II > 43°C	> 43°C
Tipo de sinal	Propriocepção Toque leve	Térmico, mecânico e químico	Térmico, mecânico e químico

Fonte: adaptado de JULIUS; BASBAUM, (2001).

Os nociceptores são ativados logo após uma lesão tecidual liberando vários mediadores químicos tais como: glutamato, bradicinina, prostaglandinas, substância P, histamina, serotonina, interleucina-1 β (IL- β), interleucina-18 (IL-18), peptídeo relacionado ao gene de calcitonina (CGRP) e citoninas como o fator de necrose tumoral- α (TNF α) (GILCHRIST; ALLARD; SIMONE, 1996).

São conhecidas cinco vias ascendentes no processo de transmissão da informação nociceptiva da medula espinhal para o tálamo e o córtex, sendo elas: os tratos espinotalâmico, espinoreticular, espinomesencefálico, cervicotalâmico e espinohipotálâmico (PINTO, 2000). Todas essas conexões participam nas respostas neuroendócrinas e autonômicas induzidas pela dor.

O trato espinotalâmico origina-se nos neurônios de segunda ordem das lâminas I e V, sendo dividido em trato paleoespinotalâmico medial, o qual conduz a dor lenta, efetuando sinapses com estruturas bulbares e mesencefálicas antes de

alcançar a estrutura talâmica, projetando-se para o córtex e insula e o trato neoespinotalâmico lateral, que conduz as informações nociceptivas em alta velocidade. O trato espinoreticular são axônios de neurônios das lâminas VII e VIII, terminando na formação reticular, ascendendo até o tálamo. Trato espinomesencefálico compreende axônio de neurônios de projeções das lâminas I e IV projetando-se até a formação reticular mesencefálica e a substância cinzenta periaquedutal. Trato espino-hipotalâmico é formado por axônios provenientes das lâminas I e V (LAMONT, TRANQUILLI, 2000; PISERA, 2005).

3.5.4 Mecanismo da dor central e periférica: inflamatória

O processo de sensibilização central está relacionado com alterações de impulsos periféricos aumentando ou reduzindo o limiar desses impulsos. Uma sequencia de impulsos em fibras do tipo C aumentam os sinais em neurônios espinhais carreando a mensagem até o encéfalo. Após lesões do tecido periférico várias substâncias são liberadas (neurotransmissores) como: substância P, somatostatina, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, neurocinina-A, glutamato e aspartato. Todas elas estão relacionadas com a ativação de potenciais pós-sinápticos excitatórios e dos receptores *N*-metil-*D*-aspartato (NMDA) (ROCHA et al., 2007). Essas substâncias podem ativar as terminações nervosas livres, resultando na excitação, produzindo um potencial de ação, os quais são levados para o SNC gerando a interpretação da dor (NETO et al., 2009).

A dor inflamatória possui função preventiva, indicando uma lesão tecidual promovendo a redução da propagação do agente etiológico, evitando lesões tissulares futuras (LAPA et al., 2003). De acordo com Neto et al. (2009), a dor inflamatória é entendida como o resultado da interação entre o tecido danificado e os neurônios sensoriais periféricos, com a participação de mediadores inflamatórios, sendo eles: bradicinina, serotonina, óxido nítrico (NO) e histamina. Os mediadores inflamatórios atuam na ativação da cascata de segundos mensageiros influenciando canais iônicos, enzimas e proteínas de sinalização intracelular nos nociceptores, aumentando a excitabilidade do neurônio, diminuindo o limiar de disparo e aumentando a frequência de potenciais de ação produzidos durante uma estimulação supralimiar (BASBAUM; WOOLF, 1999; PASSOS et al., 2007).

A via de produção das prostaglandinas e leucotrienos a partir do ácido araquidônico também está presente logo após a indução do processo inflamatório. Além desses, as células do sistema imunológico (mastócitos, macrófagos, linfócitos e plaquetas) são enviadas para o local da inflamação liberando outros mediadores químicos, incluindo fatores de crescimento e citocinas como interleucina-1 (IL-1) e fator de necrose tumoral- α (TNF- α) (KIDD; URBAN, 2001; KLAUMANN et al., 2008).

3.6 Aspectos gerais sobre inflamação

A inflamação é uma resposta fisiológica desencadeada com a finalidade de combater agressões teciduais, invasões de microrganismos ou agentes nocivos, seja ela de natureza infecciosa ou não, potencializando o reparo ao dano tecidual, sendo fundamental para o equilíbrio homeostático (ASHLEY et al., 2012)

Essa resposta fisiológica é provocada pelo sistema imunológico o qual atua no reconhecimento rápido dos agentes causadores do processo inflamatório, eliminando-os através da fagocitose e pela indução da cascata de inflamação (SKELDON; SALEH, 2011).

Na resposta inflamatória vários mediadores químicos são liberados sequencialmente, bem como ocorre a migração de células de defesa (leucócitos) para o local da inflamação após a ativação (HANADA; YOSHIMURA, 2002). Atualmente são conhecidos quatro sinais cardinais do processo inflamatório sendo eles (FIGURA 5): rubor, dor, calor e edema a além de um quinto sinal clínico característico na inflamação aguda que na crônica, que o a perda da função (COTRAN, 2006).

Figura 5- Sinais cardinais do processo inflamatório: calor, rubor, edema, dor e perda da função.



Fonte: MACEDO, (2014).

O processo inflamatório pode ser dividido em duas fases, a aguda e a crônica. A fase inicial da inflamação é considerada como a aguda, possuindo início rápido e um período de duração curta. É um estágio de inflamação que ocorre algumas reações como: alteração da microvasculatura, presença de neutrófilos e de monócitos que vão diferenciar em macrófagos, além de fibroblastos que vão tentar restabelecer a estrutura do tecido lesado (POBER; SESSA, 2007; SHERWOOD; TOLIVER-KINSKY, 2004).

A inflamação crônica é de longa duração estando relacionada com alterações histológicas com a presença de linfócitos e macrófagos, proliferação de vasos sanguíneos, fibrose e necrose tecidual. Durante o processo inflamatório ocorrem dois eventos simultâneos: eventos vasculares e celulares (BRASILEIRO-FILHO, 2007, COLLINS, 2000).

3.6.1 Eventos vasculares e celulares do processo inflamatório

Logo após estímulos inflamatórios alguns mediadores são liberados, desencadeando os eventos vasculares. Esses eventos iniciam-se de imediato e desenvolvem-se durante as primeiras horas após o estímulo inflamatório. Nesse processo alguns mediadores são produzidos no local inflamado, tais como: peptídeos vasoativos, aminas vasoativas, fragmentos de componentes do complemento, as citocinas, as quimiocinas, enzimas proteolíticas e mediadores lipídicos (SERHAN, CHIANG, VAN DYKE, 2008). Nesse processo inicial da inflamação ocorrem algumas alterações nos vasos sanguíneos, visando melhorar o fluxo de células e proteínas plasmáticas vindo da circulação para o local infeccionado ou lesado (KUMAR et al., 2005).

Depois da lesão os sinais da inflamação são rapidamente desenvolvidos, promovendo a vasodilatação e o extravasamento de células. Logo em seguida acontece a vasoconstrição, iniciada pela liberação de catecolaminas e produção de prostaglandinas pelas células lesadas. O aumento da permeabilidade vascular provoca o edema pelo extravasamento dos vasos, liberando proteínas de alto peso molecular para o interstício (ALLER et al., 2007).

Os eventos celulares são caracterizados pela saída de células circulantes da luz do vaso e migração de leucócitos para o local da inflamação. Os leucócitos participam efetivamente no processo inflamatório na defesa do organismo, destruindo agentes patogênicos através da fagocitose, contribuindo para a restauração do tecido lesado (BOYTON; OPENSHAW, 2002). Além dos linfócitos, outras células como neutrófilos, monócitos e células “natural killer” migram para o local inflamado em resposta à presença de mediadores químicos (citocinas e quimiocinas) gerados no local. (NOURSHARGH; MARELLI- BERG, 2005).

Alguns eventos na passagem dos leucócitos dos vasos para o local de inflamação são considerados, sendo eles: marginação, rolamento, adesão, diapedese e quimiotaxia. A migração dos leucócitos para o local inflamando está relacionada com a interação química entre moléculas com propriedades adesivas (proteínas), expressas pela superfície de células endoteliais conhecidas como moléculas de adesão (BRASILEIRO – FILHO, 2009).

As selectinas (E, P e L- selectinas) são um grupo de moléculas que possuem papel importante no processo inflamatório. São responsáveis pela adesão de leucócitos ao endotélio, interagindo com moléculas como açúcares ou glicoconjugados na cascata de eventos do processo inflamatório. As P-selectinas participam apenas do rolamento, as E-selectinas participam tanto do rolamento quanto na adesão de leucócitos ao endotélio e a L-selectina realiza ligação entre leucócitos (MILES et al., 2008; MITCHELL et al., 2006).

As selectinas interagem com o ligante diminuindo a velocidade dos neutrófilos permitindo que as proteínas (integrinas) realizem ligações firmes das células com o endotélio. Essas moléculas de adesão indicam às células o local específico de ação podendo ancorar em células ou em tecidos específicos (ROSSITER et al., 1997). As selectinas apresentam fraca adesão aos leucócitos seguindo de rolamento e adesão firme. A adesão firme ocorre pela ligação estável mediada por imunoglobulinas, principalmente por moléculas de adesão de célula endotelial e plaquetas presentes no endotélio, denominadas de integrinas β -2. Esse fenômeno é realizado por integrinas e imunoglobulinas que estão presentes na superfície dos leucócitos (WAGNER; ROTH, 2000).

3.6.3 Mediadores inflamatórios

No processo inflamatório vários mediadores químicos são produzidos pela ativação de uma resposta aos agentes patogênicos ou agressores. Esses mediadores são secretados por células ou derivados de proteínas do plasma podendo alterar o funcionamento de tecidos e órgãos. As células que produzem essas substâncias químicas são: leucócitos especializados (macrófagos e mastócitos), ou células presentes no tecido lesado (MEDZHITOV, 2008).

Os mediadores químicos envolvidos nesse processo podem ser de origem tissular ou de origem plasmática. Os de origem tissular são os eicosanoides, citocinas, óxido nítrico, neuropeptídios, fator de ativação plaquetária (PAF) e as aminas vasoativas. E os mediadores de origem plasmática são os sistemas de coagulação, do complemento, das cininas e fibrinolítica (RANG et al., 2012). A liberação de aminas vasoativas, serotonina e histamina provocam alteração nos

vasos sanguíneos, promovendo a vasodilatação e aumentando a permeabilidade vascular (MEDZHITOV, 2008). Os lipídios atuam na inflamação como moléculas sinalizadoras, regulando uma variedade de respostas celulares. A produção desses lipídios acontece a partir da hidrólise através das enzimas fosfolipases. Uma dessas vias de produção ocorre pelo processo metabólico convertendo o ácido araquidônico em eicosanoides pela ativação das enzimas ciclooxigenases (COX-1 e COX-2,) responsáveis pela produção de prostaglandinas, tromboxanos ou pela via da lipoxigenase gerando leucotrienos e lipoxinas (HUWILER; PFEILSCHIFETER, 2009).

As citocinas participam da resposta imune e inata e adaptativa nos eventos inflamatórios. São proteínas ou glicoproteínas de baixo peso molecular variando entre 8 a 30 kDa (CHABALGOITY et al., 2007). As citocinas mais conhecidas são: TNF (fator de necrose tumoral) e as interleucinas (IL) (IL-1 α , IL-1 β , IL-1Ra e IL-18) tendo papel importante na patofisiologia da inflamação, regulando inicialmente a manutenção das respostas inflamatórias ou o término dessas reações (MORI et al., 2011).

O fator de necrose tumoral (TNF) promove a geração de uma cascata de eventos no momento da lesão. O TNF provoca a liberação das interleucinas, dentre elas a interleucina IL-1 β e a IL-8. A IL-1 β atua aumentando a expressão da enzima ciclooxigenase produzindo prostaglandinas e a IL-8 atua na liberação de aminas simpatomiméticas (BASBAUM; JULIUS, 2006; VALE, 200). Esses mediadores inflamatórios também participam da transmissão nociceptiva. Um grupo como as citocinas e prostaglandinas promove a hiperalgesia, sensibilizando os nociceptores e o outro grupo das cininas (bradicinina) e neuropeptídeos ativam os nociceptores sensibilizados (MILLAN, 1999).

PARTE EXPERIMENTAL



4 PARTE EXPERIMENTAL

4.1 Coleta e identificação do material vegetal

O material botânico (folhas) da espécie de *Leonotis nepetifolia* foi obtido em março de 2016 a partir da planta cultivada em um horto comunitário de plantas medicinais S 9° 23' 36, 852" / O 40° 32' 47,616" no município de Petrolina-PE. O material botânico foi identificado por um biólogo por comparação de uma exsicata depositada no herbário no Herbário Vale do São Francisco (HVASF) na Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF), com número de identificação 4454 (Figura 6).

Figura 6- Exsicata da espécie *Leonotis nepetifolia* depositada no HVASF.



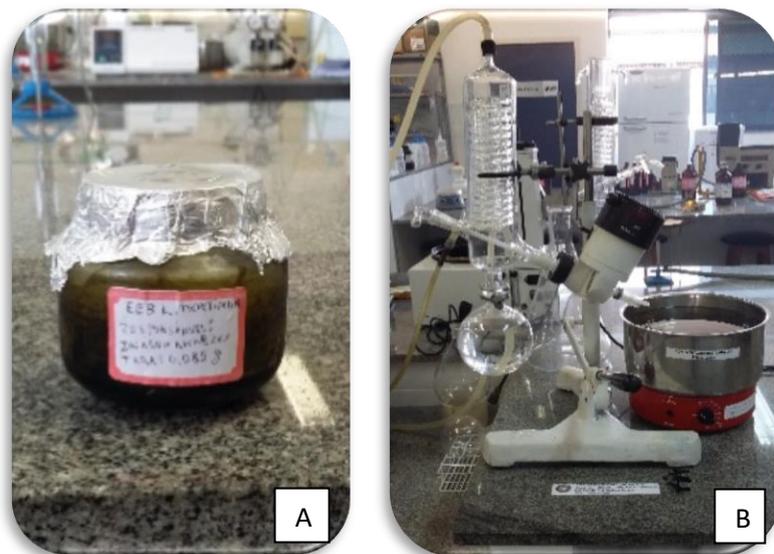
Fonte: Oliveira (2014).

4.2 Obtenção do extrato etanólico bruto das folhas de *Leonotis nepetifolia*

As folhas da espécie *Leonotis nepetifolia* foram secas em uma estufa de ar circulante com temperatura de 40 °C por um período de 72 horas. Posteriormente o material seco foi pulverizado em moinho de facas, obtendo 82 gramas do material vegetal seco e pulverizado.

O material seco foi submetido ao processo de maceração exhaustiva com etanol 95%. Várias extrações foram realizadas com intervalos de 72 horas entre cada extração com renovação do líquido extrator. Posteriormente o extrato etanólico bruto de *Leonotis nepetifolia* (EEB-Ln) (Figura 7A) foi obtido a partir da evaporação da solução extrativa em um evaporador rotatório a uma temperatura de 50 °C sobre vácuo (Fig 7B).

Figura 7- Extrato etanólico bruto de *Leonotis nepetifolia* (A) e evaporador rotatório (B).



Fonte: Autoria própria.

4.3 Análise fitoquímica preliminar do extrato etanólico bruto de *Leonotis nepetifolia*.

Buscando identificar as principais classes de metabólitos secundários presentes no extrato etanólico bruto de *Leonotis nepetifolia*, realizamos a triagem fitoquímica preliminar do extrato em cromatografia em camada delgada analítica (CCDA). Nesse teste o conjunto de técnicas utilizadas para rastrear os compostos é baseado em reagentes de coloração ou formação de precipitado que revelam a presença de metabólitos secundários em um extrato.

Para as classes específicas de constituintes químicos, tais como saponinas, esteroides, alcaloides, flavonoides e taninos foram realizados testes para uma possível identificação da presença desses metabólitos no EEB-Ln. O extrato foi avaliado em placas cromatográficas de sílica gel com suporte de alumínio, aplicados com micropipeta e eluídos em diferentes sistemas de solventes, conforme descrito por Wagner e Bladt (1996), procurando-se identificar os principais grupos do metabolismo secundário (Tabela 2).

Tabela 2- Sistema de eluição e reveladores utilizados para a caracterização dos principais metabólitos secundários presente no extrato etanólico bruto de *Leonotis nepetifolia*.

Classe química do metabólito	Sistema eluente	Padrão	Revelador
Alcaloides gerais	Tolueno:acetato de etila: dietilamina (70:20:10)	Yoimbina Quinina	Dragendorff
Antocianinas	Acetato de etila: Ácido fórmico:ácido acético glacial:água (100:11:11:26)	Azul de metileno	Anisaldeído sulfúrico
Antraquinonas agliconas	Éter de Petróleo:acetato de etila: ácido fórmico (75:25:1)	Antraquinona	Ácido fosfomolibdico/ H ₂ SO ₄ etanólico 10%

Tabela 2 – (Continuação) Sistema de eluição e reveladores utilizados para a caracterização dos principais metabólitos secundários presente no extrato etanólico bruto de *Leonotis nepetifolia*.

Classe química do metabólito	Sistema eluente	Padrão	Revelador
Triterpenos e esteroides	Tolueno:clorofórmio:etanol (40:40:10)	Lupeol Sitosterol	Lieberman-Burchard
Xantinas	Acetato de etila:Metanol:água (100: 13,5: 10)	Cafeína	Iodo- KI-HCl
Flavonoides	Acetato de etila:ácido fórmico:ácido acético glacial:água (100:11:11:26)	Rutina Quercetina	Polietilenoglicol
Cumarinas	Tolueno:éter etílico (1:1 saturado com ácido acético 10%)	Escopoletina	KOH etanólico 10%
Derivados antracênicos	Acetato de etila:metanol:água (100:13,5:10)	Aloína	KOH etanólico 10%
Lignananas	Clorofórmio:metanol:água (70:30:4)	Extrato de linhaça	Vanilina fosfórica
Naftoquinonas	Tolueno:ácido fórmico (99:1)	Biflorina Lapachol	KOH etanólico 10%
Saponinas	Clorofórmio:ácido acético:metanol:água (64:32:12:8)	Saponina	Anisaldeído sulfúrico
Taninos condensados	Acetato de etila:ácido acético glacial:ácido fórmico:água (100:11:11:26)	Catequina Epicatequina	Vanilina clorídrica

Fonte: WAGNER e BLADT (1996), com adaptações.

4.3.1 Análise por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada a Detector de Arranjo de Diodos (CLAE-DAD)

As análises com o EEB-Ln foram realizadas utilizando um cromatógrafo líquido Shimadzu® (LC-20 AT) equipado com um amostrador automático (SIL - 20 A) e um detector de arranjo de diodos (SPD-M20A) controlado pelo software LC-Solution® 1.0. O extrato foi submetido à análise nas seguintes condições cromatográficas: a fase estacionária utilizada foi uma coluna C18 com dimensões de 250 x 4,6 mm e tamanho de partícula de 5 µm (Agilent®); a fase móvel foi composta da solução A: acetonitrila (ACN) e solução B: 0,01% (v/v) de ácido trifluoracético (TFA), seguindo o gradiente descrito na tabela 3, com fluxo de 0,8 mL/min e volume de injeção de 5 µL. A temperatura da coluna foi mantida constante em 30 °C durante toda a análise.

Tabela 3- Sistema gradiente utilizado nas análises por CLAE-DAD

	Tempo	Solução A (%)	Solução B (%)
Gradiente	0 - 60 min	10 – 40	90 – 60
Gradiente	70 min	10	90
Isocratico	70-75	10	90

Fonte: Autoria própria.

Todas as soluções foram degaseificadas e filtradas através de membrana filtrante de 0,22 µm (Chromafil® Xtra, EUA), antes de serem analisadas no cromatógrafo. A detecção foi realizada em DAD no comprimento de onda de 340 e 270 nm.

4.4 Animais

Foram utilizados camundongos albinos Swiss (*Mus musculus*) de ambos os sexos, pesando entre 30-40 g, todos procedentes do Biotério Setorial da UNIVASF, Campus Petrolina. Antes dos experimentos, todos os animais foram randomicamente mantidos em gaiolas de polipropileno com ventilação e temperatura (22 ± 2 °C) controladas, em um ciclo claro-escuro de 12 horas, com a fase de luz

iniciando às 6:00 e terminando às 18:00 horas, com livre acesso à ração tipo “pellets” (Labina®) e água.

Os animais foram privados de alimento 12 horas antes dos experimentos, e para adaptação, os mesmos foram transferidos do biotério para o laboratório de fisiologia ou farmacologia 48 horas antes do experimento. Durante este período, os animais foram manipulados apenas para limpeza das caixas. Todos os procedimentos foram conduzidos de acordo com os princípios éticos na experimentação animal, sendo aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal do Vale do São Francisco - UNIVASF sob o número 0009/150616 (ANEXO A).

4.5 Toxicidade aguda

Com o objetivo de investigar a toxicidade em dose única de 2 g/kg de EEB-Ln, os camundongos foram divididos em dois grupos (o grupo experimental e o grupo controle) composto por 5 machos e 5 fêmeas (n = 10). O grupo controle recebeu o veículo (salina 0.9% + tween 80), e o grupo experimental recebeu o pré- tratamento o EEB-Ln, na dose 2,0 g/kg via oral (v.o). Posteriormente, os animais foram observados durante 14 dias para avaliar da presença de mortes e sinais de toxicidade. Outros parâmetros tais como: peso corporal, consumo de alimento e água foram monitorados diariamente, durante todo o estudo. No 15º dia os animais foram eutanasiados para retirada dos órgãos (coração, fígado, baço, pulmão, rins, estomago e pâncreas) e avaliação macroscópica.

4.5.1 Triagem comportamental

A triagem comportamental foi realizada seguindo os parâmetros descritos por Almeida (2006) (ANEXO A). Os animais foram observados em 0,5, 1, 2, 3 e 4 h após a administração do extrato etanólico bruto da espécie estudada. Comportamentos específicos (piloereção, ptose palpebral, contorções abdominais, convulsões, catatonia, tremores, paralisia das patas dianteiras, sedação, ambulação aumentada,

resposta ao toque diminuída, movimentação intensa das vibrissas, agressividade, estereotipia, analgesia e defecação) foram observados e classificados.

4.5.2 Análise macroscópica e peso relativo dos órgãos

No final do experimento no 15º dia os animais foram eutanasiados e os seguintes órgãos foram retirados, pulmão, coração, fígado, baço, pâncreas, estômago e rins, esquerdo e direito, de cada animal, para posterior análise. Os órgãos foram lavados imediatamente em solução salina, seguindo-se de verificação da análise macroscópica de cada órgão e o índice do peso relativo dos órgãos utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{Peso relativo dos órgãos} = \frac{\text{Peso absoluto do órgão (g)}}{\text{Peso do animal no dia do sacrifício (g)}} \times 100$$

4.6 Atividade antinociceptiva

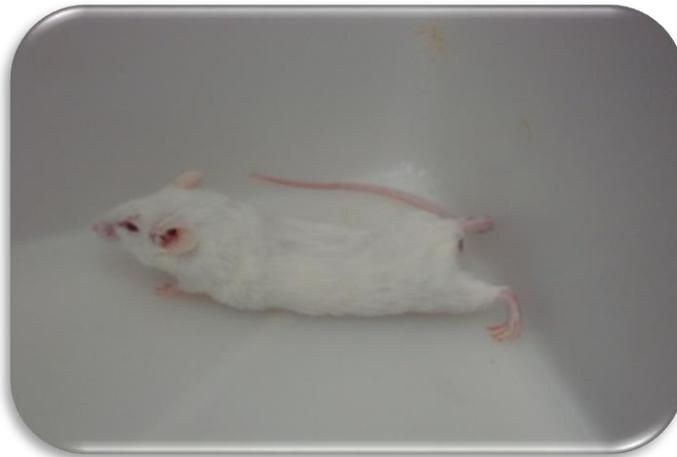
4.6.1 Teste de contorções abdominais induzidas pela injeção intraperitoneal de ácido acético 0,9%

Para o teste de contorções abdominais os camundongos foram divididos em cinco grupos com seis animais cada (n=30). A nocicepção foi induzida por uma injeção de ácido acético 0,9% administrado por via intraperitoneal (i.p.) em um volume de 0,1 mL/10 g. Este teste foi realizado de acordo com o método descrito por Collier et al. (1968) com modificações.

Os animais foram tratados com EEB-Ln (100, 200 e 400 mg/kg), ou com veículo (salina 0.9% + tween 80) administrados por via oral (v.o.) 1 hora antes do agente nociceptivo. Foi utilizado como droga padrão a morfina (10 mg/kg) sendo administrada via intraperitoneal (i.p) 30 minutos antes do agente indutor da nocicepção.

Após a injeção do agente indutor da dor (ácido acético), o número de contorções abdominais uma resposta consistindo de contração da parede abdominal, rotação pélvica, seguida de extensão dos membros posteriores foi registrado entre 5 - 15 minutos após administração (Figura 8) (QUEIROZ et al., 2010).

Figura 8- Contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos.



Fonte: <http://www.neplame.univasf.edu.br/atividade-antinociceptiva.html>.

4.6.2 Teste de nociceção induzida por formalina

Para o teste da formalina o método utilizado foi similar ao descrito por Hunskaar & Hole (1987). A solução de formalina (2,5% em salina 0,9%) foi administrada por via subplantar na pata posterior direita, em um volume de 20 μ L/pata (SANTOS et al., 2010).

Posteriormente os camundongos foram observados em uma câmara com um espelho montado em três lados permitindo a visão das patas (Figura 9). Como indicador da dor foi mensurado o tempo (em segundos) gasto lambendo e mordendo a pata injetada. Esta resposta foi medida durante 5 minutos (primeira fase, dor neurogênica) e entre 15 - 30 minutos após a injeção da formalina (segunda fase, dor inflamatória) (ALMEIDA et al., 2011).

Os animais receberam veículo (salina 0.9% + tweek 80), EEB-Ln (100, 200 e 400 mg/kg, v.o.) morfina (10 mg/kg, i.p.) e indometacina (20 mg/kg) administrados 1 hora ou 30 minutos antes da injeção de formalina (n= 6 por grupo).

Figura 9- Animal lambendo a pata após aplicação da injeção de formalina na região subplantar na pata posterior direita.



Fonte: <http://www.neplame.univasf.edu.br/atividade-antinociceptiva.html>.

4.6.3 Teste de nociceção induzida por calor (placa quente)

No teste da placa quente foram utilizados camundongos divididos em cinco grupos (n=6). Esses foram pré-selecionados no aparelho de placa quente (Insight, Brasil), na temperatura de $55 \pm 0,5$ °C. Os animais que apresentaram um tempo de reação (definido como latência para levantar ou lamber as patas) maior que vinte segundos foram excluídos. Os camundongos selecionados foram pré-tratados com veículo (salina 0.9% + tweek 80, v.o.), EEB-Ln (100, 200 e 400 mg/kg, v.o.), ou morfina (10 mg/kg, i.p.).

Cada animal foi colocado sobre a placa quente mantida à temperatura de 55 °C (Figura 10) e a latência foi medida em 30, 60, 90 e 120 min após a administração do veículo, extrato e morfina (ALMEIDA et al., 2011). Um tempo de corte de 20 s foi

escolhido para indicar completa analgesia e para proteger o animal de lesão tecidual. A latência foi medida para cada animal.

Figura 10- Animal no teste da placa quente.



Fonte: <http://www.neplame.univasf.edu.br/atividade-antinociceptiva.html>.

4.7 Sistemas envolvidos no mecanismo de ação do extrato etanólico bruto de *Leonotis nepetifolia*.

4.7.1 Envolvimento da via opioide

Para avaliar a participação do sistema opioide no efeito antinociceptivo de EEB-Ln, grupos distintos de animais foram pré-tratados com naloxona, antagonista opioide não seletivo (1,5 mg/kg, i.p.), 30 minutos antes da administração do EEB-Ln (400 mg/kg) ou morfina agonista opioide (10 mg/kg, i.p.). Após um período de 30 e 60 minutos os animais foram analisados no modelo de contorções induzidas por ácido acético.

4.7.2 Envolvimento dos canais para K⁺ sensíveis ao ATP

O papel dos canais para potássio sensíveis ao ATP sobre o possível efeito antinociceptivo de EEB-Ln foi determinado com a administração de glibenclamida (2 mg/kg, i.p.) 30 minutos antes dos animais receberem o EEB-Ln (400 mg/kg, v.o.), diazóxido (3 mg/kg, i.p.) ou veículo (salina 0.9% + tween 80, v.o.). Após 30 ou 60 minutos do tratamento, os animais foram submetidos ao teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético como descrito anteriormente.

4.7.3 Envolvimento dos receptores serotoninérgicos 5-HT₃

Para verificar o papel dos receptores serotoninérgicos sobre o efeito antinociceptivo de EEB-Ln foi administrado a ondansetrona, antagonista 5-HT₃, (0,5 mg/kg, i.p.) 30 minutos antes dos animais receberem o extrato na dose que apresentou melhor efeito antinociceptivo (400 mg/kg, v.o.) ou veículo (salina 0.9% + tweek 80). Após 30 ou 60 minutos, os animais foram submetidos ao teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético como descrito anteriormente (HESS, 2006).

4.7.4 Envolvimento do sistema colinérgico

Com o intuito de investigar a participação do sistema colinérgico sobre a atividade antinociceptiva extrato etanólico bruto de *L. nepetifolia*, os animais foram pré-tratados com o antagonista colinérgico muscarínico não-seletivo atropina (1 mg/kg, i.p.) 30 minutos antes da administração de EEB-Ln (400 mg/kg, v.o.). Após 30 a 60 minutos do tratamento, os animais foram analisados no modelo de contorções induzidas por ácido acético como descrito anteriormente.

4.7.5 Envolvimento do sistema L-arginina- óxido nítrico

O papel do NO sobre o possível efeito antinociceptivo de EEB-Ln foi determinado pela administração de veículo (salina 0.9% + tween 80, v.o), L-arginina

(600 mg/kg; i.p.), ou com o inibidor da síntese de óxido nítrico *N ω* – nitro-L-arginina (L-NOARG, 50 mg/kg, i.p.). Os animais receberam L-NOARG 30 minutos antes de receber L-arginina e foram submetidos ao teste após mais 30 minutos. Outro grupo de animais recebeu EEB-Ln (400 mg/kg) na dose que apresentou melhor efeito antinociceptivo e após 30 min receberam L-arginina (600 mg/kg; i.p.). Após 30 a 60 minutos do tratamento, os animais foram submetidos ao teste das contorções abdominais induzidas por ácido acético como descrito anteriormente.

4.8 Teste da coordenação motora (rota rod)

No teste de coordenação motora o método utilizado foi proposto por Dunham e Miya (1957). O aparelho do rota-rod (Insight, Brasil) é constituído de uma barra, subdividida em quatro compartimentos. Nesse teste, o animal é colocado sobre uma barra giratória de 2,5 cm de diâmetro com velocidade constante (7 rpm) por 180 s verificando a capacidade do animal em equilibrar-se sobre ela. Esse teste permite avaliar se os tratamentos promovem alteração na coordenação motora nos animais por sedação e/ou relaxamento muscular (LAPA et al., 2003).

Os animais utilizados foram previamente selecionados 24 h antes da realização do teste. Aqueles que permaneceram por um período igual a 60 s em pelo menos uma das três tentativas estavam aptos para participar do teste (ALMEIDA, 2006). Os camundongos que foram selecionados receberam o tratamento com EEB-Ln (100, 200 e 400 mg/kg v.o), veículo (salina 0.9% + tween 80, v.o) e diazepam (2,5 mg/kg i.p.). Após a administração, os animais foram colocados individualmente na barra giratória (sentido contrário ao movimento da barra) e foi registrado o tempo de permanência do animal na barra (SANTOS-JUNIOR et al., 2005). Os animais foram observados em diferentes intervalos de tempo (30, 60, 90 e 120 minutos) após os pré-tratamentos (Figura 11).

Figura 11- Animal na barra giratória no teste de coordenação motora (rota rod).



Fonte: <http://www.neplame.univasf.edu.br>.

4.9 Teste de atividade anti-inflamatória

4.9.1 Edema de pata induzido por carragenina

Para avaliação da atividade anti-inflamatória foi utilizado o modelo de edema de pata induzido por carragenina 2%, injetada em um volume de 20 μ L/animal na região subplantar da pata direita do camundongo de acordo com WINTER et al., (1962). Os animais foram divididos em seis grupos, e o tratamento com EEB-Ln (100, 200 e 400 mg/Kg, v.o), veículo (salina 0.9% + tween 80, v.o) ou indometacina (20 mg/Kg, i.p) foi realizado 1 h antes da injeção da carragenina ou salina.

O volume da pata foi mensurado mediante as medidas de variação de volume produzidas pela imersão das patas dos animais até o maléolo lateral do calcânhar, utilizando o aparelho pletismômetro (PanLab LE 7500, Espanha) antes (VA, basal) da administração intraplantar da carragenina e 1, 2, 3, 4 h após (VB) (HUANG et al., 2012). A formação do edema em mL foi calculada por $(VB-VA)/VA$, onde VA é o volume da pata direita anterior à injeção da carragenina, e VB é o volume da pata direita após a injeção da carragenina (SULEYMAN et al., 1999).

4.9.2 Edema de pata induzido por histamina

O edema no camundongo foi induzido por injeção de 100 µg/pata de histamina (CAVALHER-MACHADO et al., 2008). Camundongos foram divididos em três grupos de seis animais cada. Os animais foram pré-tratados com EEB-Ln (400 mg/kg, v.o.), veículo (salina 0.9% + tween 80, v.o) 1 h antes da injeção de histamina ou salina. O volume foi mensurado antes da injeção intraplantar de histamina ou salina (VA, basal) e 30, 60, 90 e 120 min após (VB) (SULEYMAN et al., 1999). A inibição do edema de pata foi calculada como descrito no teste do edema de pata induzido por carragenina.

4. 11 Análise estatística

Os dados obtidos foram analisados através do programa GraphPad Prism, versão 5.0, e expressos como média ± erro padrão da média (e.p.m). Diferenças estatisticamente significativas entre os grupos foram calculadas pela aplicação de uma análise de variância (ANOVA) one-way seguido do teste de Tukey ou pelo teste t de Student não pareado, conforme exigido pelo protocolo experimental. Foram considerados significativos valores de $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO



5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Triagem fitoquímica

As plantas medicinais apresentam uma diversidade de compostos naturais com propriedades biológicas interessantes, utilizadas para o tratamento de várias doenças. Os extratos vegetais são um complexo formado por vários metabólitos secundários, tais como, flavonoides, esteroides, terpenoides e ente outros. Essas substâncias isoladas ou em conjunto são as responsáveis pelos efeitos terapêuticos promovidos pelas plantas medicinais.

Através da triagem fitoquímica preliminar por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA) foi constatada a presença das seguintes classes de metabólitos secundários: flavonoides, terpenoides e derivados antracênicos. No entanto não ocorreu reação positiva para antocianinas, antraquinonas, cumarinas, lignanas, naftoquinonas, saponinas, taninos, xantinas e derivados cinâmicos (Tabela 4).

Tabela 4- Identificação das principais classes de metabólitos secundários presente no extrato etanólico bruto das folhas de *Leonotis nepetifolia*.

Classe química de metabólitos	Resultado
Alcaloides	+
Antocianinas	-
Antraquinonas	-
Cumarinas	-
Derivados antracênicos	+
Derivados cinâmicos	-
Flavonoides	++
Lignanas	-
Mono, sesqui e diterpenos	+
Naftoquinonas	-

Onde: (-): ausência do constituinte, (+) leve presença do constituinte, (++) moderada presença do constituinte. **Fonte:** Autoria própria.

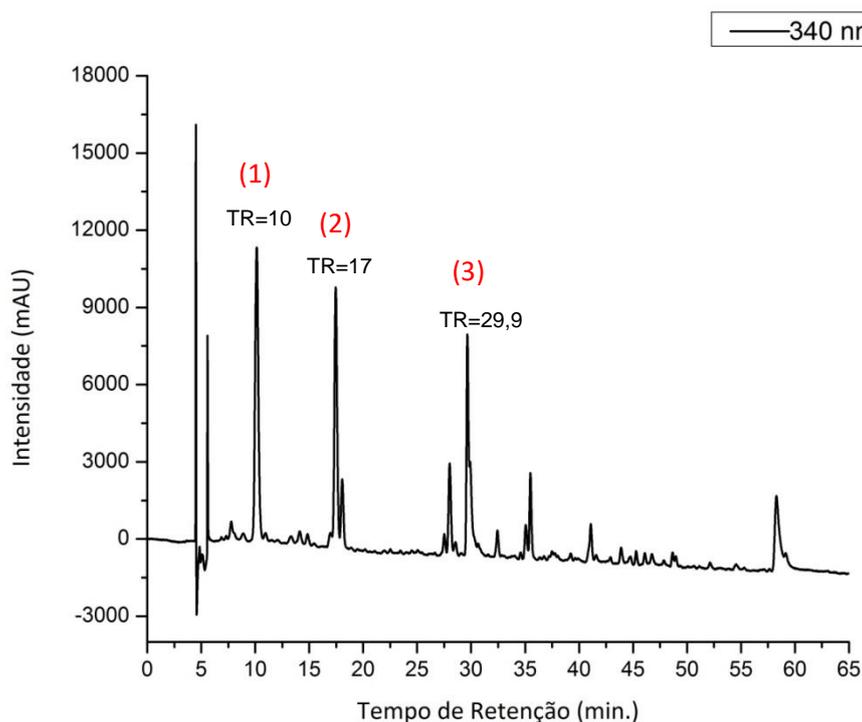
Tabela 4 – (continuação) Identificação das principais classes de metabólitos secundários presente no extrato etanólico bruto das folhas de *Leonotis nepetifolia*.

Classe química de metabólitos	Resultado
Saponinas	-
Taninos	-
Xantinas	-

Onde: (-): ausência do constituinte, (+) leve presença do constituinte, (++) moderada presença do constituinte. **Fonte:** Autoria própria.

Para determinar o perfil cromatográfico de EEB-Ln, o mesmo foi submetido à análise por CLAE-DAD. Os constituintes químicos presentes na amostra do extrato foram verificados através da comparação dos picos de absorção máxima dos espectros de ultravioleta com os padrões disponíveis para análise (Figura 12).

Figura 12- Cromatograma das folhas do extrato etanólico bruto de *Leonotis nepetifolia* (EEB-Ln).



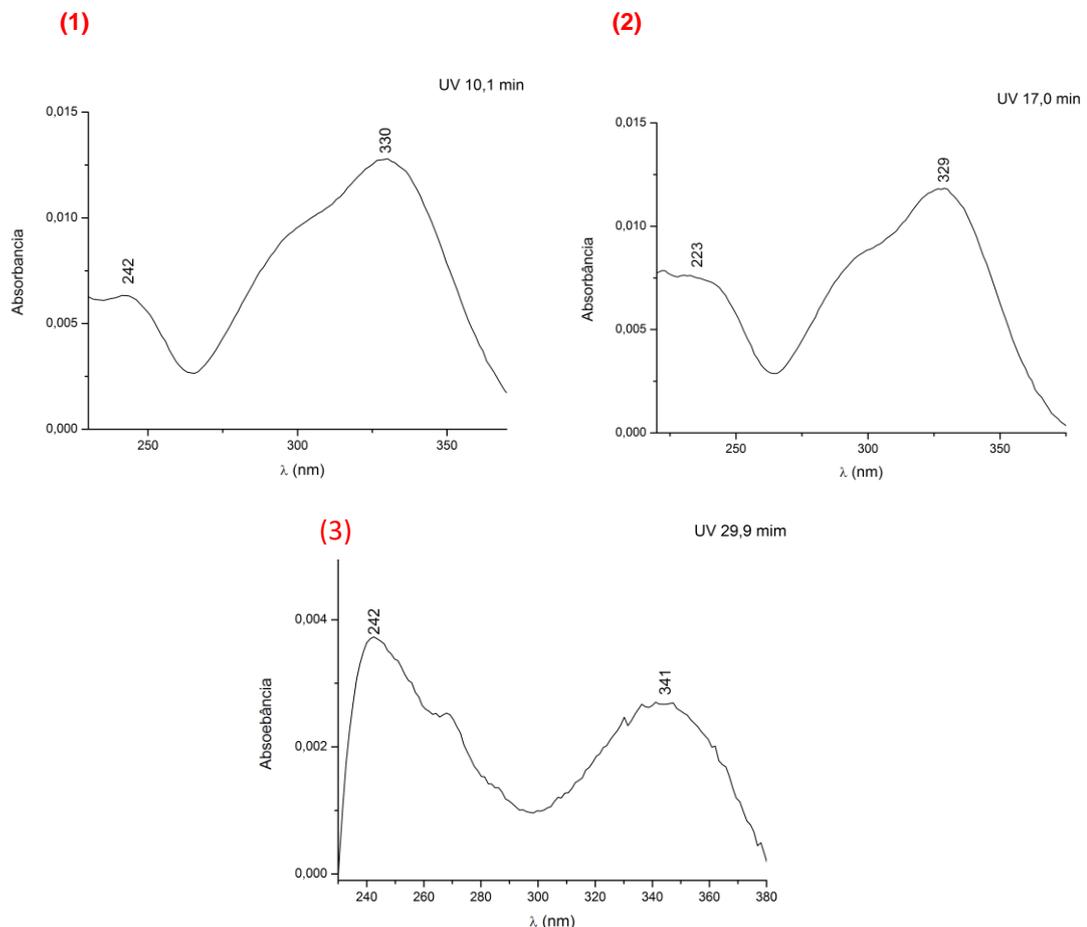
Fonte: Autoria própria.

A partir das análises foi possível identificar três picos no cromatograma, os quais apresentaram tempo de retenção de (1) 10,0, (2) 17,0 e 29,9 minutos, respectivamente.

Os picos encontrados não são característicos de nenhum padrão analisado, porém pode ser suposto que esses picos correspondem à classe dos flavonoides, uma vez que os picos de absorção máxima encontrados no espectro de UV são característicos desses metabólitos secundários. A classe dos flavonoides possuem espectros de absorção característicos no UV, com dois máximos de absorção, onde um ocorrendo entre 240-285 nm (banda II) e o outro entre 300-400 nm (banda I). A banda II se dá pela absorção do sistema benzoil do anel A e a banda I está associada à absorção do sistema cinamoil do anel B (ZUANAZZI; MONTANHA, 2010; NUNES, 2011).

As análises do espectro de ultravioleta (UV-visível) para cada pico detectado encontram-se apresentadas na Figura 13, abaixo.

Figura 13- Espectros de absorção no UV-Vis dos picos detectados no cromatograma do extrato etanólico bruto de *Leonotis nepetifolia* (EEB-Ln).



Fonte: Autoria própria.

A tabela 5 apresenta o tempo de retenção (Tr), o comprimento de onda de absorção máxima ($\lambda_{\text{máx}}$) e a possível classe de metabólitos secundários dos picos identificados no cromatograma.

Tabela 5- Classe de metabólitos, tempos de retenção e $\lambda_{\text{máx}}$ dos picos detectados no cromatograma do extrato etanólico de *Leonotis nepetifolia* (EEB-Ln).

Picos detectados no EEB-Ln	Tr (min)	$\lambda_{\text{máx}}$ (nm)	Classes de metabólitos secundários
1	10,0	242/330	Flavonoide
2	17,0	223/329	Flavonoide
3	29,9	242/341	Flavonoide

Fonte: Autoria própria.

Estudos conduzidos com a espécie de *Leonotis nepetifolia* têm reportado uma gama de compostos químicos, dentre eles os terpenóides, flavonoides e cumarinas. Li et al., (2012) isolaram dois flavonoides (Apigenina e Cirsiliol) e terpenóides das folhas de *Leonotis nepetifolia*. Em um trabalho desenvolvido por Purushothaman et al. (1976), foi isolado uma nova cumarina. Sendo assim esses estudos corroboram com as classes identificadas no EEB-Ln (flavonoides e terpenóides) através da triagem fitoquímica preliminar por cromatografia em camada delgada analítica e o os picos identificados na análise por CLAE-DAD, os quais são característicos de flavonoides.

5. 2 Estudo toxicológico

5.2.1 Toxicidade aguda do extrato etanólico de *Leonotis nepetifolia*

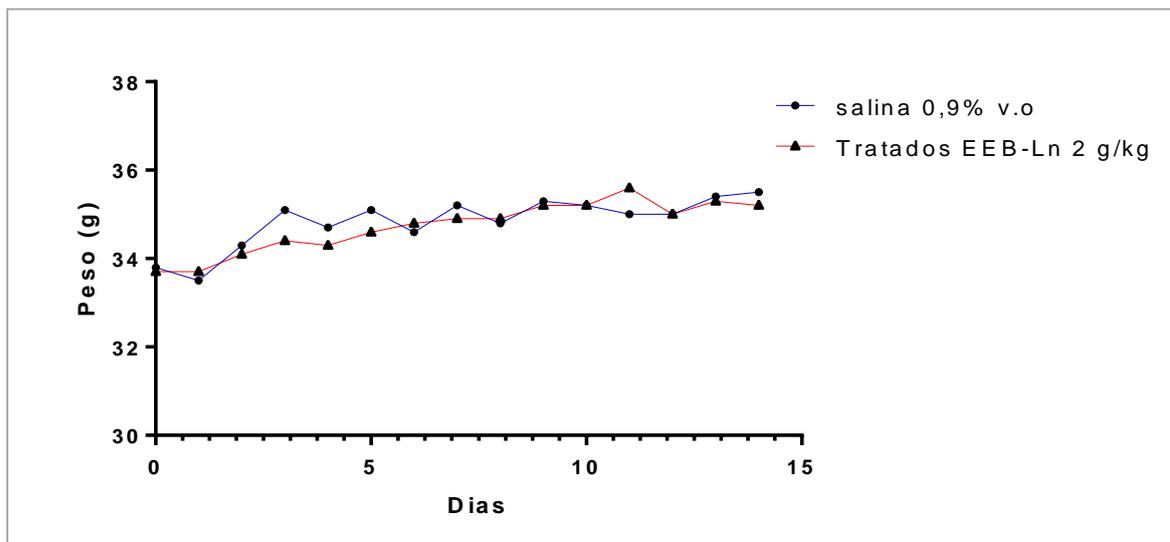
Para investigar o perfil de segurança do extrato etanólico bruto de *Leonotis nepetifolia* foi realizado o teste de toxicidade aguda de dose única (2 g/kg, v.o) em camundongos. Esse teste de avaliação de toxicidade aguda permite classificar uma substância segundo o seu potencial de letalidade de acordo com os parâmetros estabelecidos pela legislação, determinando a capacidade dos extratos e fármacos causar danos à saúde humana (VALADARES, 2006). Nesse modelo experimental

geralmente são utilizados roedores de preferência fêmeas devido suas alterações fisiológicas hormonais tornando mais susceptível aos efeitos tóxicos (HAYES, 2007).

A administração do extrato etanólico bruto de *Leonotis nepetifolia* (2 g/kg, v.o) nos camundongos machos e fêmeas não apresentou alterações comportamentais, e nenhum animal demonstrou sinais de toxicidade quando avaliados na triagem comportamental segundo os critérios estabelecidos por ALMEIDA et al., (2006). Esses resultados corroboram com um estudo de toxicidade aguda na dose de 5 g/kg, v.o, do extrato hidroetanólico de *Leonotis nepetifolia*, realizado por OLIVEIRA et al., (2012), onde não foi constatado morte ou alterações comportamentais dos animais, contribuindo com o perfil de segurança de EEB-Ln.

A avaliação do peso corporal dos animais durante os 14 dias não apresentou diferença estatística significativa entre o grupo tratado com EEB-Ln (2 g/kg, v.o) e o controle (salina 0,9%) (Figura 14), como também não houve morte de animais, evidenciando uma ausência ou baixa toxicidade do extrato. De acordo com SANGEETHA et al., (2013), a maioria dos animais quando são expostos a substâncias tóxicas apresentam uma perda de peso corporal, durante os dias de exposição, com redução do tecido adiposo e muscular dos animais.

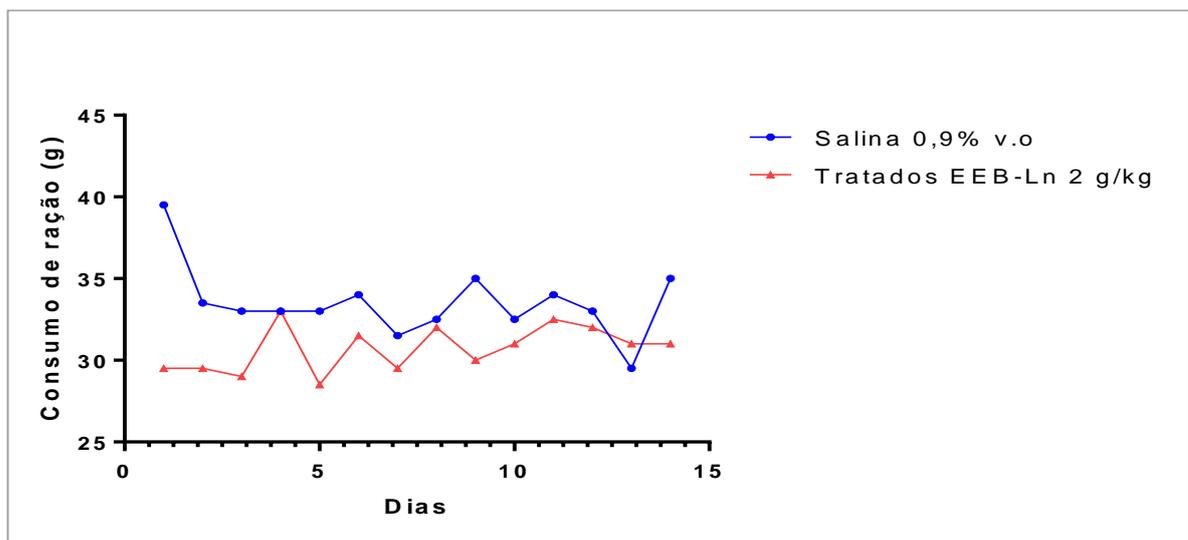
Figura 14- Efeito do tratamento com solução salina 0,9% e dose única de EEB-Ln (2 g/kg), por via oral, durante os 14 dias sobre o peso diário dos animais.



Os resultados foram expressos como *média ± erro padrão da média (E.P.M.)*. As análises foram realizadas por teste “t” de Student, considerando diferença estatística quando $p < 0,05$. **Fonte:** Autoria própria.

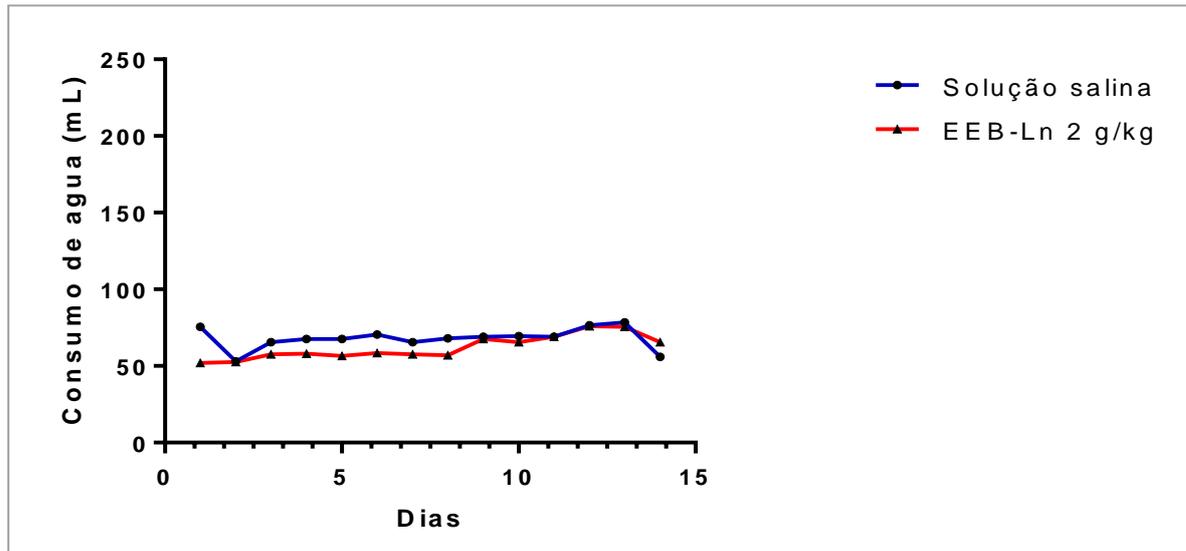
Nas análises do consumo de ração e água dos camundongos durante os 14 dias houve diferença estatística ($P < 0,05$) entre o grupo controle e o grupo tratado com EEB-Ln (2 g/kg). Houve uma diminuição no consumo de ração (Figura 15) e aumento no consumo de água dos animais tratados (Figura 16) com EEB-Ln, sendo a média final do consumo de ração do grupo controle (salina) $33,50 \pm 0,5930$ e o grupo tratado (EEB-Ln) $30,71 \pm 0,3733$. A média do consumo de água dos animais foi de $67,96 \pm 1,862$ do grupo controle e $62,04 \pm 2,092$ do grupo tratado.

Figura 15- Efeito do tratamento com solução salina 0,9% e dose única de EEB-Ln (2 g/kg), por via oral, no consumo de ração, durante os 14 dias.



Os resultados foram expressos como *média ± erro padrão da média (E.P.M.)*. As análises foram realizadas por teste “t” de Student, considerando diferença estatística quando $p < 0,05$. **Fonte:** Autoria própria.

Figura 16- Efeito do tratamento com solução salina 0,9% e dose única de EEB-Ln (2 g/kg), por via oral, no consumo de água, durante os 14 dias.



Os resultados foram expressos como *média ± erro padrão da média (E.P.M.)*. As análises foram realizadas por teste “t” de Student, considerando diferença estatística quando $p < 0,05$. **Fonte:** Autoria própria.

No final dos 14 dias de observação os animais foram eutanasiados e os órgãos foram retirados para avaliação macroscópica e pesagem. Os órgãos (coração, fígado, baço, rins, pulmão, pâncreas e estômago) não apresentaram alterações macroscópicas nas análises.

Na avaliação do peso relativo dos órgãos dos animais tratados com EEB-Ln (2 g/kg, v.o) e solução salina 0,9% houve diferença estatisticamente significativa no peso dos seguintes órgãos: pulmão, coração, rim direito e fígado. As análises do rim esquerdo, baço, pâncreas e estômago não apresentaram diferença significativa no peso relativo dos órgãos quando tratados com EEB-Ln ou salina (Tabela 6). Sendo assim, para caracterização mais precisa de perfil de segurança do extrato é necessária uma investigação mais detalhada através exames bioquímicos e hematológicos, além do estudo de toxicidade de doses repetidas.

Tabela 6 - Avaliação do peso relativo dos órgãos dos animais tratados com solução salina e EEB-Ln (2 g/kg,v.o), no teste de toxicidade aguda.

Peso dos órgãos (g)		
Órgãos	Grupos	
	Solução salina 0,9%	2,0 g/kg
Pulmão	0,85 ± 0,22	0,60 ± 0,06
Coração	0,58 ± 0,02	0,57 ± 0,06
Rim (direito)	0,76 ± 0,04	0,79 ± 0,09
Rim (esquerdo)	0,75 ± 0,06	0,73 ± 0,11
Baço	0,55 ± 0,03	0,52 ± 0,05
Fígado	4,72 ± 0,16	4,97 ± 0,44
Pâncreas	0,52 ± 0,4	0,53 ± 0,04
Estômago	1,16 ± 0,09	1,24 ± 0,11

Os resultados foram expressos como *média ± erro padrão da média (E.P.M.)*. As análises foram realizadas por teste “t” de Student, considerando diferença estatística quando $p < 0,05$. **Fonte:** Autoria Própria.

5.3 Atividade antinociceptiva do extrato etanólico bruto de *Leonotis nepetifolia*

A espécie *Leonotis nepetifolia* tem sido bastante utilizada com finalidade medicinal por comunidades tradicionais e grupos étnicos, as quais têm reportado vários efeitos terapêuticos, dentre eles, o alívio da dor e da inflamação tornando a espécie como sendo promissora na busca de novos fármacos ou fitoterápicos. Nessa perspectiva foi investigado o efeito antinociceptivo e anti-inflamatório do extrato etanólico bruto das folhas de *L. nepetifolia* e alguns possíveis mecanismos de ação de EEB-Ln no bloqueio da nocicepção e da inflamação. Os estudos foram conduzidos com o EEB-Ln utilizando diferentes modelos farmacológicos de dor e inflamação produzindo estímulos químicos e térmicos.

Essa resposta da redução do limiar da dor e da inflamação do EEB-Ln verificada nesse estudo está possivelmente relacionada aos componentes identificados na triagem fitoquímica preliminar (Tabela 3), dentre eles os flavonoides,

os quais são conhecidos pela ação antinociceptiva e anti-inflamatória. Os flavonoides de forma geral atuam no processo da dor inflamatória através da inibição da enzima cicloxigenase (COX) e de alguns estágios da inflamação, diminuindo a permeabilidade capilar presente no início do processo inflamatório e na formação de granulação (BERTOZZI et al., 2017; CARVALHO, 2004).

5.3.1 Teste de contorções abdominais induzidas por injeção intraperitoneal de ácido acético 0,9%

Para investigar o efeito antinociceptivo de EEB-Ln o primeiro teste realizado foi o de contorções abdominais induzidas por injeção intraperitoneal de ácido acético. Esse teste é um modelo experimental clássico para avaliação de dor inflamatória visceral, bastante utilizado na busca inicial de novas moléculas com potencial analgésico e anti-inflamatório. É considerado um teste sensível à substâncias analgésicas de ação central e/ou periférica, além de possuir uma baixa especificidade (CARLINI; MENDES, 2011).

A injeção intraperitoneal de ácido acético provoca estimulação e conseqüentemente a produção e liberação de vários mediadores inflamatórios. Esses mediadores químicos (substâncias endógenas) desencadeiam a excitabilidade de terminações nervosas gerando a dor inflamatória (KURIAN et al., 2006).

Nesse processo de neurotransmissão algica os mediadores endógenos que estão envolvidos são: bradicinina, substância P, prostaglandinas, citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- α), serotonina, capsaicina e outros. Todos esses neurotransmissores atuam na transmissão do potencial de ação entre as células, através da estimulação dos nociceptores periféricos e neurônios sensitivos provocando a dor (LE BARS et al., 2001; MELO et al., 2008). A nocicepção provocada pela injeção de ácido acético também pode ser mediada pela estimulação de canais (pela liberação de prótons H⁺) podendo ativar diretamente receptores transientes vaniloides subtipo 1 (TRPV 1) e canais para cátions não seletivos localizados nas fibras aferentes primárias, conhecidos como canais iônicos sensíveis a ácidos (ASIC).

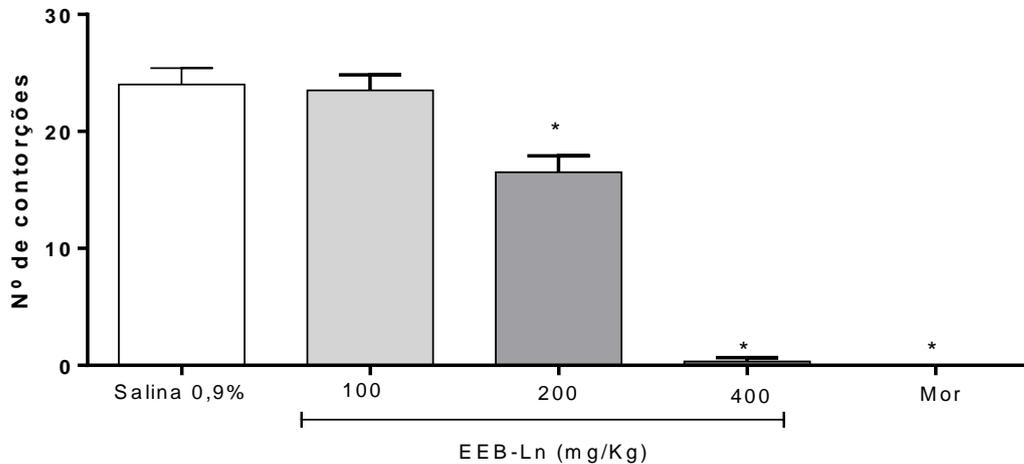
A utilização do modelo de contorção abdominal induzida por ácido acético é bastante vantajoso, pois envolve vias de mediação diferentes, além de provocar condições dolorosas inflamatórias semelhantes aos quadros clínicos provocados por doenças, tais como: artrite reumatoide, mucosite induzida por quimioterápicos no tratamento do câncer e osteoartrite (RAAP et al., 2000). Dessa forma o modelo de contorção abdominal é um teste sensível e bastante utilizado para investigação de extratos de vegetais e biomoléculas, demonstrando o potencial efeito antinociceptivo dessas substâncias.

A administração do extrato etanólico bruto de *Leonotis nepetifolia* nos animais reduziu de forma significativa o número de contorções abdominais provocadas pela injeção intraperitoneal de ácido acético (Figura 17). As doses de 200 e 400 mg/kg, v.o apresentaram inibição do comportamento nociceptivo em 31,25 (16,50 ± 1,41) e 98,62% (0,33 ± 0,33) respectivamente, quando comparados com o grupo que recebeu salina (24,00 ± 1,4) ($p < 0,01$). A morfina apresentou uma redução do número de contorções abdominais de 100% quando comparado com o grupo controle (salina). Houve diferença estatística quando comparadas as doses do EEB-Ln (100, 200 e 400 mg/kg) entre si ($p < 0,05$).

Esse resultado indica que EEB-Ln possui efeito antinociceptivo no modelo experimental utilizado, corroborando o resultado de Makambila-koubemba et al. (2011), onde demonstraram uma redução no número de contorções abdominais induzido por ácido acético quando os animais receberam o tratamento do extrato aquoso e etanólico de *Leonotis nepetifolia* na dose única de 250 mg/kg.

A inibição da nocicepção dos animais após o tratamento como o extrato possivelmente está relacionada às substâncias presentes no extrato, principalmente os flavonoides, os quais são conhecidos por suas propriedades antinociceptiva e anti-inflamatória (CARVALHO, 2004). Esses compostos bioativos provavelmente atuam como agonista ou antagonista de vias específicas da nocicepção, bloqueando a liberação dos mediadores responsáveis pela estimulação dos nociceptores periféricos.

Figura 17- Efeito antinociceptivo do extrato etanólico bruto de *Leonotis nepetifolia* nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg e morfina (Mor, 10 mg/kg), no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético.



Os Valores são expressos em média \pm erro padrão da média, (n = 6). Foram consideradas diferenças estatística significativamente, * $p < 0,05$, comparando os grupos tratados (EEB-Ln, 100, 200 e 400 mg/kg), com o grupo salina 0,9%, através da ANOVA seguido pelo teste de Tukey. **Fonte:** Autoria própria.

No entanto, o teste de contorções isoladamente é incapaz de afirmar se a antinocicepção provocada pelo tratamento com EEB-Ln foi central ou periférica. Sendo assim foram realizados os testes de formalina e da placa quente, a fim de caracterizar de forma mais precisa a atividade antinociceptiva do extrato.

5.3.2 Teste de nocicepção induzido por formalina

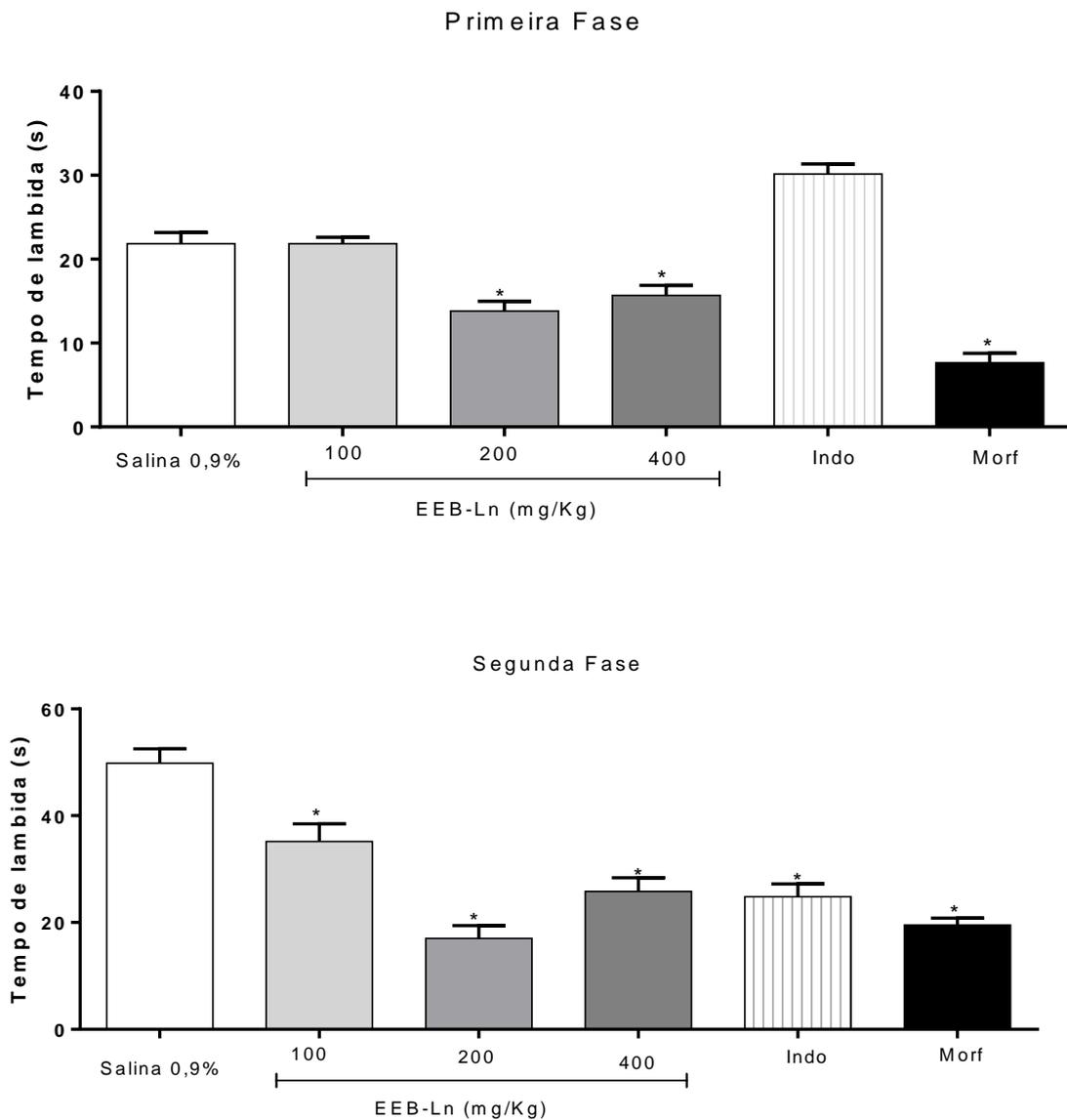
Após o extrato EEB-Ln apresentar atividade antinociceptiva no modelo de contorções abdominais, seguimos para o próximo ensaio experimental com o teste da formalina. Este modelo de dor está associado à lesão tecidual, no qual se quantifica a resposta comportamental provocada pela injeção subcutânea de formalina diluída na pata traseira do animal (MARTINS et al., 2006). Esse teste também possibilita a investigação da ação do extrato, podendo distinguir se possui efeito analgésico central ou periférico. Através do teste da formalina podemos avaliar agentes antinociceptivos por vários mecanismos de ação.

Através desse método é possível a avaliação de dois diferentes tipos de dor ao longo de um período prolongado (dor aguda e inflamatória). Essa resposta comportamental à formalina é conhecida como um padrão bifásico (HUNSKAAR; HOLE, 1987). Após a injeção da formalina inicia-se a primeira fase (dor aguda ou neurogênica) tendo um tempo de duração curta, cerca dos primeiros 5 minutos iniciais. Esse processo está relacionado com a liberação de alguns mediadores químicos (aminoácidos excitatórios, substância P e óxido nítrico) estimulando os nociceptores das fibras aferentes do tipo C e, em parte, das fibras do tipo A δ . A segunda fase da resposta se inicia 20-25 min após a injeção (fase inflamatória). Nessa fase vários mediadores pró-inflamatórios são liberados como bradicinina, prostaglandinas, serotonina entre outros. O período entre as duas fases é denominado intervalo de quiescência, resultado de uma inibição da transmissão nociceptiva através de circuitos supra-espinhais e espinhais. (MARTINS et al., 2006; PERAZA et al., 2007).

O tratamento dos animais com EEB-Ln nas doses de 200 e 400 mg/kg (v.o) reduziu o tempo de lambida da pata quando comparado com o grupo controle ($p < 0,01$) na primeira e na segunda fase no teste da formalina, e a dose de 100 mg/kg apresentou efeito antinociceptivo apenas na segunda fase (Figura 18). Na primeira fase as doses de 200 e 400 mg/kg do extrato reduziram em 36,64 ($13,83 \pm 1,14$) e 28,24% ($15,67 \pm 1,13$) respectivamente, o tempo de lambida da pata dos camundongos em comparação com o grupo que recebeu salina ($21,83 \pm 1,35$). Na segunda fase houve uma redução de 29,00 ($35,17 \pm 1,35$), 65,88 ($17,00 \pm 2,45$) e 48,16% ($25,83 \pm 2,55$) nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg respectivamente em comparação com o grupo que recebeu salina ($48,83 \pm 2,68$).

As drogas padrão indometacina e morfina apresentaram um perfil de inibição diferente nas duas fases, a indometacina reduziu o tempo de lambida da pata apenas na segunda fase, enquanto que a morfina reduziu em ambas as fases ($p < 0,05$). Houve diferença significativa entre as doses de 200 e 400 mg/kg quando comparadas com a dose de 100 na primeira fase ($p < 0,05$), sendo que essa dose não apresentou efeito antinociceptivo. Na segunda fase houve diferença estatística apenas entre as doses de 100 e 200 mg/kg do extrato ($p < 0,05$).

Figura 18- Efeito antinociceptivo do extrato etanólico bruto de *Leonotis nepetifolia* nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg, indometacina (Indo, 20 mg/kg) e morfina (Morf, 10 mg/kg), na primeira e segunda fase do teste da formalina em camundongos.



Os Valores são expressos em média \pm erro padrão da média, (n = 6). Foram consideradas diferenças estatística significativamente, * $p < 0,05$, comparando os grupos tratados (EEB-Ln, 100, 200 e 400 mg/kg), com o grupo salina 0,9%, através da ANOVA seguido pelo teste de Tukey. **Fonte:** Autoria própria.

EEB-Ln apresentou um efeito antinociceptivo maior na segunda fase da formalina (fase inflamatória), indicando um possível efeito anti-inflamatório do extrato. Outra evidência da possível atividade anti-inflamatória do EEB-Ln foi a menor dose de EEB-Ln (100 mg/kg) apresentar analgesia apenas na segunda fase da formalina, uma vez que essa dose testada modelo de contorção abdominal não apresentou atividade antinociceptiva. Drogas que possuem ação central como os opioides, reduzem a nocicepção em ambas as fases. Já as substâncias com perfil anti-inflamatório, como os anti-inflamatórios não esteroidais, atuam por mecanismos periféricos, reduzindo em geral a nocicepção na segunda fase da formalina (BITENCOURT et al., 2008). EEB-Ln foi capaz de diminuir a nocicepção em ambas as fases no teste da formalina, indicando uma ação central e periférica do extrato, embora esse efeito tenha sido mais significativo na segunda fase do teste. Nessa perspectiva foi realizado o teste da placa quente para comprovar se EEB-Ln atua por mecanismo de ação central.

5.3.3 Teste de nocicepção induzida por calor (placa quente)

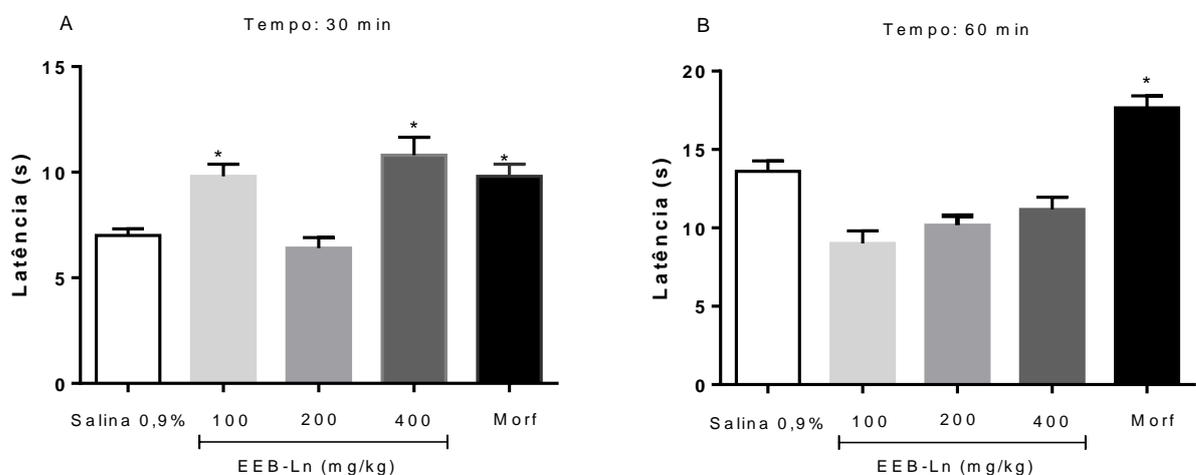
Para verificar se EEB-Ln possui envolvimento do mecanismo central no efeito antinociceptivo foi realizado o teste da placa quente. O teste da placa é um modelo farmacológico clássico, desenvolvido por Woolfe & Macdonald (1944), e até os dias atuais é amplamente utilizado para avaliação específica de substâncias analgésicas com ação central.

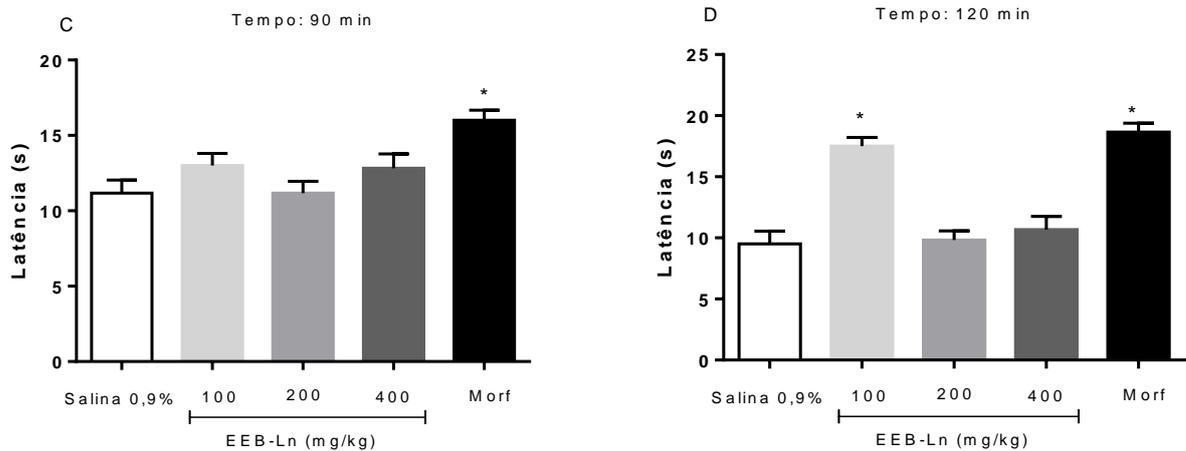
Os analgésicos com ação central aumentam o tempo de resposta no teste da placa quente, como por exemplo, os analgésicos opioides (ONG et al., 2011). O mecanismo de transdução da dor através desse modelo ocorre pela ativação de receptores vaniloides após o estímulo térmico. Os receptores vaniloides do tipo VR-1 e VRL-1 são ativados de acordo com a temperatura. Os VR-1 possuem limiar de ativação em 43 °C, e os receptores do tipo VRL-1 possuem limiar de ativação maior em 52 °C respondendo ao aumento da temperatura. Esses nociceptores ativados estimulam principalmente as fibras do tipo C e A δ as quais conduzem o impulso ao longo do corno dorsal da medula espinhal e, posteriormente, aos centros corticais (JULIUS; BASBAUM, 2001).

Na avaliação do efeito antinociceptivo utilizando o teste da placa quente, os grupos tratados com EEB-Ln nas doses de 100 e 400 mg/kg apresentaram aumento na latência para retirada da pata dos animais da chapa pré-aquecida no tempo de 30 minutos (Figura 19 A), obtendo uma média de $9,80 \pm 0,58$ e $10,80 \pm 0,86$ segundos respectivamente, sendo este valor estatisticamente significativo quando comparado ao grupo tratado com salina 0,9% ($7,00 \pm 0,32$ s). A dose de 100 mg/kg também apresentou aumento na latência para retirada da pata dos animais em 120 minutos (Figura 19 D), obtendo uma média de $17,50 \pm 0,72$ segundos, sendo este valor estatisticamente significativo quando comparado com o grupo tratado com salina 0,9% ($9,50 \pm 0,42$ s).

Os animais que foram tratados com morfina (10 mg/kg, i.p.) apresentaram aumento no tempo de latência para retirada da chapa nos tempos de 30, 60, 90 e 120 minutos (Figura A, B, C e D), sendo estatisticamente significativo quando comparados ao controle salina 0,9% ($p < 0,05$). Esse resultado indica que o EEB-Ln possivelmente possui efeito antinociceptivo por mecanismos de ação central, uma vez que EEB-Ln apresentou resultados antinociceptivos na primeira fase do teste da formalina e no teste da placa quente.

Figura 19- Efeito antinociceptivo do extrato etanólico bruto de *Leonotis nepetifolia* nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg e morfina (Morf, 10mg/kg) no teste da placa quente em camundongo.





Os Valores são expressos em média \pm erro padrão da média, (n = 6). Foram consideradas diferenças estatística significativamente, * $p < 0,05$, comparando os grupos tratados (EEB-Ln, 100, 200 e 400 mg/kg), com o grupo salina 0,9%, através da ANOVA seguido pelo teste de Tukey. **Fonte:** Autoria própria.

5.4 Estudo do mecanismo de ação do efeito antinociceptivo de EEB-Ln

Os resultados obtidos nos testes de contorções abdominais, formalina e placa quente demonstram que EEB-Ln exibe um potente efeito antinociceptivo em camundongos, atuando por mecanismos de ação central e periférico. Sendo assim, foram investigadas algumas possíveis vias de atuação do extrato etanólico bruto de *Leonotis nepetifolia* no efeito antinociceptivo, utilizando alguns antagonistas farmacológicos, os quais bloqueiam os efeitos decorrentes da ativação de receptores específicos, impedindo assim que a substância em estudo possa se ligar a este receptor e promover sua ação. O modelo de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético foi utilizado na investigação das vias de atuação do EEB-Ln na dose de 400 mg/kg.

5.4.1 Envolvimento da via opioide

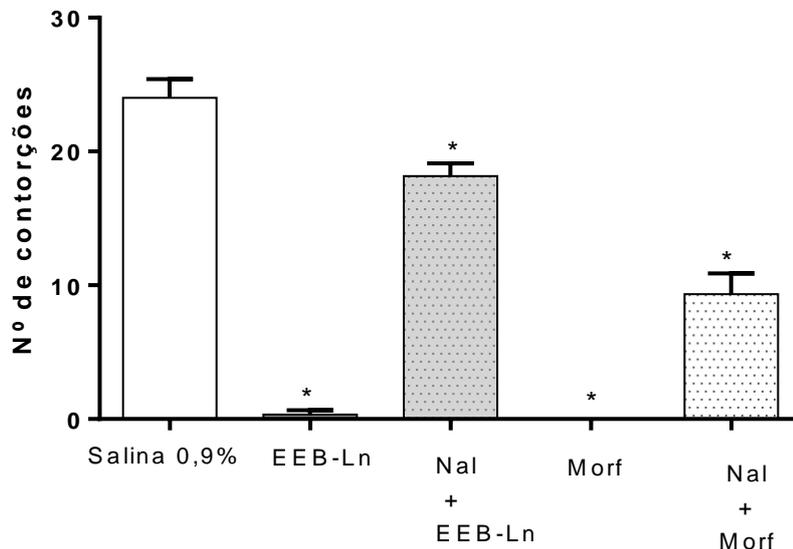
O sistema opioide é uma via importante bastante investigada na busca de novos fitoterápicos e fármacos que tenham ação antinociceptiva nesses receptores. Esse sistema participa do processo de modulação da dor em condições fisiológicas

e inflamatórias (STANFA et al., 1992). Medicamentos com ação opioide são amplamente utilizados na medicina para o tratamento da dor, porém, alguns efeitos adversos como dependência e depressão respiratória são observados, mesmo em doses terapêuticas (GHARAGOZLOU et al., 2003).

O mecanismo do efeito antinociceptivo verificado por fármacos ou fitoterápicos no sistema opioide é desencadeado pela ligação de substâncias agonistas dos receptores (δ , κ e μ) os quais são acoplados a proteína Gi/o, inibindo a atividade da enzima adenililciclase, conseqüentemente diminuindo os níveis de AMPc (adenosina 3',5'- monofosfato cíclico) no meio celular, hiperpolarizando a membrana, levando ao aumento da condutância de potássio (K^+) e à inativação de canais para cálcio (Ca^{2+}), conseqüentemente, diminuindo os neurotransmissores excitatórios (substância P e acetilcolina), nas lâminas II e V no corno dorsal da medula (IMBELLONI, 2001).

A avaliação do envolvimento do sistema opioide no efeito antinociceptivo de EEB-Ln na dose que exibiu maior efeito (400 mg/kg, v.o), foi determinada pela administração da naloxona (1,5 mg/kg, i.p) antagonista dos receptores opioides e morfina (10 mg/kg, i.p) agonista seletivo dos receptores μ . O pré-tratamento com a naloxona (1,5 mg/kg, i.p) reverteu o efeito antinociceptivo do extrato na dose de 400 mg/kg e da morfina (Figura 20) na dose de 10 mg/kg ($p > 0,05$). Houve diferença estatística quando comparadas com o controle e entre si ($p > 0,05$). Esse resultado sugere que há o envolvimento do sistema opioide no efeito antinociceptivo de EEB-Ln.

Figura 20- Influencia do pré-tratamento com naloxona (1,5 mg/kg) no efeito antinociceptivo do extatro etanólico bruto de *Leonotis nepetifolia* (400 mg/kg) e morfina (10 mg/kg), no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético.



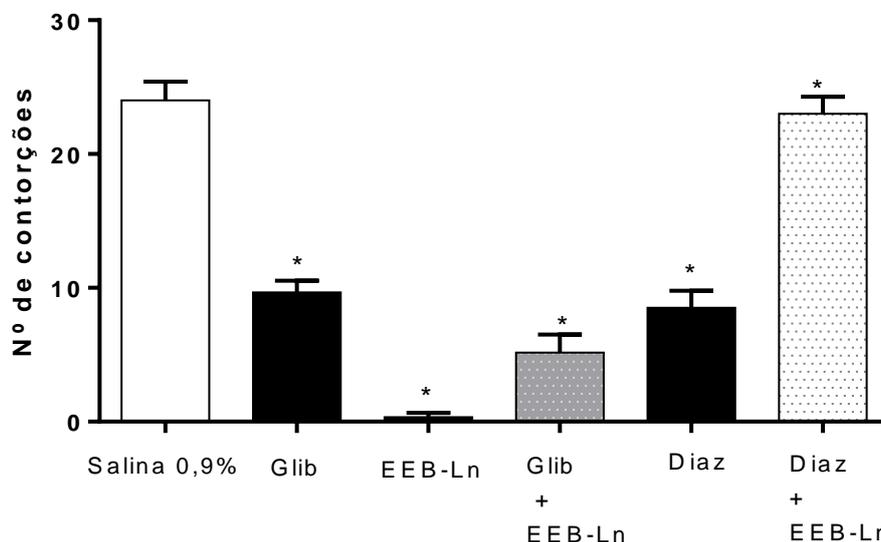
Os Valores são expressos em média \pm erro padrão da média, (n = 6). Foram consideradas diferenças estatística significativamente, * p < 0,05, comparando o grupo tratado (EEB-Ln, (400 mg/kg), com o grupo salina 0,9%, comparado com o grupo Morfina 10 mg/Kg, comparado com o grupo pré-tratado com naloxona e posteriormente com o EEB-Ln, comparado com o grupo pré-tratado com a naloxona e posteriormente com a morfina, através da ANOVA seguido pelo teste de Tukey. **Fonte:** Autoria própria.

5.4.2 Envolvimento dos canais para K⁺ sensíveis ao ATP

Os canais para potássio sensíveis ao ATP participam da atividade elétrica da membrana plasmática das células e estão presentes em diversos tipos de tecidos e células. Esses canais são importantes tanto nas células normais quanto em processos patológicos (AGUILAR-BRYAN et al., 1998). É conhecido que os canais de para potássio sensível ao ATP estão envolvidos na transmissão da dor. O efeito antinociceptivo através dessa via ocorre pela ativação desses canais, alterando o gradiente eletroquímico, promovendo hiperpolarização da membrana celular, diminuindo os níveis de Ca²⁺ intracelular, levando à redução da liberação de neurotransmissores (OCANA et al., 2004).

A investigação da participação dos canais de sensíveis ao ATP no efeito antinociceptivo do EEB-Ln foi determinada pela utilização do bloqueador desses canais (glibenclamida) e do agonista (diazóxido) desses canais. O tratamento dos animais com a glibenclamida (2 mg/kg, i.p), reverteu parcialmente o efeito antinociceptivo de EEB-Ln (400 mg/kg, v.o), no teste de contorções abdominais (Figura 21), sugerindo que pode haver o envolvimento desses canais no mecanismo antinociceptivo do extrato.

Figura 21- Influencia do pré-tratamento com glibenclamida (2 mg/kg) e diazóxido (3 mg/kg) no efeito antinociceptivo do extatro etanólico bruto de *Leonotis nepetifolia* (400 mg/kg) no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético.



Os Valores são expressos em média ± erro padrão da média, (n = 6). Foram consideradas diferenças estatística significativamente, *p < 0,05, comparando com o grupo salina 0,9%, comparando com o grupo tratado EEB-Ln (400 mg/kg), comparando com o grupo pré tratado com diazóxido e posteriormente com 400 mg/Kg do EEB-Ln , comparando com o grupo pré tratado com diazóxido e posteriormente com 2 mg/Kg de glibenclamida, através da ANOVA seguido pelo teste de Tukey.
Fonte: Autoria própria.

5.4.3 Envolvimento dos receptores serotoninérgicos 5-HT₃

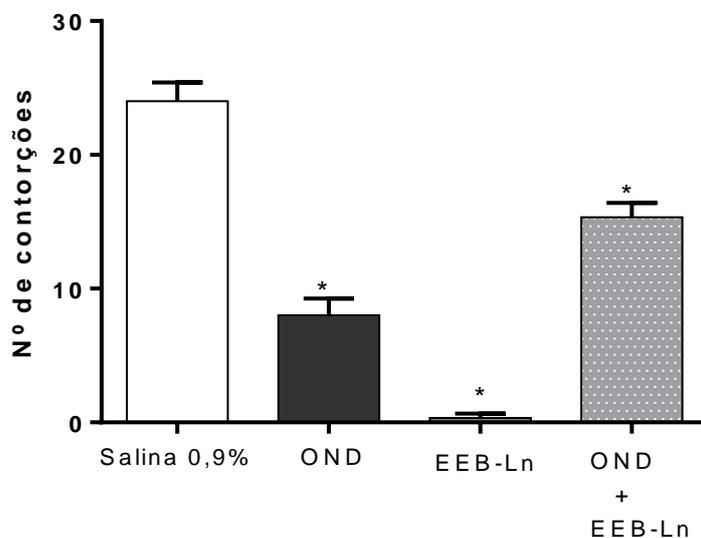
Os receptores serotoninérgicos 5HT₃ estão envolvidos no processo nociceptivo periférico, pois a utilização de bloqueadores seletivos desses receptores apresentou um efeito antinociceptivo em modelo animal (OKAMOTO et al., 2004). Estudos apresentaram a participação desses receptores na inibição descendente da

dor, demonstrando que os neurônios serotoninérgicos projetam-se no tronco espinhal liberando serotonina na medula (RAHMAN et al., 2009).

Para investigar a participação dos receptores serotoninérgicos 5HT₃ no efeito antinociceptivo de EEB-Ln os animais receberam a ondansetrona (0,5 mg/kg, i.p) antagonista do receptor serotoninérgico 5-HT₃. O pré-tratamento com a ondansetrona, no grupo que recebeu EEB-Ln (400 mg/kg, v.o), promoveu uma reversão do efeito antinociceptivo em comparação com o grupo que recebeu apenas o extrato (Figura 22).

Os resultados demonstraram que há o envolvimento do receptor serotoninérgico 5-HT₃ na ação antinociceptiva, devido à ondansetrona reverter o efeito antinociceptivo de EEB-Ln.

Figura 22- Influencia do pré-tratamento com ondansetrona (0,5 mg/kg) no efeito antinociceptivo do extrato etanólico bruto de *Leonotis nepetifolia* (400 mg/kg) no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético.



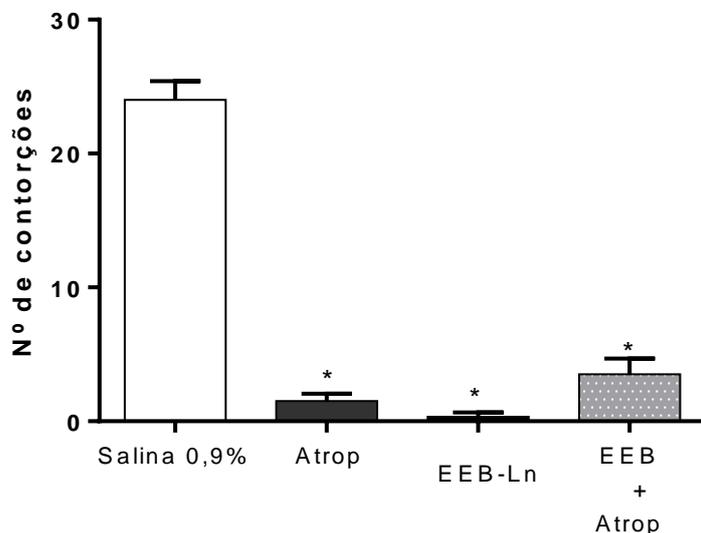
Os Valores são expressos em média ± erro padrão da média, (n = 6). Foram consideradas diferenças estatística significativamente, *p < 0,05, comparando com o grupo salina 0,9%, comparando com o grupo tratado EEB-Ln (400 mg/kg), comparando com o grupo pré tratado com ondanzetrona 2,5 m/kg e posteriormente com 400 mg/Kg do EEB-Ln , comparando com o grupo pré-tratado com ondanzetrona, através da ANOVA seguido pelo teste de Tukey. **Fonte:** Autoria própria.

5.4.4 Envolvimento do sistema colinérgico

O sistema colinérgico está envolvido nos mecanismos de modulação e percepção da dor através da liberação de acetilcolina pela medula espinhal (HABERBERGER et al., 2004). Alguns estudos têm apresentado que o tratamento de animais com agonistas colinérgicos muscarínico ou inibidores da colinesterase promovem a antinocicepção (BARTOLINE et al., 1990).

Em nossos estudos o pré-tratamento dos animais com atropina (1,0 mg/kg, i.p.) antagonista colinérgico muscarínico não seletivo, no grupo que recebeu EEB-Ln não teve reversão significativa no efeito antinociceptivo quando comparado com o grupo que recebeu apenas o extrato e a atropina (Figura 23). Dessa forma não foi evidenciado o envolvimento da via colinérgica no efeito antinociceptivo de EEB-Ln.

Figura 23- Influencia do pré-tratamento com atropina (1,0 mg/kg) no efeito antinociceptivo do exttrato etanólico bruto de *Leonotis nepetifolia* (400 mg/kg) no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético..



Os valores são expressos em média \pm erro padrão da média, n = 6. *p < 0,05 significativamente diferente do grupo controle (ANOVA seguido pelo teste de Tukey). **Fonte:** autoria própria.

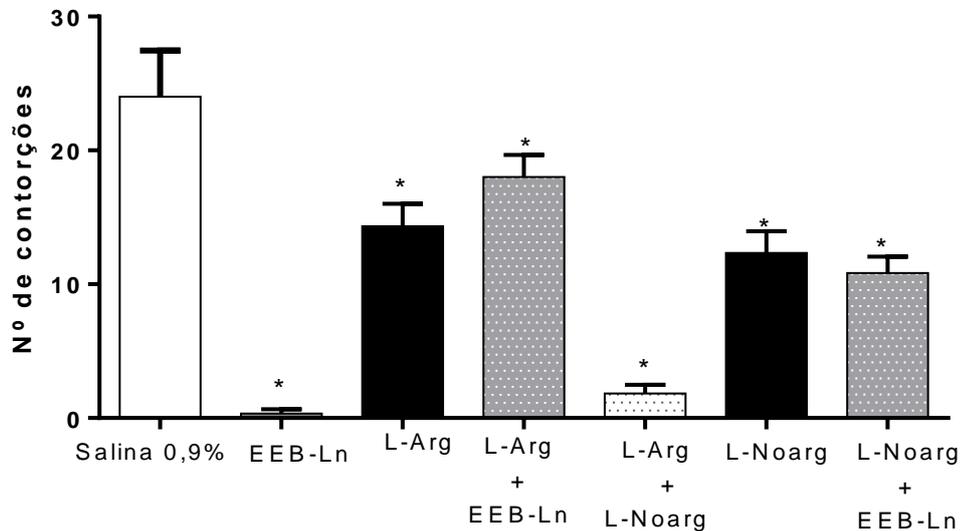
5.4.5 Envolvimento da via *L*-arginina- óxido nítrico

O óxido nítrico (NO) está envolvido na regulação de vários sistemas biológicos, dentre eles atua como transdutor no sistema nervoso central, estando concentrado no corno dorsal da medula espinhal (CURY et al., 2011; LIAUDET et., 2000). Vários estudos têm apresentado o papel do óxido nítrico no mecanismo de nocicepção. De acordo com Kawabata et al., (1994), o óxido nítrico induz a dor. Esse comportamento foi observado em seus estudos de indução da dor por formalina, demonstrando que a *L*-arginina, substrato da enzima óxido nítrico sintase promoveu o aumento da nocicepção.

A produção de óxido nítrico é o resultado da interação entre a *L*-arginina e a enzima óxido nítrico sintase (NOS). Outros estudos ressaltam a importância do NO na antinocicepção, verificando que a inibição da NOS produz a antinocicepção em modelo animal (ESPLUGUES, 2002; MOORE et al., 1993). O NO está envolvido no mecanismo de dor periférica pelo aumento dos níveis de GMPc em tecidos inflamados (TORIYABE et al., 2004).

Nessa perspectiva foi investigado o possível envolvimento da via óxido nítrico no efeito antinociceptivo de EEB-Ln. O pré-tratamento dos animais com *L*-arginina (600 mg/kg) no grupo que recebeu o EEB-Ln (400 mg/kg) promoveu a reversão do efeito antinociceptivo do extrato. Não houve diferença significativa entre o grupo tratado com *L*-NOARG (50 mg/kg) e *L*-NOARG e o EEB-Ln (Figura 24). Os resultados evidenciam que há participação da via oxidonitrérgica no efeito antinociceptivo do extrato etanólico bruto de *Leonotis nepetifolia*.

Figura 24- Influencia do pré-tratamento com L-arginina (600 mg/Kg) e L-NOARG (50 mg/Kg) no efeito antinociceptivo do extrato etanólico bruto de *Leonotis nepetifolia* (400 mg/kg) no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético.



Os Valores são expressos em média \pm erro padrão da média, (n = 6). Foram consideradas diferenças estatística significativamente, *p < 0,05, comparando com o grupo salina 0,9%, comparando com o grupo tratado EEB-Ln (400 mg/kg), comparando com o grupo 600 mg/Kg de L-arginina, comparado com o grupo pré-tratado com 600 mg/Kg de L-arginina e posteriormente 400 mg/Kg do EEB-Ln, comparado com o grupo pré-tratado com 600 mg/Kg de L-arginina e posteriormente 50 mg/Kg do L-NOARG, através da ANOVA seguido pelo teste de Tukey. **Fonte:** Autoria própria.

5.5 Avaliação da coordenação motora de animais submetidos ao tratamento com o extrato etanólico bruto de *Leonotis nepetifolia*

5.5.1 Teste do rota rod

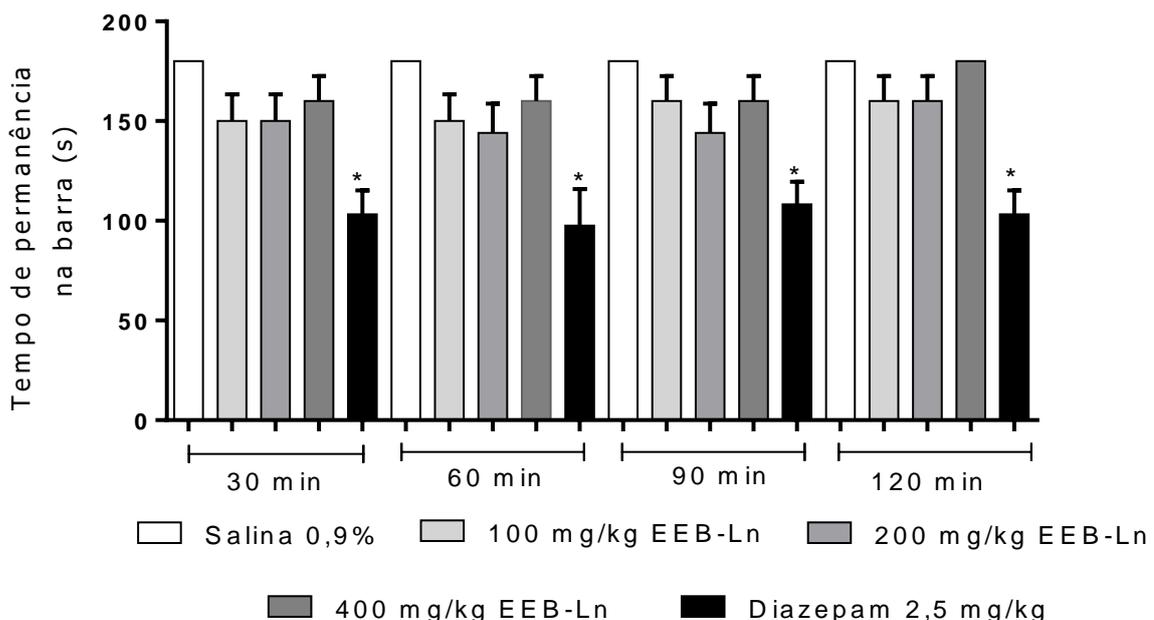
Medicamentos que reduzem a atividade do SNC (sedativos, neurolépticos e ansiolíticos) interferem na coordenação motora quando avaliados no teste do rota-rod. A partir desse teste pode-se avaliar a atividade miorreaxante ou danos neurológicos mínimos (sedação, ataxia, hiperexcitabilidade) no período de tempo em que os animais passam sobre a barra giratória (MARQUES et al., 2013).

Em testes de nocicepção é observado o envolvimento de resposta motora. A incoordenação motora é provocada por substâncias que promovem sedação ou relaxamento muscular interferindo na resposta antinociceptiva (LAPA et al., 2003).

Para avaliar o efeito do EEB-Ln sobre o sistema nervoso central dos animais, realizamos o teste de coordenação motora (rota rod).

O tempo de permanência dos animais na barra giratória não foi alterado após a administração das doses do EEB-Ln (100, 200 e 400 mg/kg v.o) em comparação com o grupo controle ($p < 0,01$) em todos os tempos de avaliações (Figura 25). Já os animais tratados com o fármaco padrão, diazepam (2,5 mg/kg) reduziram o tempo de permanência na barra giratória estatisticamente significativa ($p < 0,01$). Não houve diferença significativa entre as doses do EEB-Ln quando comparadas entre si ($p < 0,05$).

Figura 25- Efeito do extrato etanólico bruto de *Leonotis nepetifolia* (100, 200 e 400 mg/kg) e diazepam (2,5 mg/kg) sobre a coordenação motora de camundongos, no teste de rota rod.



Os Valores são expressos em média \pm erro padrão da média, ($n = 6$). Foram consideradas diferenças estatística significativamente, $*p < 0,05$, comparando com o grupo salina 0,9%, comparando com os grupos tratado EEB-Ln (100, 200 e 400 mg/kg), comparado com o grupo 2,5 mg/Kg de diazepam, através da ANOVA seguido pelo teste de Tukey. **Fonte:** Autoria própria.

5.6 Atividade anti-inflamatória do extrato etanólico bruto de *Leonotis nepetifolia*

Após o teste da formalina indicar que EEB-Ln possui um potencial efeito analgésico e anti-inflamatório, diminuindo o tempo de lambida da pata dos animais

na segunda fase do teste, investigamos o efeito anti-inflamatório do extrato nos modelos de edema de pata induzido por carragenina e histamina. Esses modelos farmacológicos são eficientes e bastantes utilizados para avaliar produtos naturais com efeito anti-inflamatório (OLIVEIRA et al., 2004).

5.6.1 Edema de pata induzido por carragenina

Os estímulos provocados quando administrados o agente flogístico (carragenina) na região subplantar da pata traseira do camundongo promovem um processo inflamatório agudo, provocando um inchaço da pata devido ao extravasamento de líquido e proteínas, com migração dos leucócitos para a região da inflamação (POSADAS et al., 2004). A migração de proteínas séricas e leucócitos, principalmente os neutrófilos, do sangue para o tecido extravascular são caracterizados como uma reação de microcirculação, este movimento é regulado pela liberação de mediadores vasoativos e quimiotáticos, os quais contribuem para os sinais cardinais clássicos da inflamação (SERHAN; CHIANG; VAN DYKE, 2008).

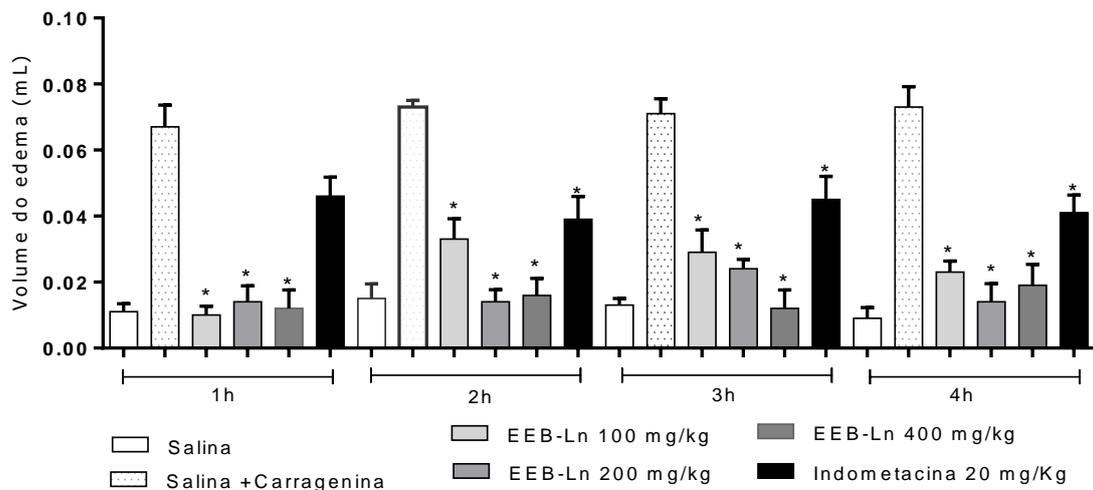
A carragenina é um agente flogístico que induz a migração de leucócitos, tais como os neutrófilos. O processo inflamatório produzido por este modelo é lento e prolongado, tornando possível avaliar a saída de líquido intersticial, bem como migração de células, além da presença de citocinas, enzimas e mediadores químicos, tais como o NO, PGE₂, IL-1 β , IL-6 e TNF- α (LORAM et al., 2007).

Os resultados demonstraram que o extrato etanólico bruto de *Leonotis nepetifolia* nas doses de 100, 200 e 400 mg/kg reduziu o edema de pata dos camundongos induzido por carragenina 1% (20 μ L/pata) de forma estatisticamente significativa ($p < 0,05$), em todos os tempos de avaliação, ou seja, na 1 e 2 h e na 3 e 4 h após o estímulo, apresentando melhor efeito que o fármaco padrão (Figura 26). A indometacina (20 mg/kg, i.p) também reduziu o edema de pata ($p < 0,05$) durante as 4 horas de experimento.

A primeira fase do processo inflamatório normalmente é ocasionada pela ação de mediadores pró-inflamatória, tais como histamina, serotonina e bradicinina e um aumento de bradicinina e da síntese de prostaglandinas nos tecidos circunvizinhos. Na segunda fase do processo inflamatório inicia-se a migração de

leucócitos para o local da inflamação, havendo liberação de enzimas proteolíticas, promovendo o aumento da geração de prostaglandinas e produção de óxido nítrico no local (ZHU et al., 2011; COSTA et al., 2016).

Figura 26- Efeito anti-inflamatório do extrato etanólico bruto de *Leonotis nepetifolia* (EEB-Ln 100, 200 e 400 mg/kg) e indometacina (20 mg/kg), sobre o edema de pata induzido por carragenina.



Os Valores são expressos em média \pm erro padrão da média, (n = 6). Foram consideradas diferenças estatística significativamente, *p < 0,05, comparando com o grupo salina 0,9% + Carragenina, comparando com o grupo tratado EEB-Ln (100, 200 e 400 mg/kg), comparado com o grupo 20 mg/Kg de indometacina através da ANOVA seguido pelo teste de Tukey. **Fonte:** Autoria própria.

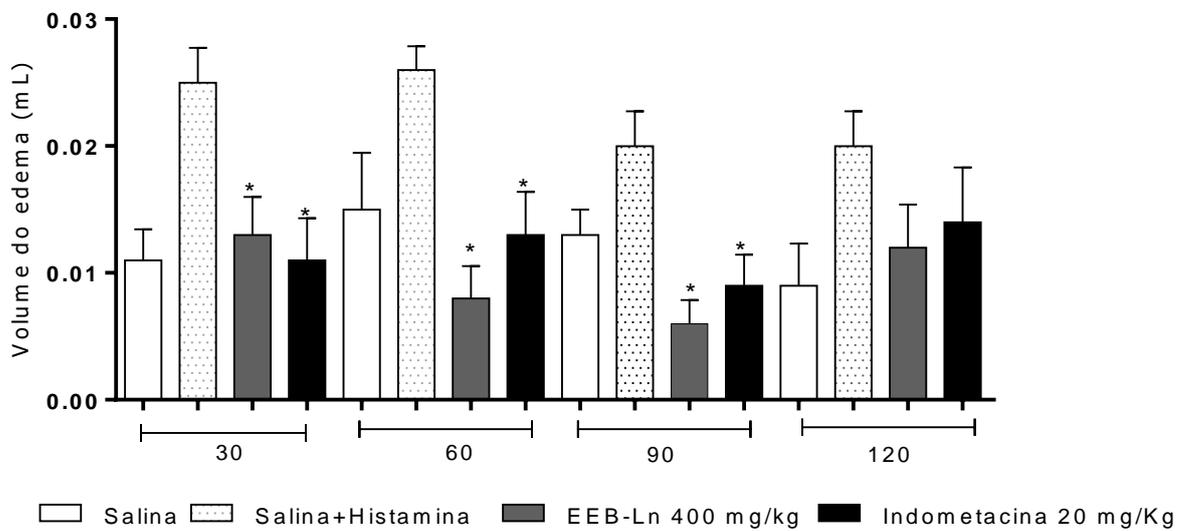
5.5.2 Edema de pata induzido por histamina

Na tentativa de verificar o efeito anti-inflamatório promovido pelo EEB-Ln no teste anterior, foi induzido o edema de pata através da administração de histamina, a qual atua por meio do aumento da permeabilidade celular decorrente da vasodilatação, desencadeada pela ligação aos receptores H1 das células endoteliais. A histamina é uma amina vasoativa, fundamental no processo inflamatório, promovendo a contração e separação das células endoteliais, permitindo a passagem dos leucócitos circulantes (MENEZES et al., 2006).

O resultado do edema de pata induzido por histamina demonstrou uma redução estatisticamente significativa (p<0,05), quando os animais foram tratados

com EEB-Ln (400 mg/kg, v.o), nos tempos de 30, 60 e 90 min (Figura 27), quando comparado com o grupo controle negativo (salina + Histamina). A indometacina também foi capaz de reduzir o edema nos tempos de 30, 60 e 90 min. Esses resultados evidenciam que o extrato etanólico bruto de *Leonotis nepetifolia* apresenta efeito anti-inflamatório, com possíveis efeitos anti-histamínicos.

Figura 27- Efeito anti-inflamatório do extrato etanólico bruto de *Leonotis nepetifolia* (EEB-Ln 400 mg/kg) e indometacina (20 mg/kg), sobre o edema de pata induzido por histamina.



Os Valores são expressos em média \pm erro padrão da média, (n = 6). Foram consideradas diferenças estatística significativamente, *p < 0,05, comparando com o grupo salina 0,9% + histamina, comparando com o grupo tratado EEB-Ln (400 mg/kg), comparado com o grupo 20 mg/Kg de indometacina, através da ANOVA seguido pelo teste de Tukey. **Fonte:** Autoria própria.

CONCLUSÕES



6 CONCLUSÕES

Os resultados apresentados demonstraram que o extrato etanólico bruto de *Leonotis nepetifolia* possui diferentes classes de metabólitos secundários, os quais foram detectados na triagem fitoquímica preliminar, com destaque para a presença de flavonoides que foram confirmados na análise por CLAE-DAD.

A investigação da toxicidade aguda do extrato etanólico bruto de *Leonotis nepetifolia* demonstrou um bom perfil de segurança, não provocando morte, nem alterações no consumo de água e ração no período de avaliações dos animais. Porém os parâmetros hematológicos, bioquímicos, histopatológicos são necessários serem realizados para contribuição do perfil de segurança do extrato etanólico bruto de *Leonotis nepetifolia*.

EEB-Ln possui efeito antinociceptivo em diferentes modelos farmacológicos, químicos e térmico (contorções abdominais induzidas por ácido acético, teste da formalina e placa quente). O efeito antinociceptivo de EEB-Ln envolve mecanismos centrais e periféricos, possivelmente atuando pelas seguintes vias: opioide, canais para potássio sensíveis ao ATP, óxido nítrico e receptor serotoninérgico 5-HT₃. O EEB-Ln não afetou a coordenação motora dos animais no teste de rota rod, um indício que o efeito antinociceptivo do extrato não está relacionado com sedação ou relaxamento muscular dos animais.

EEB-Ln apresentou efeito anti-inflamatório através da redução do edema de pata dos animais induzido por carragenina e histamina, apresentando efeito antiedematogênico, envolvendo a via histamínica.

Os resultados obtidos e apresentados nesse trabalho contribuem para a caracterização do perfil fitoquímica e investigação da atividade farmacológica da espécie *Leonotis nepetifolia*.

REFERÊNCIAS



REFERÊNCIAS

- AGUILAR-BRYAN, L.; LYDIA, J. P.; CLEMENT, IV.; GABRIELA, G.; KUMUD, K.; ANDREY, B.; JOSEPH, B. Toward understanding the assembly and structure of K_{ATP} channels. **Physiological reviews**, v. 78, n. 1, p. 227-45, 1998.
- ALLER, M. A.; ARIAS, J. L.; ARIAS, J. I.; SÁNCHEZ-PATÁN, F.; ARIAS, J. The inflammatory response recapitulates phylogeny through trophic mechanisms to the injured tissue. **Medical Hypotheses**, v. 68, n. 1, p. 202-209, 2007.
- ALMEIDA, R. N. Psicofarmacologia – fundamentos práticos. 1. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.
- ALMEIDA, T. F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain research**, v. 1000, n. 1, p. 40-56, 2004.
- ASHLEY, N. T.; ZACHARY, M. W.; RANDY, J. N. Inflammation: mechanisms, costs and natural variation. **Annual Reviews of Ecology Evolution and Systematics**, v. 43, p. 385-406, 2012.
- AYANWUYI, L. O.; YARO, A. H.; ADAMU, H. Y. S. Studies on Anticonvulsant activity of methanol capitulum extract of *Leonotis nepetifolia* Linn. **Nigerian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 8, n. 1, p. 73-79, 2009.
- BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v.32, n. 3, p. 679-688, 2009.
- BARREIRO, E. J.; F., CARLOS, A. M. Química Medicinal:- As bases moleculares da ação dos fármacos. Artmed Editora, 2014.
- BARTOLINI, A.; GHELARDINI, C.; FANTETTI, L.; MALCANGIO, M.; MALMBERG-AIELLO, P.; GIOTTI, A. Role of muscarinic receptor subtypes in central antinociception. **British journal of pharmacology**, v.105, n.1, p. 77-82, 1992.
- BASBAUM, A. I.; JESSELL, T. M. The perception of pain. **Principles of neural science**, v. 4, p. 472-491, 2000.
- BASBAUM, A. I.; JULIUS, D. Novos alvos contra a dor. **Scientific American Brasil**, v. 50, p. 76-83, 2006.
- BASBAUM, A. I.; WOOLF, C. J. Pain. **Current Biology**, v. 9, n. 12, p. R429- R431, 1999.
- BERTOZZI, M. M.; ANA, C. R.; VICTOR, F.; DANIELA, T. L.; ANDRESSA, F.; FERNANDO, Q. C.; JOSÉ, C. A.; THIAGO, M. C.; RUBIA, C.; WALDICEU, A. V. Diosmin reduces chronic constriction injury-induced neuropathic pain in mice. **Chemico Biological Interactions**, v. 273, p. 180-189, 2017.
- BIENVENU, E.; AMABEOKU, P. K.; SCOTT, G.; SPRINGFIELD, E. P. Anticonvulsant activity of aqueous extract of *Leonotis leonurus*. **Phytomedicine**, v. 9, n. 3, p. 217-223, 2002.
- BITENCOURT, F.S; FIGUEIREDO, J. G; MOTA, M.R.; BEZERRA, C.C.; SILVESTRE, P.P.; FARIAS, W. R. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of a mucin-binding agglutinin isolated from the red marine alga *Hypnea*

- cervicornis. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology**, v. 377, n. 2, p. 139, 2008.
- BOYTON, R. J.; OPENSHAW, P. J. Pulmonary defences to acute respiratory infection. **British Medical Bulletin**, v. 61, p. 1-12, 2002.
- BRASILEIRO - FILHO, G. Bogliolo: Patologia. 4a ed., Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2009.
- BRASILEIRO - FILHO, G. Bogliolo: Patologia. 7. ed. Rio de Janeiro, Editora Guanabara Koogan, 2007.
- CALVINO, Bernard.; GRILO, R. M. Central pain control. **Joint Bone Spine**, v. 73, n. 1, p. 10-16, 2006.
- CARLINI, E. A.; MENDES, F. R. Protocolo em psicofarmacologia comportamental: um guia para a pesquisa de drogas com ação sobre o SNC, com ênfase nas plantas medicinais, São Paulo: Fap-Unifesp, 2011.
- CARVALHO, J. C. T. Fitoterápico anti-inflamatório: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. Ribeirão Preto, São Paulo, **Tecmed**, p. 383-400, 2004.
- CHABALGOITY, J. A.; BAZ, A.; RIAL, A.; GRILLES, S. The relevance of cytokines for development of protective immunity and rational design of vaccines. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 18, n. 1-2, p. 195-207, 2007.
- COLLINS, T. Inflamação Aguda e Crônica. In: ROBBINS, S. L.; COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Patologia estrutural e funcional. 6ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
- COSTA, G. M.; GAZOLA, A. C.; ZUCOLOTTI, S. M.; CASTELLANOS, L.; RAMOS, F. A.; REGINATTO, F. H.; SCHENKEL, E. P. Chemical profiles of traditional preparations of four South American Passiflora species by chromatographic and capillary electrophoretic techniques. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, p. 451-458, 2016.
- COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. Patologia Estrutural e Funcional. 7. ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2006.
- COUTAUX, A.; FRÉDÉRIC, A.; JEAN-CLAUDE, W.; DANIEL, L. B. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. **Joint Bone Spine**, v. 72, n. 5, p. 359-371, 2005.
- CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J.; SNADER, K. M. Natural products in drug discovery and development. **Journal of Natural Products**, n. 60, n. 1, p.52-60, 1997.
- CRUZ, V. B.; TRESVENZOL, L. M. F.; FERREIRAS, H. D.; PAULA, J. R. de.; PAULINO, N. **Rev. Pesq. Inov. Farm.** 3(1), p.15-28, 2011.
- CURY, Y.; PICOLO, G.; GUTIERREZ, V. P.; FERREIRA, S. H. Pain and analgesia: The dual effect of nitric oxide in the nociceptive system. **Nitric Oxide**, v.25, p.243-245, 2011.
- DAVID, J. P.; MEIRA, M.; DAVID, J. M.; BRANDÃO, H. N.; BRANCO, A.; FÁTIMA, A. M.; REGINA, V. B.; LUCIANO, P. Q.; ANA, M. G. Radical scavenging, antioxidant and cytotoxic activity of Brazilian Caatinga plants. **Fitoterapia**, v. 78, n. 3, p. 215-218, 2007.

DORMAN, H. J. D.; OLIVER, B.; MUBERRA, K.; RAIMO, H. Antioxidant properties of aqueous extracts from selected Lamiaceae species grown in Turkey. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 4, p. 762-770, 2004.

EGUALE, T.; TADESSE, D.; GIDAY, M. In vitro anthelmintic activity of crude extracts of five medicinal plants against egg-hatching and larval development of *Haemonchus contortus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 1, p. 108-113, 2011.

ESPLUGUES, J. V. NO as a signalling molecule in the nervous system. **British journal of pharmacology**, v. 135, n. 5, p. 1079-1095, 2002.

FEIN, A. Nociceptores: As células que sentem dor. 1ª ed. Ribeirão Preto – SP: Dor On Line, 2011.

FERNÁNDEZ-ALONSO, J. L.; DÍAZ-RIVERA, O. Las Laiadas (família Labiatae). Instituto de ciências Naturales - Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá, p. 385-679, 2006.

FORNI, J. E.; MARTINS, M. R. I.; ROCHA, C. E.; FOSS, M. H.; DIAS, L. C.; SANTOS, J. R. D.; SILVA, J. S. C. D. Perfil sociodemográfico e clínico de uma coorte de pacientes encaminhados a uma clinica de dor. **Rev Dor**, v. 13, n. 2, p. 147-51, 2012.

GHARAGOZLOU, P.; HASAN, D.; DAVID, C. J.; JELVEH, L. Activity of opioid ligands in cells expressing cloned mu opioid receptors. **BMC pharmacology**, v. 3, n. 1, p. 1, 2003.

GILCHRIST, H. D.; ALLARD, B. L.; SIMONE, D. A. Enhanced withdrawal responses to heat and mechanical stimuli following intraplantar injection of capsaicin in rats. **Pain**, v. 67, p. 179-188, 1996.

GOLAN, D.; JUNIOR, T.; ARMEN, H. Princípios de farmacologia: a base fisiopatológica da farmacoterapia. 2º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

GOPAL, R. H.; VASANTH, S.; VASUDEVAN, S. V. Antimicrobial activity of essential oil of *Leonotis nepetaefolia*. **Ancient Science of Life**. v. 14, n. 1, p. 68-70, 1994.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. **Molecular aspects of Medicine**, v. 27, n. 1, p. 1-93, 2006.

HABERBERGER, R. V.; NADIA, B.; MICHAELA, K.; PETRA, H.; KATRIN, S. L.; WOLFGANG, K. Nicotinic acetylcholine receptor subtypes in nociceptive dorsal root ganglion neurons of the adult rat. **Autonomic Neuroscience: Basic and Clinical**., v. 113, n. 1-2, p. 32-42. 2004.

HAIDA, K.S.; PARZIANELLO, L.; WERNER, S.; GARCIA, D.R.; INÁCIO, C.V. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de oito espécies de plantas medicinais. **Arquivo de Ciências da Saúde Unipar**, Umuarama. v.11, n. 3, p.185-192, 2007.

HANADA, T.; YOSHIMURA, A. Regulation of cytokine signaling and inflammation. **Cytokine e Growth Factor Reviews**, v. 13, p. 413-41, 2002.

HARLEY, R.; FRANÇA, F.; SANTOS, E. P.; SANTOS, J. S.; PASTORE, J. F. 2015. Lamiaceae in: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB17909>>. Acesso em:06 mai. 2017.

HAYES, A. W. Principles and Methods of Toxicology. 5. Ed. Informa: Healthcare, 2007.

HUWILER, A.; PFEILSCHIFTER, J. Lipids as targets for novel anti-inflammatory therapies. **Pharmacology & therapeutics**, v. 124, n. 1, p. 96-112, 2009.

IMBELLONI, L. E. Tratado de anestesia raquidiana. Curitiba: Medidática Ltda. 2001.

JONES, S. L. Dipyrone into the nucleus raphe magnus inhibits the rat nociceptive tail-flick reflex. **European journal of pharmacology**, v. 318, n. 1, p. 37-40, 1996.

KESIM, M.; DUMAN, E. N.; KADIOGLU, M.; YARIS, E.; KALYONCU, N. I.; ERCIYES, N. The different roles of 5-HT(2) and 5-HT(3) receptors on antinociceptive effect of paroxetine in chemical stimuli in mice. **Journal of pharmacological sciences**, v.97, n.1, p.61-6, 2005.

KIDD, B. L.; URBAN, L. A. Mechanisms of inflammatory pain. **British Journal of Anaesthesia**, v. 87, n.1, p. 3 - 11, 2001.

KLAUMANN, P. R.; WOUK, A. F. P. F.; SILLAS, T. Patofisiologia da dor, **Archives of Veterinary Science**, v. 13, n.1, p.1-12, 2008.

KURIAN, R.; ARULMOZHI, D. K.; VEERANJANEYULU, A.; BODHANKAR, S. L. Effect of eugenol on animal models of nociception. **Indian Journal Pharmacology**, v. 38, n. 5, p. 341-345, 2006.

LAMONT, L.A.; TRANQUILLI, W. J.; GRIMM, K. A. Physiology of Pain. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 30, n. 4, p. 703-728, 2000.

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

LEE, C.; CHEN, L.; CHANG, T.; KE, W.; LO, Y.; WANG, C. The correlation between skin-care effects and phytochemical contents in Lamiaceae plants. **Food Chemistry**. v. 124, p. 833-841, 2011.

LEWINSOHN, T. M.; PRADO, P. I. Quantas espécies há no Brasil. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 36-42, 2005.

Li, J.; Fronczek, F. R.; Ferreira, D.; Burand, C. L.; Setola, V.; Roth, B. L. Z.; Jawiony, J. K. Bis-spirolabdane Diterpenoids from *Leonotis nepetifolia*. **Journal of natural products**, v. 75, n. 4, p. 728-734, 2012.

LI, J.; FRONCZEK, F.R.; FERREIRA, D.; BURANDT-JR, C. L.; SETOLA, V.; ROTH, B.L.; ZJAWIONY, J.K. Bis-spirolabdane diterpenoids from *Leonotis neetaefolia*. **Journal of Natural Products**, v. 75, p. 728-734, 2012.

LIAUDET L.; SORIANO F. G.; SZABÓ C. Biology of nitric oxide signaling. **Critical care medicine**, v. 26, p. 37-52, 2000.

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

LORAM, L. C.; FULLER, A.; FICK, L. G.; CARTMELL, T.; POOLE, S.; MITCHELL, D. Cytokine profiles during carrageenan-induced inflammatory hyperalgesia in rat muscle and hind paw. **The Journal of Pain**. v. 8, n. 2, p. 127-136, 2007.

MACIEL, M. A. M.; ANGELO C. P.; VALDIR F. V. J. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MAKAMBILA-KOUBEMBA, M. C.; MBATCHI, B.; ARDID, D.; GELOT, A, HENRION, C.; JANISSON, R. Pharmacological studies of ten medicinal plants used for analgesic purposes in Congo Brazzaville. **International Journal of Pharmacology**, v. 7, n. 5, p. 608-615, 2011.

MAREGESI, S. M.; OLIPA, D. N.; LUC, P.; ARNOLD, J. V. Ethnopharmacological survey of the Bunda district, Tanzania: Plants used to treat infectious diseases. **Journal of ethnopharmacology**, v. 113, n. 3, p. 457-470, 2007.

MARQUES, T. H. C.; MARQUES, M. L. B. G. C. B.; LIMA, D. S.; SIQUEIRA, H. D. S.; NETO, J. D. N.; BRANCO, M. S. B. G. C.; SOUZA, A. A.; SOUSA, D. P.; FREITAS, R. M. Evaluation of the neuropharmacological properties of nerol in mice. **World Journal of Neuroscience**, v. 3, p. 32-38, 2013.

MARTINS, M. A.; BASTOS, L. C.; TONUSSI, C. R. Formalin injection into knee joints of rats: pharmacologic characterization of a deep somatic nociceptive model. **The Journal of Pain**. v. 7, n. 2, p. 100 – 107, 2006.

MCDUGALL, J. J. Peripheral analgesia: Hitting pain where it hurts. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1812, n. 4, p. 459-467, 2011.

MEDZHITOV, R. Origin and physiological roles of inflammation. **Nature**, v. 454, n. 7203, p. 428, 2008.

MELO, M. G. D; ARAÚJO, A. A. S.; ROCHA, C. P. L.; ALMEIDA, E. M. S. A.; SIQUEIRA, R. S.; BONJARDIM, L. R.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Purification, physicochemical properties, termal analysis and antinociceptive effect of atranorin extracted from *Cladina kalbii*. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.31, p.1977–1980, 2008.

MILES, A.; LIASKOU, E.; EKSTEEN, B.; LALOR, P.F.; ADAMS, D.H. CCL25 and CCL28 promote alpha4 beta7-integrin-dependent adhesion of lymphocytes to MAdCAM-1 under shear flow. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and liver Physiology**, v. 294, p. 1257-1267, 2008.

MILLAN, M. J. Descending control of pain. **Progress in neurobiology**, v. 66, n. 6, p. 355-474, 2002.

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

MITCHELL, R. N.; KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. Adaptações celulares, lesão celular e morte celular. In: Robbins e Cotran: fundamentos de patologia. 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; p. 3-28, 2006.

MOORE, P. K.; BABBEDGE, R. C.; WALLACE, P.; GAFFEN, Z. A.; HART, S.L. 7-Nitro indazole, an inhibitor of nitric oxide synthase, exhibits anti-nociceptive activity in the mouse without increasing blood pressure. **British journal of pharmacology**, v. 108, p. 296-297, 1993.

MORI, T.; MIYAMOTO, T.; YOSHIDA, H.; ASAKAWA, M.; KAWASUMI, M.; KOBAYASHI, T.; MORIOKA, H.; CHIBA, K.; TOYAMA, Y.; YOSHIMURA, A.. IL-1 β and TNF α -initiated IL-6–STAT3 pathway is critical in mediating inflammatory cytokines and RANKL expression in inflammatory arthritis. **International immunology**, v. 23, n. 11, p. 701-712, 2011.

NETO, O. A. Dor: princípios e prática. Artmed Editora, Porto Alegre, 2009.

Newman, D. J.; Cragg, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of natural products**, v. 79, n. 3, p. 629-661, 2016.

NUNES, C. R. *Annona muricata* L.: Análise química e biológica dos frutos de gravioleira. 2011. 126 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal). Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, Campos dos Goytacazes, 2011.

OCANA, M.; 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, n.1, p. 203-219, 2004.

OJEWOLE, J. A. O. Antinociceptive, antiinflammatory and antidiabetic effects of *Leonotis leonurus* (L.) R. BR.(Lamiaceae) leaf aqueous extract in mice and rats. **Methods and findings in experimental and clinical pharmacology**, v. 27, n. 4, p. 257-264, 2005.

OKAMOTO, K.; IMBE, H.; TASHIRO, A.; KUMABE, S.; SENBA, E. Blockade of peripheral 5HT3 receptor attenuates the formalin-induced nocifensive behavior in persistent temporomandibular joint inflammation of rat. **Neuroscience letters** v.367, n.2, p.259-63. 2004.

OLIVEIRA, D. M.; FERNANDA, G. M.; SIKIRU, O. B.; ADRIANA F.; LUIZ, A. M. A. C.; ILSAMAR, M. S.; LARISSA, I. S.; SÉRGIO, D. A.; DOMINGOS, T. O. M. Antibacterial mode of action of the hydroethanolic extract of *Leonotis nepetifolia* (L.) R. Br. involves bacterial membrane perturbations. **Journal of ethnopharmacology**, v. 172, p. 356-363, 2015.

OLIVEIRA, D. P.; MARCELO, A. S.; GABRIELA, S. L.; LIDIANE, O.; ALEXANDRE, G. P. PNS018 Evaluation of acute toxicity, antioxidant activity, flavonoid quantification and total phenols from the hydroethanolic extract from leaves of *Leonotis nepetifolia*. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 9, n. 1, p. 1. 2012.

ONG, H. M.; MOHAMAD, A. S.; MAKHTAR, N. A.; KHALID, M. H.; KHALID, S.; PERIMAL, E. K.; MASTUKI, S. N.; ZAKARIA, Z. A.; LAJIS, N.; ISRAF, D. A.; SULAIMAN, M. R. Antinociceptive activity of methanolic extract of *Acmella uliginosa* (Sw.) Cass. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, p. 227-233, 2011.

OYEDEJI, O. A.; AFOLAYAN, A. J.; ELOFF, J. N. Comparative study of the essential oil composition and antimicrobial activity of *Leonotis leonurus* and *L. ocyimifolia* in the Eastern Cape, South Africa. **South African Journal of Botany**, v. 71, n. 1, p. 114-116, 2005.

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

PERAZA, G. G.; RODRIGUES, S. T.; MEDEIROS, S. H. L.; MUCCILLO- BAISCH, A. L. O uso de animais para avaliar o potencial antinociceptivo dos produtos de origem natural. **VITTALLE-Revista de Ciências da Saúde**, v. 19, n. 1, p. 35-44, 2008.

PINTO, M. S. C. T. A percepção da dor receptores envolvidos. **Revista da Faculdade de Medicina de Lisboa**, v. 5, p. 253 - 262, 2000.

PISERA, D. Fisiologia da dor. In: Dor Avaliação e Tratamento em pequenos Animais. OTERO, P. E. São Paulo: Interbook,. p. 30-74, 2005.

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

PRAKASH N. U.; BHUVANESWARI, S.; JAHNAVI, B.; ABHINAYA, K.; RAJALIN, A. G.; KUMAR, M. P.; SUNDRARAMAN, G.; ELUMALAI, K.; DEVIPRIYA, S.; KANNAN, V.; SRIRAMAN, V.; KATHIRAVAN, G. A study on antibacterial activity of common weeds in northern districts of Tamil Nadu, India. **Research Journal of medicinal plant**. 2012; 6(4): 341-345.

Purushothaman, K. K.; Vasanth, S. 4,6,7-Trimethoxy-5-methylchromen-2-one, a New Coumarin from *Leonotis nepetifolia*. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1**, n. 23, p. 2594-2595, 1976.

RAAHMAN, W.; BAUER, C. S.; BANNISTER, K.; VVONSY, J. L.; DOLPHIN, A. C.; DICKENSON, A. H. Descending serotonergic facilitation and the antinociceptive effects of pregabalin in a rat model of osteoarthritic pain. **Molecular pain**, v. 5, n. 1, p. 45-62, 2009.

RAAP, T.; JÜSTEN, H. P. ; MILLER, L. E. ; CUTOLO, M.; SCHÖLMEIRICH, J. ; STRAUB, R. H. Neurotransmitter modulation of interleukin 6 (IL-6) and IL-8 secretion of synovial fibroblasts in patients with rheumatoid arthritis compared to osteoarthritis. **The Journal of rheumatology**, v. 27, p. 2558-2565, 2000.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J.; HENDERSON, G. Farmacologia. 7a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2012.

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

ROCHA, A. P.C.; KRAYCHETE, D. C.; LEMONICA, L.; CARVALHO, L.R.; BARROS, G. A. M.; GARCIA, J. B. S. Dor: aspectos atuais da sensibilização periférica e central. **Revista Brasileira Anestesiologia**, v. 57, nº1, p. 94-105, 2007.

ROSSITER, H.; ALON, R.; KUPPER, T. S. Selectins, T-cell rolling and inflammation. **Molecular Medicine Today**, v. 3, p. 214-222, 1997.

SÁ, P. G. S.; NUNES, X. P.; LIMA, J. T.; FILHO, J. A. S.; FONTANA, A. P.; SIQUEIRA, J. S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J.; DAMASCENO, P. K. F.; BRANCO, C. R. C.; BRANCO, A.; ALMEIDA, J. R. G. S. Antinociceptive effect of ethanolic extract of *Selaginella convoluta* in mice. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 12, n.1, p.187-193, 2012.

SADEGHI, Z.; MARYAM, A.; ALIREZA, S.; AMIRHOSSEIN, S.; SEYED, A. E. Evaluation the Ethnopharmacological Studies in Iran During 2004–2016: A Systematic Review. **Journal of cellular physiology**, 2017.

SANGEETHA, M. K.; VALLABI, D. E.; SALI, V. K.; THANKA, J.; VASANTHI, H. R. Sub-acute toxicity profile of a modified resveratrol supplement. **Food and Chemical Toxicology**, v. 59, p. 492–500, 2013.

SANTOS, M. J.; MACHADO, I. C.; LOPES, A. V. Biologia reprodutiva de duas espécies de *Jatropha L.* (Euphorbiaceae) em Caatinga, Nordeste do Brasil, **Revista Brasileira de Botânica**, v.28, n.2, p.361-373, 2005.

SERHAN, C. N.; CHIANG, N.; VAN DYKE, T. E. Resolving inflammation: dual anti-inflammatory and pro-resolution lipid mediators. **Nature Review Immunology**, v.8, n.5, p. 349-361, 2008.

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

SIMÕES, C. M. O.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento, 6. Ed. Porto Alegre: UFRGS, 2010.

SIMÕES, R. R.; IGOR, S. C.; STELLA, C. J.; GLAUCE, R. P.; MARCOS, J. S.; ADAIR, R. S. S.; FELIPE, M. F. Oral treatment with essential oil of *Hyptis spicigera* Lam.(Lamiaceae) reduces acute pain and inflammation in mice: Potential interactions with transient receptor potential (TRP) ion channels. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 200, p. 8-15, 2017.

SKELDON, a.; SALEH, M. The inflammasomes: molecular effectors of host resistance against bacterial, viral, parasitic, and fungal infections. **Frontiers in Microbiology**, v. 2 , p.15, 2011.

SOBOLEWSKA, D.; PAŚKO, P.; GALANTY, A.; MAKOWSKA-WAŚ, J.; PADŁO, K.; WASILAK, W. Preliminary phytochemical and biological screening of methanolic and acetone extracts from *Leonotis nepetifolia* (L.) R. Br. **Journal of Medicinal Plants Research**. 6(30): 4582-4585, 2012.

STANFA, L. C.; SULLIVAN, A. F.; DICKENSON, A. H. Alterations in neuronal excitability and the potency of spinal mu, delta and kappa opioids after carrageenan-induced inflammation. **Pain**, v. 50, n. 3, p. 345-354, 1992.

TAKEDA, T.; NARUKAWA, Y.; HADA, N. Studies on the constituents of *Leonotis nepetaefolia*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*. v. 47, n. 2, p. 284-286, 1999.

TAKEDA, T.; NARUKAWA, Y.; HADA, N. Studies on the constituents of *Leonotis nepetaefolia*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 47, n. 2, p. 284-286, 1999.

TORIYABE, M.; OMOTE, K.; KAWAMATA, T.; & NAMIKI, A. Contribution of interaction between nitric oxide and cyclooxygenases to the production of prostaglandins in carrageenan-induced inflammation. *Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists*, v. 101, n. 4, p. 983-990, 2004.

TORIYABE, M.; OMOTE, K.; KAWAMATA, T.; NAMIKI, A. Contribution of interaction between nitric oxide and cyclooxygenases to the production of prostaglandins in carrageenan-induced inflammation. **Anesthesiology: The Journal of the American Society of Anesthesiologists**, v. 101, n. 4, p. 983-990, 2004.

TRIVEDI, A.; NEERAJ, S. K.; SH, M. Preliminary pharmacognostic and phytochemical analysis of "Granthika" (*Leonotis nepetifolia*): an ayurvedic herb. *Indian Journal of Traditional Knowledge*. v. 10, n. 4, p.682-688, 2011.

TRIVEDI, A.; NEERAJ, S. K.; SH, M. Preliminary pharmacognostic and phytochemical analysis of "Granthika" (*Leonotis nepetifolia*): an ayurvedic herb. **Indian Journal of Traditional Knowledge**, v. 10, n. 4, p.682-688, 2011.

UDAYA P. N. K.; BHUVANESWARI, S.; BALAMURUGAN, A.; VAISHNAVI, S.; SUGUNAN, S.; MEENA, S.; CHANDRAN, M.; BADU, H. S. Studies on antibacterial, antioxidant, larvicidal, pesticidal activities and phytochemistry of *Leonotis nepetifolia*

(Linn) R.Br. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. v. 4, n. 2, p.303-309, 2013.

UDAYA, P. N. K.; BHUVANESWARI, S.; BALAMURUGAN, A.; VAISHNAVI, S.; SUGUNAN, S.; MEENA, S.; CHANDRAN, M.; BADU, H. S. Studies on antibacterial, antioxidant, larvicidal, pesticidal activities and phytochemistry of *Leonotis nepetifolia* (Linn) R.Br. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 4, n. 2, p.303-309, 2013.

VALADARES, M. C. Avaliação de toxicidade aguda: Estratégias após a “Era do Teste DL50”. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 93-98, 2006.

VALE, F. M. Dor novos aspectos fisiopatológicos e consequentes estratégias farmacológicas. **Revista da Faculdade Medicina Lisboa**, v. 5, p. 291-304, 2003.

VEERABADRAN, U.; VENKATRAMAN, A.; SOUPRAYANE, A.; NARAYANASAMY, M.; PERUMAL, D.; ELUMLAI, S.; DEVARJ, V.; PERUNAL, A. Evaluation of antioxidant potential of leaves of *Leonotis nepetifolia* and its inhibitory effect on MCF7 and Hep2 cancer cell lines. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 3, n. 2, p. 103-110, 2013.

VILLAS BÔAS, G. K.; GADELHA, C. A. G. Oportunidades na indústria de medicamentos e a lógica do desenvolvimento local baseado nos biomas brasileiros: bases para a discussão de uma política nacional. **Caderno de Saúde Pública**, v. 23, n. 6, p. 1463 – 1471, 2007.

WAGNER, J. G.; ROTH, R. A. Neutrophil Migration Mechanisms, with an Emphasis on the Pulmonary Vasculature. **Pharmacological Reviews**, v. 52, n. 3, p. 349 - 374, 2000.

WALLER, S. B.; CLEFF, M. B.; SERRA, E. F.; SILVA, A. L.; GOMES, A. D. R.; MELLO, J. R. B.; FARIA, R. O.; MEIRELES, M. C. A. Plants from Lamiaceae family as source of antifungal molecules in humane and veterinary medicine. **Microbial Pathogenesis**, v. 104, p. 232-237, 2017.

ZHU, Z. Z.; MA, K. J.; RAN, X.; ZHANG, H.; ZHENG, C. J.; HAN, T.; ZHANG, Q. Y.; QIN, L. P. Analgesic, anti-inflammatory and antipyretic activities of the petroleum ether fraction from the ethanol extract of *Desmodium podocarpum*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 3, p. 1126 – 1131, 2011.

ANEXOS



ANEXO A- Protocolo Experimental da Triagem Farmacológica Comportamental
(Modelo retirado de Almeida et al., 2006).

ATIVIDADE FARMACOLÓGICA	Quantificação dos efeitos (0) sem efeito, (-) efeito diminuído, (+) efeito presente, (++) efeito intenso				
	até 30'	60'	120'	180'	240'
1 – SNC					
Agressividade					
Ambulação aumentada					
Andar em círculo					
Autolimpeza					
Bocejo					
Contorções abdominais					
Convulsões					
Escalar					
Estereotipia					
Irritabilidade					
Levantar					
Movimentação intensa das vibrissas					
Pedalar					
Sacudir a cabeça					
Saltos					
Tremores					
Vocalização					
b) Depressores					
Abdução das patas do trem posterior					
Ambulação diminuída					
Analgesia					
Ataxia					
Catatonía					
Cauda de Straub					
Hipnose					
Perda do reflexo auricular					
Perda do reflexo corneal					
Ptose palpebral					
Reflexo do endireitamento					
Resposta ao toque diminuída					
Sedação					
2) SNA					
Cianose					
Constipação					
Defecação					
Diarréia					
Força para agarrar					
Lacrimajamento					
Micção					
Piloereção					
Respiração					
Salivação					
Tônus muscular					
3 – MORTE					

ANEXO B – Parecer do Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA)

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
COMITÊ DE ÉTICA E DEONTOLOGIA EM ESTUDOS E PESQUISAS - CEDEP
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS- CEUA

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE TOXICOLÓGICA, ANTINOCICEPTIVA E ANTIINFLAMATÓRIA DE *Leonotis nepetifolia*", Protocolo nº 0009/150616, que utilizam 206 animais da espécie *Mus musculus*, sob a responsabilidade de Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida, estando de acordo com os princípios éticos de experimentação animal da Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Vale do São Francisco.

Certify that the project entitled "EVALUATION TOXICOLOGICAL, ANTINOCICEPTIVE AND ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF *Leonotis nepetifolia*", protocol number nº 0009/150616, utilizing 206 animals of specie *Mus musculus*, under the responsibility Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida, being in accordance with the ethical principles of animal experimentation adopted by Ethics Committee on Animal Use at the Federal University of Vale do São Francisco.

Petrolina, 08 de julho de 2016.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Andréa Vieira Colombo'.

Andréa Vieira Colombo – Coordenadora
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA

APÊNDICE



APÊNDICE I – Apresentação de trabalho no I Simpósio Interdisciplinar do Vale do São Francisco.



Apêndice II- Apresentação de trabalho no VI Simpósio de Plantas Medicinais do Vale do São Francisco.

**VI SIMPÓSIO DE PLANTAS
MEDICINAIS DO VALE
DO SÃO FRANCISCO**

CERTIFICADO

Certificamos que
o trabalho intitulado

**EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO EXTRATO ETANÓLICO BRUTO DE LEONOTIS
NEPETIFOLIA (L) R. BR.**

de autoria de

**JACKSON DE MENEZES BARBOSA¹., ANA EDILÉIA BARBOSA PEREIRA¹., LEAL¹.,
ERICA MARTINS DE LAVOR¹., FERNANDA PIRES RODRIGUES DE ALMEIDA
RIBEIRO¹., MARIANA GAMA E SILVA¹., MARIA ALICE MIRANDA BEZERRA
MEDEIROS¹., JACKSON ROBERTO GUEDES DA SILVA ALMEIDA¹.**

foi apresentado na modalidade pôster no VI Simpósio Plantas Medicinais do Vale do São Francisco realizado no Complexo Multieventos da UNIVASF, Juazeiro-BA, no período de 27 a 30 de setembro de 2017.

Jackson Roberto Guedes da S. Almeida
Dr. Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida
Presidente do Simpósio

REALIZAÇÃO

APÓIO

FACEPE Pernambuco

UNAF Juazeiro

PYANSA