



Universidade Federal de Pernambuco
Centro de Biociências
Programa de Pós-graduação em Biotecnologia - RENORBIO

Aline Stamford Henrique da Silva Guerra Gatis Carrazzoni

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO E
ANTINOCICEPTIVO DE *Miconia minutiflora* (Bonpl.) DC. (MELASTOMATACEAE)

Recife
2016

Aline Stamford Henrique da Silva Guerra Gatis Carrazzoni

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO E
ANTINOCICEPTIVO DE *Miconia minutiflora* (Bonpl.) DC. (MELASTOMATACEAE)

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Biotecnologia – RENORBIO, da Universidade
Federal de Pernambuco, como requisito para
obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia em Recursos
Naturais.

Orientadora: Profa. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva

Recife
2016

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Carrazzoni ,Aline Stamford Henrique da Silva Guerra Gatis

Avaliação do potencial anti-inflamatório e antinociceptivo de *Miconia minutiflora* (Bonpl.) DC. (Melastomataceae)/ Recife: O Autor, 2016.

97 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Teresinha Gonçalves da Silva

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Biotecnologia, 2016.

Inclui referências e anexos

1. Fitoquímicos 2. Melastomataceae 3. Antioxidantes I. Silva, Teresinha Gonçalves da (orientadora) II. Título

572.2

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2017-047

ALINE STAMFORD HENRIQUE DA SILVA GUERRA GATIS CARRAZZONI

**“AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTI-INFLAMATÓRIO E ANTINOCICEPTIVO
DE *Miconia minutiflora* (Bonpl.) DC. (MELASTOMATACEAE)”**

Tese aprovada para a obtenção do grau de doutor em Biotecnologia em
01/07/2016 pela comissão julgadora:

Prof^a. Dr^a. Teresinha Gonçalves da Silva

Prof^a. Dr^a. Márcia Silva do Nascimento

Prof^a. Dr^a. Elba Lúcia Cavalcanti de Amorim

Prof^a. Dr^a. Isla Vanessa Gomes Alves Bastos

Dr^a. Jaciana dos Santos Aguiar

Prof^a.

Recife-PE
2016

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, irmãs e marido por sempre me apoiar, ajudar e amar incondicionalmente. Obrigada família pelo carinho e dedicação, pela paciência e confiança e por ajudar a realizar meus sonhos me incentivando e rezando.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me proporcionar a vida e todas as experiências maravilhosas que passei, por me iluminar e abençoar minhas escolhas e por me dar força através da minha fé para sempre seguir em frente e obter sucesso.

À minha orientadora, Profa. Dra. Teresinha Gonçalves da Silva, pela oportunidade que me foi dada, pela dedicação, orientação e amizade. Seus valiosos conhecimentos contribuem para minha formação e futuro.

A todos do Laboratório de Prospecção Farmacotoxicológica de Produtos Bioativos - BIOFARMATOX, da UFPE, em especial aos pesquisadores do Biotério, por contribuírem para consolidação deste trabalho.

Aos MSc. Tonny Cley Campos Leite e MSc. Earl Celestino de Oliveira Chagas por fornecer a matéria prima para a realização deste projeto: Os extratos de *M. minutiflora*.

A Prof^a. Dr^a. Elba Lúcia Amorim, Prof. Dr. Rafael Matos Ximenes e Prof. Dr. Valdemiro Amaro da Silva Junior e suas respectivas equipes de pesquisa pela parceria e pelos valiosos conhecimentos que me foram apresentados.

A todos que fazem parte do Departamento de Antibióticos, por ceder o espaço para minha pesquisa.

A todos que fazem parte do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia – RENORBIO, pelo convívio e disponibilidade em atender minhas solicitações.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE), pelo incentivo e apoio financeiro.

A minha família, pelo amor, carinho e educação que me prestaram. Por vocês eu cheguei até aqui e para vocês que continuarei a seguir.

A todos, muito obrigada!

"Quando o homem compreende a sua realidade, pode levantar hipóteses sobre o desafio dessa realidade e procurar soluções. Assim, pode transformá-la e o seu trabalho pode criar um mundo próprio, seu Eu e suas circunstâncias."

Paulo Freire

RESUMO

As espécies da família Melastomataceae destacam-se por possuírem propriedades antimicrobiana, antitumoral, analgésica e antimalárica. Dentre os gêneros da família Melastomataceae, o gênero *Miconia* compreende 1/4 das espécies conhecidas. Tendo em vista poucos estudos relatados na literatura sobre espécies de *Miconia*, este trabalho teve como objetivo avaliar o perfil fitoquímico, toxicidade e atividades farmacológicas dos extratos hexânico, acetato de etil e metanólico das folhas de *M. minutiflora*. O perfil fitoquímico foi analisado por cromatografia em camada delgada. O teor de fenóis totais e a atividade antioxidante foi determinada através do método do DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil). O extrato de metanólico de *M. minutiflora* (Mm-MeOH) foi submetido à cromatografia líquida de alta eficiência com matriz de detector de diodo (CLAE -DAD) para a identificação dos principais polifenóis bioativos. Para avaliar a segurança de utilização dos extratos, foram feitos testes de citotoxicidade frente a várias linhagens de células e a toxicidade aguda *in vivo*. Para a realização dos testes *in vivo* foram utilizados camundongos albinos Swiss e ratos Wistar (n = 06). O potencial anti-inflamatório foi avaliado através dos modelos de bolsão de ar e edema de pata induzidos por carragenina, permeabilidade vascular, edema de orelha induzido por óleo de cróton e pleurisia induzida por carragenina com determinação dos níveis de citocinas (TNF, IL-1 β) e óxido nítrico (NO), dos exsudatos inflamatórios. Para a avaliação da atividade cicatrizante, foi utilizado o método de ferida excisional. Na avaliação da atividade antinociceptiva foram utilizados os testes de contorções abdominais induzidas por ácido acético e o teste da formalina. A ação do extrato frente aos receptores adrenérgicos e opióide também foi avaliada. A triagem fitoquímica do Mm-MeOH indicou a presença de compostos fenólicos, derivados antracênicos, esteroides e triterpenos no Mm-MeOH. O CLAE-DAD revelou a presença de ácido gálico, ácido elágico e rutina no Mm-MeOH. Este extrato apresentou maior concentração de fenólicos totais, como também melhor atividade antioxidante e baixa citotoxicidade frente à linhagem J774.A1 (inibição de 8,8%). No teste de toxicidade aguda, não foi observada nenhuma variação significativa no peso, consumo de ração e água e no peso dos órgãos em relação aos animais do grupo controle, cujo valor da DL₅₀ foi superior a 2.000 mg/kg. Mm-MeOH (100 mg/kg) inibiu a resposta inflamatória, reduzindo amigração leucocitária no teste do bolsão de ar (70%), a formação do edema de pata na terceira hora de observação (40%), como também reduziu a produção da MPO. O Mm-MeOH também reduziu a permeabilidade vascular (56%) e o edema de orelha. Houve redução da migração leucocitária no teste da pleurisia, como também diminuição dos níveis de TNF e IL-1 β no exudato pleural. A formulação a base de Mm-Meoh 10% (FSSMm) apresentou atividade cicatrizante significativa, principalmente no 14º dia após a incisão, com aumento do percentual de contração da ferida (90 $\pm$ 4 %) e progressos na remodelação do tecido danificado, incluindo a formação de anexos cutâneos, quando comparado ao grupo controle. Mm-MeOH apresentou atividade antinociceptiva com a redução do número de contorções abdominais (58,9%) e aumentou a limiar da dor no teste da formalina. Este extrato reverteu à ação antinociceptiva quando os animais foram pré-tratados com um antagonista α 2-adrenérgicos, entretanto não reverteu a a ação antinociceptiva quando os animais foram pré-tratados com naloxona. Podemos concluir que Mm-MeOH possui ação anti-inflamatória, antinociceptiva, cicatrizantes e baixa toxicidade. A atividade anti-inflamatória está associada à inibição da migração leucocitária, da liberação de aminas vasoativas e citocinas pró-inflamatórias (TNF e IL-1 β). Em relação à atividade antinociceptiva, o Mm-MeOH atua na dor inflamatória, pelo menos em parte, ativando os receptores α 2-adrenérgicos.

Palavras-chave: fitoquímica, antioxidante, citotoxicidade, toxicidade aguda, CLAE-DAD.

ABSTRACT

The Brazilian ecosystems have a variety of native species with potential application in the pharmaceutical field and which are targets of research for the production of phytotherapies/phytochemicals. The species of Melastomataceae family stand out for having antimicrobial, antitumor, analgesic and anti-malarial properties. *Miconia* is the largest family genre and comprises 1/4 of the known species. This study aimed to evaluate the phytochemical profile and antioxidant, cytotoxic, acute toxicity, anti-inflammatory, healing and antinociceptive activities in organic extracts of *Miconia minutiflora*. Were prepared hexane, ethyl acetate and methanol extracts of *M. minutiflora* leaves. The phytochemical profile was analyzed by thin layer chromatography. It was determined the total phenolic content and antioxidant activity by DPPH method (2,2-diphenyl -1 - picryl hydrazyl). The methanol extract of *M. minutiflora* (Mm-MeOH) was subjected to high-performance liquid chromatography with detector diode array (HPLC-DAD) for the identification of the major bioactive polyphenols. To evaluate the safety of use of crude extracts, they were subjected to *in vitro* cytotoxicity against several cell lines and acute toxicity *in vivo*. For the realization of *in vivo* tests was used albino Swiss mice and Wistar rats, divided into groups of 6 animals. The anti-inflammatory potential of *M. minutiflora* extracts was assessed through the air pocket and paw edema induced by carrageenan, with determination of myeloperoxidase activity (MPO) in the plantar tissue, vascular permeability, ear edema induced by croton oil, and pleurisy induced by carrageenan with determination of cytokine levels (TNF, IL-1 β) and nitric oxide (NO) in inflammatory exudates. To evaluate the antinociceptive activity the writhing test induced by acetic acid and formalin test were used. The action of the extract front of the adrenergic receptors and opioid were also evaluated. The phytochemical screening indicated the presence of phenolic compounds, antracenic derivatives, triterpenes and steroids. The HPLC-DAD revealed the presence of gallic acid, ellagic acid and rutin. The methanol extract of *M. minutiflora* (Mm-MeOH) showed the highest concentration of total phenolics, as well as better antioxidant activity and low cytotoxicity against the J774.A1 cells (8.8%). In the acute toxicity test, we observed no significant change in weight, feed intake and water and the weight of bodies in relation to the control group animals, whose DL₅₀ value was more than 2,000 mg/kg. Mm-MeOH (100 mg/kg) inhibited leukocyte migration by 70% in the air pocket test, inhibited the paw edema formation at the third hour of observation (40 %), but also reduced the production of MPO. The Mm-MeOH extract also reduced vascular permeability (56%) and the ear edema. A reduction of leukocyte migration in pleurisy test, as well as reduction of TNF and IL-1 β . Mm-MeOH presented evidenced healing activity mainly from the 14th day after the incision, increasing the percentage of wound contraction (90 $\pm$ 4%) and progress in the damaged tissue remodeling, including the formation of skin appendages, when compared to the control group. Mm MeOH (100 m/kg) showed antinociceptive activity by reducing the number of writhes 58,9 %, action as an agonist of the α 2-adrenergic receptors and increased the pain threshold in the formalin test. We suggest that the pharmacological potential of Mm-MeOH is associated with phenolic compounds synergism, the release inhibition amines, prostaglandins and inhibiting the release of pro-inflammatory cytokines. On antinociceptive activity, Mm-MeOH acts by peripheral mechanisms, in inflammatory pain and as an agonist of α 2 -adrenergic.

Keywords: Phytochemistry , antioxidant, cytotoxicity , acute toxicity, HPLC-DAD.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Inflorescência de <i>M. minutiflora</i> .	22
Figura 2: Processo inflamatório: sinais cardinais da inflamação e suas resoluções.	23
Figura 3: Esquema geral que representa as diferenças entre o processo inflamatório agudo e crônico, como também sua resolução ou evolução.	25
Figura 4: Mediadores químicos do processo inflamatório e suas respectivas fontes.	28
Figura 5: Mecanismo específico da dor nociceptiva (A) e dor inflamatória (B).	34
Figura 6: Esquema representativo das vias metabólicas que levam a produtos do ácido araquidônico envolvidos no processo inflamatório e atuação dos anti-inflamatórios.	35
Figura 7: Cromatograma da solução padrão, contendo ácido gálico, rutina e ácido elágico.	55
Figura 8: Cromatograma da amostra do extrato Mm-MeOH.	55
Figura 9: Cromatograma da mistura formada pela amostra do extrato Mm-MeOH e a solução padrão, contendo ácido gálico, rutina e ácido elágico.	55
Figura 10: Espectro UV do ácido gálico e do composto presente na amostra do extrato Mm-MeOH, cujo tempo de retenção foi o mesmo do ácido gálico.	56
Figura 11: Espectro UV da rutina e do composto presente na amostra do extrato Mm-MeOH, cujo tempo de retenção foi o mesmo da rutina.	57
Figura 12: Espectro UV do ácido elágico e do composto presente na amostra do extrato Mm-MeOH, cujo tempo de retenção foi o mesmo do ácido elágico.	57
Figura 13: Efeito do extrato de <i>Miconia minutiflora</i> (Mm-MeOH) na redução do volume do edema de pata de ratos induzido por carragenina. Os valores foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (n=5). *p< 0,05 vs controle. Significativos após análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni com intervalo de confiança de 95%, quando comparados ao grupo controle.	63
Figura 14: Atividade do extrato metanólico de <i>Miconia minutiflora</i> (Mm-MeOH) sobre a atividade enzimática da mieloperoxidase dos tecidos plantar de animais submetidos ao edema de pata de rato induzido por carragenina. *mDO (média de densidade óptica). Os valores foram expressos como média	65

± desvio padrão (n=5). *p<0,0001, **p<0,01 vs controle. Significativos após análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Tukey com intervalo de confiança de 95%, quando comparados ao grupo controle.

Figura 15: Potencial do extrato de *Miconia minutiflora* (Mm-MeOH) frente à permeabilidade vascular induzida por ácido acético. Os valores foram expressos como média ± desvio padrão (n=5). *p<0.0001 vs controle. Significativos após análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Tukey, quando comparados ao grupo controle. 66

Figura 16: Efeito do extrato metanólico (Mm-MeOH) sobre a redução do volume do edema de orelha induzido por óleo de cróton. Os valores foram expressos como média ± desvio padrão (n=5). ****p<0,0001, ***p<0,01. Significativos após análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Tukey, quando comparados ao grupo controle. 67

Figura 17: Concentração de IL-1β (a) e TNF (b) no exsudato inflamatório oriundo do teste de pleurisia induzida por carragenina. Os valores foram expressos como média ± desvio padrão (n=5). *p<0,05 ***p<0,001 vs controle. Significativos após análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Tukey, quando comparados ao grupo controle. 69

Figura 18: Efeito do extrato metanólico de *Miconia minutiflora* (Mm-MeOH) na produção de óxido nítrico em µM nos exsudatos inflamatórios provenientes do teste de pleurisia induzida por carragenina. Os valores foram expressos como média ± desvio padrão (n=5).. **p<0,01 vs controle. Significativos após análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Tukey, quando comparados ao grupo controle. 69

Figura 19: Aspecto macroscópico das lesões durante o teste de atividade cicatrizante. As imagens representam os grupos que foram tratados da seguinte forma: A; D e G – Grupo controle negativo tratados com a base. B; E e H – Grupo tratado com dexapantenol (50 mg/kg). C; F e I – formulação semissólida contendo 10% do extrato metanólico de *M. minutiflora* (FSSMm 10%). 71

Figura 20: Efeito formulação semissólida contendo 10% do extrato metanólico de *M. minutiflora* (FSSMm 10%) na contração da área da ferida em camundongos submetidos ao teste de atividade cicatrizante. Os valores foram expressos como média ± desvio padrão (n=5). ****p< 0,0001 e **p< 0,01 vs controle. Significativos após análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni com intervalo de confiança de 95%, quando comparados ao grupo controle. 72

Figura 21: Análise histológica da área de contração da ferida durante o teste de atividade cicatrizante. As imagens (objetiva de 4 e 10x) representam os grupos que foram tratados da seguinte forma: I; IV e VII – Grupo controle negativo tratados com a base de lanovaselina. II; V e VIII – Grupo tratado com Dexpantenol (50 mg/kg). III; VI e IX grupo tratado com a formulação semissólida contendo 10% do extrato metanólico de *M. minutiflora* (FSSMm 73

10%)–. a – infiltrado inflamatório; b – área de collagenólise; c – hiperplasia; d – tecido adiposo; e – tecido conectivo; f – fibroblastos; g – tecido de granulação; h – vasos sanguíneos; i – tecido epitelial; j – início da formação da epiderme; k – re-epitelização total da ferida; l – fibras colágeno; m – anexos cutâneos; n – colágeno denso.

Figura 22: Número de contorções abdominais (média $\pm$ desvio padrão) e percentual de inibição do extrato de *Miconia minutiflora* (Mm-MeOH) no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético. Os valores foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (n=5). *p < 0,05 vs controle. Significativos após análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Tukey com intervalo de confiança de 95%, quando comparados ao grupo controle.

75

Figura 23: Número de contorções abdominais (média $\pm$ desvio padrão) e percentual de inibição do extrato de *Miconia minutiflora* (Mm-MeOH) para avaliação do mecanismo de ação sob os receptores adrenérgicos (a e b) e opioide (c), no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético. Os valores foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (n=5). ****p < 0,0001 e ***p < 0,001. Significativos após análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Tukey com intervalo de confiança de 95%, quando comparados ao grupo controle.

76

Figura 24: Efeito do extrato bruto de *Miconia minutiflora* (Mm-MeOH) no teste de nocicepção induzida por formalina. Os valores foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (n=5). *p < 0,005. Significativos após análise de variância (ANOVA) de uma via seguido pelo teste de Tukey com intervalo de confiança de 95%, quando comparados ao grupo controle.

78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1: Atividades farmacológicas e compostos isolados de espécies de Miconia.	19
Tabela 1.2: Extratos e compostos isolados de espécies de Miconia.	20
Tabela 2: Análise fitoquímica utilizando sistema eluente e reveladores específicos para a identificação de metabolitos secundários	41
Tabela 3: Resultado do <i>screening</i> fitoquímico dos extratos em hexano (Hex), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH) de <i>M. minutiflora</i> .	52
Tabela 4: Doseamento de fenóis totais, flavonoides e taninos totais dos extratos hexânico (Mm-HEX), acetato de etila (Mm-AcOEt) e metanólico (Mm-MeOH) das folhas de <i>M. minutiflora</i>	53
Tabela 5: Efeito dos extratos de <i>M. minutiflora</i> sobre a Viabilidade celular pelo método do MTT.	59
Tabela 6: Evolução ponderal, consumo de ração, água e peso relativo dos órgãos (média $\pm$ desvio padrão), dos animais tratados com os extratos de <i>M. minutiflora</i> .	60
Tabela 7: Avaliação dos parâmetros bioquímicos em animais submetidos ao teste de toxicidade aguda.	61
Tabela 8: Avaliação dos parâmetros hematológicos em animais submetidos ao teste de toxicidade aguda.	61
Tabela 9: Efeito dos extratos de <i>M. minutiflora</i> sobre a migração leucocitária no teste do bolsão de ar.	62
Tabela 10: Efeito do extrato metanólico de <i>M. minutiflora</i> (Mm-MeOH) no teste da pleurisia induzida por carragenina.	68

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AINES	Anti-inflamatórios não Esteroidais
ANVISA	Agencia Nacional de Vigilância Sanitária
CCR5	Receptor para quimiocinas do tipo 5
CD4	<i>Cluster</i> de diferenciação 4
CI ₅₀	Concentração que produz 50 % de inibição no crescimento celular
COX	Cicloxygenase
DL ₅₀	Dose letal (50%)
DMSO	Dimetil sulfóxido
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
J774.A1	Linhagem de macrófago murinho
H 460	Linhagem celular de adenocarcinoma de efusões pleurais
HL-60	Leucemia promielocítica aguda
HEP-2	Carcinoma de laringe humana
HIV	Vírus da imunodeficiência Humana
HSF	Células fibroblásticas epitelial humana
IASP	Associação Internacional do Estudo da Dor
IFN- γ	Interferon γ
IL	Interleucina
IMA-AL	Instituto de Proteção Ambiental do Estado de Alagoas
LPS	Lipopolissacarídeo
MCF-7	Linhagem celular de adenocarcinoma de mama humano
MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio

NCI-H292	Carcinoma mucoepidermoide de pulmão humano
NK	Células <i>Natural Killer</i>
NO	Óxido nítrico
OECD	<i>Organization for Economic Cooperation and Development</i>
PBS	Solução tampão fosfato
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGG ₂	Prostaglandina G ₂
PGH ₂	Prostaglandina H ₂
PGI ₂	Prostaciclina
PMNLs	Leucócitos Polimorfonucleares
PPAR _r	Receptores Ativados por Proliferadores de Peroxissomos
TGF	Fator Transformador de Crescimento
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TXA ₂	Tromboxano A ₂

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 Família Melastomatacea - gênero <i>Miconia</i>	18
2.2 Fisiopatologia da inflamação	23
2.2.1 Inflamação aguda	24
2.2.2 Inflamação crônica	24
2.2.3 A cicatrização de feridas	25
2.2.4 Resposta imune e inflamação	26
2.2.5 Alguns mediadores químicos do processo inflamatório	28
2.2.5.1 Aminas vasoativas	29
2.2.5.2 Mieloperoxidase	30
2.2.5.3 Citocinas	30
2.2.5.4 Óxido nítrico (NO)	31
2.3 Fisiologia da dor	32
2.3.1 Dor inflamatória	33
2.4 Anti-inflamatórios esteroidais e não-esteroidais	34
3 OBJETIVOS	38
3.1 Geral	38
3.2 Específicos	38
4 MATERIAIS E MÉTODOS	40
4.1 Material botânico	40
4.2 Obtenção dos extratos	41

4.2.1 <i>Screening</i> fitoquímico - cromatografia de camada delgada (CCD)	40
4.2.2 Determinação do teor fenólico total (TFT) e do teor de tanino total (TTT)	41
4.2.3 Determinação do teor de flavonóides totais (TFLT)	42
4.2.4 Avaliação da atividade antioxidante pelo método DPPH	42
4.2.5 Determinação dos metabólitos secundários por CLAE	43
4.3 Viabilidade celular (Teste do MTT)	43
4.4 Animais experimentais	44
4.5 Procedimentos éticos	44
4.6 Toxicidade aguda	45
4.7 Atividade anti-inflamatória	45
4.7.1 Teste do bolsão de ar subcutâneo	45
4.7.2 Edema de pata induzido por carragenina	46
4.7.3 Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO)	46
4.7.4 Permeabilidade vascular induzida por ácido acético	47
4.7.5 Edema de orelha	47
4.7.6 Pleurisia induzida por carragenina	48
4.7.7 Determinação dos níveis de citocinas (TNF e IL-1 β)	48
4.7.8 Determinação da concentração de óxido nítrico (NO)	48
4.8 Avaliação da atividade cicatrizante	49
4.9 Atividade antinociceptiva	49
4.9.1 Nocicepção induzida por ácido acético	49
4.9.2 A valiação da participação do sistema α -adrenérgico no efeito antinocicptivo do Mm-MeOH	50
4.9.3 Avaliação da participação do sistema α -adrenérgico no efeito antinocicptivo do Mm-MeOH	50

4.9.4 Nocicepção induzida por formalina	51
4.10 Análise estatística	51
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
5.1 Rendimento do material botânico	52
5.2 <i>Screening</i> fitoquímico – cromatografia de camada delgada (CCD)	52
5.3 Doseamento de fenóis totais, flavonoides e taninos totais	53
5.3.1 Atividade antioxidante pelo método DPPH	54
5.4 Determinação dos metabólitos secundários por CLAE	54
5.5 Viabilidade celular (ensaio do MTT)	58
5.6 Toxicidade aguda	60
5.7 Teste do bolsão de ar subcutâneo	62
5.8 Edema de pata em induzido por carragenina	63
5.8.1 Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO)	64
5.9 Permeabilidade vascular induzida por ácido acético	65
5.10 Edema de orelha induzido pelo óleo de cróton	66
5.11 Pleurisia induzida por carragenina	67
5.11.1 Determinação dos níveis de citocinas e óxido nítrico	68
5.12 Avaliação da atividade cicatrizante	70
5.13 Nocicepção induzida por ácido acético	74
5.13.1 Avaliação da participação do sistema α - adrenérgico e opióide no efeito antinocicptivo do Mm-MeOH	75
5.14 Nocicepção induzida pela formalina	77
6 CONCLUSÕES	79
7 PERSPECTIVAS	81
REFERÊNCIAS	82

1 INTRODUÇÃO

Apesar dos avanços no desenvolvimento de métodos para a síntese química de produtos farmacêuticos, as plantas ainda representam fontes importantes de novas biomoléculas com interesse farmacológico (MUNARI et al., 2010, REGNER et al., 2011). O Brasil tem uma longa tradição no uso de plantas medicinais para o tratamento de diferentes doenças agudas e crônicas. Este fato impulsiona os pesquisadores brasileiros a estudar as plantas medicinais nativas e seus princípios ativos (SHERIDAN, 2012). Mais recentemente, o uso de novas tecnologias, tais como abordagens moleculares, proteômicas e genômicas, aumentou o interesse por produtos naturais, tanto na academia quanto por empresas farmacêuticas (HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) cerca de 70-80% da população mundial utiliza ervas para seus cuidados de saúde primários (WHO, 2009).

A família Melastomataceae é a sétima família de angiospermas mais rica em diversidade do planeta e a maior entre as famílias da ordem Myrtales. Ela possui cerca de 200 gêneros e 5.000 espécies (GIULIETTI et al., 2009). As plantas desta família são pantropicais e uma grande parte de suas espécies são endêmicas da América do Sul (CLAUSING; RENNER, 2001; RENNER, 2004). No Brasil, esta família possui 68 gêneros e 1.312 espécies, pertencentes principalmente às tribos Melastomeae Bartl., Miconieae DC. e Microlicieae Naudin (BAUMGRATZ et al., 2010; ROMERO, 2003). Na região nordeste 26 gêneros e 226 espécies de Melastomataceae foram identificadas, estando entre as dez famílias com maior número de representantes (BAUMGRATZ, 2006).

As espécies da família Melastomataceae possui um amplo potencial farmacológico relatado na literatura científica, apresentando atividades antimicrobiana (LEITE et al., 2012), antiviral, citotóxica (LOH´EZIC-LE D´EV´EHAT et al., 2002), anticoagulante, antiúlcera (JOFFRY et al., 2012), antidiarréia (UMALI-STUART; STIUART-SANTIAGO, 2010), anti-inflamatória, antinociceptiva, antipirética (ZAKARIA et al., 2006) quimiopreventiva (FURTADO et al., 2008) tripanomicida (CUNHA et al., 2009). Do ponto de vista químico, essa família destaca-se pela presença de ácidos graxos, triterpenoides e flavonoides (GUNATILAKA et al., 2001; MACARI; EMERICIANO; FERREIRA et al., 1990). Dentre os compostos isolados predominam cumarinas, triterpenos e quinonas (GUNATILAKA et al., 2001; LOWRY, 1968; MACARI; EMERECIANO; FERREIRA, 1990).

O gênero *Miconia* é o mais representativo dentro da família Melastomataceae por abrigar o maior número de espécies. Estudos científicos apontam variados usos populares das

espécies deste gênero, como eupéptica, para tratar reumatismo, resfriado, febre (CRUZ; KAPLAN, 2004); como antisséptico, cicatrizante e para afecções da garganta (FENNER et al., 2006). Há relatos do uso de algumas espécies de *Miconia*, na medicina popular brasileira, como anti-inflamatório e anti-reumáticos (RODRIGUES et al., 2011). Algumas propriedades farmacológicas de espécies do gênero *Miconia* já foram descritas na literatura, incluindo atividades antioxidante, antimicrobiana, antitumoral, antiviral (CUNHA et al., 2008); antinociceptiva (SPESSOTO et al., 2003) e tripanocida (CUNHA et al., 2006).

Atualmente, diversos estudos a cerca do potencial farmacológico de plantas medicinais, principalmente no que se refere ao tratamento da inflamação e dos processos de cicatrização estão sendo realizados a fim de buscar tratamentos alternativos que possam ser incorporados no Sistema Único de Saúde (SUS). Desta forma, este trabalho visa contribuir para o estudo farmacológico de plantas do gênero *Miconia*, em particular de *M. minutiflora*, na busca de NOVAS alternativas terapêuticas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Família Melastomatacea - gênero *Miconia*

A família Melastomataceae está distribuída em regiões tropicais e subtropicais sendo encontrada em abundância na América do Sul (CLAUSSING; RENNER, 2001). Exemplos dessa família são encontrados na maioria dos ecossistemas desde o nível do mar nas restingas até os campos de altitude, nos mais variados biomas do Brasil como a mata atlântica, o cerrado, a caatinga e a floresta amazônica (BAUMGRATZ; CHIAVEGATTO, 2006). Em Pernambuco, o bioma de maior incidência das espécies é a Mata Atlântica (RODRIGUES et al., 2011)

O maior gênero da família Melastomataceae é *Miconia*, que compreende 1/4 das espécies conhecidas. Este gênero é exclusivamente neotropical, e nas Américas ocorre desde o sul do México até o norte da Argentina e Uruguai (BAUMGRATZ; CHIAVEGATTO, 2006). Algumas espécies de miconias são comumente utilizadas na medicina popular brasileira como anti-inflamatório e anti-reumático (RODRIGUES et al., 2011).

No Brasil são encontradas 287 espécies do gênero *Miconia* e destas 122 são endêmicas. No nordeste estão presentes 74 espécies, sendo Pernambuco o segundo estado a possuir o maior número de representantes do gênero (BAUMGRATZ et al. 2010).

Extratos de miconias e seus compostos isolados mostraram notáveis atividades biológicas, tais como: antimutagênica, antitumoral, antimicrobiana, atividade tripanocida, atividade antioxidante, analgésica e anti-inflamatória, entre outras, como descrito na Tabela 1. Em relação às classes de compostos mais encontradas estão: triterpenos, cumarinas, taninos e flavonoides, como descrito na Tabela 2.

Tabela 1.1: Atividades farmacológicas e compostos isolados de espécies de Miconia.

Espécie	Atividade farmacológica	Extrato bruto	Composto isolado	Referências
<i>M. albicans</i>	Antioxidante	CHCl ₃ ; MeOH/	3-(E)-p-cumaroil- α -amirina; α -amirina; ác. epi-Betulínico; ác. epi-ursólico; ác. ursólico; quercetina; quercetina-3-O-glicosídeo; rutina; ác. ursólico; ác. oleanólico.	Pieroni et al., 2011
	Antinociceptiva	CH ₂ Cl ₂ ;		Vasconcelos et al., 2006
	Anticlastogênica	CHCl ₃ ; MeOH.	-	Serpeloni et al., 2008
	Citotoxicidade			
	Anti-mutagênica, mutagênica e Citotoxicidade	CHCl ₃ ; MeOH; H ₂ OEtOH.	-	Serpeloni et al., 2011
<i>M. alypifolia</i>	Microbicida	Hexano; CH ₂ Cl ₂ ; EtOH.	-	Celotto et al., 2003
	Antioxidante	-	apigenina-7-O-glicosídeo; canferol-3-O-diglicosídeo; canferol-3-O-galactosídeo; quercetina-3-O galactosídeo.	Mancini et al., 2008
<i>M. cabucu</i>	Microbicida	CHCl ₃ ; MeOH;	-	Rodrigues et al., 2008
	Anticlastogênica e Citotoxicidade	CHCl ₃ ; MeOH.	-	Serpeloni et al., 2008
	Anti-mutagênica e Citotoxicidade	CHCl ₃ ; MeOH; H ₂ OEtOH.	-	Serpeloni et al., 2011
<i>M. calvescens</i>	Microbicida	CHCl ₃ ; MeOH.	-	Bardon et al., 2007
<i>M. fallax</i>	Anti-carcinogênica		ác. ursólico; ác. oleanólico.	Furtado et al., 2008
<i>M. langsдорffii</i>	Leishmanicida	H ₂ OEtOH	ác. ursólico; ác. oleanólico.	Peixoto et al., 2011
<i>M. lepidota</i>	Citotoxicidade e Fungicida	MeOH; AcOEt	-	Gunatilaka et al., 2001
<i>M. ligustroides</i>	Bactericida	CHCl ₃ /	ác. ursólico; ác. oleanólico.	Cunha et al., 2010
	Antinociceptiva	Hexano; CH ₂ Cl ₂ ; EtOH.	α -amirina; β -amirina; β -sitosterol; estigmasterol.	Cunha et al., 2003 ^a

<i>M. rubiginosa</i>	Microbicida	Hexano; CH ₂ Cl ₂ ; EtOH.	-	Celotto et al., 2003
	Anticlastogênica e Citotoxicidade	CHCl ₃ ; MeOH.	-	Serpeloni et al., 2008
	Anti-mutagênica e Citotoxicidade	CHCl ₃ ; MeOH; H ₂ OEtOH.	-	Serpeloni et al., 2011
<i>M. salicifolia</i>	Microbicida	EtOH	-	Bussmann et al., 2010
<i>M. sellowiana</i>	Tripanocida	CH ₂ Cl ₂ /	ác. ursólico; ác. hidroursólico; ác. oleanólico; ác arjunólico; ác. Máslico.	Cunha et al., 2006
<i>M. stenostachya</i>	Microbicida	CHCl ₃ ; MeOH;	-	Rodrigues et al., 2008
	Microbicida	Hexano; CH ₂ Cl ₂ ; EtOH	-	Celotto et al., 2003
	Anticlastogênica e Citotoxicidade	CHCl ₃ ; MeOH.	-	Serpeloni et al., 2008
	Anti-mutagênica e Citotoxicidade	CHCl ₃ ; MeOH; H ₂ OEtOH.	-	Serpeloni et al., 2011
<i>Miconia sp</i>	Inibição da acetilcolinesterase	MeOH	-	Nino et al., 2006

Tabela 1.2: Extratos e compostos isolados de espécies de Miconia.

Espécie	Extrato	Composto isolado	Referências
<i>M. albicans</i>	CHCl ₃ ; MeOH	3-(E)-p-cumaroil- α -amirina; α -amirina; ác. epi-Betulínico; ác. epi-ursólico; ác. ursólico; quercetina; quercetina-3-O-glicosídeo; rutina;	Pieroni et al., 2011
	CH ₂ Cl ₂ ;	ác. ursólico; ác. oleanólico.	Vasconcelos et al., 2006
	Hexano; CH ₂ Cl ₂	3 β -hidroxi-olean-12-en-28-oato de metila; 3 β -hidroxi-urs-12-en-28-oato de metila; 3-O- β -D-glicopiranosil sitosterol; ác. arjunólico; β -sitosterol;	Macari et al., 1990
	Hexano	α -amirina; β -amirina; β -sitosterol; campesterol; estigmasterol; lupeol.	Crevelin et al., 2006
<i>M. cabucu</i>	MeOH	5-hidroxi-4',7-dimetoxiflavona-(6-C-6'')-5''-hidroxi-3''',4''',7''-trimetoxiflavona; ác. gálico; quercetina-3-O- α -L-ramnopiranosil-(2 $\rightarrow$ 1)-O- β -D-xilopiranosídeo; quercetina-3-O- α -L-ramnopiranosídeo; miricetina-3-O- α -L-ramnopiranosídeo; quercetina-3-O- β -D-glicopiranosídeo; canferol-3-O- β -D-(6''-cumaril)	Rodrigues et al., 2007

		glicopiranosídeo.	
<i>M. fallax</i>	Hexano	α -amirina β -amirina; β -sitosterol; estigmasterol; lupeol.	Crevelin et al., 2006
	EtOH	ác. ursólico; ác. oleanólico.	Cunha et al., 2008
	CH ₂ Cl ₂	ác. ursólico; ác. oleanólico; ác. sumaresinólico.	Cunha et al., 2003b
<i>M. langsдорffii</i>	H ₂ OEtOH	ác. ursólico; ác. oleanólico.	Peixoto et al., 2011
<i>M. ligustroides</i>	CHCl ₃	ác. ursólico; ác. oleanólico.	Cunha et al., 2010
	Hexano; CH ₂ Cl ₂ ; EtOH.	α -amirina; β -amirina; β -sitosterol; estigmasterol.	Cunha et al., 2003 ^a
	CH ₂ Cl ₂	ác. ursólico; ác. hidroursólico; ác. oleanólico; ác. arjunólico; ác. Máslico.	Cunha et al., 2006
<i>M. myriantha</i>	-	D-xilopiranosídeo; ác. elágico; ác. gálico; mattucinol-7-O-[4",6"-O-(S)-hexahidroxidifenil]- β -D-glicopiranosídeo; mattucinol-7-O-[4",6"-di-O-galoil]- β -D-glicopiranosídeo; mattucinol-7-O- β -D-glicopiranosídeo.	Li et al., 2001
<i>M. pepericarpa</i>	Hexano	α -amirina; β -amirina; β -sitosterol; acetato de α -amirina; acetato de amirina; campesterol; estigmasterol; friedelina; lupeol.	Crevelin et al., 2006
<i>M. prasina</i>	MeOH	7-O- α -D-apiofuranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D glicopiranosilmatteucinol; desmetoximatteucinol; farrerol; matteucinol; miconiosídeo B; miconiosídeo C	Tarawneh et al., 2014
<i>M. rubiginosa</i>	Hexano	α -amirina; β -amirina; β -sitosterol; Lupeol.	Crevelin et al., 2006
	Água	ác. gálico; casuarictina; epicatequina; quercetina-3-O- α -ramnopiranosídeo; quercetina-3-O- β -arabinofuranosídeo; quercetina-3-O- α -arabinopiranosídeo; quercetina-3-O- β -arabinopiranosídeo; quercetina-3-O- galactopiranosídeo; quercetina-3-O- α -ramnopiranosil-(1 $\rightarrow$ 4)-O- β -galactopiranosídeo; canferol-3-O- β -galactopiranosídeo; schizandrisideo	Rodrigues et al., 2011
<i>M. sellowiana</i>	CH ₂ Cl ₂	ác. ursólico;ác. hidroursólico; ác. oleanólico; ác arjunólico; ác. Máslico.	Cunha et al., 2006
	Hexano	α -amirina; β -amirina; β -sitosterol; campesterol; estigmasterol; lupeol.	Crevelin et al., 2006
<i>M. stenostachya</i>	AcOEt	ác. Sumaresinólico; ác. 3-epi-sumaresinólico.	Chan et al., 1992
	CH ₂ Cl ₂	ác. gipsogênico; ác. sumaresinólico.	Cunha et al., 2003b
<i>M. trailli</i>	EtOH	ác. arjunólico; ác. bartogênico; estigmast-4-eno-3,6-diano matteucinol; matteucinol-7-O- β -apiofuranosil-(1 $\rightarrow$ 6)- β -D-glicopiranosídeo; miconiosídeo A; miconiosídeo B.	Zhang et al., 2003

CH₂Cl₂: extrato diclorometano, CHCl₃: extrato clorofórmico, EtOH: extrato etanólico, MeOH: extrato metanólico, H₂OEtOH: extrato hidroalcolico, PCE: eritrócito policromático, NCE: eritrócito normocromático. DMH: 1,2-dimetilhidrazina.

Poucas espécies de Melastomataceae presentes no Brasil possuem registro na literatura científica da sua composição química e atividade biológica, e o gênero *Miconia* se enquadra neste contexto (GOLDENBERG, 2000). Apesar da ampla distribuição de *M. minutiflora*, a literatura científica carece de informações sobre sua morfologia e não há relatos sobre sua composição fitoquímica nem suas atividades biológicas.

Miconia minutiflora (Bonpl.) DC é um arbusto ou árvore de pequeno porte, que possui flores pequenas, compostas por cinco pétalas brancas que organizam-se em grupos de 20 inflorescências (Figura 1) (MORI; PIPOLY, 1984). Distribui-se desde o sul do México e Caribe até o Brasil, sendo encontrada em 17 estados (AC, AM, PA, TO; AL, BA, CE, MA, PB, PE, SE; RJ, SP; GO, MG, MT e DF). No Nordeste, esta espécie pode ser encontrada nas formações da floresta atlântica, além de áreas antropizadas e raramente em áreas litorâneas junto a cursos de rios e córregos.

Essa espécie é popularmente conhecida como manipueira, sabiazeira ou garamondé, em Pernambuco (PE); canela de veado, na Paraíba e no Rio Grande do Norte e por diversos vernáculos como: brasa-apagada caiuia roxa, carpuna-branca, carrasco-branco, caiubim, caubim, cauia-branca, chumbinho e maçaranduba-vermelha, no estado de Alagoas (CHAGAS, 2012).

O uso de plantas medicinais é uma alternativa economicamente viável e bastante utilizada atualmente. Apesar do avanço nas pesquisas sobre novos fármacos e todo o conhecimento disponível sobre a fisiopatologia da inflamação e da dor, encontrar substâncias eficazes, com mínimos efeitos colaterais e com baixa toxicidade levam os pesquisadores a uma busca incansável por novos fármacos anti-inflamatórios e antinociceptivos.

Figura 1: Inflorescência de *Miconia minutiflora* (Bonpl.) DC. (MELASTOMATACEAE).



Fonte: CORTEZ et al., 2014.

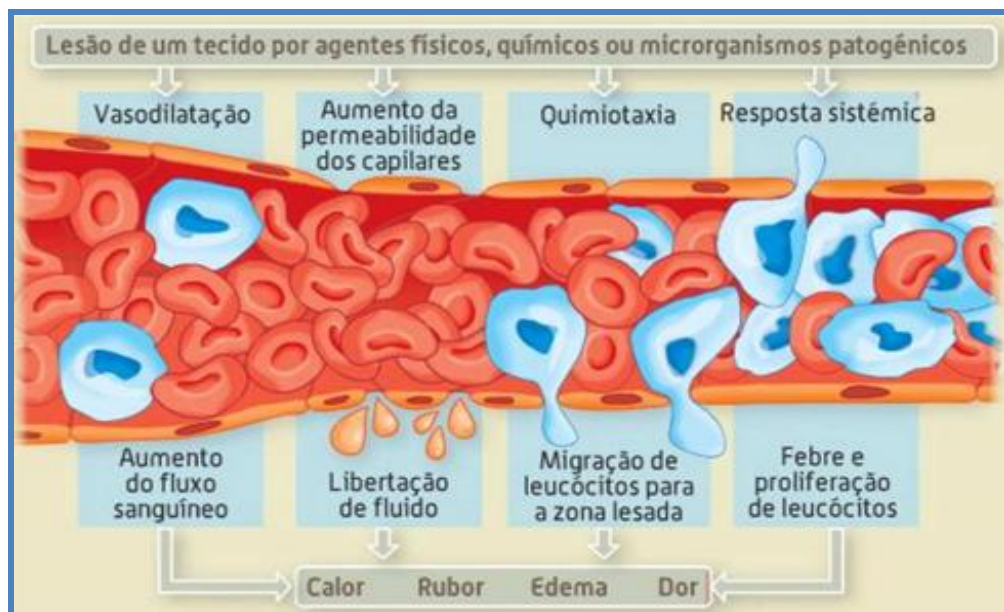
2.2 Fisiopatologia da inflamação

A resposta inflamatória é uma propriedade essencial para a sobrevivência de um organismo. Esta capacidade dos seres vivos em responder defensivamente a estímulos lesivos ocorre de forma cada vez mais complexa, à medida que aumenta a especialização biológica (CUZZOCREA, 2005).

Celsius (30 a.C. – 38 d.C.) propôs os quatro sinais clássicos da inflamação: rubor, tumor, calor e dor. Muitos anos depois, Virchow (1821-1902), descreveu o quinto sinal clássico da inflamação, que é a perda de função do órgão ou tecido inflamado (Figura 2) (HEIDLAND et al., 2006).

A inflamação pode ocorrer sob diferentes formas: traumas no tecido, invasão de bactérias, vírus ou parasitas, presença de complexos imunes, entre outros (CUNHA et al., 2003). Para que ocorra uma resposta do organismo lesionado a estas diversas injúrias, mediadores bioquímicos são sintetizados, como: histamina, serotonina, enzimas lisossomais, prostaglandinas, leucotrienos, fatores ativadores de plaquetas, citocinas, óxido nítrico (NO), o sistema complemento, bradicininas, os fatores de coagulação e fibrinólise (CUZZOCREA, 2005; SARKAR; FISHER, 2006; WANG; ALJAROUDI; NEWBY, 2005).

Figura 2: Processo inflamatório: sinais cardinais da inflamação.



Fonte: http://www.pathology.com.br/Apresentação_UNESP.

O processo inflamatório é classificado em inflamação aguda ou crônica de acordo com a intensidade de ação do agente injuriante ou o tempo de permanência do mesmo no organismo (duração). A inflamação aguda possui entre outras características curto tempo de duração (minutos até dias), já a inflamação crônica perdura por semanas ou até mesmo alguns anos (SILVA, et al 2014).

2.2.1 Inflamação aguda

A inflamação aguda é a reação imediata do organismo frente a um estímulo físico, químico ou biológico, onde mediadores de defesa são sintetizados e direcionados ao local da lesão. Essa resposta geralmente é breve, podendo durar alguns minutos, horas, ou até mesmo alguns dias. O principal objetivo da reação inflamatória é possibilitar ao tecido lesionado o acesso de células, proteínas e outros elementos originários do sangue para que haja reparação tecidual. Segundo Suffredini et al. (1999), o processo inflamatório agudo pode ser dividido em uma sequência de eventos. Primeiramente há uma lesão no organismo, fazendo com que este produza mediadores inflamatórios. Em seguida há um aumento do fluxo sanguíneo local, devido à retração de células endoteliais, promovendo a vasodilatação. Assim estes mediadores inflamatórios podem ter acesso à região inflamada. Posteriormente, há o extravasamento de macromoléculas plasmáticas devido ao aumento da pressão oncótica local, que promove a evasão de água e leva a formação do edema. Por ultimo, há a quimiotaxia de leucócitos, caracterizando o processo inflamatório (SUFFREDINI et al., 1999).

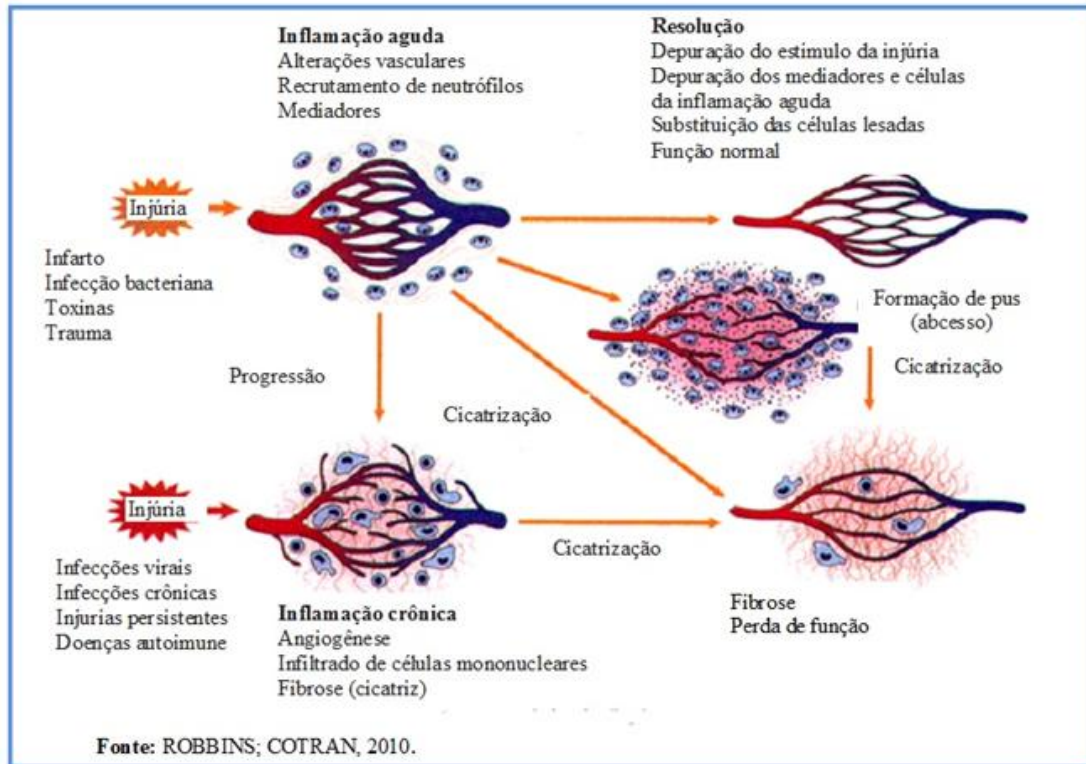
2.2.2 Inflamação crônica

Algumas doenças crônicas se originam de inflamações agudas que evoluem nos sintomas apresentados, como por exemplo, infecções por micro-organismos, tais como o *Mycobacterium tuberculosis*, ou agentes de baixo grau de toxicidade, como sílica, algumas viroses e reações auto-imunes. Uma inflamação é denominada crônica quando ocorre a persistência do estímulo agressor, ocasionando uma destruição contínua dos tecidos e há tentativas de cicatrização por reparo fibroso, além de respostas auto-imunes (COSSEUNS; WERB, 2002; DE MARZO et al., 2007; RODRIGUEZ-VITA; LAWRENCE, 2010).

A inflamação crônica se prolonga por períodos maiores que a inflamação aguda e está associada a alguns processos específicos de alteração histológica como fibrose e necrose do

tecido afetado, proliferação de vasos sanguíneos e, principalmente, a participação de linfócitos e macrófagos (FERREIRA; LORENZETTI; POOLE, 1993) (Figura 3).

Figura 3: Esquema geral que representa as diferenças entre o processo inflamatório agudo e crônico, como também sua resolução ou evolução.



2.2.3 A cicatrização de feridas

A cicatrização é um processo que envolve uma cascata ordenada de eventos e se inicia com o processo inflamatório, posteriormente a formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese), deposição de colágeno, reepitelização e remodelamento (MARTIN, 1997). O processo de cicatrização é fisiologicamente benéfico e tem como objetivo restabelecer a integridade do tecido lesado, reconstruindo sua funcionalidade (SINGER e CLARK, 1999).

Na fase inflamatória ocorre a formação de um coágulo de fibrina formado através da ativação das plaquetas. Este coágulo impede a hemostasia e estimula a liberação de fatores de crescimento derivados de plaquetas (PDGF) e o fator de transformação de crescimento beta (TGF- β), além de algumas citocinas pró-inflamatórias (PARK et al., 2011). O TGF- β estimula a quimiotaxia de leucócitos polimorfonucleares (PMN), como os neutrófilos, macrófagos e linfócitos. Estas células aumentam a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), que são essenciais na remoção de microrganismos e debridamento das células mortas. (PARK et

al., 2011). Além de impedir a invasão de micro-organismos, as EROs, em baixas concentrações, atuam como mensageiros celulares, sinalizando a ativação de fatores de transcrição e a produção de citocinas pró-inflamatórias (RHEE, 1999).

Os neutrófilos e macrófagos, no local da ferida, além de produzirem EROs e citocinas (interleucinas pró-inflamatórias e o fator de necrose tumoral alfa - TNF), também produzem quimiocinas e enzimas proteolíticas. As quimiocinas do tipo proteínas inflamatórias para macrófagos (MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-2) e proteína quimioatraente de macrófagos-1 (MCP-1), contribuem para a regulação da epitelização, angiogênese e remodelamento do tecido (GILLITZER; GOEBELER, 2001; EFRON; MOLDAWER, 2004).

A fase proliferativa é onde ocorre a angiogênese, a formação do tecido de granulação e o início da deposição de colágeno (tecido conjuntivo vascularizado), re-epitelização e o processo de contração da ferida (SINGER; CLARK, 1999; YOUNG; McNAUGHT, 2011). A hipóxia no tecido lesado que ocorreu devido ao rompimento inicial de vasos sanguíneos, estimula a liberação do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) juntamente com outras citocinas, induzindo a neovascularização do local (YOUNG; McNAUGHT, 2011).

A migração e proliferação de células endoteliais, como os queratinócitos presentes nas bordas da ferida, ocorre de maneira centrípeta, para recobrir a área da lesão com uma matriz provisória (SANTORO; GAUDINO, 2005). A reorganização da nova matriz tecidual é o processo final da cicatrização.

No processo de remodelamento, os fibroblastos e leucócitos produzem collagenases que promovem a lise da matriz antiga. A cicatrização tem sucesso quando há equilíbrio entre a síntese da nova matriz e a lise da matriz antiga (BROUGHTON; JANIS; ATTINGER, 2006).

2.2.4 Resposta imune e inflamação

O sistema imune é responsável tanto pelos processos de reparo tecidual como também pela defesa do organismo. A resposta imune pode ser classificada em imunidade não-específica (inata) e a específica (adquirida) onde estes dois tipos de imunidade atuam de maneira independente. Na imunidade inata as células atuantes são principalmente células fagocitárias mononucleares (macrófagos/monócitos) e os granulócitos (ex. neutrófilos). No caso da imunidade adquirida, além das células efectoras, há atuação dos linfócitos (linfócitos T e linfócitos B) (KIRVESKARI et al., 2003).

Na imunidade inata, os macrófagos atuam secretando diversos mediadores, tais como NO, citocinas (IL-1, IL-6, IL-12) e TNF, quimiocinas (IL-8) entre outros (KONSMAN et al., 2002). A indução para a ativação dos macrófagos pode ser tanto pelo estímulo lesivo, agente infectante ou pela ação de outras citocinas, principalmente interferon gama (IFN- γ) que são liberadas por linfócitos (MARTÍN-FONTECHA et al., 2004; WALKER et al., 1999). Dentre estes mediadores que atuam como vasodilatadores e contribuem para a migração leucocitária está a bradicinina que estimula tanto a produção de uma cascata de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-8, IL-6 e IL-1 β) como também a liberação de prostaglandinas e aminas simpaticomiméticas que induzem a hipernocicepção e a dor (CUNHA et al., 1992; VERRI et al., 2007).

Na imunidade adquirida as células em atuação são os linfócitos. Estas células são primeiramente produzidas no timo ou na medula óssea, depois sofrem amadurecimento nos órgãos linfóides periféricos (baço, linfonodos e amígdalas), para então serem liberadas durante a resposta imune (MARTÍN-FONTECHA et al., 2004; WALKER et al., 1999). Os linfócitos T efetores (maduros), quando chegam ao local da injúria liberam diversas citocinas (IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, TNF) e quimiocinas. Estas são responsáveis pela ativação de células B, quimiotaxia de leucócitos, ativação dos macrófagos, deposição de fibrina e dor (WATKINS et al., 1995).

Os TNFs, atuam mediando o processo inflamatório agudo e crônico. Os subtipos TNF- α e o TNF- β , são produzidos principalmente por macrófagos e linfócitos T, respectivamente (TANSEY; SZYMKOWSKI, 2009). A interação dos TNFs com seus receptores (TNFR1 ou TNFR2), podem ativar o fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B) e a proteína ativadora-1 (AP-1), que são responsáveis pela transcrição de genes para produção de diversas citocinas inflamatórias, como por exemplo as interleucinas. Além disso, os TNFs podem induzir a formação EROS, provocando a morte celular (CHU, 2013).

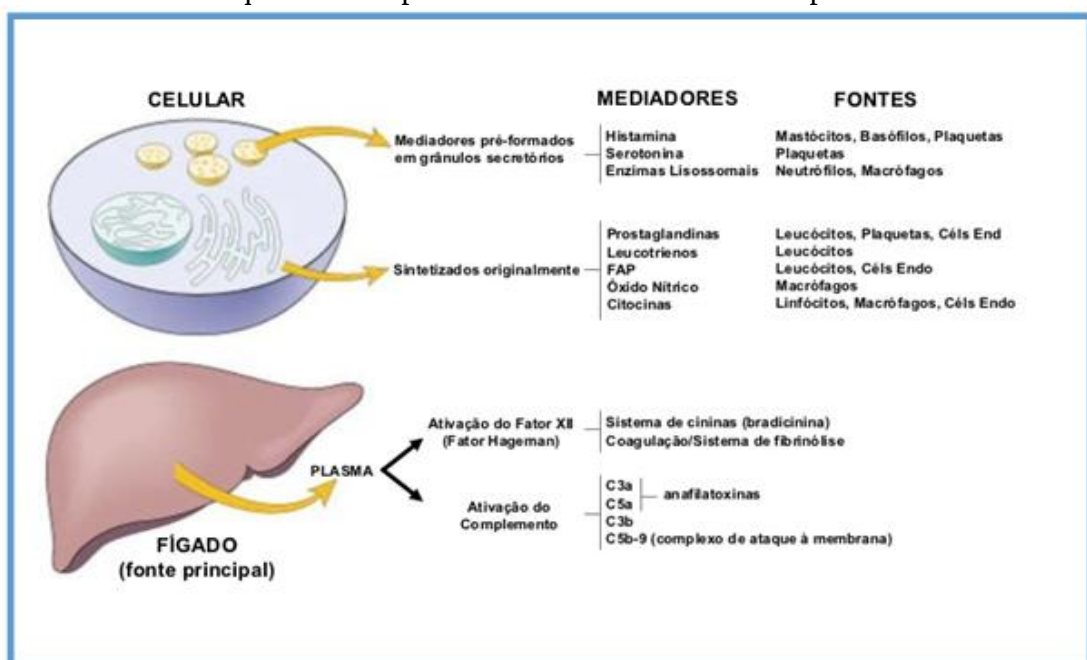
Os linfócitos do tipo T CD₄ +, T-helper de tipo 1 (Th1) e de tipo 2 (Th2) atuam na resposta imune adaptativa, produzindo mediadores específicos. As células do tipo Th1 produzem IFN- γ , TNF- α e TNF- β e interleucinas (IL-2, IL-3, IL-10,). Estes, são moduladores da resposta imunológica frente à ação de micro-organismos invasores intracelulares, como as bactérias, vírus e parasitas. Os linfócitos Th2 produzem as interleucinas IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, e o fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) para aumentar a resposta imunitária contra os agentes patogênicos extracelulares (MAHAJAN; MEHTA, 2011).

O $\text{TNF-}\alpha$ secretado pela células Th1 aumentam as respostas inflamatórias *in vivo*, enquanto a interleucina IL-10, produzida pelas células Th2, por linfócitos T reguladores (Th3), por macrófagos e alguns linfócitos B, atuam como citocina anti-inflamatória, inibindo a síntese de citocinas e outras funções dos macrófagos durante a fase tardia da inflamação (LIN; LI, 2010). Ou seja, Th1 e Th2 possuem perfis de secreção de citocinas que atuam modulando o sistema imune Th1/Th2 no hospedeiro, em homeostase (WONG et al., 2001).

2.2.5 Alguns mediadores químicos do processo inflamatório

A resposta inflamatória é mediada por componentes químicos (Figura 4) que possuem funções específicas. Histamina, serotonina e enzimas lisossomais são os primeiros a atuar na resposta inflamatória, pois se encontram pré-formados em grânulos secretórios. A histamina é produzida por mastócitos, basófilos e plaquetas; a serotonina encontrasse pré-formada nas plaquetas e as enzimas lisossomais são produzidas pelas células fagocitárias: neutrófilo e macrófago. Depois de instaurada a inflamação, os leucócitos e células endoteliais produzem e secretam os subprodutos do ácido aracdônico que são as prostaglandinas e leucotrienos. Os macrófagos locais liberam NO e citocinas no meio. Por fim, as células hepáticas secretam os fatores de ativação que atuam no processo de coagulação e há ativação do sistema complemento (Figura 4) (ROBBINS; COTRAN, 2010).

Figura 4: Mediadores químicos do processo inflamatório e suas respectivas fontes.



Fonte: ROBBINS; COTRAN, 2010.

2.2.5.1 Aminas vasoativas

As aminas vasoativas são as primeiras substâncias a serem liberadas durante a ativação da cascata do processo inflamatório. Estes mediadores são liberados por macrófagos, mastócitos e plaquetas, e são responsáveis por alterações vasculares como: vasodilatação, aumento do fluxo sanguíneo, aumento da permeabilidade vascular e exsudação plasmática (PARADA et al., 2001) (Figura 4). As aminas vasoativas (serotonina e histamina) atuam sinergicamente com a bradicinina induzindo a hiperalgesia térmica, hipernocicepção e formação do edema (KAY, 2001; LAVICH et al, 2003). Estes mediadores induzem a elevação da perfusão local e extravasamento de líquido para o espaço intercelular, provocando edema (tumor), hiperemia (rubor) e elevação da temperatura (calor) no sítio da inflamação. Estes eventos, associados com a liberação de substâncias quimiotáticas, induzem a migração de leucócitos para o local da inflamação (BILATE, 2007).

A serotonina (5-HT) é uma amina derivada do aminoácido triptofano, está presente nos mastócitos de algumas espécies como rato e camundongo, mas nos seres humanos, encontra-se presente nas plaquetas (BERGUER; GRAY; RUTH, 2009). A serotonina tem um importante papel na alteração do tônus e permeabilidade vascular, o que contribui para o extravasamento de fluídos (COLE et al., 1995). Além disso atua como estimulante das terminações nervosas sensitivas para dor e produz rubor, que são sintomas característicos da inflamação. Esses efeitos ocorrem provavelmente devido a constrição venosa com consequente aumento no enchimento capilar (YAMAGUCHI et al., 1999).

A bradicinina é um peptídeo vasoativo derivado do cininogênio (precursor inativo) que afeta a musculatura, promovendo dilatação de vasos sanguíneos e aumento da permeabilidade vascular. Esta substância tem um importante papel na dor, pois possui efeito algíco (VAVREK; STEWART, 1985).

A histamina é um forte estimulante das terminações nervosas sensitivas e está associada à sensação de prurido (AMIN, 2012). Esta desencadeia a liberação de mediadores como prostaglandinas e NO, sendo considerado um dos principais mediadores do processo inflamatório na fase aguda (DI ROSA; GIROUD; WILLOUGHBY, 1971). Algumas pesquisas têm associado o bloqueio de receptores de histamina no sistema nervoso central (SNC) a produção de potente analgesia (HAAS, 2008; HOUGH, 2000). Esta substância é um importante mediador das respostas alérgicas imediata e inflamatória. A histamina está presente nos mastócitos, onde se encontra pré-formada nos grânulos mastocitários, porém também são encontradas em basófilos, plaquetas e nos neurônios.

2.2.5.2 Mieloperoxidase (MPO)

A MPO é uma enzima encontrada primariamente nos grânulos azurofilos dos neutrófilos, e comumente usada como um marcador do conteúdo tecidual de polimorfonucleares que migram para o local do estímulo inflamatório. Esta enzima também é considerada um marcador de leucócitos ativados (LAU; BALDUS, 2006) e, pode ser utilizada como marcador de neutrofilia em condições de inflamação e sepse (FAITH et al., 2008).

A MPO pode estar presente nos grânulos dos monócitos, porém com apenas um terço da quantidade de MPO encontrada nos neutrófilos (ARNHOLD, 2004). Essa enzima é uma hemeproteína catiônica que representa 5% do conteúdo proteico total de um neutrófilo e cerca de 1% no monócito (JANTSCHKO, et al., 2004)

A MPO pode formar uma grande variedade de compostos. Após a conversão do oxigênio molecular em ânion superperóxido, promovido pela enzima nicotinamida adenina dinucleotideo fosfato oxidase (NADPH), a enzima superóxido dismutase converte o ânion em peróxido de hidrogenio, o qual possui ação microbica. A reação subsequente envolve a ligação da MPO com o peróxido de hidrogênio e sua conversão em íons hidroxila ou ácido hipocloroso, que possui também intensa atividade microbica (ARNHOLD, 2004; JANTSCHKO, et al., 2004).

2.2.5.3 Citocinas

As citocinas são um imenso grupo de moléculas que atuam regulando a resposta inflamatória e imunológica, entre outros processos. São produzidas principalmente por macrófagos após estimulação por toxinas, lesão mecânica ou mediadores inflamatórios (ZHANG, 2008).

Existem interleucinas anti- e pró-inflamatórias: as interleucinas IL-4, IL-10, IL-13, IL-1ra (antagonista da interleucina-1) e o TGF- β 1 (fator transformador de crescimento- β 1) são anti-inflamatórias, pois inibem a liberação de citocinas pró-inflamatórias e reduzem a expressão da ciclo-oxigenase 2 (COX-2) (CUNHA, 2003). Já as interleucinas IL-6, IL-8, TNF e IL-1 β são pró-inflamatórias, migram e atuam na área lesionada, sinalizando a inflamação. Estas interleucinas também estão associadas com a indução e manutenção da dor aguda e crônica (CUNHA, et al., 2000; VALE et al., 2003)

Um dos principais papéis da IL-1 β é aumentar a expressão das ciclo-oxigenases (COX-1 e COX-2), induzindo a produção de prostaglandinas. Estas sensibilizam os

nociceptores, resultando em hipernocicepção/dor (VERRI et al., 2006). O uso de inibidores da ciclo-oxigenase como a indometacina inibe o seu efeito algico (DINARELLO et al., 1999).

O TNF é sintetizado e liberado no local da lesão a partir de diversas células, como: macrófagos, linfócitos Th1, mastócitos, neutrófilos, eosinófilos, astrócitos, células *natural killers* (NK) e células do sistema nervoso (MEYERS; ALBITAR; ESTEY, 2005). Além de estar envolvido com o processo inflamatório e hipernocicepção/dor, o TNF está relacionado com a anorexia e outros sintomas (OMOIGUI, 2007; SACHS et al., 2002).

2.2.5.4 Óxido nítrico (NO)

O NO é formado a partir do aminoácido L-arginina através de uma reação catalisada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS). Este aminoácido está presente em altas concentrações no sangue, no fluído extracelular e também em diferentes tipos de células. O processo de liberação do NO é o resultado de uma série de eventos oxidativos e redutores, envolvendo um grande número de cofatores (BRUCKDORFER, 2005). O NO é um radical livre responsável por regular funções celulares em condições fisiológicas e patológicas (MONCADA; HIGGS, 2006).

Existem três isoformas de NOS: NOS neuronal (nNOS), NOS endotelial (eNOS) e NOS induzida (iNOS). A nNOS e eNOS são enzimas constitutivas, produzem NO em baixas concentrações e sua ativação é dependente de cálcio (CIRINO; FIORUCCI; SESSA, 2003), enquanto que a iNOS libera grandes quantidades de NO. Isso se deve ao fato da iNOS se ligar fortemente a calmodulina, mesmo em baixas concentrações de cálcio. Esta enzima é ativada por estímulos externos, atingindo um pico máximo 24 h após ativação (BRUCKDORFER, 2005).

Estímulos inflamatórios como lipopolissacarídeo e citocinas induzem a liberação do NO por vários tipos de células: endoteliais, da musculatura lisa vascular, da musculatura lisa de vasos arterioscleróticos, além de macrófagos (XIE; KASHIWABARA; NATHAN, 1994). O NO atua no processo inflamatório através do relaxamento do músculo liso vascular (vasodilatação), redução da agregação e aderência plaquetária, redução do recrutamento de leucócitos, ação citostática e citotóxica através de mecanismos mediados por radicais livres que são protetores contra agentes infecciosos e células tumorais (RIBBONS et al., 1997).

2.3 Fisiologia da dor

Em 1996, a Associação Internacional para o Estudo da dor (IASP) definiu a dor como "uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a dano tecidual real ou potencial, ou descrito nos termos de tal dano". A dor é uma experiência subjetiva, que não pode ser facilmente medida. Ao descrever a dor como uma "experiência", podemos diferenciá-la de nocicepção uma vez que a nocicepção é um processo neural que envolve a transdução e transmissão de um estímulo nocivo para o cérebro, enquanto a dor é o resultado de uma complexa interação entre sistemas de sinalização e a percepção única do indivíduo a um estímulo (STEEDS, 2009).

Portanto, a dor é o resultado de uma resposta física e psicológica a uma lesão. Um conjunto complexo de vias transmite mensagens de dor a partir da periferia, através das fibras aferentes primárias, para o SNC (STEEDS, 2009). Os receptores nociceptivos são representados pelas terminações nervosas livres presentes nas fibras mielínicas A- δ e amielínicas C. A atividade dos nociceptores é modulada pela ação de substâncias algigênicas e estas são responsáveis pela hiperalgesia termomecânica e pela vasodilatação observada em lesões mecânicas, inflamatórias e isquêmicas (SMIDERLE, 2008).

Existem três mecanismos básicos para a percepção da dor: 1) transdução, que é o processo de ativação dos nociceptores através da transformação de um estímulo nódico mecânico, térmico ou químico; 2) transmissão, conjunto de vias que permitem a propagação do impulso nervoso, gerado ao nível de nociceptor, ao SNC; 3) a modulação, que é o processo de supressão da dor ativadas pelas próprias vias nociceptivas (VANDERMEULEN, 2000)

Entre os receptores periféricos e o cérebro existem duas vias mediadoras dos estímulos dolorosos: a via neoespinotalâmica e a via paleoespinotalâmica (LÜLLMANN et al., 2000). Através da via neoespinotalâmica, as sensações térmicas e dolorosas são trazidas dos membros e do tronco do lado oposto ao do estímulo. Esta via medeia a sensação de dor rápida e localizada (somatotopia) (ROCHA et al., 2007). Ao contrário, a via paleoespinotalâmica não tem organização somatotópica, ela é responsável pela dor profunda do tipo crônica, correspondendo à chamada dor em queimação (LÜLLMANN et al., 2000).

A dor nociceptiva está relacionada à lesão de tecidos ósseos, musculares ou ligamentares e ocorre por ativação fisiológica de receptores ou da via dolorosa (Figura 5 A), enquanto a dor neuropática é o resultado da ativação anormal da via nociceptiva, sendo iniciada por uma lesão ou disfunção do sistema nervoso. As principais doenças relacionadas à

dor neuropática são: diabetes mellitus, neuralgia pós-herpética, neuralgia trigeminal, dor regional complexa, acidente vascular encefálico, esclerose múltipla, lesão medular, entre outros (BENNETT et al., 2006). As dores nociceptiva e neuropática muitas vezes podem coexistir, contudo, a dor neuropática requer abordagens analgésicas específicas, diferentes das abordagens analgésicas destinadas às dores nociceptivas (SMIDERLE, 2008).

2.3.1 Dor inflamatória

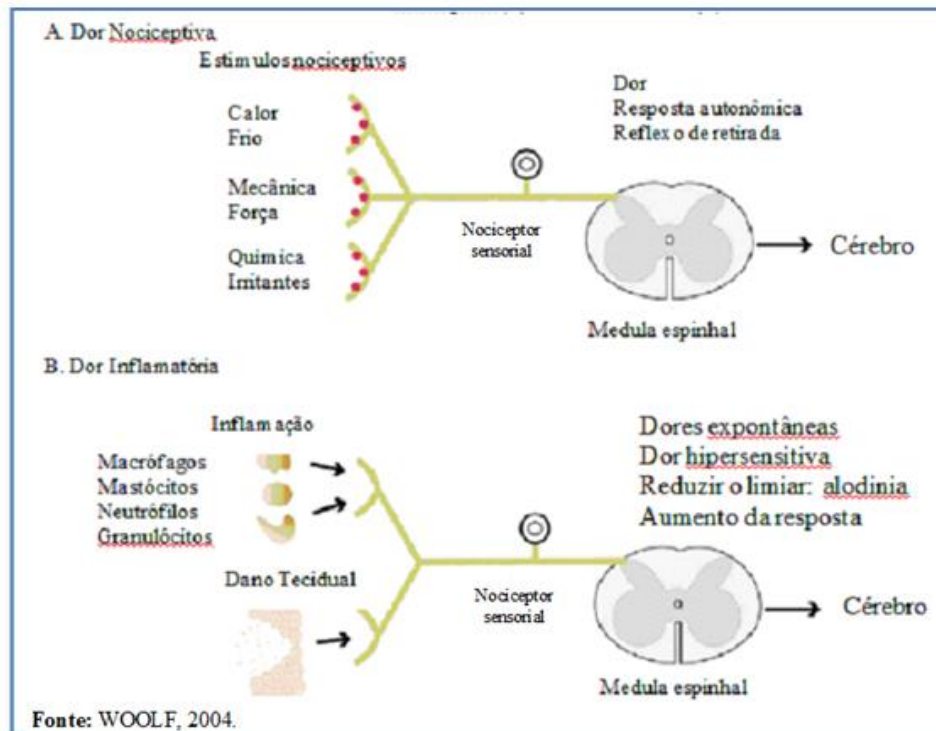
As células envolvidas no processo inflamatório produzem uma série de mediadores químicos como bradicinina, serotonina, histamina, mediadores lipídicos como os produtos da cascata do ácido araquidônico, além de citocinas. Estes mediadores promovem a sensibilização dos nociceptores e conseqüentemente há diminuição no limiar de percepção do estímulo doloroso (BONICA; YAKSH; LIEBESKIND, 1990; CARVALHO; LEMÔNICA, 1998; MEYER; CAMPBELL; RAJA, 1994).

A percepção do estímulo doloroso pode ser acompanhada de duas alterações sensoriais: hiperalgesia (sensibilidade aumentada para um estímulo doloroso) ou alodinia (dor provocada por um estímulo previamente não nocivo) (BESSON, 1999) (Figura 5 B).

A hiperalgesia envolve a estimulação de nociceptores que produz um reflexo axônico local, resultando na liberação de neuropeptídios como a substância P (SP) e neurocinina A (NKA), o que contribui para o aumento do processo inflamatório. Os neuropeptídeos liberados provocam a vasodilatação, aumento da produção de enzimas lisossômicas, liberação de prostaglandinas e interleucinas além da síntese do NO, estimulando e sensibilizando os nociceptores (MELLER et al., 1994; MELLER et al., 1996).

A alodinia é a sensação de dor frente a um estímulo que normalmente é inócuo. Podemos citar como exemplo a autosensibilidade que a pele sofre após uma queimadura. A nível do SNC, a alodinia se dá pela responsividade aumentada dos neurônios transmissores da dor, da coluna espinal. A nível do Sistema Nervoso Periférico (SNP), a alodinia deve-se a diminuição dos limiares de ativação dos nociceptores (ALMEIDA; ROIZENBLATT; TUFIK, 2004; BASBAUM; JESSELL, 2000).

Figura 5: Mecanismo específico da dor nociceptiva (A) e dor inflamatória (B).



2.4 Anti-inflamatórios esteroidais e não-esteroidais

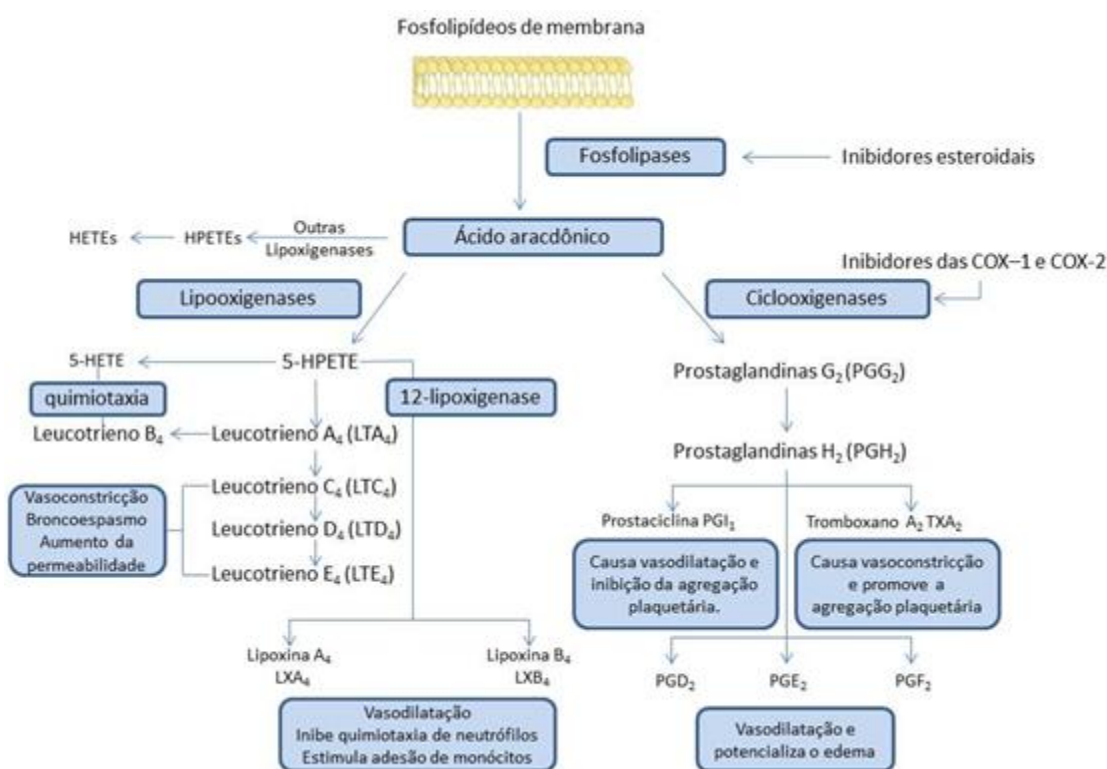
Os anti-inflamatórios esteroidais, também denominados de glicocorticóides ou corticosteróides, fazem parte de um grupo de hormônios cujo mecanismo clássico de ação envolve a interação com um receptor de glicocorticóides e a regulação da expressão de proteínas (FALKENSTEIN et al., 2000). Os fármacos anti-inflamatórios esteroidais bloqueiam a liberação de prostaglandinas pela inibição da atividade de fosfolipase A_2 , que interfere na cascata do ácido araquidônico, pois impede a produção dos seus metabólitos (Figura 6). Assim, indivíduos que utilizam este tipo de anti-inflamatório por períodos prolongados ficam expostos aos seus efeitos adversos como: gástricos, cardíacos e imunossupressores (MILLER, STANTON; DERERY, 2001). Segundo Falkenstein et al., (2000) o uso prolongado de derivados da cortisona também promove o aumento da pressão arterial devido à retenção de sódio além de está relacionado com úlceras gástricas devido à inibição da produção de prostaglandinas. Os principais representantes desta classe são a dexametasona, hidrocortisona, prednisolona e prednisona.

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) estão entre os mais utilizados dentre todos os agentes terapêuticos, devido a suas três principais ações farmacológicas: anti-inflamatória, analgésica e antipirética. Atualmente, já existem mais de 50 AINES diferentes no

mercado, contudo, nenhum deles se apresenta como fármaco ideal no controle e/ou na modificação dos sinais e sintomas do processo inflamatório, principalmente aqueles que ocorrem nas doenças articulares inflamatórias comuns. AINEs não-seletivos, apresentam grupos ácidos em suas estruturas, que conferem a molécula efeitos colaterais como irritabilidade tópica e gastrointestinal e AINES com seletividade apresentam toxicidade renal e efeitos cardiovasculares (LÚCIO et al., 2008).

Os AINES clássicos são aqueles que tratam o processo inflamatório através da inibição não seletiva da enzima COX, tem mecanismo de ação e estruturas químicas completamente diferentes dos fármacos anti-inflamatórios esteroidais. Nesta classe estão inclusos diversos grupos: salicilatos (está incluída a aspirina, o primeiro e mais popular dos anti-inflamatórios); derivados indolacéticos (indometacina) derivados do ácido propiônico (ibuprofeno, naproxeno); ácido hetaroaril acético (diclofenaco); os fenamatos (ácido flufenâmico); alcanonas (nabumetona); pirazolonas (fenilbutazona); oxicans (piroxican e meloxican); entre outros (PALASKA et al., 2002; BORNE et al., 2008; SANDILANDS; BATEMAN, 2016).

Figura 6: Esquema representativo das vias metabólicas que levam a produtos do ácido araquidônico envolvidos no processo inflamatório e atuação dos anti-inflamatórios.



Fonte: próprio autor, adaptado de KUMAR, 2010.

Entretanto, estudos apontam uma série de reações adversas para os AINES, como por exemplo: toxicidade gastrointestinal, alterações na função renal, “rashes” cutâneos, efeitos no SNC e infiltrados pulmonares (HAWKEY, 2001). Inicialmente pensou-se que essas reações fossem apenas devido a efeitos locais e diretos dos AINES na mucosa gastrointestinal, uma vez que o ácido araquidônico produz a desestabilização nos fosfolipídios de membrana promovendo lesões gástricas por retrodifusão. Posteriormente, observou-se efeitos indiretos sob a cadeia da inibição da síntese das prostaglandinas (PGs) pelos AINES que promove a diminuição na produção de PGE pela mucosa gastrointestinal, tendo como resultado o aumento da secreção gástrica e a diminuição da produção de fatores protetores na barreira mucosa superficial, gerando o processo de ulceração. Estudos apontam que 80 % das úlceras gástricas estão associadas à infecção crônica com o *Helicobacter pylori* ou uso de AINES, com ambos prejudicando as defesas gastrointestinais e aumento da acidez e outros fatores nocivos que causem danos à mucosa (CHAN; GRAHAM, 2004; PÉREZ et al., 2002).

Os efeitos adversos dos AINES, tanto os gástricos como os extra gástricos, ocorrem provavelmente devido às mesmas ações biológicas que os tornam anti-inflamatórios, ou seja, a inibição da COX. Investimentos feitos na última década relacionados à elucidação das duas isoformas COX-1 e COX-2, com a presença da COX-1 envolvida nos processos fisiológicos, e COX-2 mais relacionada à produção induzida e exagerada de PGs, contribuiu de forma efetiva para o desenvolvimento de novos alvos terapêuticos em doenças inflamatórias e degenerativas, aumentando o interesse da indústria farmacêutica na busca de novos fármacos anti-inflamatórios (TURINI; DUBOIS, 2002).

O meloxicam, AINE não específico, possui a habilidade de inibir a COX-2 dez vezes mais que a COX-1, quando comparamos com o diclofenaco, piroxicam e naproxeno. Esse AINE apresentou boa atividade analgésica e anti-inflamatória, além de maior tolerabilidade gástrica (RIOJA et al., 2002). A partir de estudos com este fármaco, surgiram os coxibes, AINEs seletivos para a COX-2. Estes foram desenvolvidos com o intuito de prevenir os efeitos adversos gastrointestinais dos AINEs clássicos, uma vez não há redução total de prostaglandinas gastroprotetoras oriundas da COX-1, mantendo-se a eficácia anti-inflamatória (SINGH et al., 2004).

Os inibidores de COX-2, chamados de coxibes, pertencem à segunda geração de AINEs e possuem em comum em, suas estruturas, grupo difenilheterociclo e presença de grupo sulfona ou sulfonamida. Entre os coxibes, encontram-se os celecoxibe, rofecoxibe, etorocoxibe, lumiracoxibe, paraminofenol, glicosaminoglicano, entre outros. Apesar da

eficácia anti-inflamatória e da baixa toxicidade gastrointestinal, os inibidores seletivos da COX-2 podem induzir ou agravar a hipertensão arterial, uma vez que promovem retenção de sais como o sódio (RAO; CHEN; KNAUS, 2006). Os coxibes também apresentam efeitos colaterais ao nível cardiovascular, em pacientes portadores de artrite reumatoide, o que ocasionou o cancelamento do registro do rofecoxibe (VIOXX[®]) e consequentemente sua retirada da terapêutica. Os fármacos lumiracoxibe e valdecoxibe estão sob avaliação pois também podem ter suas vendas suspensas. Por isso a comercialização dos respectivos medicamentos está sob controle da Vigilância Sanitária (GUAN et al., 2007; HARRAK et al., 2007; ANVISA, 2016)

A inibição específica da COX-2 resulta na baixa produção de PGI₂ pelo endotélio cardiovascular, o que pode contribuir para um aumento no risco de trombose, uma vez que PGI₂ é um inibidor da agregação plaquetária e vasodilatador (FENDRICK; GREENBERG, 2009; VONKEMAN; LAAR, 2010). Em contrapartida, a COX-1 produz tromboxano A₂ (TXA₂), que tem função na agregação plaquetária e vasoconstrição, efeitos contrários aos da PGI₂ (DAJANI; ISLAM, 2008). O desequilíbrio homeostático gerado pelo uso de inibidores específicos da COX-2, ocasiona efeitos colaterais cardiovasculares (WALLACE; VONG, 2008; VONKEMAN; LAAR, 2010).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar o perfil fitoquímico e as atividades biológicas de extratos orgânicos das folhas de *Miconia minutiflora*.

3.2 Específicos

- Determinar o perfil fitoquímico dos extratos hexânico, acetato de etila e metanólico das folhas de *M. minutiflora*;
- Quantificar as concentrações de compostos fenólicos totais, flavonoides e taninos totais como também avaliar a atividade antioxidante *in vitro* pelo método do DPPH dos extratos hexânico, acetato de etila e metanólico das folhas de *M. minutiflora*;
- Analisar os metabólitos secundários no extrato metanólico das folhas de *M. minutiflora* utilizando a técnica de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE),
- Observar o potencial citotóxico dos extratos hexânico, acetato de etila e metanólico das folhas de *M. minutiflora*;
- Avaliar a toxicidade aguda pela triagem farmacológica comportamental e a determinação da DL₅₀ dos extratos hexânico, acetato de etila e metanólico;
- Realizar a triagem dos extratos hexânico, acetato de etila e metanólico das folhas de *M. minutiflora* utilizando o modelo de inflamação aguda bolsão de ar;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória do extrato metanólico de *M. minutiflora*, utilizando modelos experimentais de inflamação aguda como, edema de pata e pleurisia induzidas por carragenina, edema de orelha induzido por óleo de cróton e permeabilidade vascular induzida por ácido acético;

- Quantificar a MPO em amostras do tecido subplantar dos animais oriundos do teste de edema de pata induzida por carragenina;
- Determinar as concentrações de TNF, IL-1 β e NO nos exsudatos inflamatórios dos animais do teste de pleurisia induzida por carragenina;
- Avaliar a atividade cicatrizante da formulação semi-sólida 10% do extrato metanólico das folhas de *M. minutiflora*;
- Analisar a atividade antinociceptiva do extrato metanólico das folhas de *M. minutiflora* nos modelos experimentais de nocicepção induzida por ácido acético e formalina,
- Investigar o mecanismo de ação nociceptiva do extrato metanólico das folhas de *M. minutiflora* através da utilização de antagonistas e agonistas de vários receptores que modulam a nocicepção.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material botânico

As folhas de *M. minutiflora* foram coletadas na região de Rio Largo, no estado de Alagoas, Brasil. A espécie foi identificada pelo Botânico MSc. Earl Celestino de Oliveira Chagas, pesquisador do Instituto de Proteção Ambiental do Estado de Alagoas (IMA-AL). A exsicata foi depositada no Herbário do IMA-AL sob número 50397. PERÍODO DE COLETA, REGIME DE CHUVAS, LATITUDE, LONGITUDE

4.2 Obtenção dos extratos

Para a obtenção dos extratos, as folhas foram secas, moídas, maceradas e protegidas da incidência da luz, em temperatura ambiente. Utilizou-se 300g de folhas de *M. minutiflora* para 1 L de cada solvente. Os solventes utilizados para a extração foram hexano (hex), acetato de etila (AcOEt) e metanol (MeOH), por um período de 48 h para cada solvente, pelo método da maceração. Os solventes foram evaporados sob pressão reduzida (rotaevaporação), a uma temperatura de 37 °C.

4.2.1 Screening fitoquímico - Cromatografia de Camada Delgada (CCD)

A triagem fitoquímica foi realizada a fim de detectar a presença de metabólitos secundários usando a técnica de Cromatografia de Camada Delgada (CCD) (WAGNER; BLADT, 2001). Os extratos hexânico (Mm-Hex), acetato de etila (Mm-AcOEt) e metanólico (Mm-MeOH) foram pesados e dissolvidos em seus respectivos solventes para se obter a concentração final de 5 mg/mL. Após a eluição nos sistemas de solventes, as placas foram secas e pulverizadas com os reveladores específicos para a identificação dos metabólitos presentes, de acordo com a Tabela 2. Os cromatogramas foram examinados sob luz ultravioleta (254 e 365 nm) e espectro visível. – COLOCAR A TAMPA NA FIGURA.

Tabela 2: Análise fitoquímica utilizando sistema eluente e reveladores específicos para a identificação de metabolitos secundários.

Metabólitos secundários	Sistema eluente	Padrão	Revelador
Alcaloides	Tolueno: acetate de etila: dietilamida (70:20:10)	quinina e yoimbina	Dragendorff
Flavonoides	Acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético glacial: água (100:11:11:26)	rutina e quercetina	NEU
Cumarinas	Tolueno: éter (1:1 saturado com ácido acético 10%)	cumarina	KOH etanólico 10%
Derivados antracênicos	Acetato de etila: metanol: água (100:13,5:10)	aloína e antraquinona	KOH etanólico 10%
Mono, sesqui e diterpenos	Tolueno: acetato de etila (93 :7)	carvacol e timol	Vanilina sulfúrica (10 mim a 110 °C)
Triterpenos e esteroides	Tolueno: clorofórmio: etanol (40:40:10)	sitosterol e estigmaferol	Lieberman-burchard (10 mim a 110 °C)

4.2.2 Determinação do teor fenólico total (TFT) e do teor de tanino total (TTT)

A determinação espectrofotométrica dos compostos fenólicos foi realizada utilizando o reagente de Folin-Ciocalteu e o teor de fenóis residuais foi obtido pelo método de precipitação de caseína seguido do reagente Folin-Ciocalteu, onde o TTT é a diferença entre os níveis de fenóis totais e residuais (AMORIM et al., 2008). O TFT foi calculado utilizando alíquotas de 0,2 mL dos extratos hexânico (Mm-Hex), acetato de etila (Mm-AceOH) e metanólico (Mm-MeOH) das folhas de *M. minutiflora* diluídos em metanol (1 mg/mL, p/v) e transferido para tubos de ensaio. Em seguida, foram adicionados 500 µL de solução aquosa do reagente Folin-Ciocalteu (10%, v/v), 1 mL de solução aquosa de carbonato de sódio (7,5%, p/v) e 8,3 mL de água destilada. As amostras permaneceram em repouso no escuro durante 30 minutos a temperatura ambiente e a absorbância foi medida em espectrofotômetro a 760 nm contra um branco preparado com água destilada. As amostras foram submetidas ao mesmo procedimento que o TFT. A curva de calibração foi obtida fazendo-se uso de oito diluições de ácido tânico (0,5 – 10 µg/mL) e submetida ao mesmo procedimento que os extratos. Para calcular o conteúdo fenólico residual, 6 mL dos extratos diluídos (1 mg/mL, p/v) foram

agitados durante 3 horas com 1 g de caseína e 12 mL de água destilada. Após filtrar, o volume foi ajustado a 25 mL com água destilada. Em seguida, 1 mL do filtrado foi adicionado a 500 µL de Folin-Ciocalteu, 1 mL de solução aquosa de carbonato de sódio (7,5% , p/v) e 7,5 mL de água destilada. O TFT e TTT foram expressos em miligramas de equivalentes de ácido tânico por grama de extrato (mg EAT/g). As amostras foram avaliadas com seis repetições. A equação da curva de calibração para o ácido tânico foi $y = 0,0839x + 0,0134$ ($R^2 = 0,9902$).

4.2.3 Determinação do teor de flavonóides totais (TFLT)

O TFLT dos três extratos foi estimado pelo método colorimétrico baseado na formação de um complexo entre o flavonoide e o alumínio (PEIXOTO SOBRINHO et al., 2008). O TFLT foi calculado usando 0,2 mL dos Mm-Hex, Mm-AceOH e Mm-MeOH, diluídos em metanol (1 mg/mL, p/v), 0,12 mL de ácido acético glacial, 2 mL de piridina em metanol (20%, v/v), 0,5 mL de cloreto de alumínio em metanol (5%, p/v) e 7,18 mL de água destilada. A solução foi deixada em repouso no escuro durante 30 min e a absorbância foi medida em espectrofotômetro a 420 nm contra um branco preparado com água destilada. Os resultados foram expressos em miligramas equivalentes de rutina por cada grama do extrato (mg RU/g). A curva de calibração foi obtida fazendo-se uso de oito diluições de rutina (0,5 – 20 µg/mL) e submetida ao mesmo procedimento dos extratos. As amostras foram avaliadas com seis repetições. A equação da curva de calibração de rutina foi $y = 0,0299x + 0,0015$ ($R^2 = 0,9991$).

4.2.4 Avaliação da atividade antioxidante pelo método DPPH

A atividade antioxidante dos extratos brutos de *M. minutiflora* foi determinada pelo método do DPPH. Este teste fotolorimétrico avalia o sequestro do radical livre estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazil - DPPH (BLOIS, 1958). Para a realização do ensaio, adicionou-se 270 µL da solução de DPPH (1 mM) a 30 µL de diferentes concentrações dos extratos em estudo (1,0 a 500 µg/mL). Após 30 minutos, a absorbância foi lida em espectrofotômetro com um comprimento de onde $\lambda = 517$ nm. O ácido ascórbico foi usado como composto de referência e o controle negativo foi o DPPH adicionado a 30 µL de etanol. A eliminação de radicais DPPH foi calculada pela fórmula:

CÁLCULO DA ATIVIDADE SEQUESTRADORA

$$AS (\%) = 100 \left(\frac{Abs\ controle - Abs\ amostra}{Abs\ controle} \right)$$

4.2.5 Determinação dos metabólitos secundários - CLAE

A determinação de metabólitos secundários do Mm-MeOH foi realizado de acordo com o método descrito por Zacarie et al. (2014). O extrato (10 mg/kg) foi dissolvido em 1 mL de metanol e depois filtrou-se através do filtro de membrana (tamanho de poro de 0,22 µm). O filtrado foi analisado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) num sistema Shimadzu (SPD-M20A) equipado com uma bomba quaternária acoplada com um desgaseificador, um forno para controlar a temperatura da coluna, fixada em 30 °C, um amostrador automático e um díodo detector array (DDA) com um comprimento de onda de 190-800 nm. O software utilizado para a aquisição de dados foi LC-Solutions, fabricadas pela Shimadzu Corporation (Kyoto, Japão). As amostras foram separadas numa coluna C-18 (Shim-pack; 46 milímetros x 25 cm) usando um gradiente linear. Os solventes utilizados foram: (A) ácido fórmico aquoso a 0,1% e (B) acetonitrila o sistema de eluição foi o seguinte: As condições iniciais foram de 95% A e 5% de B com gradiente linear de 25% de B, em t = 12 min. Esta foi mantida durante 8 minutos, após o que o programa diminuiu para 15% de B, em t = 22 min e foi mantida durante mais 8 min. O programa foi então devolvido para a composição inicial de solvente em t = 35 min. O volume de injeção foi de 20 µL.

4.3 Viabilidade celular (Teste do MTT)

Para avaliar a citotoxicidade dos extratos Mm-Hex, Mm- AcOet e Mm- MeOH foram utilizadas 4 linhagens de células tumorais: NCI-H292 (carcinoma mucoepidermoide de pulmão humano), MCF-7 (adenocarcinoma de mama humano), HEP-2 (carcinoma de laringe humana), HL-60 (leucemia promielocítica aguda) e uma linhagem de células normais J774.A1 (macrófago murino). Estas foram plaqueadas em placa de 96 poços, na concentração de 10^5 células/mL para as linhagens NCI-H292, MCF-7 e HEP-2; e na concentração de $0,3 \times 10^6$ para a linhagem HL-60 e $3,5 \times 10^4$ células/mL para a linhagem J774 A1. Após incubação em estufa a 37 °C, as células foram tratadas com os extratos na concentração de 50 µg/mL

durante 72 h. A doxorubicina (5 µg/mL) foi utilizada como fármaco padrão. Após esse período, as células foram reincubadas com MTT (5 mg/mL) por mais 3 h. Posteriormente, o sobrenadante foi aspirado e os cristais de formazan foram dissolvidos em dimetil sulfoxido (DMSO). A absorbância foi lida usando um leitor de microplacas no comprimento de onda de 540 nm. Os extratos foram classificados, de acordo com o percentual de inibição da viabilidade celular, nas seguintes categorias: inativo (1-20%), fracamente ativo (20-50%), moderadamente ativo (50-70%) ou muito ativo (70-100%) (FOUCHE et al., 2008).

4.4 Animais experimentais

Foram utilizados camundongos machos e fêmeas, albinos swiss (*Mus musculus*), pesando entre 20 a 25 g e ratos wistar (*Rattus norvegicus*), pesando entre 250 a 300g, provenientes do Biotério do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Os animais foram acondicionados em gaiolas de polietileno com grades de aço inoxidável e maravalha como cama da gaiola, tendo livre acesso à água e ração balanceada, mantidos em ambiente com temperatura de 22 ± 2 °C e luminosidade controlada, proporcionando um ciclo claro-escuro de 12 h. Todos os animais foram submetidos a jejum, com a retirada da ração cerca de 4 h antes do início do experimento, mas tiveram livre acesso à ingestão de água. Os animais foram mantidos de acordo com as normas internacionais do Conselho de Laboratório de Animais Experimentais (ICLAS).

4.5 Procedimentos éticos

Todos os experimentos foram realizados de acordo com as normas adotadas pela Sociedade Brasileira de Ciência de Animais de Laboratório (SBCAL) e com as normas estabelecidas pelo *National Institute of Health Guide for Care and Use of Laboratory Animals*. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Pernambuco (CEUA-UFPE), sob protocolo de número 23076.013749/2015-23. Este trabalho encontra-se em concordância com as normas vigentes no Brasil, de acordo com a Lei 9.605- art. 32 e decreto 3.179- art. 17, de 21/09/1999, que se refere ao uso de animais para fins científicos.

4.6 Toxicidade aguda

Para o teste de toxicidade aguda Foi utilizada a metodologia recomendada pela *Organisation for Economic Cooperation and Development* (OECD, 2001), que consiste na administração em dose única de 2.000 mg/kg dos extratos Mm-Hex, Mm-AcOet e Mm-MeOH. Os extratos brutos foram solubilizados em uma mistura de solução salina 0,9% e tween 80% (95:5; v/v) e um grupo recebeu apenas o veículo. Após a administração, os animais foram observados continuamente nas primeiras 2 h e depois a cada 24 h durante 14 dias para a verificação de qualquer alteração comportamental ou atividades fisiológicas. Os animais foram avaliados pelo método de *screening* hipocrático, o qual verifica qualquer comprometimento do animal como: estado de consciência, disposição, atividade e coordenação do sistema motor e tônus muscular, atividade do SNC e SNA do animal. Também foram observados o consumo de água, ração e o peso dos órgãos (fígado, rim e baço) após a eutanásia.

4.7 Atividade anti-inflamatória

Para avaliação da atividade anti-inflamatória dos extratos de *M. minutiflora*, os animais foram submetidos ao teste de bolsão de ar, edema de pata e pleurisia induzidos por carragenina; edema de orelha induzida por óleo de cróton e permeabilidade vascular induzida por ácido acético. Foram avaliados parâmetros como: migração leucocitária, exsudação, formação de edema, produção de mieloperoxidase, produção de citocinas pró-inflamatórias e concentração de NO.

4.7.1 Teste do bolsão de ar subcutâneo.

Esta metodologia foi realizada como triagem para a escolha do melhor extrato e da melhor dose para ser utilizada nos próximos experimentos, no intuito de reduzir o número de animais. Para avaliar a migração leucocitária para o sítio da inflamação, foram utilizados 9 grupos contendo 6 animais cada. Inicialmente foi feita a indução de uma bolsa de ar no dorso dos animais através da injeção de ar estéril. No primeiro dia, injetou-se 2,5 mL de ar estéril no dorso do animal, repetindo esse processo após 72 h. No sétimo dia do ensaio os animais

receberam, por via oral, os extratos Mm-AcOet e Mm-MeOH nas doses de 50, 100 ou 200 mg/kg. O grupo controle positivo recebeu o fármaco padrão por via oral (indometacina 5mg/kg) e um grupo controle negativo recebeu veículo (salina 0,9% e tween 80% (95:5; v/v). Após sessenta minutos, 1 mL de uma solução de carragenina a 1% (p/v) foi injetado dentro da bolsa de ar. Decorridas 6 h após a aplicação do agente flogístico, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ e as bolsas lavadas com 3 mL de tampão fosfato (PBS) contendo EDTA, como líquido de arraste. A contagem de leucócitos totais foi realizada em analisador hematológico ABX micros 60 (KIM et al., 2006).

4.7.2 Edema de pata induzido por carragenina

Ratos wistar machos (n=6) foram tratados via oral com o extrato Mm-MeOH (50, 100 e 200 mg/kg), indometacina (5 mg/kg) e solução salina 0,9% 1 h antes da injeção de carragenina. O edema foi induzido pela injeção de 0,1 mL de carragenina a 1% (p/v) na região subplantar da pata posterior direita uma hora após a administração do extrato (WINTER, 1962). O volume da pata foi medido antes e nos intervalos de 1, 2, 3, 4 h após a injeção de carragenina através do pletismômetro (Ugo Basile). Os resultados foram expressos como a diferença entre o volume final da pata a cada tempo (Vf) e o volume inicial (Vi). No final do experimento, os animais foram eutanasiados em câmara de CO₂ e o tecido plantar foi coletado em tampão fosfato/HTAB para posterior teste de atividade da mieloperoxidase.

4.7.3 Determinação da atividade da Mieloperoxidase (MPO)

Para avaliar a produção da MPO foram feitos homogenatos das secções subplantares do grupos controles e tratados de acordo com a técnica descrita por Bradley et al., (1982). O tecido subplantar foi colocado em tampão fosfato de potássio 50 mM (pH 6,0) contendo 0,5% de hexadeciltrimetilamônio (1,5 mL - 100 mg de tecido) em homogeneizador de Potter. O homogenato foi agitado em vórtex e centrifugado durante 15 minutos a 2.500 rpm. Dez microlitros do sobrenadante obtido foram adicionados em microplaca de 96 cavidades, em duplicata, sendo a seguir, adicionado 200 µL de solução tampão [di-hidrocloreto de o-dianisidina (16,7 mg), água bidestilada (90 mL), tampão fosfato de potássio (10 mL) e H₂O₂ 1% (50 µL)]. A atividade da enzima foi determinada pela medida de absorbância (460

nm) em leitor de microplaca com comprimento de onda de 610 nm, e expresso em mDO/tecido.

4.7.4 Permeabilidade vascular induzida por ácido acético

Os efeitos do extrato metanólico de *M. minutiflora* sobre o aumento da permeabilidade vascular induzida por ácido acético em camundongos foi determinado de acordo com o método descrito por Whittle (1964). O tratamento foi administrado por via oral, os animais do grupo controle negativo receberam o veículo, o grupo controle positivo recebeu a indometacina e um grupo recebeu o Mm-MeOH. Uma hora após o tratamento, os animais foram anestesiados com uma solução de cetamina e xilazina, (8:2; v/v), por via intraperitoneal. Imediatamente após, foi injetado no plexo retro-orbital 0,2 mL/camundongo do corante azul de Evans a 1% (Sigma, St. Louis, Missouri, USA). Em seguida, administrou-se 0,5 mL da solução de ácido acético (1% v/v) na cavidade peritoneal. Após um intervalo de 30 minutos, os camundongos foram eutanasiados em câmara de CO₂, a cavidade peritoneal foi lavada com 2 mL de salina e o exsudato foi coletado e centrifugado a 2000 rpm durante 10 min. A absorbância do sobrenadante foi lida em filtro de 610 nm em leitor de microplaca.

4.7.5 Edema de Orelha

A atividade anti-inflamatória tópica do extrato metanólico de *M. minutiflora* foi avaliada frente ao edema induzido por óleo de cróton, de acordo com o procedimento descrito por Rauh et al. (2011). Os animais foram anestesiados com uma associação de cetamina e xilazina (2:1, i.p.) e o agente flogístico foi diluído em 20 µL de acetona e aplicado na superfície interna da orelha direita dos animais. A orelha esquerda recebeu somente acetona e funcionou como controle negativo. O extrato metanólico em estudo e a indometacina (fármaco padrão) também foram diluídos em acetona, e administrado logo após a indução do agente flogístico, por via tópica. Passado 6 h, os animais foram eutanasiados e uma amostra de 6 mm de diâmetro foi retirada de cada orelha com auxílio de um *punch* de biópsia. As amostras foram pesadas e o edema foi calculado pela diferença entre os pesos da amostra da orelha inflamada em relação ao controle (amostra de orelha não inflamada).

4.7.6 Pleurisia Induzida por Carragenina

Os animais foram pré-tratados por via oral com o extrato Mm-MeOH (50, 100 e 200 mg/kg), dexametasona (0,5 mg/kg), indometacina (10 mg/kg) e veículo. Após 1 h, os animais foram anestesiados com uma solução de cetamina e xilazina, numa proporção de 2:1 (v/v). Após a anestesia, foi feita a tricotomia e a higienização com álcool iodado, na região dorso-lateral torácica esquerda, local de inserção cirúrgica, onde o tecido epitelial foi removido, expondo a musculatura intercostal. A pleurisia foi induzida pela injeção intrapleural de 0,1 mL de carragenina (1% p/v) como descrito por Fröde e Medeiros (2001). Para controle do processo cirúrgico, o procedimento foi realizado em um grupo controle sem a administração da carragenina intrapleural (grupo falso operado-*shan*). Após 4 h, os animais foram eutanaziados, o tórax aberto e a cavidade pleural foi lavada com 1 mL de uma solução tampão fosfato estéril contendo EDTA. A contagem total de leucócitos foi feita em analisador hematológico ABX micros 60. O exsudato obtido foi centrifugado e o sobrenadante foi congelado a -20°C para posterior análise de citocinas.

4.7.7 Determinação dos níveis de citocinas (TNF e IL-1 β)

A quantificação de IL-1 β e TNF dos exsudatos oriundo do teste de pleurisia foram determinadas pela técnica de ELISA sanduíche, utilizando kits específicos para camundongos, de acordo com as instruções do fabricante (eBioscience, San Diego, Califórnia, EUA).

4.7.8 Determinação da concentração de óxido nítrico (NO)

Para avaliar a produção de NO, as concentrações de nitrato (metabólito estável do NO) foram medidos do exsudato dos animais submetidos à pleurisia induzida por carragenina. Uma alíquota de 50 μ L de amostra foi transferida para uma microplaca e incubada com 50 μ L de reagente de Griess (sulfanilamida 1%, dicloridrato de naftiletilenodiamina 0,1%, H₃PO₄ 5%) por 10 min em temperatura ambiente protegido da luz. A absorbância foi medida em 540 nm em leitor de microplacas e a concentração de nitrato foi calculada usando uma curva padrão de nitrato de sódio (XU et al, 2000).

4.8 Avaliação da atividade cicatrizante

Nesse teste os camundongos foram distribuídos aleatoriamente em gaiolas individuais e divididos em 3 grupos: Controle negativo (CN) - tratado com a pomada base lanovaselina (obtida da Farmácia Escola Carlos Drummond de Andrade - UFPE); grupo tratado com dexpanthenol 50 mg/g e grupo tratado via tópica com a formulação semissólida contendo 10% de extrato metanólico de *M. minutiflora* (FSSMm 10%). Os grupos por sua vez foram subdivididos em 3 grupos de acordo com o período de observação (3, 7, ou 14 dias) com n=6. Para todos os procedimentos cirúrgicos, foi administrada anestesia dissociativa utilizando xilazina (10 mg/kg) e cetamina (60 mg/kg), por via intramuscular. Após a contenção dos animais em decúbito ventral, realizou-se a tricotomia da região dorsolombar e assepsia com solução de diglucolato de clorexidrina 2%, seguida de demarcação e excisão da ferida, com o *punch* de biópsia estéril de seis milímetros com lâmina cortante na borda, até a fáscia muscular. A hemostasia foi realizada por compressão digital, utilizando gaze estéril. Os tratamentos foram topicamente aplicados após o procedimento cirúrgico com auxílio de hastes plásticas estéreis. As feridas foram tratadas diariamente, uma vez ao dia, durante 3, 7 e 14 dias. Após cada período os animais foram contidos e anestesiados. Foi realizado debridamento da área lesionada e assepsia com solução fisiológica a 0,9%. As áreas das feridas foram registradas fotograficamente e medidas com auxílio do programa *ImageJ* 1,37, nos dias 0, 3, 7 e 14 pós-cirúrgico. Em seguida, excisões abrangendo a área da lesão e a pele íntegra, de dois milímetros, foram realizadas em cada grupo, a cada dia de análise, e encaminhadas para análise histopatológica.

4.9 Atividade antinociceptiva

4.9.1 Nocicepção induzida por ácido acético

Para avaliação da atividade antinociceptiva, os animais receberam, por via oral, o Mm-MeOH (50, 100 e 200 mg/kg); indometacina na dose de 10 mg/kg (substância padrão) e o grupo controle recebeu o veículo. Após uma hora, foi injetado o ácido acético 1% (v/v) (0,1 mL/10g do peso do animal) na cavidade peritoneal dos animais para induzir contrações da musculatura abdominal e/ou alongamento dos membros posteriores. Dez minutos após a aplicação do ácido, os camundongos foram colocados em gaiolas de polietileno transparentes,

onde foram observados e registrados o número de contorções abdominais durante 20 minutos. A porcentagem de inibição das contorções abdominais foi calculada comparando a média de contorções do grupo tratado com o a média de grupo controle (KOSTER, 1959).

4.9.2 Avaliação da participação do sistema α - adrenérgico no efeito antinocicptivo do Mm-MeOH colocar a refer

Neste teste, foi avaliada a participação dos sistemas $\alpha 1$ - e $\alpha 2$ - adrenérgico. Para verificar a participação do sistema $\alpha 1$ - adrenérgico na atividade antinociceptiva apresentada pelo Mm-MeOH, os grupos foram pré-tratados com prazosina (0,15 mg/kg - antagonista dos adrenoceptores $\alpha 1$), por via intraperitoneal 15 mim antes da administração do Mm-MeOH (100 mg/kg) ou do fármaco padrão fenilefrina (1 mg/kg - agonista $\alpha 1$ adrenérgico), Após o tratamento, os animais foram avaliados pelo método de nocicepção induzida pelo ácido acético, conforme descrito anteriormente.

Para verificar a participação do sistema $\alpha 2$ - adrenérgico, os animais foram pré-tratados com ioimbina (0,15 mg/kg; antagonista $\alpha 2$ - adrenérgico), administrado via intraperitoneal 15 mim antes da administração do Mm-MeOH (100 mg/kg) ou do fármaco padrão clonidina (1 mg/kg; agonista $\alpha 2$ - adrenérgico). Após o tratamento, os animais também foram avaliados pelo método de nocicepção induzida pelo ácido acético, conforme descrito anteriormente.

4.9.3 Avaliação da participação do sistema opióide no efeito antinocicptivo do Mm-MeOH

Com o objetivo de verificar a participação do sistema opióide, os animais foram pré-tratados com o antagonista não seletivo dos receptores opióides, naloxona (1,0 mg/kg) via intraperitoneal 15 mim antes da administração do Mm-MeOH (100 mg/kg) ou da morfina (5,0 mg/kg), que foi utilizada como controle positivo. Após o tratamento, os animais foram avaliados pelo método de nocicepção induzida pelo ácido acético.

4.9.4 Nocicepção induzida por formalina

O Mm-MeOH foi administrado por via oral na dose de 100 mg/kg, e morfina (padrão) por via subcutânea. Após 15 min, foi injetado 20 µL de formalina a 2,5% (formaldeído 0,92% diluído em salina) na área subplantar da pata traseira direita dos animais. O tempo acumulado em segundos que os animais permaneceram lambendo a pata foi medido em duas fases distintas, a primeira fase de 0 a 5 min e a segunda fase de 15 a 30 min após a injeção da formalina (HUNSKAAR; HOLE, 1987).

4.10 Análise estatística

Os resultados foram expressos como valores de média $\pm$ desvio padrão para cada grupo experimental, utilizando o software *GraphPad Prism* (versão 6.0). Os dados foram avaliados por meio da análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido pelo teste de Tukey ou avaliados por meio da análise de variância (ANOVA) de duas vias, seguido pelo teste de múltiplas comparações de Bonferroni. Para o intervalo de confiança de 95%, valores de “p” menores que 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados como indicativos de significância estatística.

5. RESULTADOS

5.1 Rendimento do material botânico.

A partir das folhas trituradas e secas de *M. minutiflora*, foram obtidos os extratos com os seguintes rendimentos: hexânico (2 g, com rendimento de 0,7%), acetato de etila (3 g e rendimento de 1%) e metanólico (10 g e rendimento de 3%). O rendimento dos extratos foi calculado em relação à quantidade do material vegetal seco utilizado na extração.

5.2 Screening fitoquímico – cromatografia de camada delgada (CCD)

A Tabela 3 mostra o resultado do perfil fitoquímico dos extratos de *M. minutiflora* por cromatografia de camada delgada (CCD).

Tabela 3: Resultado do *screening* fitoquímico dos extratos em hexano (**Hex**), acetato de etila (**AcOEt**) e metanol (**MeOH**) de *M. minutiflora*.

Metabólitos secundários	Hex	AcOEt	MeOH
Alcaloides	-	-	+
Compostos fenólicos	+	+	++
Cumarinas	-	-	-
Derivados antracênicos	++	+++	+++
Mono, sesqui e diterpenos	+	+	-
Triterpenos e esteroides	+	+++	++

— Não detectado (-) positivo (+)

Através dos resultados obtidos, verificou-se a presença de triterpenos/esteróides e derivados antracênicos nos três extratos brutos (Hex, AcOet e MeOH). O extrato metanólico apresentou alcaloides e compostos fenólicos. A presença de esteroides e triterpenos corroboram com os estudo de Chan et al. (1992), em que nove triterpenos foram isolados de *M. stenotachia*; Um outro estudo, realizado por Macari, Emereciano e Ferreira (1990) relata que foram isolados três triterpenos diferente de *M. albicans*. Crevelin et al. (2006) isolaram nove triterpenos e esteróides das seguintes espécies: *M. rubiginosa*, *M. fallax*, *M. sellowiana*, *M. ligustroides*, *M. albicans* e *M. pepericarpa*.

Embora um grande número de compostos tenha sido isolados a partir de espécies da família Melastomataceae, apenas algumas espécies do gênero *Miconia* têm sido extensivamente estudados. Os principais constituintes desta família pertencem a terpenóides, fenóis simples, quinonas, lignanas e seus glicosídeos, bem como uma vasta gama de taninos ou polifenóis (Serna, Martinez, 2015). Melhorar a discussão, colocar os da tabela 1

5.3 Doseamento de fenóis totais, flavonoides e taninos totais

Os resultados obtidos a partir do doseamento de fenóis totais, flavonoides e taninos totais estão expressos na Tabela 4.

Tabela 4: Doseamento de fenóis totais, flavonoides e taninos totais dos extratos hexânico (Mm-HEX), acetato de etila (Mm-AcOEt) e metanólico (Mm-MeOH) das folhas de *M. minutiflora*

Amostras	Fenóis Totais (mg EAT/g $\pm$ SD)	Flavonoides (mg ER/g $\pm$ SD)	Taninos Totais (mg EAT/g $\pm$ SD)
Mm- Hex	24,4 $\pm$ 4,4	ND	ND
Mm-AcOEt	63,9 $\pm$ 2,7	ND	39,6 $\pm$ 3,9
Mm - MeOH	154,8 $\pm$ 3,2	62,34 $\pm$ 7,9	112,7 $\pm$ 2,3

ND – não determinado; EAT – Equivalente de ácido tânico; ER – equivalente de rutina; EC – equivalente de cumarina

A análise quantitativa referente à presença de taninos na amostra Mm-MeOH (112,7 $\pm$ 2,3) corrobora com os achados qualitativos do *screening* fitoquímico obtidos anteriormente.

Rodrigues et. al. (2006) realizaram o estudo fitoquímico do extrato metanólico das folhas de *Miconia cabucu*, no qual observaram a presença de flavonoides e do ácido gálico, sendo este amplamente reconhecido na literatura por sua propriedade antioxidante.

5.3.1 Atividade antioxidante pelo método do DPPH

Na atividade antioxidante foi observado um efeito concentração-dependente em relação ao teor de compostos fenólicos totais encontrados para todos os extratos. A concentração efetiva (CE_{50}) capaz de sequestrar o radical livre estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazil - DPPH para extrato metanólico foi de $(16,6 \pm 0,06 \mu\text{g/mL})$, em acetato $(114,9 \pm 6,24 \mu\text{g/mL})$, em hexânico $(> 500 \mu\text{g/mL})$ e ácido ascórbico $(4,82 \pm 0,06 \mu\text{g/mL})$.

Algumas classes de metabólitos secundários são descritos na literatura científica por apresentarem atividades biológicas como: anti-inflamatória; antitumoral, antialérgica e antioxidante. Os compostos fenólicos e terpenos são metabólitos secundários que estão intimamente relacionados a essas atividades biológicas, em destaque a atividade antioxidante (DELGADO et al., 2013). A atividade antioxidante de compostos fenólicos deve-se principalmente às suas propriedades redox, que lhes permitem atuar como agentes redutores, doadores de hidrogênio e sequestradores de oxigênio (RICE-EVANS et al., 1996). Pieroni et al. (2011) avaliaram a atividade antioxidante de *M. albicans* pelo método do DPPH e observaram que o extrato metanólico foi o que apresentou maior quantidade de compostos fenólicos totais e melhor atividade antioxidante.

5.4 Determinação dos metabólitos secundários por CLAE

O cromatograma da Figura 7 refere-se à amostra padrão, contendo ácido gálico, rutina e ácido elágico. A Figura 8 apresenta o cromatograma da amostra do extrato Mm-MeOH. Nesta figura é possível observar que existem picos nos mesmos tempos de retenção dos padrões apresentados na Figura 7. A amostra do extrato Mm-MeOH foi misturada com a amostra padrão e, após a injeção no cromatógrafo, foi gerado o cromatograma apresentado na Figura 9, sendo possível constatar que os analitos padrão estão presentes na amostra.

Figura 7: Cromatograma da solução padrão, contendo ácido gálico, rutina e ácido elágico.

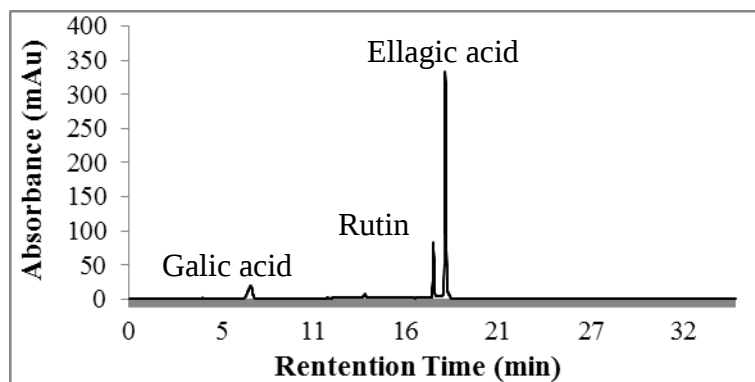


Figura 8: Cromatograma da amostra do extrato Mm-MeOH.

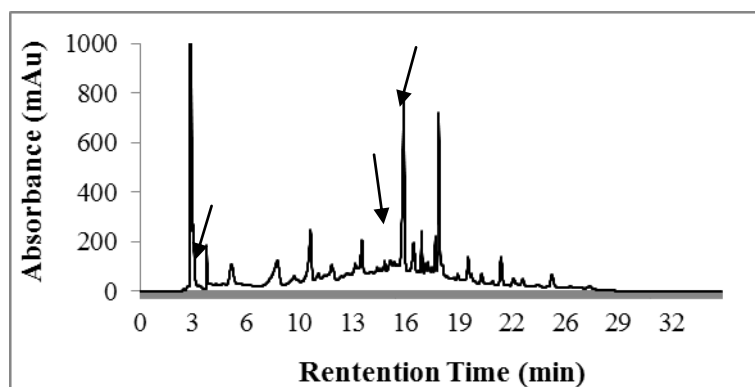
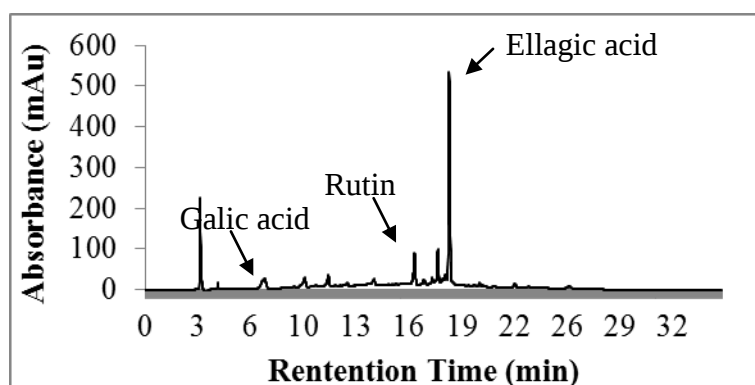


Figura 9: Cromatograma da mistura formada pela amostra do extrato Mm-MeOH e a solução padrão, contendo ácido gálico, rutina e ácido elágico.



Para confirmar a identificação dos analitos padrão, as Figuras 10, 11 e 12 apresentam os espectros UV do ácido gálico, rutina e ácido elágico, respectivamente, bem como os

espectros UV dos compostos presentes na amostra do extrato Mm-MeOH, cujos tempos de retenção coincidiram com os dos analitos padrão.

A amostra padrão do ácido gálico apresentou bandas de absorção em 205 e 271 nm, enquanto que o composto presente no Mm-MeOH no mesmo tempo de retenção do ácido gálico apresentou maiores bandas de absorção em 214 e 271. Analisando os espectros apresentados na Figura 9, observa-se que a rutina apresenta três bandas de maior INTENSIDADE: 228, 258 e 354 nm, confirmando mais uma vez a identificação deste composto na amostra do extrato Mm-MeOH, que tem o mesmo tempo de retenção da rutina, com maiores bandas de absorção a 223, 253 e 351 nm. Finalmente, o ácido elágico apresentou maiores bandas de absorção a 253 e 367 nm e o composto presente no Mm-MeOH, cujo tempo de retenção foi o mesmo do ácido elágico, também apresentou maiores bandas de absorção a 253 e 367 nm. Ácido gálico, rutina e ácido elágico foram quantificados na amostra do extrato bruto, sendo encontradas as seguintes concentrações para estes três compostos, respectivamente: 4,013mg/g, 2,123 mg/g e 1,846 mg/g.

Figura 10: Espectro UV do ácido gálico e do composto presente na amostra do extrato Mm-MeOH, cujo tempo de retenção foi o mesmo do ácido gálico.

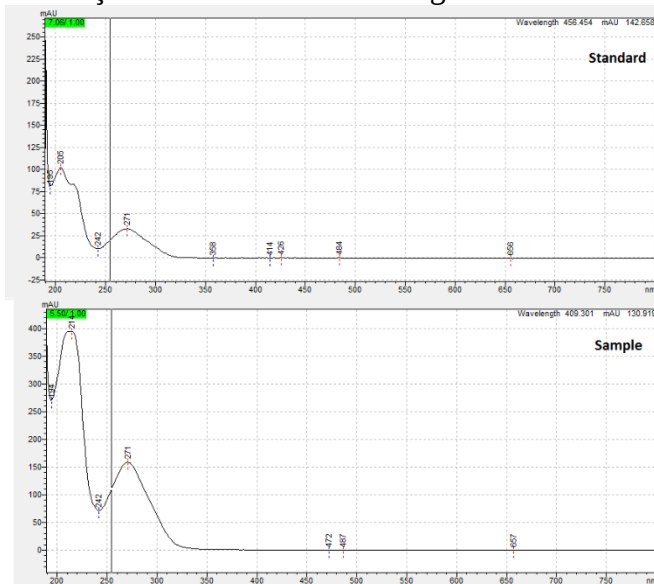


Figura 11: Espectro UV da rutina e do composto presente na amostra do extrato Mm-MeOH, cujo tempo de retenção foi o mesmo da rutina.

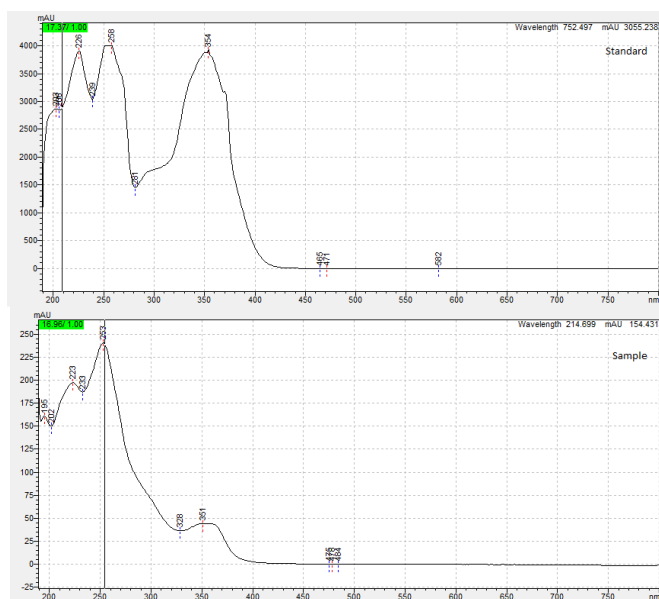
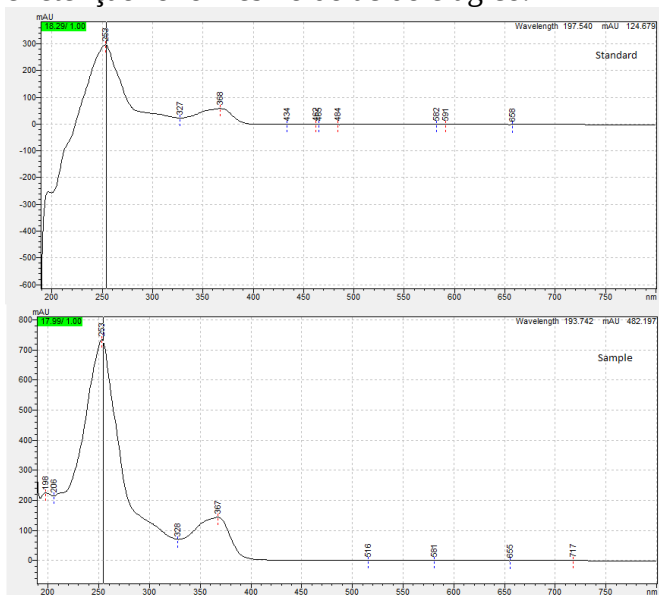


Figura 12: Espectro UV do ácido elágico e do composto presente na amostra do extrato Mm-MeOH, cujo tempo de retenção foi o mesmo do ácido elágico.



Esses achados obtidos neste estudo, foram semelhantes ao estudo realizado por Serna e Martinez (2015), em que eles relataram a presença de ácido gálico várias espécies de espécies de Melastomataceae, como *M. Cabuçu*, *M. rubiginosa* e *Monochaetum multiflorum* Bonpl., enquanto que o ácido elágico estava presente nas espécies *Dissotis perkinsiae* Gil, *M.*

multiflorum, and *Tibouchina semidecandra*. O ácido elágico é um composto fenólico conhecido por suas atividades biológicas, tais como antioxidante, hepatoprotetor, antifibronogênico e antihepatocarcinogênico. Este antioxidante natural é comumente encontrado em frutas vermelhas, nozes, amêndoas e chá verde (GARCÍA-NIÑO; ZAZUETA, 2015). A presença deste composto fenólico no extrato metanólico de *M. Minutiflora* pode estar relacionada com sua atividade antioxidante. A rutina é um bioflavonoide derivado da quercetina. Este polifenol é bastante conhecido por suas propriedades anti-tumoral, anti-inflamatória, antioxidante e seus efeitos neuroprotetores (MAGALINGAM; RADHAKRISHNAN; HALEAGRAHARA, 2013). Estudos *in vitro* sobre o mecanismo de ação do ácido gálico indicou sua ação sobre a inibição da liberação de mieloperoxidase, na migração leucocitária além de sua atividade antioxidante (KROES et al., 1992). A presença do ácido elágico, rutina e ácido gálico indicam possíveis ações anti-inflamatórias e antioxidante para o extrato metanólico de *M. Minutiflora*.

5.5 Viabilidade celular (Teste do MTT)

O percentual de inibição da viabilidade celular dos extratos hexânico, em acetato de etila e metanólico estão apresentados na Tabela 5. O extrato em acetato apresentou citotoxicidade frente às linhagens cancerígenas NCI-H292, HL-60 e HEP-2, com percentuais de inibição da viabilidade celular superiores a 90%, sendo considerado muito ativo. Para a linhagem de adenocarcinoma de mama humano (MCF-7), o extrato em acetato de etila mostrou-se fracamente ativo, com percentual de inibição de 43%.

O extrato metanólico, por outro lado, foi inativo para a linhagem NCI-H292 e fracamente ativo para as linhagens MCF-7, HL-60 e HEP-2. Além disso, o extrato metanólico não apresentou citotoxicidade sobre a linhagem de células normais.

O extrato hexânico foi muito ativo sobre a linhagem de carcinoma de laringe humana (HEP-2), com 88% de inibição. No entanto, foi fracamente ativo para as linhagens MCF-7 e HL-60 e inativo para a linhagem NCI-H292. O extrato hexânico foi fracamente ativo sobre a linhagem J774.A1.

Estes resultados indicam que o extrato em acetato apesar de ter mostrado resultados promissores, apresentou toxicidade significativa em células normais, enquanto os extratos hexânico e metanólico são promissores para a investigação de outras atividade farmacológicas, diante da baixa citotoxicidade sobre células normais.

Tabela 5: Efeito dos extratos de *M. minutiflora* sobre a Viabilidade celular pelo método do MTT.

Extratos	Concentração	% de inibição				
	(µg/mL)	NCI-H292	HL-60	MCF-7	HEP-2	J774.A1
Mm-Hex	50	16,1 ± 1,6	48,7 ± 3,5	50,4 ± 4,2	88,1 ± 3,4	44,7 ± 0
Mm-AcOEt	50	91,4 ± 1,0	96,5 ± 1,4	43,4 ± 1,3	95,2 ± 1,7	90,2 ± 1,6
Mm-MeOH	50	11,9 ± 0,9	32,4 ± 2,9	42,8 ± 2,4	47,6 ± 2,7	8,80 ± 0
Doxorrubicina	5	94,2 ± 1,9	92,9 ± 0,6	74,8 ± 2,1	79,4 ± 2,6	96,0 ± 0,1

Extratos de *M. minutiflora*: hexânico (Mm-Hex), acetato de etila (Mm-AcOEt) e metanólico (Mm-MeOH). NCI-H292 (carcinoma mucoepidermoide de pulmão humano), MCF-7 (adenocarcinoma de mama humano), HEP-2 (carcinoma de laringe humana), HL-60 (leucemia promielocítica aguda) e J774.A1 (macrófago murino)

Várias plantas, apesar de suas propriedades farmacológicas e utilização, podem exibir toxicidade a nível celular ou até sistêmico, como por exemplo, o confrei (*Symphytum officinale*) que possui alcaloides com ação hepatotóxica (ARBO et al., 2008; OBERLIES et al., 2004). Neste cenário, o emprego de testes celulares para a avaliação da citotoxicidade de produtos naturais ou sintéticos é uma ferramenta para estudos preliminares de baixo custo, que proporciona resultados com rapidez, além de evitar o uso desnecessário de modelos animais.

Entre as técnicas para avaliação da citotoxicidade, o método do MTT tem sido amplamente empregado em inúmeros estudos (DEB et al., 2011; FOTAKIS; TIMBRELL, 2006). Trata-se de um método espectrofotométrico, no qual a atividade da enzima succinil-desidrogenase, presente na mitocôndria das células viáveis catalisará a formação de cristais de formazan, um produto de coloração roxa, a partir do sal tetrazólico MTT (MOSMANN, 1983; ALLEY et al., 1988).

Estudos anteriores realizados com extratos metanólicos de *Miconia albicans*, *Miconia cabucu*, *Miconia rubiginosa* e *Miconia stenostachya* indicaram que estas espécies não apresentaram efeitos citotóxicos em concentrações abaixo de 20 µg/mL, porém em concentrações acima de 30 µg/mL para *Miconia albicans* e 40 µg/mL para *M. cabucu*, os extratos metanólicos apresentaram efeitos citotóxicos frente a fibroblastos (SERPELONI, et. al., 2008).

No presente estudo, verificou-se que o extrato metanólico de *M. minutiflora*, em concentração mais elevada (50 µg/mL), apresentou baixa citotoxicidade, indicando que esta espécie parece ser menos citotóxica do que outras espécies descritas acima.

5.6 Toxicidade aguda

Durante a avaliação do *screening* hipocrático, os grupos que receberam os extratos hexânico, acetato de etila e metanólico de *M. minutiflora* na dose de 2.000 mg/kg apresentaram piloereção na primeira hora de observação, entretanto, nenhum animal veio a óbito até o final do experimento. Não foi observada nenhuma variação significativa no peso, consumo de ração e água em relação aos animais dos grupos controles durante 14 dias. Não houve diferença no peso dos órgãos e na análise macroscópica dos mesmos. Os resultados indicam que os extratos possuem baixa toxicidade *in vivo*, tendo o valor da DL₅₀ acima de 2.000 mg/kg, sendo considerada segura (OECD, 2001). Os resultados deste teste estão descritos na Tabela 6.

Tabela 6: Evolução ponderal, consumo de ração, água e peso relativo dos órgãos (média $\pm$ desvio padrão), dos animais tratados com os extratos de *M. minutiflora*.

Grupos	Consumo de ração (g/dia)	Consumo de água (mL/dia)	Peso dos animais (g) Inicial/Final	Peso relativo dos órgãos		
				Baço	Fígado	Rim
Mm-Hex	5,33 $\pm$ 0,57	8,33 $\pm$ 1,7	21,3 – 29,3	0,005 $\pm$ 0,0	0,052 $\pm$ 0,003	0,005 $\pm$ 0,0
Mm-AcoEt	4,8 $\pm$ 0,59	8,33 $\pm$ 1,2	24,5 – 29,5	0,007 $\pm$ 0,0	0,055 $\pm$ 0,019	0,005 $\pm$ 0,0
Mm-MeOH	5,6 $\pm$ 0,53	6,7 $\pm$ 1,4	25,3 – 27,0	0,006 $\pm$ 0,001	0,066 $\pm$ 0,016	0,006 $\pm$ 0,001
Controle	5,25 $\pm$ 0,61	10 $\pm$ 1,8	24,6 – 30,9	0,005 $\pm$ 0,0	0,053 $\pm$ 0,004	0,005 $\pm$ 0,0

Os valores foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (n=5). *P< 0,05. Significativos após análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni com intervalo de confiança de 95%, quando comparados ao grupo controle. Extratos de *M. minutiflora*: hexânico (Mm-Hex), acetato de etila (Mm-AcOEt) e metanólico (Mm-MeOH).

Seguindo o protocolo da OECD, também foram avaliados os parâmetros bioquímicos e hematológicos. Para avaliação das alterações nos parâmetros bioquímicos, foram observados marcadores de funções hepáticas: transaminase glutâmica oxalacética sérica (TGO); transaminase glutâmica pirúvica sérica (TGP) e fosfatase alcalina (FA), Além dos marcadores de função renal: uréia (UR) e creatinina (CR). Não foi observada alteração significativa em nenhum dos parâmetros renais avaliados (Tabela 7).

Tabela 7: Avaliação dos parâmetros bioquímicos em animais submetidos ao teste de toxicidade aguda.

Parâmetros	Controle	Mm-HEX	Mm-AcOet	Mm-MeOH
UR (mg/Dl)	51,8 ± 5,02	40,50 ± 6,36	41,67 ± 6,66	34,67 ± 2,52
CR (mg/dL)	0,38 ± 0,01	0,38 ± 0,05	0,39 ± 0,02	0,37 ± 0,05
TGO (U/L)	147,20 ± 27,16	ND	119,0 ± 22,52	140,33 ± 20,65
TGP (U/L)	48,40 ± 1,95	75,33 ± 7,09	53,33 ± 0,58	58,00 ± 13,45
FA (U/L)	105,6 ± 35,56	55,67 ± 14,64	77,0 ± 14,18	106,67 ± 16,62

Uréia (UR); creatinina (CR); transaminase glutâmica oxalacética sérica (TGO); transaminase glutâmica pirúvica sérica (TGP) e fosfatase alcalina (FA). *** p < 0,0001 Significativos após análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Newman-Keuls com intervalo de confiança de 95%, quando comparados ao grupo controle. Os valores foram expressos como média ± desvio padrão (n=5). *p< 0,05. Significativos após análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni com intervalo de confiança de 95%, quando comparados ao grupo controle.

Em relação à avaliação hematológica, não foi observada alteração significativa em nenhum dos parâmetros avaliados, como mostra a Tabela 8.

Tabela 8: Avaliação dos parâmetros hematológicos em animais submetidos ao teste de toxicidade aguda.

Parâmetros	Controle	Mm-HEX	Mm-AcOet	Mm-MeOH
UR (mg/Dl)	51,8 ± 5,02	40,50 ± 6,36	41,67 ± 6,66	34,67 ± 2,52
CR (mg/dL)	0,38 ± 0,01	0,38 ± 0,05	0,39 ± 0,02	0,37 ± 0,05
TGO (U/L)	147,20 ± 27,16	ND	119,0 ± 22,52	140,33 ± 20,65
TGP (U/L)	48,40 ± 1,95	75,33 ± 7,09	53,33 ± 0,58	58,00 ± 13,45
FA (U/L)	105,6 ± 35,56	55,67 ± 14,64	77,0 ± 14,18	106,67 ± 16,62

Glóbulos brancos (WBC); Glóbulos vermelhos (RBC); Hemoglobina (GHB); Hematócrito (HCT); Contagem de plaquetas (PLT); Plaquetária (PCT); Volume corpuscular principal (MCV); Hemoglobina corpuscular principal (MCH); Concentração de hemoglobina corpuscular principal (MCHC); Largura da distribuição de células vermelhas (RDW); Volume principal de plaquetas (MPV). Os valores foram expressos como média ± desvio padrão (n=5). *p< 0,05. Significativos após análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni com intervalo de confiança de 95%, quando comparados ao grupo controle.

De acordo com o Guia 423 (OECD, 2001), quando não ocorre óbito de nenhum animal ao ser administrada a dose de 2.000 mg/kg, o valor da DL₅₀ é acima de 2.000 mg/kg ou entre 2.000 e 5.000 mg/kg, sendo considerada praticamente atóxica. O mesmo protocolo não aconselha a realização do teste de toxicidade aguda utilizando a dose de 5.000 mg/kg, uma

vez que é difícil a solubilização da substância e administração, protegendo assim a vida do animal. Deve-se utilizar a dose de 5.000 mg/kg caso seja necessário em um estudo para garantir a qualidade da saúde humana. **Para os clínicos.**

5.7 Teste do bolsão de ar subcutâneo

Os extratos de *M. minutiflora* apresentaram atividade anti-inflamatória no teste do bolsão de ar, inibindo a migração leucocitária (Tabela 9). Este teste foi utilizado como triagem para determinação do melhor extrato e da melhor dose para a continuidade do estudo. O extrato metanólico na dose de 100 mg/kg é o melhor extrato para ser utilizado, com percentual de inibição da migração leucocitária em 70% .

Tabela 9: Efeito dos extratos de *M. minutiflora* sobre a migração leucocitária no teste do bolsão de ar.

Grupos	Dose (mg/kg)	No. de PMNL/mL ($\times 10^6$)	Inibição (%)
Controle carragenina	-	17,70 $\pm$ 1,07	-
Controle salina	-	0,10 $\pm$ 0,01*	-
Mm-MeOH	50	9,30 $\pm$ 0,67 *	47
	100	5,36 $\pm$ 0,66 *	70
	200	7,22 $\pm$ 1,88 *	59
Mm-AcOEt	50	10,86 $\pm$ 0,99 *	38
	100	10,56 $\pm$ 1,98 *	40
	200	9,22 $\pm$ 0,63 *	48
Indometacina	5	6,54 $\pm$ 0,74*	62

Os valores foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (n=5). *P<0.0001. Significativos após análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Tukey com intervalo de confiança de 95%, quando comparados ao grupo controle carragenina.

O modelo de bolsão de ar induzido por carragenina é conhecido por ser um excelente modelo para avaliação da atividade inflamatória aguda, em que o extravasamento de líquidos, a migração de leucócitos e vários parâmetros de exsudado bioquímicos envolvidos na resposta inflamatória podem ser detectados (KOO et al., 2006). Este modelo mimetiza a artrite reumatoide e é utilizado como triagem para potenciais candidatos a fármacos no tratamento da

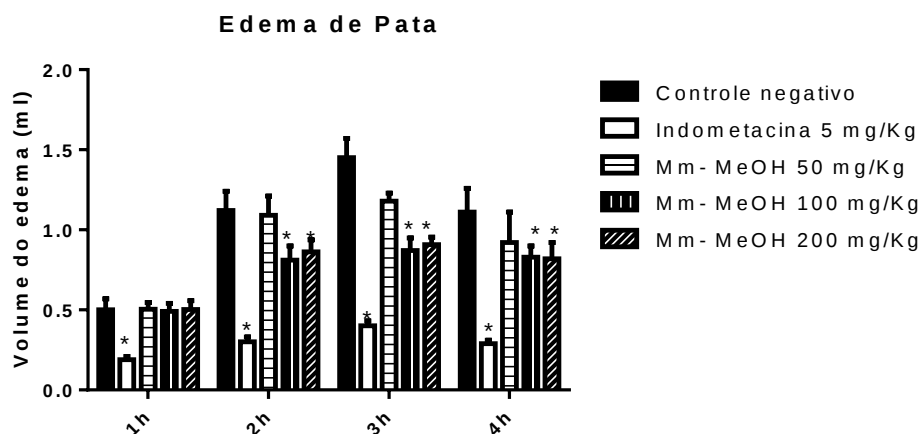
artrite. A bolsa de ar previamente inoculada no dorso do animal forma uma membrana com características semelhantes à membrana sinovial inflamada de pacientes com artrite reumatoide (SEDGWICK; LEES, 1986).

A partir dos resultados obtidos neste teste foi possível definir o melhor extrato e a melhor dose a ser utilizadas nos experimentos seguintes. O extrato Mm-MeOH apresentou atividade anti-inflamatória significativa neste ensaio, e esta atividade não foi dose-dependente. Com base nestes resultados, sugere-se que a espécie pode ter potencial antiartrítico.

5.8 Edema de pata induzido por carragenina

O extrato metanólico de *M. minutiflora* nas doses de 100 e 200 mg/kg apresentou atividade antiedematogênica conforme mostrado na Figura 13.

Figura 13: Efeito do extrato de *Miconia minutiflora* (Mm-MeOH) na redução do volume do edema de pata de ratos induzido por carragenina. Os valores foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (n=5). *p < 0,05 vs controle. Significativos após análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni com intervalo de confiança de 95%, quando comparados ao grupo controle.



O edema de pata induzido por carragenina em ratos está associado com a produção de diferentes mediadores inflamatórios, incluindo histamina, serotonina, bradicinina, óxido nítrico e prostaglandinas, cuja liberação é intimamente associada com a migração de leucócitos para o sítio inflamatório (FRANÇA et al., 2001). É caracterizado pela liberação sequencial de mediadores inflamatórios: nos primeiros 90 minutos ocorrem a liberação concomitante de histamina e serotonina (responsáveis pela vasodilatação e aumento da

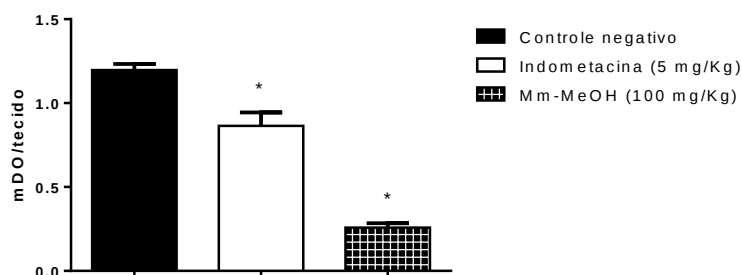
permeabilidade); a segunda fase, que se estende até aproximadamente 150 minutos é desencadeada por cininas (induzindo um aumento na permeabilidade dos vasos sanguíneos); enquanto na terceira fase que começa a partir de 150 minutos, ocorre a liberação de PGs e óxido nítrico, com um pico máximo na terceira hora (DI ROSA; GIROUD; WILLOUGHBY, 1971; SEIBERT et al., 1994). Neste estudo, o extrato metanólico de *M. minutiflora* reduziu o edema principalmente na terceira hora, sugestivo da diminuição da síntese e/ou liberação de prostaglandinas, possivelmente por inibição das enzimas cicloxigenases.

5.8.1 Determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO)

Após o teste de indução do edema de pata por carragenina, os animais dos grupos controle negativos, indometacina e Mm-MeOH (100 mg/kg) foram eutanasiados e a região subplantar da pata esquerda do animal foi removida para determinação da atividade da mieloperoxidase (MPO).

O Mm-MeOH reduziu a atividade enzimática da MPO quando comparada ao grupo controle (Figura 14), confirmando a diminuição da migração leucocitária para o local da inflamação.

Figura 14: Atividade do extrato metanólico de *Miconia minutiflora* (Mm-MeOH) sobre a atividade enzimática da mieloperoxidase dos tecidos plantar de animais submetidos ao edema de pata de rato induzido por carragenina. *mDO (média de densidade óptica). Os valores foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (n=5). *p<0,0001, **p<0,01 vs controle. Significativos após análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Tukey com intervalo de confiança de 95%, quando comparados ao grupo controle.

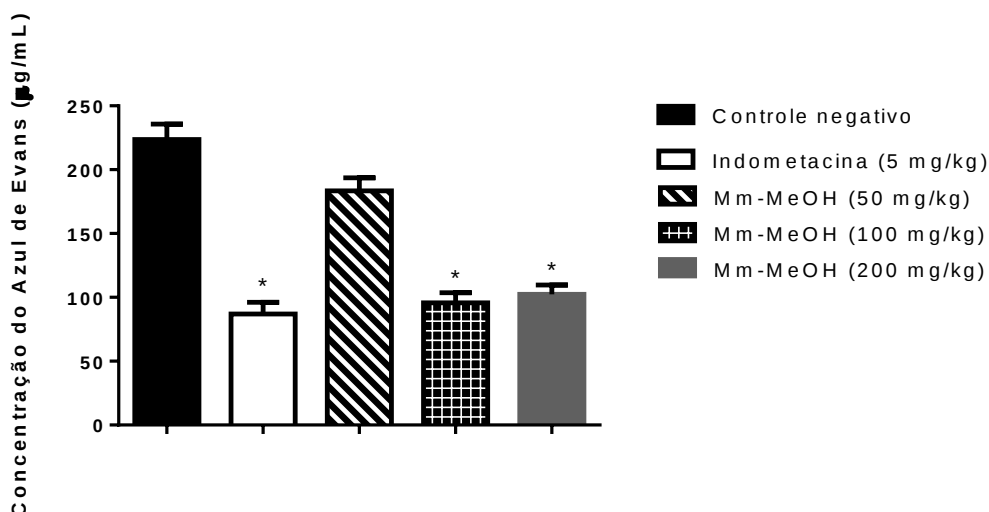


A MPO é uma enzima presente nos grânulos azurófilos dos neutrófilos, cuja função é promover a formação de espécies de oxigênio reativas que assistem na destruição de agentes patogênicos (ARNHOLD 2004). Portanto, a inibição de MPO pode resultar num efeito anti-inflamatório (NIEMEGEREERS et al., 1964). A redução de atividade de mieloperoxidase neste teste confirma a actividade anti-inflamatória relacionada com a redução da migração dos leucócitos, especialmente dos neutrófilos.

5.9 Permeabilidade vascular induzida por ácido acético

O aumento da permeabilidade vascular induzido por ácido acético é conhecida por provocar a inflamação exsudativa e leva a libertação inicial de mediadores químicos tais como a prostaglandina E2 (PGE2), histamina e serotonina (CHOI et al., 2006). Neste estudo, Mm-MeOH inibiu a exsudação (Figura 15), sugerindo a inibição da liberação de prostaglandinas. Estes resultados corroboram com os dados encontrados no teste do edema da pata induzido por carragenina. Tem sido demonstrado que a inibição de edema da pata de rato induzida por carragenina na fase tardia correlaciona-se bem com os efeitos terapêuticos dos fármacos anti-reumáticos (NIEMEGEREERS et al., 1964).

Figura 15: Potencial do extrato de *Miconia minutiflora* (Mm-MeOH) frente à permeabilidade vascular induzida por ácido acético. Os valores foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (n=5). * $p < 0.0001$ vs controle. Significativos após análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Tukey, quando comparados ao grupo controle.

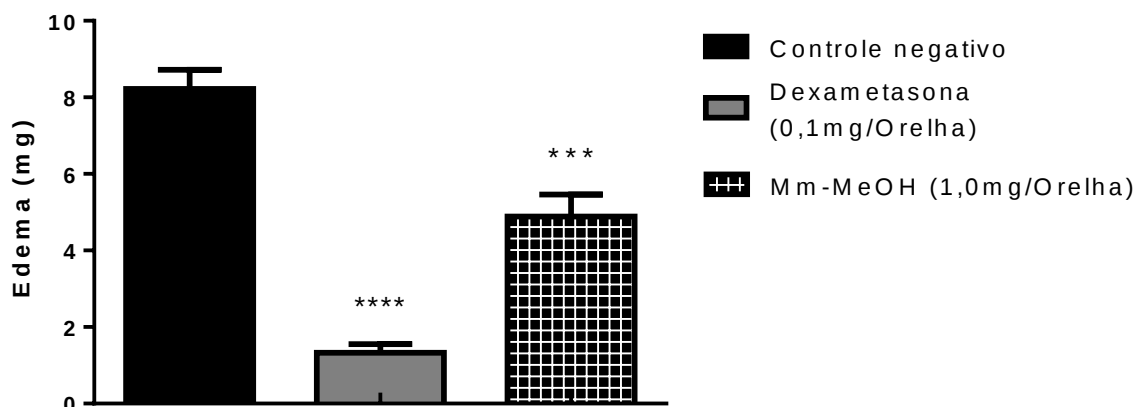


As principais características de inflamação aguda estão vasodilatação, exsudação de plasma, aumento da permeabilidade vascular, e a migração de células para o sítio da inflamação (SHERWOOD E TOLIVER-KINSKY, 2004). O aumento da permeabilidade vascular induzida por ácido acético é conhecida por induzir a inflamação exsudativa conduz a liberação inicial de mediadores químicos, tais como a prostaglandina E2 (PGE2), a histamina, a serotonina e (CHOI et al., 2006). Neste estudo, MM-MeOH inibide exsudação, sugerindo a inibição da liberação de aminas vasoativas e prostaglandinas. Tais resultados corroboram os dados encontrados no teste de edema de pata induzido por carragenina.

5.10 Edema de orelha induzido por óleo de cróton

Para avaliar o efeito anti-inflamatório tópico, o extrato metanólico de *M. minutiflora* na dose de 0,1 mg/orelha apresentou atividade anti-inflamatória, com a redução do edema de orelha ($40,5 \pm 1,3$ %), como verificado na Figura 16.

Figura 16: Efeito do extrato metanólico (Mm-MeOH) sobre a redução do volume do edema de orelha induzido por óleo de cróton. Os valores foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (n=5). ****p<0,0001, ***p<0,01. Significativos após análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Tukey, quando comparados ao grupo controle.



O óleo de cróton possui em sua composição o TPA, que é um éster de forbol comum na espécie *Croton tiglium* L. O TPA é um agente promotor de tumor relacionado à resposta inflamatória e hiperproliferativa intensa, por promover exsudação (GÁBOR, 2003; GÁBOR, 2000). Este modelo permite identificar inibidores da biossíntese das prostaglandinas e dos leucotrienos, sendo amplamente utilizado na triagem de compostos inibidores da COX e/ou LOX (GÁBOR, 2000). O Mm-MeOH promoveu a redução do edema em relação ao grupo controle, sugerindo que este extrato atua como inibidores da COX e/ou LOX.

5.11 Pleurisia induzida por carragenina

Os resultados da atividade anti-inflamatória no teste da pleurisia induzida por carragenina encontram-se na Tabela 10. O extrato metanólico de *M. minutiflora* apresentou atividade anti-inflamatória, diminuindo significativamente a migração celular para a cavidade pleural. O extrato metanólico na dose de 100 mg/kg inibiu a migração celular em 62%.

Tabela 10: Efeito do extrato metanólico de *M. minutiflora* (Mm-MeOH) no teste da pleurisia induzida por carragenina.

Grupo	Dose (mg/kg)	Migração Celular ($10^3 / \text{mm}^3$)	Inibição (%)
Controle	-	11±1,47	-
Mm-MeOH	50	4,48 ± 0,92 *#	59
Mm-MeOH	100	4,22 ± 0,61 *	62
Mm-MeOH	200	6,18 ± 0,58 *	44
Dexametasona	0,5	1,75 ± 0,25*	84

Os valores foram expressos como média ± desvio padrão (n=5). *p < 0,05. Significativos após análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste Tukey com intervalo de confiança de 95%, quando comparados ao grupo controle.

O modelo da pleurisia induzida por carragenina é caracterizado por duas fases inflamatórias, uma aguda (4 h) e uma crônica (48 h), com diferentes mediadores envolvidos. Ambas as fases estão associadas a uma acentuada reação inflamatória nas vias respiratórias, semelhante a que ocorre na asma humana (DALMARCO e FRÖDE, 2007). Estudos realizados por Frode, Souza e Calixto (2001) comprovam que neste modelo experimental existe a participação de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-1 β , IL-8) e anti-inflamatórias (IL-6, IL-10), com base nos resultados de que tanto anticorpos-policlonais como citocinas-recombinantes administrados diretamente na cavidade pleural juntamente com a carragenina, reproduziram parcialmente seus efeitos pró-inflamatórios ou anti-inflamatórios. O influxo de leucócitos para o local de inflamação desempenha um papel importante na modulação da resposta inflamatória (SALEH et al 1996; PENIDO et al., 2006). Os nossos resultados mostraram que o Mm-MeOH tem efeito anti-inflamatório na fase aguda da pleurisia induzida por carragenina, inibindo a migração de leucócitos.

5.11.1 Determinação dos níveis de citocinas e óxido nítrico

A avaliação dos níveis de citocina foi realizada nos exsudatos obtidos no teste de pleurisia induzida por carragenina. Para estas análises, escolhemos o Mm-MeOH na concentração de 100 mg/kg, pois foi o que obteve melhor percentual de inibição da migração leucocitária do teste da pleurisia. O Mm-MeOH reduziu a produção de TNF e IL-1 β quando comparado com o grupo de controle (Figura 17a e 17b), no entanto, Mm-MeOH não foi capaz de inibir a produção de óxido nítrico (Figura 18).

Figura 17: Concentração de IL-1 β (a) e TNF (b) no exsudato inflamatório oriundo do teste de pleurisia induzida por carragenina. Os valores foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (n=5). *p<0,05 ***p<0,001 vs controle. Significativos após análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Tukey, quando comparados ao grupo controle.

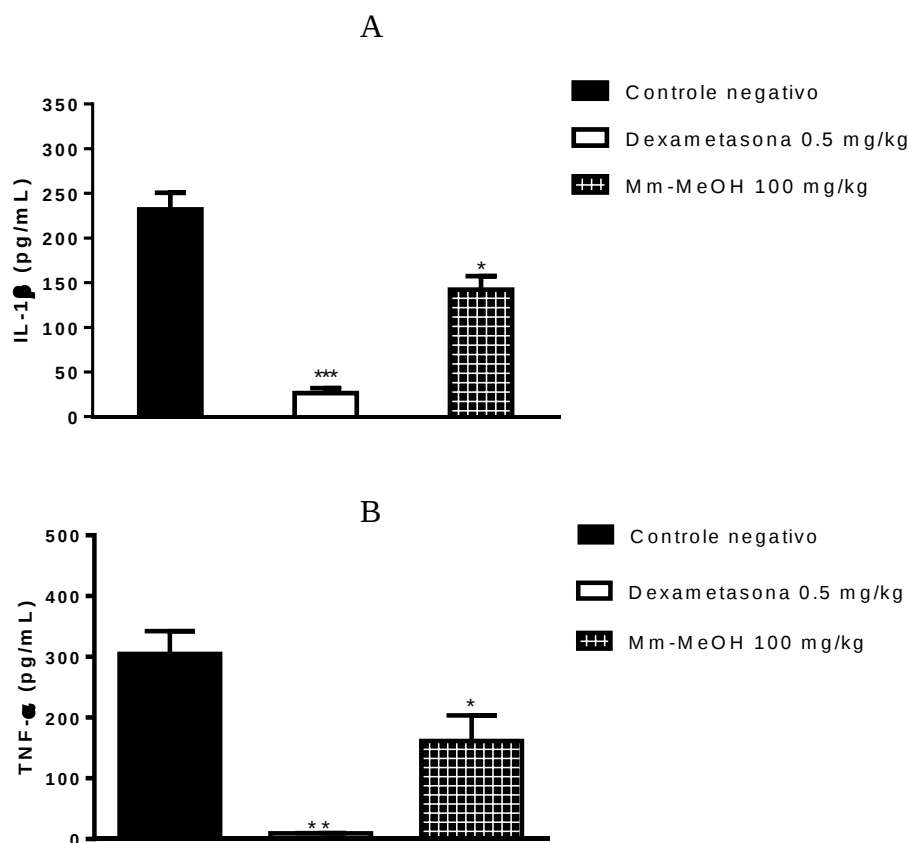
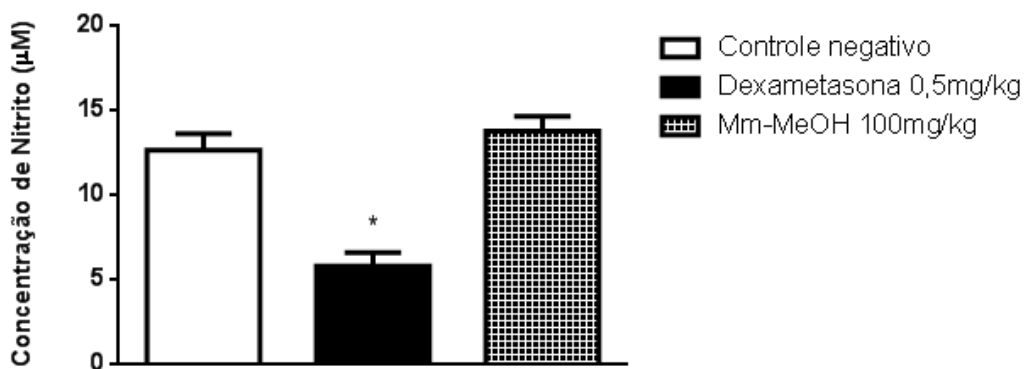


Figura 18: Efeito do extrato metanólico de *Miconia minutiflora* (Mm-MeOH) na produção de óxido nítrico em μ M nos exsudatos inflamatórios provenientes do teste de pleurisia induzida por carragenina. Os valores foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (n=5).. **p<0,01 vs controle. Significativos após análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Tukey, quando comparados ao grupo controle.

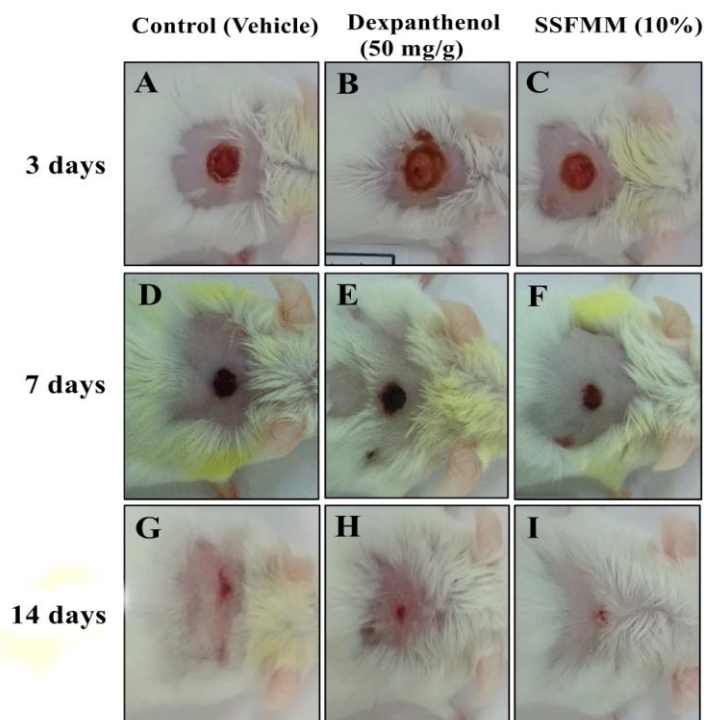


A IL-1 β é uma citocina que promove a expressão de moléculas de adesão, migração de leucócitos e aumento da permeabilidade vascular, indicando que IL-1 β é um importante mediador pró-inflamatório (HALLEGUA; WEISMAN, 2002). Por outro lado A TNF é liberada principalmente por macrófagos durante o processo inflamatório e é uma citocina chave para a resposta imune inata. Esta citocina promove a hiperalgesia, aumento da permeabilidade vascular e o recrutamento de leucócitos (NIU et al., 2015). Com base nos resultados obtidos podemos sugerir uma relação entre a diminuição da migração celular e a redução na liberação destas citocinas pró-inflamatórias.

5.12 Avaliação da atividade cicatrizante

Para avaliação da atividade cicatrizante, o extrato metanólico de *M. minutiflora* (Mm-MeOH) a 10% foi incorporado a uma pomada base (fornecida pela Farmácia escola Carlos Drummond de Andrade– UFPE) para obter a formulação codificado por FSSMm 10%. A avaliação macroscópica das lesões foi realizada do 1º ao 14º dia de experimento. Os seguintes aspectos foram observados: exsudação, edema, hiperemia, presença de crosta (tecido de granulação) e re-epitelização (Figura 19). Acrescentar a quantidade de pomada correta que foi aplicada.

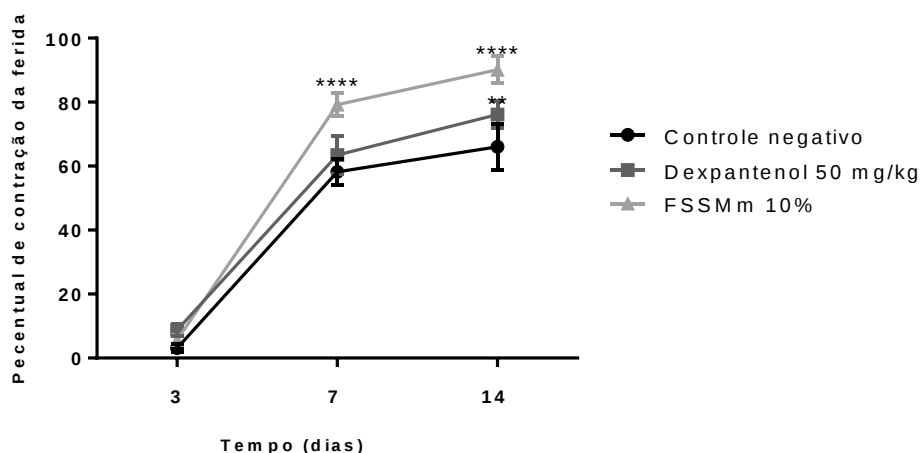
Figura 19: Aspecto macroscópico das lesões durante o teste de atividade cicatrizante. As imagens representam os grupos que foram tratados da seguinte forma: A; D e G – Grupo controle negativo tratados com a base. B; E e H – Grupo tratado com dexapantenol (50 mg/kg). C; F e I – formulação semissólida contendo 10% do extrato metanólico de *M. minutiflora* (FSSMm 10%).



Logo após a incisão cirúrgica houve exsudação, porém esta só foi observada nas primeiras 24 h. O edema foi observado em todos os grupos do experimento até o terceiro dia. Houve formação de crosta a partir do 3º dia após a incisão cutânea, sendo a crosta menos espessa no grupo controle, em relação ao grupo tratado com FSSMm 10%. neste mesmo período. Os grupos tratados com dexpanthenol (50 mg/g) e FSSMm 10%. mostraram perceptível redução dos sintomas da inflamação (exsudação, edema, hiperemia) ao longo dos 14 dias de experimento, quando comparados ao grupo controle. O processo de re-epitelização tornou-se evidente a partir do 10º dia, com o início de desprendimento da crosta.

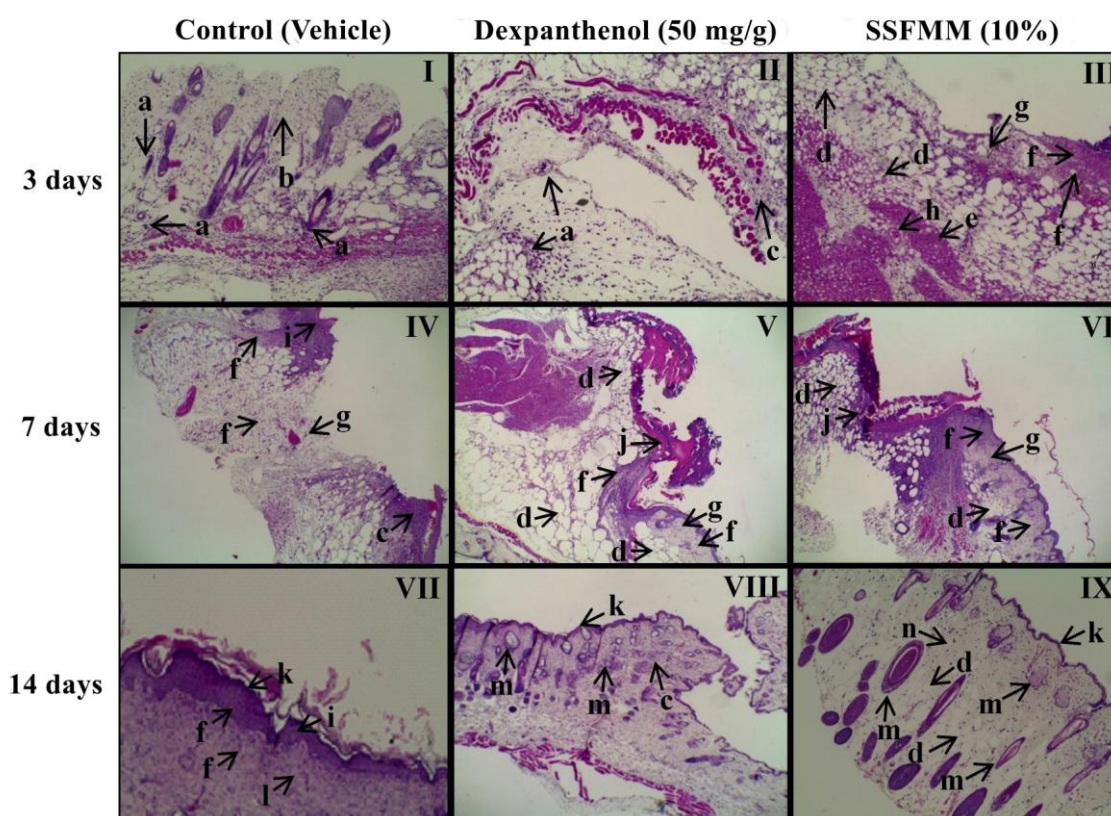
Os resultados referentes ao potencial de diminuição da área inicial da ferida estão expressos na Figura 20. O grupo tratado com FSSMm 10%. reduziu a área da ferida (mm^2) em relação ao grupo controle (tratado apenas com a pomada base), após 7 e 14 dias de administração ($79,2 \pm 3,6 \%$ e $90,13 \pm 4,1 \%$, respectivamente).

Figura 20: Efeito formulação semissólida contendo 10% do extrato metanólico de *M. minutiflora* (FSSMm 10%) na contração da área da ferida em camundongos submetidos ao teste de atividade cicatrizante. Os valores foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (n=5). ****p < 0,0001 e **p < 0,01 vs controle. Significativos após análise de variância (ANOVA) de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni com intervalo de confiança de 95%, quando comparados ao grupo controle.



Os achados histológicos obtidos na área de contração da lesão oriunda do teste de atividade cicatrizante são observados na Figura 16 e descritos abaixo. O grupo tratado com FSSMm 10% mostrou avanço no processo de cicatrização da ferida em relação ao grupo controle, após 14 dias de administração.

Figura 21: Análise histológica da área de contração da ferida durante o teste de atividade cicatrizante. As imagens (objetiva de 4 e 10x) representam os grupos que foram tratados da seguinte forma: I; IV e VII – Grupo controle negativo tratados com a base de lanovaselina. II; V e VIII – Grupo tratado com Dexpanthenol (50 mg/kg). III; VI e IX grupo tratado com a formulação semissólida contendo 10% do extrato metanólico de *M. minutiflora* (FSSMm 10%)–. a – infiltrado inflamatório; b – área de collagenólise; c – hiperplasia; d – tecido adiposo; e – tecido conectivo; f – fibroblastos; g – tecido de granulação; h – vasos sanguíneos; i – tecido epitelial; j – início da formação da epiderme; k – re-epitelização total da ferida; l – fibras colágeno; m – anexos cutâneos; n – colágeno denso.



A avaliação histopatológica evidenciou os seguintes aspectos: com 3 dias de tratamento, o grupo controle negativo apresentou formação de crosta superficial e calcificação distrófica. Logo abaixo da crosta superficial, havia um infiltrado inflamatório com células polimorfonucleares. Houve uma grande área de hemorragia e área de collagenólise. Os grupos tratados com dexapentanol (50 mg/kg) e FSSMm apresentaram ferida em fase inflamatória com hiperplasia epidérmica. O grupo tratado com FSSMm apresentou proliferação intensa do tecido adiposo e uma faixa de tecido conjuntivo com colágeno e fibroblasto proliferado. Observou-se o surgimento do tecido de granulação a partir do tecido adiposo.

Com 7 dias, observou-se no grupo controle hiperplasia epidérmica e formação de tecido de granulação. Houve proliferação fibroblástica do tecido de granulação. Os grupos tratados com dexapentanol (50 mg/kg) e FSSMm apresentam áreas de tecido adiposo que são responsáveis pela formação do tecido de granulação. Nas bordas observou-se a presença de fibroplasia e início da formação da epiderme.

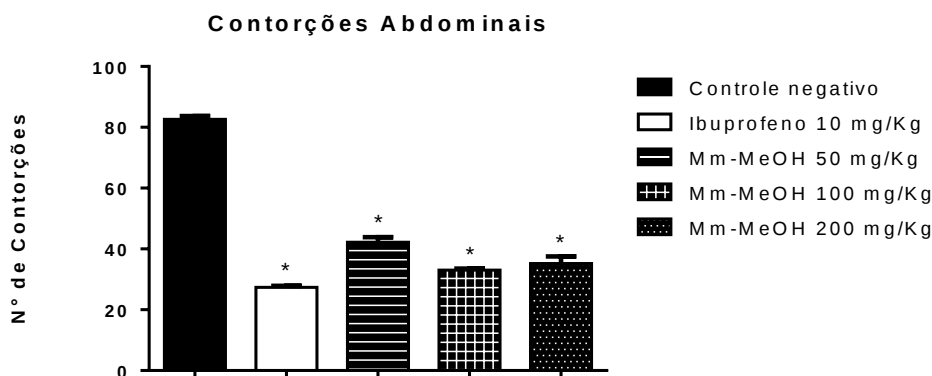
Ao término do experimento, com 14 dias de tratamento observou-se no grupo controle que houve o fechamento total da ferida. O centro da área lesada apresentou epitélio hiperplásico e com fibroplasia e remodelação do colágeno. O grupo tratado com dexapantenol também estava com a ferida completamente fechada. Porém a área de centro da ferida que ainda estava hiperplásica, já apresentou a formação de anexos cutâneos. O grupo tratado com FSSMm mostrou lesão completamente fechada, não há hiperplasia epidérmica, nem sinal de inflamação. Na região da lesão, havia colágeno denso completamente remodelado e logo abaixo desta camada, havia tecido adiposo profundo. A matriz da área lesada apresentou anexos cutâneos neoformados: glândulas sebáceas associadas à pêlos.

Estes resultados indicam que o grupo tratado com FSSMm mostrou avanço no processo de cicatrização em relação ao grupo controle, evidenciado na avaliação macroscópica pela redução da exsudação, edema e hiperemia. Houve redução significativa da área da ferida no 14º dia e remodelamento do tecido lesado inclusive com formação de anexos cutâneos.

5.13 Nocicepção induzida por ácido acético

O teste do ácido acético é muito utilizado como triagem na avaliação de compostos com atividade antinociceptiva. Os resultados da atividade antinociceptiva do Mm-MeOH no teste de nocicepção induzida por ácido acético estão descritos na Figura 22. O extrato Mm-MeOH, testado nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg, respectivamente, reduziram o número de contorções abdominais em comparação ao grupo controle. Entre as doses testadas, a Mm-MeOH 100 mg/kg apresentou melhor percentual de inibição das contorções abdominais (58,9%).

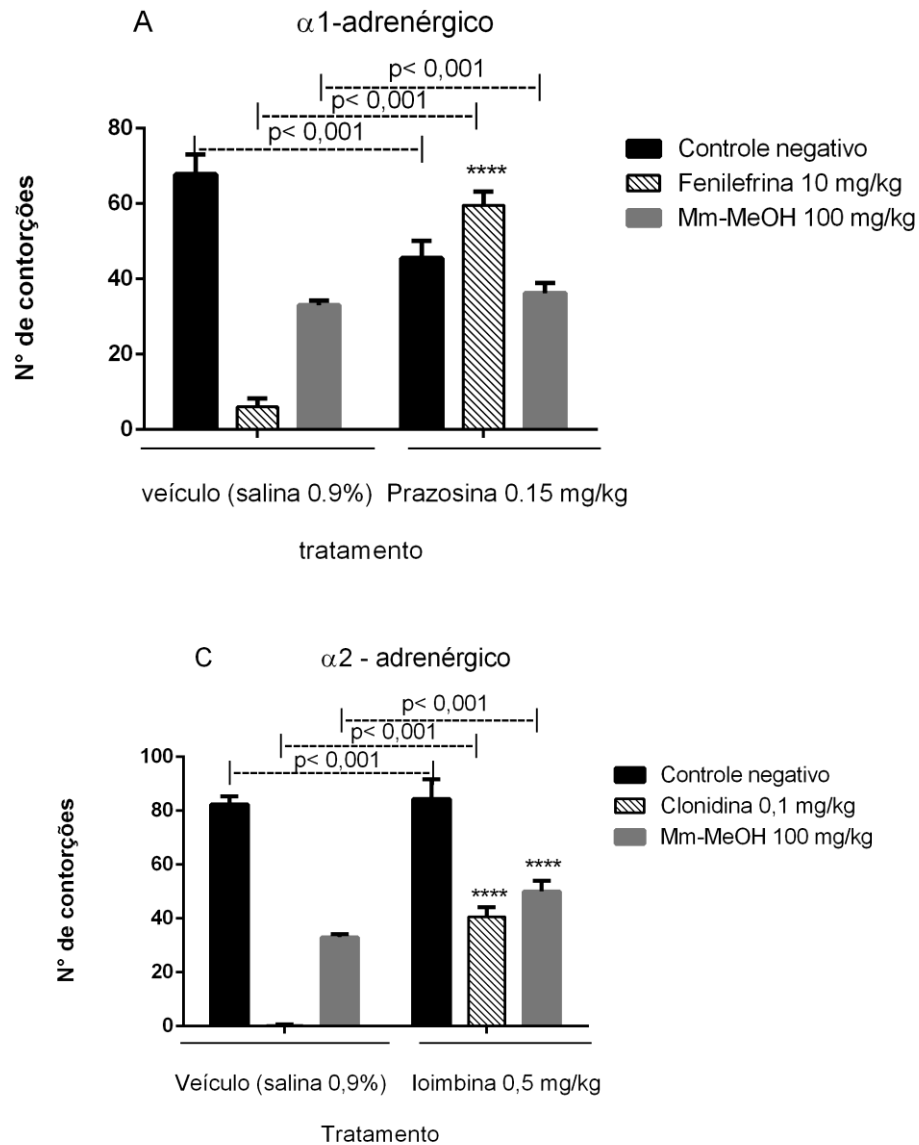
Figura 22: Número de contorções abdominais (média $\pm$ desvio padrão) e percentual de inibição do extrato de *Miconia minutiflora* (Mm-MeOH) no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético. Os valores foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (n=5). *p < 0,05 vs controle. Significativos após análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Tukey com intervalo de confiança de 95%, quando comparados ao grupo controle.

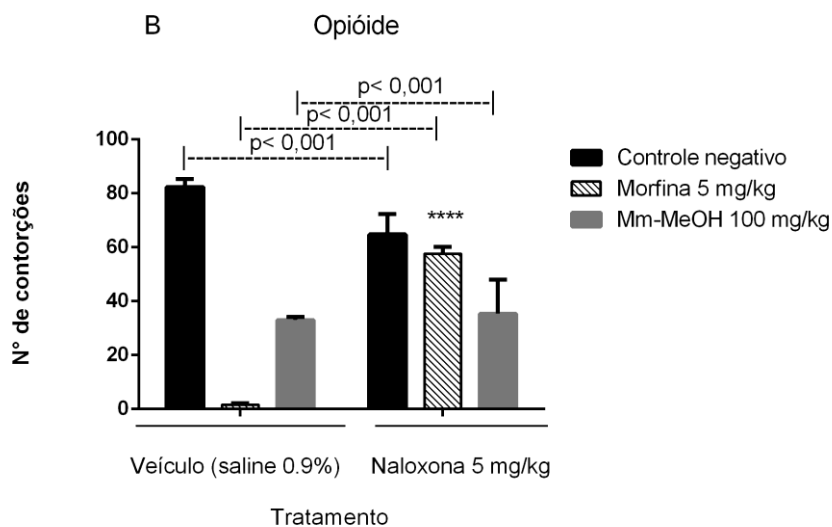


5.13.1 Avaliação da participação dos sistemas α - adrenérgico e opióide no efeito antinocicptivo do Mm-MeOH

Os resultados da participação dos receptores α - adrenérgicos e sistema opióide de extrato metanólico de *M. minutiflora* na nocicepção induzida por ácido acético estão representados na Figura 23. O extrato testado a 100 mg/kg, mostrou atividade nociceptiva no receptor α_2 - adrenérgico, como pode ser visto abaixo.

Figura 23: Número de contorções abdominais (média $\pm$ desvio padrão) e percentual de inibição do extrato de *Miconia minutiflora* (Mm-MeOH) para avaliação do mecanismo de ação sob os receptores adrenérgicos (a e b) e opioide (c), no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético. Os valores foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (n=5). ****p < 0,0001 e ***p < 0,001. Significativos após análise de variância (ANOVA) de uma via seguida pelo teste de Tukey com intervalo de confiança de 95%, quando comparados ao grupo controle.



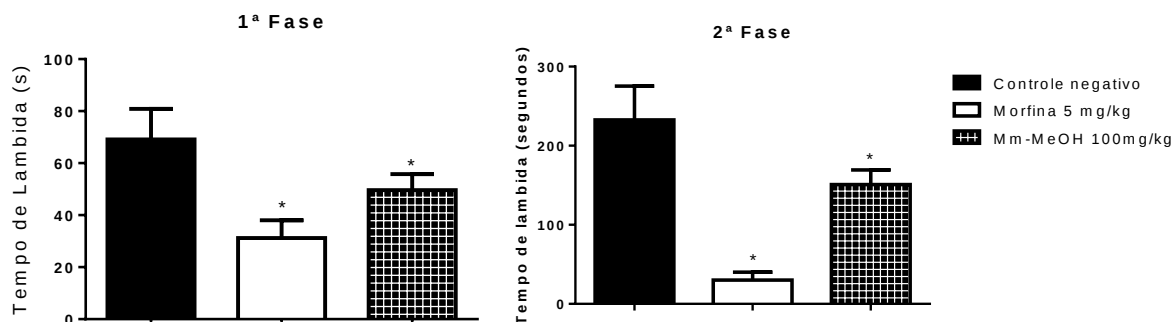


O ácido acético age liberando mediadores endógenos que estimulam os neurônios nociceptivos. Em camundongos provoca, em nível peritoneal, um aumento nos níveis de PGE2 e PGF2A, serotonina, histamina (DERAEDT et. al., 1980), liberação de bradicinina e citocinas, como TNF e IL-8 (RIBEIRO et al., 2000). Deste modo provoca comportamentos estereotipados que são caracterizados por contorções abdominais, redução e incoordenação da atividade motora (LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001). A redução do número de contorções para o grupo tratado com o Mm-MeOH sugere que este extrato atue reduzindo os níveis de prostaglandinas e citocinas, conforme observado dos testes de atividade anti-inflamatória. Dentre os receptores estudados para a avaliação do possível mecanismo de ação, o extrato Mm-MeOH mostrou atividade apenas sobre o α 2-adrenérgico. Estudos com outras ferramentas farmacológicas são necessários para confirmar seus mecanismos de ação.

5.14 Nocicepção induzida pela formalina

O teste da formalina evidencia duas fases da nocicepção: 0-5 mim (dor de origem central) e 15-30 mim (dor de origem inflamatória). Os resultados apresentados na Figura 24 indicam que os animais que receberam tratamento com os extratos metanólicos e acetato de etila de *M. minutiflora* reduziram significativamente do tempo de lambida da pata quando comparados ao grupo controle.

Figura 24: Efeito do extrato bruto de *Miconia minutiflora* (Mm-MeOH) no teste de nociceção induzida por formalina. Os valores foram expressos como média $\pm$ desvio padrão (n=5). *p < 0,005. Significativos após análise de variância (ANOVA) de uma via seguido pelo teste de Tukey com intervalo de confiança de 95%, quando comparados ao grupo controle.



Na indução do estímulo doloroso pela formalina se distingue duas fases, onde a primeira fase é indicativa de dor neurogênica (primeiros 5 minutos) e a segunda fase é indicativa de dor inflamatória (15 a 30 minutos) (HUNSKAAR; FURO 1987). O extrato metanólico inibiu ambas as fase do teste. Segundo García et al. (2004), os fármacos que agem na primeira fase têm ação central como os narcóticos. A inibição da segunda fase do teste da formalina indica uma ação periférica semelhante aos AINES e anti-inflamatórios esteroidais. A sensação de dor intensa causada pela formalina ocorre devido a ativação de neurónios sensoriais aferentes primários através de ações específicas e direta dos agentes pró-inflamatórios endógenos e citocinas no receptor transiente potencial vanilha-1 (TRPA-1), um membro de o receptor transiente potencial família (TRP) de canais de catiões que é altamente expressa por um subconjunto de nociceptores das fibras-C (MCNAMARA et al., 2007). TRPA1 é capaz de degranular mastócitos, causando libertação de histamina e serotonina que activam nociceptores (PARADA et al., 2001). Estudos realizados pela Trevisan et al. (2014) demonstraram a acção do ácido gálico, como um antagonista de TRPA1. O efeito antinociceptivo apresentado por Mm-MeOH parece envolver mecanismos periféricos e centrais, inibição da síntese/ou libertação de prostaglandinas, e bloqueando os receptores de TRPA1.

6 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste estudo podemos concluir que:

- A análise por cromatografia líquida de alta eficiência mostrou a presença de ácido elágico, rutina e ácido gálico, metabólitos secundários responsáveis por atividades anti-inflamatórias e antioxidantes.
 - O *screening* fitoquímico dos extratos de *M. minutiflora* indicou a presença de triterterpenos/esteroides, derivados antracênicos e compostos fenólicos nos extratos hexânico, acetato de etila e metanólico, e este último também apresentou alcaloides
- O extrato metanólico de *M. minutiflora* (Mm-MeOH) foi o que apresentou maior concentração de compostos fenólicos totais, justificando sua maior atividade antioxidante *in vitro*;
- O Mm-MeOH apresentou baixa citotoxicidade frente às linhagens de células tumorais e macrófagos murino;
- A administração oral em dose única de Mm-MeOH na concentração mais elevada de (2000 mg/kg) não causou qualquer mortalidade e não revelaram quaisquer sinais clínicos, como alterações na pele, olhos, membrana mucosa, taxa respiratória, sinais circulatórios, efeitos autonômicos, e sistema nervoso central. Em geral, a exposição dos animais a uma dose oral única de MM-MeOH não produziu qualquer mortalidade ou quaisquer efeitos relacionados com o tratamento, tendo o valor da DL₅₀ superior a 2.000 mg/kg, sendo considerada segura;
- A atividade anti-inflamatória foi evidenciada pela diminuição da migração celular no bolsão e na pleurisia, e esta diminuição provavelmente se deve a uma modulação do sistema imune, através da diminuição de TNF e IL-1 β , atuando na dor inflamatória. Também pode envolver a inibição da síntese/ou liberação de prostaglandinas e leucotrienos, por seu efeito no teste do edema por óleo de cróton.

- O grupo tratado com Mm-MeOH mostrou avanço no processo de cicatrização evidenciado pela redução da exsudação, edema e hiperemia. Redução significativa da área da ferida e remodelamento do tecido lesado inclusive com formação de anexos cutâneos.
- O extrato Mm-MeOH apresentou atividade antinociceptiva evidenciada pelo teste de contorções induzidas por ácido acético, estando relacionada com a ação sobre os receptores $\alpha 2$ -adrenérgicos. O efeito antinociceptivo apresentado parece envolver mecanismos periféricos, uma vez que inibiu a segunda fase da nocicepção pela formalina.
- O Mm-MeOH apresenta propriedades antioxidante, anti-inflamatória, cicatrizante e antinociceptiva promissoras.

8 PERSPECTIVAS

- Realizar o experimento de hepatoproteção e analisar a atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo*;
- Aprofundar os estudos a cerca do mecanismo de ação anti-inflamatório e antinociceptivo de *M minutiflora* (Mm-MeOH).
- Aprofundar o estudo químico da espécie.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, T. F.; ROIZENBLATT, S.; TUFIK, S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. **Brain Research**. v.1000, n. 1-2, p. 40-56. 2004.
- ALLEY, M. C.; SCUDIERE, D. A.; MONKS, A.; HURSEY, M. L.; CZERWINSKI, M. J.; FINE, D. L.; ABBOTT, B. J.; MAYO, J. G.; SHOEMAKER, R. H.; BOYD, M. R. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. **Cancer Research**, n.48, p.589-601, 1988.
- AMIN, K. The role of mast cells in allergic inflammation. **Respiratory Medicine**, v. 106, p. 9-14, 2012.
- AMORIM, E. L. C.; NASCIMENTO, J. E.; MONTEIRO, J. M.; PEIXOTO SOBRINHO, T. J. S.; ARAÚJO, T. A. S.; ALBUQUERQUE, U. P. A simple and accurate procedure for the determination of tannin and flavonoid levels and some applications in ethnobotany and ethnopharmacology. **Func ecosystem and communit**. v. 2, n. 1, p. 88-94, 2008.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 20 de julho de 2016.
- AQUINO, F. G.; WALTER, B. M. T.; RIBEIRO, J. F.; Espécies vegetais de usos múltiplo e reservas legais de cerrado –Balsas MA. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5 n.1, p. 147-149, 2007.
- ARBO, M. D.; LARENTIS, E. R.; LINCK, V. M.; ABOY, A. L.; PIMENTEL, A. L.; HENRIQUES, A. T.; DALLEGRAVE, E.; GARCIA, S. C.; LEAL, M. B.; LIMBERGER, R.P. Concentrations of p-synephrine in fruits and leaves of Citrus species (Rutaceae) and the acute toxicity testing of *Citrus aurantium* extract and p-synephrine. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 8, p. 2770-2775, 2008.
- ARNHOLD J. Properties, functions, and secretion of human myeloperoxidase. **Biochemistry**. v. 69, n.1, p. 4-9. 2004.
- BALAN, T.; MOHD, S. M. H.; SUPPAIAH, V.; MOHTARRUDIN, N.; SUHAILI, Z.; AHMAD, Z.; ZAKARIA, Z. A. Antiulcer activity of Muntingia calabura leaves involves the modulation of endogenous nitric oxide and nonprotein sulfhydryl compounds. **Pharmaceutical Biology**, 2013.
- BAUMGRATZ, J. F. A.; CHIAVEGATTO B. Nova espécie de Miconia Ruiz & Pav. (Melastomataceae) para Minas Gerais, Brasil. **Acta Botânica Brasilica**, v. 20, n. 2, p. 483-486, 2006.
- BAUMGRATZ, J.F.A. 2006. Melastomataceae. Pp. 135-136. In: M.R.V. Barbosa; C. Sothers; S. Mayo; C.F.L. Gamarra-Rojas & A.C. Mesquita (eds.). Checklist das Plantas do Nordeste Brasileiro: Angiospermas e Gymnospermas. Brasília: Ministério de Ciência e Tecnologia. Disponível em: <http://www.cnip.org.br/> (acesso em 19/06/2016)
- BAUMGRATZ, J. F.A.; Bernardo, K.F.R.; Chiavegatto, B.; Goldenberg, R.; Guimarães, P.J.F.; Kriebel, R.; Martins, A.B.; Michelangeli, F.A.; Reginato, M.; Romero, R.; Souza,

M.L.D.R.; Woodgyer, E. 2010. Melastomataceae. Pp. 1236-1277. In: Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB000161>(acesso em 19/06/2016)

BASBAUM, A. I.; JESSEL, T. M. The perception of pain. In: Kandel, E. R.; Schwartz, J. H.; Jessel, T. M. Principles of neural science. New York: McGraw Hill; 2000. p. 472-91.

BENNETT, M. I. Can pain can be more or less neuropathic? Comparison of symptom assessment tools with ratings of certainty by clinicians. **Pain**. v. 122, n. 3, p. 289-294, junho. 2006.

BERGER, M.; GRAY, M.; ROTH, B. L. The expanded biology of serotonin. **Annual Review of Medicine**, v. 60, p. 355-366, 2009.

BESSON, J. M. The neurobiology of pain. **Lancet**. v. 8, n. 353 (9164), p. 1610-1615. 1999.
BILATE, A. M. B. Inflamação, citocinas, proteínas de fase aguda e implicações terapêuticas. **Temas de reumatologia clínica**, v. 8, n. 2, p. 47-50. 2007.

BISWAS, T. K.; MUKHERJEE, B. Plant medicines of Indian origin for wound healing activity: a review. **The International Journal of Lower Extremity Wounds**, v. 2 p. 25–39, 2003.

BLOIS, M. S. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. **Nature**, v. 181, p. 1199-1200, 1958.

BONICA, J. J.; YAKSH, T.; LIEBESKIND, J.C. Biochemistry and modulation of nociception and pain. **The Management of Pain**, Malvern, Lea & Febiger, Ed. 02, v. 1, p. 95-121. 1990.

BORNE, R. F.; LEVI, M.; WILSON, N. Nonsteroid Anti-inflammatory Drugs. In: FOYE, W. O., LEMKE, T. L. Principles of Medicinal Chemistry. USA: Lippincott Williams Wilkins, 6ed, p. 954-1003, 2008.

BRADLEY, P. P.; PRIEBAT, D. A.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 78, p. 206-209, 1982.

CARVALHO, W. A.; LEMÔNICA, L. Mecanismos Centrais de Transmissão e de Modulação da Dor. Atualização Terapêutica. **Revista Brasileira Anestesiologia**. v. 48, n. 3, p. 221-241, 1998.

CABRINI, D. A. Effectiveness of Vernonia scorpioides ethanolic extract against skin inflammatory processes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 138, p. 390-397, 2011.

CELOTTO, A. C.; NAZARIO, D. Z.; SPESSOTO, M. A.; MARTINS, C. H. G.; CUNHA, W. R. Evaluation of the in vitro antimicrobial activity of crude extracts of three Miconia species. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 34 p. 339-340, 2003.

CHAGAS, E. C. O. O gênero *Miconia* ruiz & pav. (melastomataceae) na floresta atlântica do nordeste oriental. **Dissertação**. 2012.

CHAN, W. R.; SHEPPARD, V.; KATHLEEN, A. M.; TINTO, W. F.; REYNOLDS, W. F. Triterpenes from *Miconia stenostachya*. **Journal of Natural Products**, v. 55, p. 963-966, 1992.

CHAN, F.K.L.; GRAHAM, D.Y.; Review article: prevention of non-esteroidal anti-inflammatory drug gastrointestinal complications- review and recommendations on risk assessment. **Alimentary Pharmacology Therapeutics**, v. 19, p. 1051-1061, 2004.

CHOI, J. H.; JUNG, B. H.; KANG, O. H.; CHOI, H. J.; PARK, P. S.; CHO, S. H.; KIM, Y. C.; SOHN, D. H.; PARK, H.; LEE, J. H.; KWON, D. Y. The anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of ethyl acetate fraction of *Cynanchi Paniculati* Radix. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 29, p. 971-975, 2006.

CIRINO, G.; FIORUCCI, S.; SESSA, W. C. Endothelial nitric oxide synthase: the Cinderella of inflammation? **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 24, n. 2, p. 91-5, 2003.

CLAUSSING, G.; RENNER, S. S. Molecular phylogenetics of Melastomataceae and Memecylaceae: implications for character evolution. **American Journal of Botany**, v. 88, p. 486-498, 2001.

COLE, H. W.; BROWN, C. E.; MAGEE, D. E.; MAGEE, C.; ROUDEBUSH, R. E.; BRYANT, H. U. Serotonin-induced paw edema in the rat: pharmacological profile. **General Pharmacology**, v. 26, n. 2, p. 431-436, 1995.

CORREA, C. C.; ALVES, A. F. Plantas medicinais como alternativa de negócios: caracterização e importância. Sociedade Brasileira de Economia, Administração e Sociologia Rural (SOBER). **AgEcom Search**, 2008.

COUSSENS, L.M.; WERB, Z. Inflammation and cancer. **Nature**, v. 420, n. 6917, p. 860–867, 2002.

CORTEZ, P. A.; CAETANO, A. P. S.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M.; Teixeira, S. P. Elucidating the mechanism of poricidal anther dehiscence in *Miconia* species (Melastomataceae). **Flora**, v. 209, p. 571–579, 2014.

CUNHA, J.M.; CUNHA, F.Q.; POOLE, S.; FERREIRA, S.H. Cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia limited by interleukin-1 receptor antagonist. **British Journal of Pharmacology**, v. 130, n. 7, p. 1418-1424, 2000.

CUNHA, F. Q.; POOLE, S.; LORENZETTI, B. B.; FERREIRA, S. H. The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. **British Journal of Pharmacology**, v. 107, n. 3, p. 660-664, 1992.

CUNHA, W. R.; SANTOS, F. M.; PEIXOTO, J. A.; VENEZIANI, R. C. S.; CROTTI, A. E. M.; SILVA, M. L. A.; SILVA FILHO, A. A.; ALBUQUERQUE, S.; TURATTI, I. C. C.; BASTOS, J. K. Screening of plant extracts from the Brazilian Cerrado for their in vitro trypanocidal activity. **Pharm. Biology**, v. 47, n. 8, p. 744-749, 2009.

BROUGHTON, G.; JANIS, J. E.; ATTINGER, C. E. Wound healing: an overview. **Plastic and Reconstructive Surgery**, v. 117, s. 7, 2006;

CUNHA J.M.; SACHS, D.; CANETTI, C.A.; POOLE, S.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q. The critical role of leukotriene B4 in antigen-induced mechanical hyperalgesia in immunised rats. **British Journal of Pharmacology**, v. 139, p. 1135–1145, 2003.

CUNHA, W. R.; CREVELIN, E. J.; ARANTES, G. M.; CROTTI, A. E.; ANDRADE E SILVA, M. L.; FURTADO, N. A.; ALBUQUERQUE, S.; FERREIRA, D. A. S. A study of the trypanocidal activity of triterpene acids isolated from *Miconia* species. **Phytotherapy Research**, v. 20, p. 474-478, 2006.

CUNHA, W. R.; SILVA, M. L. A.; SANTOS, F. M.; MONTENEGRO, I. M.; OLIVEIRA, A. R. A.; TAVARES, H. R.; SANTOS, H. S. L.; BIZÁRIO, J. C. S. In vitro inhibition of tumor cell growth by *Miconia fallax*. **Pharmaceutical Biology**. v. 46, n.4 p. 292–294, 2008.

CUNHA, W. R.; DE MATOS, G. X.; SOUZA, M. G.; TOZATTI, M. G.; ANDRADE E SILVA, M. L.; DA SILVA, R.; FILHO, A. A. S. Evaluation of the antibacterial activity of the methylene chloride extract of *Miconia ligustroides*, isolated triterpene acids, and ursolic acid derivatives. **Pharmaceutical Biology**. v. 48, p. 166-169, 2010.

CHU, W. M. Tumor necrosis factor. *Cancer Lett*, v. 328, n. 2, p. 222-5, Jan 2013.

CRUZ, A. V. M.; KAPLAN, M. A. C. Uso medicinal de espécies das famílias Myrtaceae e Melastomataceae no Brasil. *Florest. Ambient*, v. 11, n. 1, p. 47-52, 2004.

CREVELIN, E. J.; TURATTI, I. C.; CROTTI, A. E.; VENEZIANI, R. C.; LOPES, J. L.; LOPES, N. P.; CUNHA, W. R. Identification of biologically active triterpenes and sterols present in hexane extracts from *Miconia* species using High-Resolution Gas Chromatography. **Biomedical Chromatography**, v. 20, p. 807-826, 2006.

CUZZOCREA, S. Shock, inflammation and PARP. **Pharmacological Research**, v.52, n. 1, p. 72-82, julho. 2005.

DAJANI, E. Z.; ISLAM, K. Cardiovascular and Gastrointestinal Toxicity of Selective Cyclooxygenase-2 Inhibitors in Man. *Journal of Physiology & Pharmacology*, v. 9, s. 2, p. 117-133, 2008.

DALMARCO, E. M.; FRÖDE, T.S. In vivo effects of cyclosporin A on expression of adhesion molecules in tissues in mice. **Frontiers of Medical & Biological Engineering**, v. 9, p. 111-123, 2007.

DE MARZO, A. M.; PLATZ, E. A.; SUTCLIFFE, S.; XU, J.; GRÖNBERG, H.; DRAKE, C. G.; NAKAI, Y.; ISAACS, W. B.; NELSON, W. G. Inflammation in prostate carcinogenesis. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, n. 4, p. 256-269, 2007.

DEB, D. D.; PARIMALA, G.; DEVI, S. S.; CHAKRABORTY, T. Effect of thymol on peripheral blood mononuclear cell PBMC and acute promyelotic cancer cell line HL-60. **Chemico-Biological Interactions**, v. 193, n. 1, p. 97-106, 2011.

DELGADO, N. G.; VÁZQUEZ, A. I. F.; SÁNCHEZ, H. C.; DEL VALLE, R. M. S.; GÓMEZ, Y. S.; ALFONSO, A. M. S.; Anti-inflammatory and antinociceptive activities of methanolic extract from red seaweed *Dichotomaria obtusata*; **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 49, n. 1, 2013

DERAEDT, R.; JOUQUEY, S.; DELEVALLEE, F.; FLAHAUT, M. Release of prostaglandins E and F in an algogenic reaction and its inhibition. **European Journal of Pharmacology**, v. 61, n. 1, p. 17-24, 1980.

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

DINARELLO, C. A. et al. Interleukin-6 as an endogenous pyrogen: induction of prostaglandin E2 in brain but not in peripheral blood mononuclear cells. **Brain Research**, v. 562, n. 2, p. 199-206, outubro.1991.

EFRON, P. A.; MOLDAWER, L. L. Cytokines and wound healing: the role of cytokine and anticytokine therapy in the repair response. **Journal of Burn Care & Rehabilitation**, v. 25, n. 2, p. 149-160, 2004.

FAITH, M.; SUKUMARAN, A.; PULIMOOD, A. B.; JACOB, M. How reliable an indicator of inflammation is myeloperoxidase activity? **Clinica Chimica Acta**, v. 396, n. 1-2, p. 23 – 25. 2008.

FALKENSTEIN, E.; TILLMANN, H.; CHRIST, M.; FEURING, M.; WEHLING, M. Multiple Actions of Steroid Hormones: A Focus on Rapid, Nongenomic Effects. **Pharmacological Reviews**, v. 52, p. 513–555, 2000.

FENNER, R.; BETTI, A. H.; MENTZ, L. A.; RATES, S. M. K. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 42, n. 3, p. 369-394, 2006.

FERREIRA S.H.; LORENZETTI, B.B.; POOLE, S. Bradykinin initiates cytokine mediated inflammatory hyperalgesia. **British Journal of Pharmacology**, v. 110, n. 3, p. 1227–1231, novembro. 1993.

FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J. A. In vitro cytotoxicity assays: comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicology Letters**, v. 160, n. 2, p. 171-177, 2006.

FOUCHE, G.; CRAG, G. M.; PILLAY, P.; KOLESNIKOVA, N.; MAHARAJ, V. J.; In vitro anticancer screening of South African plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, p. 455 461, 2008.

FRANÇA, D. S.; SOUZA, A. L.; ALMEIDA, K. R.; DOLABELLA, S.S.; MARTINELLI, C.; COELHO, M. M. B Vitamins induce an antinociceptive effect in the acetic acid and formaldehyde models of nociception in mice. **European Journal of Pharmacology**. v. 421, n. 3, p. 157-164. 2001.

FENDRICK, A. M.; GREENBERG, B. P. A review of the benefits and risks of nonsteroidal antiinflammatory drugs in the management of mild-to-moderate osteoarthritis. **Osteopathic Medicine and Primary Care**, v. 3, p. 1-7, 2009.

FRODE, T. S.; SOUZA, G. E.; CALIXTO, J. B. The modulatory role played by TNF-alpha and IL-1 beta in the inflammatory responses induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. **Cytokine**, v. 13, n. 3, p. 162-8, 2001.

FRÖDE, T.S.; MEDEIROS, Y.S. Myeloperoxidase and adenosine-deaminase levels in the pleural fluid leakage induced by carrageenan in the mouse model of pleurisy. **Mediators Inflammation**, v. 10, p. 223–227, 2001.

FURTADO, R. A.; RODRIGUES, E. P.; ARAÚJO, F. R. R.; OLIVEIRA, W. L.; FURTADO, M. A.; CASTRO, M. B.; CUNHA, W. R.; TAVARES, D. C. Ursolic acid and oleanoic acid suppress preneoplastic lesions induced by 1,2-dimethylhydrazine in rat colon. *Toxicol. Pathol.*, v. 36, p. 576-580, 2008.

GÀBOR, M. Models of acute inflammation in the ear. In: WINYARD, P.G. e WILLOUGHBY, D.A. **Inflammation protocols**, New Jersey: Humana Press, p.129-131, 2003.

GÀBOR, M. Mouse Ear Inflammation Models and their Pharmacological Applications. Budapest: **Akadémiai Kiadó**, 2000.

GARCIA, M. D.; FERNANDEZ M. A.; ALVAREZ A.; SAENZ, M. T. Antinociceptive and anti-inflammatory effect of the aqueous extract from leaves of *Pimenta racemosa* var. *ozua* (Mirtaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 91, p. 69-73, 2004.

GARCÍA-NIÑO, W.R.; ZAZUETA, C. Ellagic acid: pharmacological activities and molecular mechanisms involved in liver protection. **Pharmacological Research**, 97, 84–103. 2015

GILLITZER, R.; GOEBELER, M. Chemokines in cutaneous wound healing. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 69, n. 4, p. 513-521, 2001.

GUAN, Y.; ZHANG, Y.; WU, J.; QI, Z.; YANG, G.; DOU, D.; GAO, Y.; CHEN, L.; ZHANG, X.; DAVIS, L. S.; WEI, M.; FAN, X.; CARMOSINO, M.; HAO, C.; IMIG, J. D.; BREYER, R. M.; BREYER, M. D. Anthihypertensive Effects of Selective Prostaglandin E2 Receptor Subtype 1 Targeting. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 117, n. 9, p. 2496-2505, 2007.

GUNATILAKA, A. A.; BERGER, J. M.; EVANS, R.; MILLER, J. S.; WISSE, J. H.; NEDDERMANN, K. M.; BURSUKER, I.; KINGSTON, D. G.; Isolation, synthesis and structure-activity relationships of bioactive benzoquinones from *Miconia lepidota* from The Suriname Rainforest. **Journal of Natural Products**, v. 64, p. 2-5, 2001.

HAAS, H. L.; SERGEEVA, O. A.; SELBACH, O. Histamine in the nervous system. **Physiological Reviews**, v. 88, p. 1183-241. 2008.

HALLEGUA, D. S.; WEISMAN, M. H. Potential therapeutic uses of interleukin 1 receptor antagonists in human diseases. **Annales Rheumatology**, v. 61, p. 960-967 2002.

HARRAK, Y.; ROSELL, G.; DAIDONE, G.; PLESCIA, S.; SCHILLACI, D.; PUJOL, M. D. Synthesis and Biological Activity of New Anti-inflammatory Compounds Containing the 1,4-benzodioxine and/or Pyrrole System. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 4876-4890, 2007.

HARVEY, A. L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature reviews. Drug Discovery**, v. 14, p. 111-129, 2015.

HAWKEY, C., J. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and the gastrointestinal tract: consensus and controversy. **American Journal of Medicine**, v. 110, p. 1-3, 2001.

HEIDLAND, A; KLASSEN, A.; RUTKOWSKI, P.; BAHNER, U. The contribution of Rudolf Virchow to the concept of inflammation: what is still of importance? **Journal of Nephrology**, v.19, p. 102-109, 2006.

HOUGH, L. B.; NALWALK, J. W.; LEURS, R.; MENGE, W. M.; TIMMERMAN, H. Antinociceptive activity of derivatives of improgran and burimamide. **Pharmacology Biochemistry and Behavior**, v. 65, p. 61-66. 2000.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**, v. 30, p. 103-14, 1987.

JANTSCHKO W, FURTMULLER PG, ZEDERBAUER M, JAKOPITSCH C, OBINGER C. Kinetics of oxygen binding to ferrous myeloperoxidase. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 426, n.1, p. 91-97. 2004.

JOFFRY, S. MOHD.; YOB, N. J.; ROFIEE, M. S.; AFFANDI, M. M. R. MEOR MOHD.; SUHAILI, Z.; OTHMAN, F.; AKIM, A. MD.; DESA, M. N. M.; ZAKARIA, Z. A. Melastoma malabathricum (L.) Smith ethnomedicinal uses, chemical constituents, and pharmacological properties: A review. **Evid.-based Complement. Alternat. Med.**, 48p. 2012.

JUNG, S. M.; KIM, K. W.; YANG, C. W.; PARK, S. H.; JU, J. H. Cytokine-Mediated Bone Destruction in Rheumatoid Arthritis. **Journal of Immunology Research**. v. 2, p. 1-43, 2014.

KAY, A. B. Allergy and allergic diseases. First of two parts. **The New England Journal of Medicine**. v. 344, n. 1, p.30-37. 2001.

KIM, J.Y.; HWANG, Y.P.; KIM, D.H.; HAN, E.H.; CHUNG, Y.C.; ROH, S.H.; JEONG, H.G. Inhibitory Effect of the Saponins Derived from Roots of Platycodon grandiflorum on Carrageenan-Induced Inflammation. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 70, n. 4, p. 858–864, 2006.

KIRVESKARI, J.; HELINTÖ, M.; SAAREN-SEPPÄLÄ, H.; RENKONEN, R.; TERVO, T. Leukocyte rolling and extravasation in surgical inflammation after mechanical and laser-induced trauma in human patients. **Experimental Eye Research**, v. 77, n. 3, p. 387-390, 2003.

KONSMAN, J. P.; PARNET, P.; DANTZER, R. Cytokine-induced sickness behaviour: Mechanisms and implications. *Trends Neurosci*, v. 25, p. 154–159, 2002.

KOO, H. J.; LIM, K. H.; JUNG, H. J.; PARK, E. H. Anti-inflammatory evaluation of gardenia extract, geniposide and genipin. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, n. 3, p. 496-500, 2006.

KOSTER R.; BEER, A. M. Acetic acid for analgesic screening. *Federation Proceedings*, v. 18, p.412, EJ 1959.

KROES, B. H.; VAN DEN BERG, A. J.; QUARLES VAN UFFORD, H. C.; VAN DIJK, H.; LABADIE, R. P. Anti-inflammatory activity of gallic acid. Research Centre for Natural Products and Phytopharmaceuticals, Faculty of Pharmacy, University of Utrecht, The Netherlands. **Planta Medica**, v. 58, n. 6, p. 499-504, 1992.

LAU, D.; BALDUS, S. Myeloperoxidase and its contributory role in inflammatory vascular disease. **Pharmacology & Therapeutics**. v. 111, n. 1, p. 16–26. 2006.

LAVICH, T. R.; CORDEIRO, R. S.; CALIXTO, J. B.; SILVA, P. M.; MARTINS, M. A. Combined action of vasoactive amines and bradykinin mediates allergen-evoked thermal hyperalgesia in rats. *European Journal of Pharmacology*, v. 462, n. 1-3, p.185-192, 2003.

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

LEITE, T. C. C.; MARTINEZ, S. T.; UETANABARO, A. P. T.; SILVA, T. R. S.; BRANCO, A. The flavonol calycopterin from the antimicrobial ethyl acetate extract of *Marcetia latifolia*. **Chem. Nat. Comp.**, v. 48, n. 3, p. 474-476, 2012.

LIN, J. Y.; LI, C. Y. Proteinaceous constituents of red cabbage juice increase IL-10, but decrease TNF- α secretions using LPS-stimulated mouse splenocytes. **Journal of Food and Drug Analysis**, n. 18, p. 15–23, 2010.

LIZ, R.; PEREIRA, D. F.; HORST, H.; DALMARCO, E. M.; DALMARCO, J. B.; SIMIONATTO, E. L.; PIZZOLATTI, M. G.; GIRARD, D.; FRÖDE, T. S. Protected effect of *Esenbeckia leiocarpa* upon the inflammatory response induced by carrageenan in a murine air pouch model. **International Immunopharmacology**, v. 11, p. 1991-1999, 2011.

LOH'EZIC-LE D'EV'EHAT, F.; BAKHTIAR, A.; B'EZIVIN, C.; AMOROS, M.; AND BOUSTIE, J. Antiviral and cytotoxic activities of some Indonesian plants. **Fitoterapia**, v. 73, n. 5, p. 400–405, 2002.

LOWRY, J. B. The distribution and potential taxonomic value of alkylated ellagic acids. **Phytochemistry**, v. 7, p. 1803-1813, 1968.

LÚCIO, M.; BRINGEZU, F.; REIS, S.; LIMA, J. L. F. C.; BREZESINSKI, G. Binding of Nonsteroidal Antiinflammatory Drugs to DPPC: Structure and Thermodynamic Aspects. **Langmuir**, v. 24, p. 4132-4139, 2008.

LÜLLMANN, H.; MOHR, K.; BIEGER, D.; ZIEGLER, A. **Color Atlas of Pharmacology**. New York: Thieme Stuttgart, 2 ed., p. 196-201, 2000.

MACARI, P. A. T.; EMERENCIANO, V. P.; FERREIRA, Z. M. G. F. S. Identificação dos triterpenos de *Miconia albicans* Triana através de análises de microcomputador. **Química Nova**. v. 13, n. 4, p. 260-262, 1990.

MAIOLI-AZEVEDO, V.; FONSECA-KRUEL, V. Plantas medicinais e ritualísticas vendidas em feiras livres no município do Rio de Janeiro, RJ, Brasil: estudo de caso nas zonas Norte e Sul. **Acta Botânica Brasilica**, v. 21, p. 263-275, 2007.

MAHAJAN, S. G.; MEHTA, A. A. Suppression of ovalbumin-induced Th2-driven airway inflammation by beta-sitosterol in a guinea pig model of asthma. **European Journal of Pharmacology**, v. 650, p. 458–464, 2011.

MAJNO, G.; PALACE, G.E. Studies of inflammation. 1. The effect of histamine and serotonin on vascular permeability: an electron microscopic study. **The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology**, v. 11, p. 571-605, 1961.

MARTIN, P. Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. **Science**, v. 276, n. 5309, p. 75-81, 1997.

MARTÍN-FONTECHA, A.; THOMSEN, L. T.; BRETT, S.; GERARD, C.; LIPP, M.; LANZAVECCHIA, A.; SALLUSTO, F. Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN- γ for TH1 priming. **Nature Immunology**. v. 5, n. 12, 2004.

MELLER, S. T.; CUMMINGS, C. P.; TRAUB, R. J.; GEBHART, G. F. The role of nitric oxide in the development and maintenance of the hyperalgesia produced by intraplantar injection of carrageenan in the rat. **Neuroscience**. v.60, p. 367-374, 1994.

MELLER, S. T.; DYKSTRA, C.; GEBHART, G.F. Acute thermal hyperalgesia in the rats is produced by activation of N- methyl- D . aspartato receptors and protein kinase C and production of nitric oxide. **Neuroscience**. v.71, p. 327-335. 1996.

MEYER, R. A.; CAMPBELL, F. N.; RAJA, S. N. Peripheral neural mechanisms of nociception. In: Wall P. D.; Melzack R. **Textbook of Pain**, 3 ed., p. 13-44, 1994.

MEYERS, C.; ALBITAR, M.; ESTEY, E. Cognitive impairment, fatigue, and cytokine levels in patients with acute myelogenous leukemia or myelodysplastic syndrome. **Cancer**. v. 104, n. 4, p. 788-793, 2005.

MCDONALD, D. M.; THURSTON, G.; BALUK, P. Endothelial gaps as sites for plasma leakage in inflammation. **Microcirculation**, v. 6, p. 7-22, 1999.

MONCADA S, HIGGS EA. The discovery of nitric oxide and its role in vascular biology. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, n. 1, p. 193-201. 2006.

MORI, S. A.; PIPOLY, J. J. Observations on the big bang flowering of *Miconia minutiflora* (melastomataceae). **New York Botanical Garden, Bronx**, v. 36, n. 4, p. 337-341, 1984.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MUNARI, C. C.; ALVES, J. M.; BASTOS, J. K.; TAVARES, D. C. Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic potential of *Baccharis dracunculifolia* extract on V79 cells by the comet assay. **Journal of Applied Toxicology**, v. 30, p. 22-28, 2010.

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

NIEMEGEREERS, C. J. E.; VERBRUGGEN, F. J.; JANSSEN, P. A. J. Effects of various drugs on carrageenan-induced oedema in the rat hind paw. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 16, p. 810-816, 1964.

NIU, X. F.; WANG, Y.; LI, W.; ZHANG, H.; WANG, X.; MU, Q.; HE, Z.; YAO, H. Esculin exhibited anti-inflammatory activities in vivo and regulated TNF- α and IL-6 production in LPS-stimulated mouse peritoneal macrophages in vitro through MAPK pathway. **International Immunopharmacology**, v. 29, p. 779-786, 2015.

OECD - ORGANIZATION FOR ECONOMIC COOPERATION AND DEVELOPMENT, OECD/OCDE. Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method. **Guideline For The Testing Of Chemicals**, p. 1-14, dezembro, 2001.

OMOIGUI, S. The biochemical origin of pain--proposing a new law of pain: the origin of all pain is inflammation and the inflammatory response. Part 1 of 3--a unifying law of pain. **Medicinal Hypotheses**, v. 69, n. 1, p. 70-82, 2007.

OBERLIES, N. H.; KIM, N. C.; BRINE, D. R.; COLLINS, B. J.; HANDY, R. W.; SPARACINO, C. M.; WANI, M. C.; WAL, M. E. Analysis of herbal teas made from the leaves of comfrey (*Symphytum officinale*): reduction of N-oxides results in order of magnitude increases in the measurable concentration of pyrrolizidine alkaloids. **Public Health Nutrition**, v. 7, n. 7, p. 919-924, 2004.

OSÓRIO, A. C.; MARTINS, J. L. S. Determinação de cumarina em extrato fluido e tintura de guaco por espectrofotometria derivada de primeira ordem. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 4, p. 481-486, 2004.

PALASKA, E.; SAHIN, G.; KELICEN, P.; DURLE, N. T.; ALTINOK, G. Synthesis anti-inflammatory activity of 1-acylthiosemicarbazides, 1,3,4-thiadiazoles and 1,2,4-triazole-3-thiones. **IL Farmaco**, v. 57, p. 101-107, 2002.

PARADA, C. A.; TAMBELI, C. H.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. The major role of peripheral release of histamine and 5-hydroxytryptamine in formalin induced nociception. **Neuroscience**, v. 102, n. 4, p. 937-944, 2001.

PARK, E.; LEE, S. M.; JUNG, I. K.; LIM, Y.; KIM, J. H. Effects of genistein on early-stage cutaneous wound healing. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 410, p. 514-519, 2011.

PATRONO, C.; ROCCA, B. Nonsteroidal antiinflammatory drugs: Past, present and future. **Pharmacology Research**, v. 59, n.5, p. 285-289, 2009.

PEREZ, R. G.; GUEDES, P. P.; VIVES, R.; CANTO, G. Revisión. antinflamatorios inhibidores selectivos de la cicloxigenasa-2 (COX-2). **Alergol Immunology Clinic**, v. 17, p. 247-254, 2002.

PEIXOTO SOBRINHO, T. J. S.; SILVA, C. H. T. P.; NASCIMENTO, J. E.; MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; AMORIM, E. L. C. Validação de metodologia espectrofotométrica para quantificação dos flavonoids de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**. v. 44, n. 4, p. 683-689, 2008.

PIERONI, L. G.; DE REZENDE, F. M.; XIMENES, V. F.; DOKKEDAL, A. L. Antioxidant activity and total phenols from the methanolic extract of *Miconia albicans* (Sw.) Triana leaves. **Molecules**, v. 16, n. 11, p. 9439-9450, 2011.

PIOTROWSKI, W.; FOREMAN, J. C. Some effects of calcitonin generelated peptide in human skin and on histamine release. **Br J Dermatol**, v. 114, p. 37-46, 1986.

RAO, P. N. P.; CHEN, Q. H.; KNAUS, E. E. Synthesis and Structure-Activity relationship Studies of 1,3-Diarylprop-2-yn-1-ones: Dual Inhibitors of Cyclooxygenases and Lipoxygenases. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 49, p. 1668-1683, 2006.

RAUH, L. K.; HORINOUCI, C. D.; LODDI, A. M.; PIETROVSKI, E. F.; NERIS, R.; SOUZA-FONSECA-GUIMARÃES, F.; BUCHI, D. F.; BIAVATTI, M. W.; OTUKI, M. F.;

REGNER, G. G.; GIANESINI, J.; VON BOROWSKI, R. G.; SILVEIRA, F.; SEMEDO, J. G.; FERRAZ AD. B. F.; WIILLAND, E.; VON POSER, G.; ALLGAYER, M.; PICADA, J. N.; PEREIRA P. Toxicological evaluation of *Pterocaulon polystachyum* extract: a medicinal plant with antifungal activity. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 31, p. 242–249, 2011.

RENNER, S. S. Melastomataceae (Black Mouth Family). In: N. Smith, S. A. Mori, A. Henderson, D. W. Stevenson & S. V. Heald (eds.) *Flowering Plants of the Neotropics*. Princeton University press. p. 240-243, 2004.

RHEE, S. G. Redox signaling: hydrogen peroxide as intracellular messenger. **Experimental & Molecular Medicine**, v. 31, n. 2, p. 53-59, 1999.

RIBBONS, K. A.; CURRIE, M. G.; MANNING, P. T.; ALLEN, P. C.; DIDIER, P.; RATTERREE, M. S.; CLARK, D. A.; MILLER, M. J. The effect of inhibitors of inducible nitric oxide synthase on chronic colitis in the rhesus monkey. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v. 280, p. 1008-1115. 1997.

RIBEIRO, R.A.; VALE, M.L.; THOMAZZI, S.M. PASCHOALATO, A.B.P.; POOLE, S.; FERREIRA, S.H.; CUNHA, F.Q. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing noceptive response induced by Zymosan and acetic acid in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 387, n. 1, p. 111-118, 2000.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N. J.; PAPAGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolics acids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, p. 933-956, 1996.

RIOJA, I.; TERCENIO, M. C.; UBEDA, A.; MOLINA, P.; TÁRRAGA, A.; TEJERO, A.G.; ALCARAZ, M. J. Pyrroloquinazoline derivative with anti-inflammatory and analgesic activity by dual inhibition of cyclo-oxygenase-2 and 5-lipoxygenase. **European Journal of Pharmacology**, v. 434, p. 177-185, 2002.

ROBBINS; COTRAN. Pathologic Basis of Disease – Kumar, Abbas and Fausto – 8 edição, 2010.

ROCHA, A.P.C.; KRAYCHETE, D.C.; LEMONICA, L.; CARVALHO, L.R.; BARROS, G.A.M.; GARCIA, J.B.S.; SAKATA, R.K. Pain: Current Aspects on Peripheral and Central Sensitization. **Revista Brasileira Anestesiologia**, v. 57, n.1, p. 94-105, 2007.

ROCHA A. P. C.; Kraychete, D. C.; Lemonica, L.; Carvalho, L. R.; Barros, G. A. M.; Garcia JBS, Sakata, R. K. Pain: Current Aspects on Peripheral and Central Sensitization. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 57, n. 1, 2007

RODRIGUES, J.; MICHELIN, D. C.; RINALDO, D.; ZOCCOLO, G. J.; DOS SANTOS, L. C.; VILEGAS, W. Antimicrobial activity of *Miconia* species (Melastomataceae). **Journal of Medicinal Food**, v. 11, p. 120-126, 2008.

RODRIGUES, J.; RINALDO, D.; DOS SANTOS, L. C.; VILEGAS, W. An unusual C6–C6'' linked flavonoid of *Miconia cabucu* (Melastomataceae). **Phytochemistry**, v. 68, p. 1781–1784, 2007.

RODRIGUES, J.; RINALDO, D.; DA SILVA, M. A.; DOS SANTOS, L. C.; VILEGAS, W. Secondary Metabolites of *Miconia rubiginosa*. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, n. 7-8, p. 834-839, 2011.

RODRIGUES, J.; SANTOS, L. C.; TAMASHIRO, J.; BRITO, A. R. M.; VILEGAS, W. S. Constituintes químicos isolados das folhas de *Miconia cabucu* Hoehne (Melastomataceae) Sociedade Brasileira de Química (SBQ), 2006.

RODRIGUES, M. R.; KANAZAWA, L. K.; DAS NEVES, T. L.; DA SILVA, C. F.; HORST, H.; PIZZOLATTI, M. G.; SANTOS, A. R.; BAGGIO, C. H.; WERNER, M. F. Antinociceptive and anti-inflammatory potential of extract and isolated compounds from the Leaves of *Salvia officinalis* in mice. **Journal of Ethnopharmacol**, v. 139, p. 519-526, 2012.

RODRIGUEZ-VITA, J.; LAWRENCE, T. The resolution of inflammation and cancer. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 21, n.1, p. 61-65, 2010.

ROMERO, R. Revisão taxonômica de *Microlicia* sect. *Chaetostomoides* (Melastomataceae). **Rev. Bras. Bot.**, v. 26, n. 4, p. 429-435, 2003.

RONDON NETO, R. M.; SANTOS, J. S.; SILVA, M. A.; KOPPE, V. C. Potencialidades de uso de espécies arbustivas e arbóreas em diferentes fisionomias de cerrado, em Lucas do Rio Verde/MT. **Redalyc**, v. 10, n. 2, p. 113-126, 2010.

RUCKDORFER, R. The basics about nitric oxide. **Molecular Aspects of Medicine**. v. 26, n. 1-2, p. 3-31. 2005.

SACHS, D.; CUNHA, F.; POOLE, S.; FERREIRA, S. Tumour necrosis factor-alpha, interleukin-1beta and interleukin-8 induce persistent mechanical nociceptor hypersensitivity. **Pain**. v. 96, n. 1-2, p. 89-97, 2002.

SANDILANDS, E. A.; BATEMAN, D. N. Non-steroidal anti-inflammatory drugs. **Medicine**, v. 44, n. 3, p. 185–186, 2016.

SANTORO, M. M.; GAUDINO, G. Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing. **Experimental Cell Research**, v. 304, p. 274-286, 2005.

SARKAR, D.; FISHERABC, P. P. Molecular mechanisms of aging-associated inflammation. **Cancer letters**, v. 236, n. 1, p. 13-23, 2006.

SEDGWICK, A. D.; LEES, P. Studies of eicosanoid production in the air pouch model of synovial inflammation. **Agents Actions**, v. 18, p. 429-238, 1986.

SERPELONI, J. M.; VIEGAS, W.; VARANDA, E. A.; CÓLUS, I. M.S. In vivo evaluation os anticlastogenicity of extracts from medicinal plants of Miconia genus using the micronucleus test. **Semina: Ciências Biológicas e Saúde**, v. 29, n. 1, p. 47-56, 2008.

SERPELONI, J. M.; BARCELOS, G. R. M.; MORI, M. P.; YANAGUI, K.; VILEGAS, W.; VARANDA, E. A.; CÓLUS, I. M. S. Cytotoxic and mutagenic evaluation of extracts from species of the Miconia genus and their influence on doxorubicin-induced mutagenicity: an in vitro analysis. **Experimental and Toxicology Pathology**. v. 63, p. 499-504, 2011.

SPESSOTO, M. A.; FERREIRA, D. S.; CROTTI, A. E. M.; ET AL. Evaluation of the analgesic activity of extracts of *Miconia rubiginosa* (Melastomataceae). **Phytomedicine**, v. 10, p. 606–609, 2003.

SILVA, A. O.; ALVES, A. D.; ALMEIDA, D. A. T.; BALOGUN, O. S.; OLIVEIRA, R. G.; AGUIAR, A. A.; SOARES, I. M.; MARSON-ASCÊNCIO, P. G. ; ASCÊNCIO, S. D.; MARTINS, D.T.O.; Evaluation of anti-inflammatory and mechanism of action of extract of *Macrosiphonia ongiflora* (Desf.) Müll.Arg. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 154, p. 319–329, 2014.

SINGER, A. J.; CLARK, R. A. Cutaneous wound healing. *The New England Journal of Medicine*., v. 341, p. 738-746, 1999.

SINGH, S. K.; VOBALAREDDY, S.; SHIVARAMAKRISHNA, S.; KRISHNAMRAJU, A.; RAJJAK, S. A.; CASTURI, S. R.; AKHILA, V.; RAO, Y. K. Methanesulfonamide group at position-4 of the C-5-phenyl ring of 1,5-diarylpyrazole affords a potent class of cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 14, p. 1683–1688, 2004.

SMIDERLE, F. R.; OLSEN, L. M.; CARBONERO, E. R.; MARCON, R.; BAGGIO, C. H.; FREITAS, C. S.; SANTOS, A. R. S.; TORRI, G.; GORIN, P. A. J.; IACOMINI, M. A 3-O-methylated mannogalactan from *Pleurotus pulmonarius*: Structure and antinociceptive effect. **Phytochemistry**, v. 69 p. 2731–2736, 2008.

SOBOLEWSKI, C.; LEGRAND, N.; MORCEAU, F.; DIEDERICH, M. Inflammation: novel arrows for an ancient target. **Biochemical Pharmacology**, v. 80, p. 1769-1770, 2010.

SHERIDAN, C. Recasting natural product research. **Nature Biotechnology**, v. 30, p. 385–387, 2012

STEEDS, C. E. The anatomy and physiology of pain. **Surgery**, v. 27, n. 12, p. 507-511, 2009.

SUFFREDINI, A. F.; FANTUZZI, G.; BADOLATO, R.; OPPENHEIM, J. J.; O'GRADY, N. P. New insights into the biology of the acute phase response. **Journal of Clinical Immunology**, v. 19, n. 4, p. 203-214, 1999.

TANSEY, M. G.; SZYMKOWSKI, D. E. The TNF superfamily in 2009: new pathways, new indications, and new drugs. **Drug Discov Today**, v. 14, n. 23-24, p. 1082-1088, 2009.

TARAWNEH, A. H.; LEÓN, F.; IBRAHIM, M. A.; PETTAWAY, S.; MCCURDY, C. R.; CUTLER, S. J. Flavanones From *Miconia prasina*. **Phytochemistry Letters**, v. 7, p. 130–132, 2014.

TURINI, M. E.; DUBOIS, R. N.; Cyclooxygenase-2: a therapeutic target. **Annual Review of Medicine**, v. 53, p. 35–57, 2002.

UMALI-STUART, G.; STIUART-SANTIAGO, A. Phillippine Medicinal Plants: Family Melastomaceae, in: [http:// www.stuartxchange.org/Malatungaw.html](http://www.stuartxchange.org/Malatungaw.html). 2010.

VALE, M. L.; MARQUES, J. B.; MOREIRA, C. A.; ROCHA, F. A.; FERREIRA, S. H.; POOLE, S.; CUNHA, F. Q.; RIBEIRO, R. A. Antinociceptive effects of interleukin-4, -10, and -13 on the writhing response in mice and zymosan-induced knee joint incapacitation in rats. **Journal of Pharmacological Experimental Therapeutics**, v. 304, p. 102–108, 2003.

VANDERMEULEN, E. Pain perception, mechanisms of action of local anesthetics and possible causes. **Revista Belge Med Dent**, v. 55, p. 29-40, 2000.

VANE, J. R.; BAKHLE, Y. S.; BOTTING, R. M. Cyclooxygenases 1 and 2. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 38, p. 97–120. 1998.

VASCONCELOS, M. A.; FERREIRA, D. DA S.; ANDRADE E SILVA, M. L.; VENEZIANI, R. C.; CUNHA, W. R.; Analgesic Effects of Crude Extracts of *Miconia Albicans* (Melastomataceae) **Bolletino Chimico Farmacêutico**, v. 142, n. 8, p. 333-335, 2003.

VASCONCELOS, M. A.; ROYO, V. A.; FERREIRA, D. S.; CROTTI, A. E.; ANDRADE E SILVA, M. L.; CARVALHO, J. C.; BASTOS, J. K.; CUNHA, W. R. In vivo analgesic and anti-inflammatory activities of ursolic acid and oleanolic acid from *Miconia albicans* (Melastomataceae). **Zeitschrift Für Naturforschung C**. v. 61, p. 477-482, 2006.

VERRI, W. J.; CUNHA, T. M.; PARADA, C. A.; POOLE, S.; FERNANDO Q. CUNHA, F. Q. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development? **Pharmacology & Therapeutics**, v. 112, n. 1, p. 116-38. 2006.

VERRI, W. A.; CUNHA, T. M.; PARADA, C. A.; POOLE, S.; LIEW, F. Y.; FERREIRA, S. H. Antigen-induced inflammatory mechanical hypernociception in mice is mediated by IL-18. **Brain Behavior and Immunity**, v. 21, p. 535–543, 2007.

VONKEMAN, H. E.; VAN DE LAAR, M. A. F. J. Nonsteroidal Anti-inflammatory Drugs: Adverse Effects and Their Prevention. **Seminars in Arthritis and Rheumatism**, v. 39, n. 4, p. 294-312, 2010.

WALLACE, J. L.; CIRINO, G. The development of gastrointestinal-sparing nonsteroidal antiinflammatory drugs. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 15, n. 11, p. 405-406, 1994.

WAGNER, H.; BLADT, S. Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. New York: Springer, 2001

WALKER, P. S.; SCHARTON-KERSTEN, T.; KRIEG, A. M.; LOVE-HOMAN, L.; ROWTON, E. D.; UDEY, M. C.; VOGEL, J. C. Immunostimulatory oligodeoxynucleotides promote protective immunity and provide systemic therapy for leishmaniasis via IL-12- and IFN-g-dependent mechanisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. V. 96, p. 6970–6975, Junho, 1999.

WANG, T.Y.; ALJAROUDI, W.A.; NEWBY, L.K. Markers of Cardiac Ischemia and Inflammation. **Cardiology Clinical**, v. 23, n. 4, p. 491–501, novembro. 2005.

WATKINS, L. R.; GOEHLER, L. E.; RELTON, J.; BREWER, M. T.; MAIER, S. F. Mechanisms of tumor necrosis factor- α (TNF- α) hyperalgesia. **Brain Research**, v. 692, p. 244–50, 1995.

WHITTLE, B. A. The use of changes in capillary permeability in mice to distinguish between narcotic and nonnarcotic analgesics. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**, v. 22, p. 246–253, 1964.

WINTER, C. A.; RISLEY, E. Q.; NUSS, G. W. Carageenan-induced edema in hind paw of rat as an assay for anti-inflammatory drugs. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v. 1, p. 547-554, 1962.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO Drug Information Vol 23, No. 1, 2009

WONG, C. K.; HO, C. Y.; KO, F. W.; CHAN, C. H.; HO, A. S.; HUI, D. S.; et al. Proinflammatory cytokines (IL-17, IL-6, IL-18 and IL-12) and Th cytokines (IFN γ , IL-4, IL-10 and IL-13) in patients with allergic asthma. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 125, p. 177–183, 2001.

WOOLF, C. J. Pain: Moving from Symptom Control toward Mechanism-Specific Pharmacologic Management. **Annals of Internal Medicine**, v. 140, p. 441-451, 2004

XIE, Q. W.; KASHIWABARA, Y.; NATHAN, C. Role of transcription factor NF-kappa B/Rel in induction of nitric oxide synthase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 7, p. 4705-8. 1994.

XU, J.; XU, X.; VERSTRAETE, W. Adaptation of E. coli cell method for microscale nitrate measurement with the griess reaction in culture media. **Journal of Microbiology Methods**, v. 41, p. 23-33, 2000.

YAMAGUCHI, T.; NAGASAWA, T.; SATOH, M.; KURAISHI, Y. Itch-associated response induced by intradermal serotonin through 5-HT2 receptors in mice. **Neuroscience Research**, v. 35, p. 77-83. 1999.

YOUNG, A.; McNAUGHT, C. The phisiology of woung healing. **Surgery (Oxford)**, v. 29, p.475-479, 2011.

ZAKARIA, M.; MOHD, M. A. Traditional Malay Medicinal Plants, Fajar Bakti Sdn. Bhd., Kuala Lumpur, Malaysia, 1994.

ZAKARIA, Z. A.; RADEN, M. N. R. N. S.; HANAN KUMAR G. et al. Antinociceptive, anti-inflammatory and antipyretic properties of Melastomamalabathricum leaves aqueous extract in experimental animals. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 84, n. 12, p. 1291–1299, 2006.

ZAKARIA, Z. A.; SANI, M. M.; CHEEMA, M. S.; KADER, A. A.; KEK, T. L.; SALLEH M. Z. Antinociceptive activity of methanolic extract of Muntingia calabura leaves: further elucidation of the possible mechanisms. **Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, p. 63, 2014.

ZHANG, Z.; ELSOHLY, H. N.; LI, X. C.; KHAN, S. I.; BROEDEL, S. E. J. R.; RAULLI, R. E.; CIHLAR, R. L.; WALKER, L. A. Flavanone glycosides from *Miconia trailii*. **Journal of Natural Products**, v. 66, p. 39–41, 2003.

ZHANG, C. The role of inflammatory cytokines in endothelial dysfunction. **Basic Research in Cardiology**, v. 103, n. 5, p. 398-406, 2008.