



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DA RENORBIO**

**THAYS DE LIMA MATOS FREIRE DIAS**

**ESTUDO FARMACOLÓGICO DE EXTRATOS, FRAÇÕES E SUBSTÂNCIAS  
ISOLADAS DE PLANTAS MEDICINAIS E DO PÓLEN E GEOPRÓPOLIS DE**  
*Melipona subnitida* Ducke

**MACEIÓ- AL**  
**2016**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS**  
**INSTITUTO DE QUÍMICA E BIOTECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA DA RENORBIO**

**THAYS DE LIMA MATOS FREIRE DIAS**

**ESTUDO FARMACOLÓGICO DE EXTRATOS, FRAÇÕES E SUBSTÂNCIAS  
ISOLADAS DE PLANTAS MEDICINAIS E DO PÓLEN E GEOPRÓPOLIS DE**  
*Melipona subnitida* Ducke

**Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, como requisito parcial para a obtenção do grau de doutor.**

**Área de concentração: Biotecnologia em saúde**

**Linha de pesquisa:** Desenvolvimento de agentes profiláticos, terapêuticos e testes de diagnósticos.

**Profa. Orientadora: Dra. Magna Suzana Alexandre Moreira**

**Profa. Coorientadora: Dra. Tania Maria Sarmiento da Silva**

**MACEIÓ- AL**

**2016**

**Catálogo na fonte**  
**Universidade Federal de Alagoas**  
**Biblioteca Central**  
**Divisão de Tratamento Técnico**

Bibliotecária Responsável: Helena Cristina Pimentel do Vale

D541e Dias, Thays de Lima Matos Freire.  
Estudo farmacológico de extratos, frações e substâncias isoladas de plantas medicinais e do pólen e geoprópolis de *Melipona subnitida* Duke. / Thays de Lima Matos Freire Dias. – 2016.  
128 f. : il. tabs., grafs.

Orientadora: Magna Suzana Alexandre Moreira.  
Tese (doutorado na Rede Nordeste de Biotecnologia) – Universidade Federal de Alagoas. Instituto de Química e Biotecnologia. RENORBIO. Maceió, 2016.

Bibliografia: f.109-127.  
Anexos: f.128-129.

1. *Piper montealegreanum*. 2. *Melipona subnitida*. 3. *Ximenia americana*. 4. Atividade antinociceptiva. 5. Atividade anti-inflamatória. 6. Flavonoides. 7. Geoprópolis. I. Título.

CDU: 547.972

## FOLHA DE APROVAÇÃO

THAYS DE LIMA MATOS FREIRE DIAS

**Estudo Farmacológico de Extratos, Frações e/ou Flavonoides Isolados de Plantas Medicinais, Pólen e Geprópolis de *Melinpona subnitida* Ducke.**

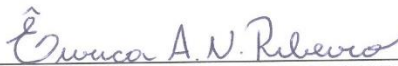
Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO, Ponto Focal Alagoas, Universidade Federal de Alagoas, como requisito parcial para a obtenção do Título de Doutora em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia em Recursos Naturais.

Aprovada em: 31/08/2015.

### BANCA EXAMINADORA



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Magna Suzana Alexandre Moreira (Orientadora/UFAL)



Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Érica Adélia Nogueira Ribeiro (ESENFAR/UFAL)



Prof. Dr. João Xavier de Araújo Junior- (ESENFAR - UFAL)



Prof. Dr. Mario Meneghetti (IQB/UFAL)



Prof. Dr. Tiago Gomes de Andrade, (UFAL/ARAPIRACA)



Dedico esta tese à minha mãe, Jeane de Lima Matos, e aos meus filhos, Nilson,  
Ian e Liandra, por me botarem no mundo!

## AGRADECIMENTOS

Em homenagem ao meu Nordeste escrevo os agradecimentos em forma de Cordel:

Primeiro quero agradicê  
Deus nosso criadô  
Pra chegar intê aqui  
Foi quem mais ajudô  
Sem Ele eu não seria  
Nem o pó da maravalha  
Nem uma pontêra suja  
Nem lamínula quebrada  
Imagine uma dotôra  
Hômi, eu num seria é nada!

Ao sair da minha terra  
Tão cheia de esperança  
Só levando a alegria  
Coisa de gente baiana  
Sem saber que encontraria  
Tanta pessoa bacana  
Que no LaFI me acolheu  
E agora aqui estou eu  
Agradicendo a confiança

Começando pela chefia  
Qualidade de primêra  
Seu nome é Magna Suzana  
Que mulher trabaiadêra!  
Na pesquisa e na vida  
É a minha conselhêra

Há pessoas que confesso  
Num posso mi isquecê  
São os anjos que à Terra  
Deus resolveu concedê  
Mariana, Gabriela e Aline  
São amigas tão sublimes,  
Repito mais de uma vez  
O que seria de mim,  
Se num fossem vocês?

O LaFI é uma família  
Que aprendi a amá  
Agradeço muito a todos  
Que puderam mi ajudá  
Os colegas de jornada  
Que andaram a mesma estrada

Que eu resolvi trilhá  
Anderson, Amanda, Yolanda  
E tantos outros  
Discurpa o tempo pôco  
Pra consegui enumerá

E por falar em família  
(Agora sei que vô chorá!)  
Minha mãezinha Jeane  
Pra sempre vô lembrá  
De todo o seu esforço  
Fazendo mais do que pôde  
Pru mode eu istudá

Agradeço ao "paitrocínio"  
E toda a confiança  
Do homem que nunca perde  
Sua alma de criança  
José Fernando, pai querido  
Sempre o terei na lembrança

Também nunca esquecerei  
As minhas lindas sobrinhas  
E as manas Maureen e Fernanda  
Mesmo com toda distância  
Vocês foram a companhia  
Que eu tive na infância  
Sem contar os tios e tias  
Que amo como aos meus pais  
Fizeram toda a diferença  
Como ocês num tem iguais

Muitos são os primos e primas  
Que levo no coração  
E os amigos arretados  
Tão chegados quanto irmãos  
Gente que num arrudeia  
Chega junto, num tapeia  
Na hora da precisão  
Vou citar apenas quatro:  
Luciana, Lauane, Ciro e Marcos  
Vixe, esqueci do Pereira!  
Mas se fô butar tudinho  
Escrevo a noite inteira

Meu esposo Eliandro  
Não esqueci d'ocê  
Pense como é complicado  
Consegui agradicê  
Os doze anos de cuidado  
Que recebi com prazê  
Essa conquista é nossa  
Num preciso nem dizê

Aos meus filhos amados  
Vai meu muito obrigada  
Nilson, Ian e Liandra  
Por me botaram no mundo  
Serem a minha segurança  
Nunca pensem o contrário  
Vocês são a minha força  
Não permita Deus que eu morra  
Sem vê-los bem criados

Num posso dêxar de homenagiá  
a Banca Ixaminadora  
Esse povo tão bunito,  
Muito simpático e sabido  
Que permitirá eu ser dotôra  
Também aos “caba macho”  
E “mulheres de vergonha”  
Que pelejam na pesquisa  
Não deixam a ciência a toa

Nessa terra que fiz minha  
Que é também dos Marechais  
Com um povo tão bonito  
Tantas belezas naturais  
E o governo si esquece  
Que o povo aqui padece  
Carece de muito mais

Mi discurpa se isqueço  
De mais alguém importante  
Pois a felicidade é muita  
O coração palpitante  
Foram quatro anos vividos  
Para falar aqui ixprimido  
Tudo em um só instante

E para finalizar  
Acabando a choradêra  
Agradeço aos que pagaram  
Por toda essa bagacêra  
CAPES, INCT-INO FAR,  
Renorbio e CNPq  
E agradeço também a você  
Que leu as minhas bestêras!

Muito Obrigada!

Todo homem prudente age com base no conhecimento,  
mas o tolo expõe a sua insensatez.

**Provérbios 13:16**

## RESUMO

Neste estudo identificamos o efeito antinociceptivo e anti-inflamatório dos flavonoides PMT1 e PMT2 obtidos das partes aéreas de *Piper montealegreanum*, o extrato etanólico e frações fenólicas de geoprópolis, bem como o extrato, frações (acetato de etila e hidrometanólica) e o flavonoide tricetina, sendo ambos (geoprópolis e pólen) coletados pela abelha *Melipona subnitida*, também foi estudado o extrato etanólico, frações e o flavonoide epicatequina XACC-1 obtidos da casca do caule de *Ximenia americana*. O efeito antinociceptivo de PMT1 e PMT2 (0,1; 1; 30 e 100  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.) foi avaliado usando o ensaio de contorção abdominal induzida por ácido acético, os flavonoides foram capazes de inibir o número de contorções com uma  $\text{DI}_{50}$  de 0,58 e 0,44  $\mu\text{mol/kg}$ , respectivamente. Além disso, estes flavonoides (100  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.) inibiram o tempo de lambida na 1ª fase do teste de formalina, mas apenas PMT2 permaneceu ativo na 2ª fase. No entanto, PMT1 e PMT2 (100  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.) não aumentaram o tempo de latência dos animais na placa quente. A fim de avaliar o efeito anti-inflamatório destes flavonoides, o ensaio de edema da orelha induzido por capsaicina foi realizado. Ambos os flavonoides (100  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.) foram ativos neste modelo. O extrato etanólico do pólen coletado por *M. subnitida*, a fração acetato de etila, hidrometanólica e o flavonoide tricetina, quando testados em camundongos, induziram efeito antinociceptivo no ensaio de contorções abdominais. A atividade anti-inflamatória do flavonoide tricetina também foi confirmada no ensaio de edema de pata induzido por carragenina. Além disso, o teste de contorção induzida por ácido acético foi utilizado para avaliar a atividade antinociceptiva dos extratos etanólicos (100 mg/kg) de geoprópolis e respectivas frações fenólicas (100 mg/kg). Os resultados demonstram que os extratos etanólicos produziram uma inibição significativa ( $p < 0,05$ ), com inibições de 96,9% a 100%. As frações fenólicas, na mesma dose, inibiram também o número de contorções ( $p < 0,05$ ) na proporção de 71,4% a 93,5%. O fato dos extratos etanólicos mostrarem ligeiramente maior atividade antinociceptiva que as frações fenólicas, sugere que geoprópolis contém outros compostos responsáveis por esta atividade, os quais devem ser investigados quimicamente. A ação antinociceptiva e anti-inflamatória do extrato etanólico, frações e a XACC-1 isolada de *X. americana* foram também determinadas utilizando modelos *in vivo*, tais como contorções abdominais induzidas por ácido acético, o teste de formalina, teste de placa quente, peritonite induzida por Zymosan A e um ensaio de inibição de ciclooxigenase *in vitro*. Verificou-se o efeito antinociceptivo de XACC-1 em ambas as fases do teste da formalina, enquanto que a fração clorofórmio induziu inibição apenas na 1ª fase; já a fração aquosa e o extrato etanólico causaram inibição significativa na 2ª fase. A XACC-1 e fração acetato de etila não apresentaram nenhum efeito antinociceptivo central observado no teste da placa quente. O efeito anti-inflamatório foi determinado pela inflamação peritoneal induzida por Zymosan A e os dados indicam que XACC-1, o extrato etanólico a fração hidrometanólica, e acetato de etila reduziram o número de células recrutadas. Além disso, observou-se também que XACC-1 inibe *in vitro* COX-1 e COX-2. As ações biológicas mostradas no presente estudo sugerem que PMT1 e PMT2 de *P. montealegreanum*, tricetina, extrato e frações do pólen e extrato e frações de geoprópolis obtidos pela *M. subnitida*, bem como o extrato, frações e XACC-1 de *X. americana* produzem resposta antinociceptiva e anti-inflamatória.

**Palavras-chave:** *Piper montealegreanum*. *Melipona subnitida*. *Ximenia americana*. Atividade antinociceptiva. Atividade anti-inflamatória. Flavonoides.

## ABSTRACT

In this study, we identified the antinociceptive and anti-inflammatory effects of the flavonoids PMT1 and PMT2 from *Piper montealegreanum*, geopropolis and pollen from stingless bee *Melipona subnitida* and the phenolic fractions extraction, such as the ethanolic extract, fractions and a catechin (XACC-1) isolated from *Ximenia americana*. The antinociceptive effects of PMT1 and PMT2 (0.1, 1, 30 and 100  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.) were evaluated using the classical tests acetic acid-induced writhing, reduced the writhings with an  $\text{ID}_{50}$  of 0.58 and 0.44  $\mu\text{mol/kg}$ , respectively. Moreover, these flavonoids (100  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.) inhibited paw-licking time in the first phase of the formalin test, but only PMT2 was active in the second phase. However, PMT1 and PMT2 (100 $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.) did not increase the latency time of the animals in the hot plate. In order to evaluate the anti-inflammatory effect of these flavonoids, capsaicin-induced ear oedema assay was carried out. Both flavonoids (100 $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.) were active in this model. The ethanolic extract of pollen collected by *M. subnitida*, the fractions ethyl acetate and hydromethanol and the flavonoid tricetin, when tested in mice, induced antinociceptive effects. The anti-inflammatory activity of the flavonoid tricetin was also confirmed. Moreover, acetic acid-induced writhing test was initially used to evaluate the antinociceptive activity of the ethanolic extracts (100 mg/kg) of geopropolis and their phenolics fractions (100 mg/kg). The results demonstrate that the ethanolic extract (100 mg/kg), produced inhibition of abdominal constrictions induced by acetic acid in mice ( $p < 0.05$ ), with inhibitions of 96.9% to 100%. Phenolic fractions at the same concentration also inhibited the number of writhes ( $p < 0.05$ ) from 71.4% to 93.5%. The fact that the ethanolic extracts showed slightly greater antinociceptive activities than the phenolic fractions suggests that geopropolis contains other compounds responsible for this activity and should be chemically investigated, however the phenolic fraction is probably principally responsible for this activity. The antinociceptive and anti-inflammatory action of the ethanolic extract, fractions and XACC-1 isolated from *X. americana* were also determined utilizing *in vivo* models such as acetic acid-induced writhing, the formalin test, hot plate test, Zymosan A-induced peritonitis and an *in vitro* cyclooxygenase inhibition assay. The writhing test revealed antinociceptive effects of all samples from *X. americana*. In the formalin test verified an antinociceptive effect in both the early and late phases by XACC-1, while the chloroform fraction showed a lower antinociceptive effect in the first phase; and the aqueous fraction and ethanolic extract of stem bark caused significant inhibition in the second phase. XACC-1 and the ethyl acetate fraction had no central antinociceptive effect in the hot plate test. Anti-inflammatory effects were determined for Zymosan A-induced peritoneal inflammation and the data indicated that XACC-1, the hydromethanol fraction, the ethanolic extract and the ethyl acetate fraction reduced the number of recruited cells. Moreover, it observed that XACC-1 also inhibited *in vitro* COX-1 and COX-2. The biological actions showed in the present study demonstrate that PMT1 and PMT2 from *P. montealegreanum*, tricetin, extract and fractions from pollen and extract and fractions geopropolis both from *M. subnitida*, such as the extract, fractions and XACC-1 from *X. americana* produce antinociceptive and anti-inflammatory responses.

**Keywords:** *Piper montealegreanum*. *Melipona subnitida*. *Ximenia americana*. Antinociceptive activity. Anti-inflammatory activity. Flavonoids.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Geoprópolis e potes com polén de abelha jandaíra ( <i>M. subnitida</i> ).....	22
Figura 2 -	<i>Ximenia americana</i> L.....	23
Figura 3 -	Estrutura básica dos flavonoides.....	26
Figura 4 -	Classificação dos flavonoides.....	26
Figura 5 -	Síntese de prostanoides através da ação da COX.....	35
Figura 6 -	Biossíntese dos produtos do ácido araquidônico e posterior formação de leucotrienos e prostanoides.....	36

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>5-HPETE</b>	5-hidroperoxieicosatetraenoico
<b>a.C.</b>	Antes de Cristo
<b>ACTH</b>	Hormônio adrenocorticotrófico
<b>AINEs</b>	Anti-inflamatórios não-esteroidais
<b>AMPc</b>	Monofosfato cíclico de adenosina
<b>CCK</b>	Colecistocinina
<b>CGRP</b>	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
<b>COX</b>	Cicloxygenase
<b>d.C.</b>	Depois de Cristo
<b>DI<sub>50</sub></b>	Dose inibitória de 50%
<b>DPOC</b>	Doença pulmonar obstrutiva crônica
<b>EROs</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	Interferon-gama
<b>IL</b>	Interleucina
<b>IL-1R</b>	Receptor de IL-1
<b>iNOS</b>	Sintetase de óxido nítrico induzida
<b>i.p.</b>	Intraperitoneal
<b>LOX</b>	Lipoxigenase
<b>LT</b>	Leucotrieno
<b>NF-<math>\kappa</math>B</b>	Fator nuclear kappa B
<b>NO</b>	Óxido nítrico



<b>NOS</b>	Sintetase de óxido nítrico
<b>PAF</b>	Fator ativador das plaquetas
<b>PG</b>	Prostaglandina
<b>PGL<sub>2</sub></b>	Prostaciclina
<b>PGHS</b>	Sintase de prostaglandina H
<b>PKC</b>	Proteína cinase C
<b>PLA<sub>2</sub></b>	Fosfolipase A <sub>2</sub>
<b>SNC</b>	Sistema Nervoso Central
<b>SP</b>	Substância P
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral $\alpha$
<b>TPG</b>	Transportadores de prostaglandinas
<b>TX</b>	Tramboxano
<b>TRPV1</b>	Receptor de potencial transiente vanilóide do tipo 1
<b>VR-1</b>	Receptor vaniloide-1

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	17
2.1 Objetivo Geral.....	17
2.2 Objetivos Específicos.....	17
<b>3 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	18
3.1 Considerações sobre a importância terapêutica dos produtos naturais.....	18
3.2 Considerações sobre a espécie <i>Piper montealegreanum</i> .....	20
3.3 Considerações sobre pólen e geoprópolis de <i>Melipona subnitida</i> .....	21
3.4 Considerações sobre a espécie <i>Ximenia americana</i> L.....	22
3.5 Considerações sobre os flavonoides e sua importância.....	25
3.6 Dor e nocicepção.....	27
3.7 Dor e inflamação.....	29
3.8 Mediadores da dor e inflamação.....	31
3.9 Fármacos analgésicos e anti-inflamatórios.....	39
3.9.1 Opioides.....	39
3.9.2 Anti-inflamatórios não-esteroidais.....	40
3.9.3 Anti-inflamatórios esteroidais.....	41
3.10 Considerações sobre a atividade antioxidante, antinociceptiva e anti-inflamatória dos flavonoides.....	42
<b>4 ARTIGO 1</b> .....	45
<b>5 ARTIGO 2</b> .....	50
<b>6 ARTIGO 3</b> .....	56
<b>7 ARTIGO 4</b> .....	81
<b>8 DISCUSSÃO</b> .....	97
<b>9 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	108
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	109
<b>ANEXOS</b> .....	128

## 1 INTRODUÇÃO

A inflamação é uma resposta imediata do corpo desencadeada pelo dano devido à presença de patógenos, substâncias tóxicas ou agressão física (UMAMAHESWARI; SANGEETHA, 2015; WEISS, 2008). Os processos inflamatórios são necessários à vigilância imunológica, reparação ótima, e regeneração após a lesão (NATHAN; DING, 2010). No entanto, a inflamação excessiva ou inadequada é a causa de inúmeras doenças, incluindo artrite reumatoide, psoríase e doença inflamatória intestinal. A inflamação é o maior componente dos danos causados por doenças autoimunes e um colaborador essencial para doenças como câncer, diabetes e doença cardiovascular (MCINNES; SCHETT, 2011; TABAS; GLASS, 2013).

Localmente, a inflamação se desenvolve nas formas clássicas, caracterizadas pelo edema, calor, rubor e muitas vezes dor. Os indutores comuns de inflamação compreendem uma grande variedade de condições adversas que iniciam o recrutamento dos leucócitos, indução e ativação de mediadores inflamatórios, como cininas, produtos da enzima ciclooxigenase - COX e citocinas. Muitas dessas moléculas são produzidas localmente e têm comprovado envolvimento no processo inflamatório dos tecidos, e são os principais alvos para a intervenção terapêutica em uma variedade de doenças (CALDER, 2015; MEDZHITOV, 2008, TABAS; GLASS, 2013). A dor é um dos sinais clássicos do processo inflamatório em que a sensibilização dos nociceptores é o denominador comum (GREENE, 2010). Esta sensibilização causa hiperalgesia ou alodinia em seres humanos, fenômenos que envolvem a percepção da dor, e é mais bem descrita como nocicepção em modelos animais (CUNHA et al., 2008; VERRI-JÚNIOR et al., 2006).

O tratamento clínico da dor e inflamação é dependente de fármacos que pertencem à classe dos anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs), esteroidais bem como dos analgésicos opioides (SERHAN; CHIANG; DALLI, 2015). A constante busca por agentes analgésicos e anti-inflamatórios potencialmente eficazes e seguros não pode ser subenfaticada. O uso de extratos de ervas e suplementos nutricionais como medicina alternativa ou complementar à quimioterapia convencional para o tratamento de processos inflamatórios está bem documentado na medicina Ayurveda (RAO; FANG; TZENG, 2005). Além disso, diferentes populações nas mais variadas regiões do mundo utilizam correntemente os produtos naturais como único recurso terapêutico (CALIXTO, 2005; USTULIN, 2009).

A busca de produtos naturais com propriedades medicinais tornou-se uma importante atividade científica, visando o crescimento e o aperfeiçoamento de técnicas e recursos

humanos especializados, que possam colaborar com as pesquisas voltadas para o desenvolvimento de fármacos capazes de contribuir para o tratamento e cura de doenças que acometem a população. Neste sentido, desde 2009, o governo brasileiro está dando prioridade ao estudo de produtos oriundos da fauna e flora nativa com ênfase à descoberta de novos medicamentos e/ou substâncias que possam servir de ferramentas farmacológicas ou como modelos para a síntese de novos fármacos (BRASIL, 2009).

Portanto, este trabalho versa sobre o estudo das propriedades antinociceptivas e anti-inflamatórias dos flavonoides PMT1 e PMT2 obtidos das partes aéreas de *Piper montealegreanum*, o extrato etanólico e frações fenólicas de geoprópolis, o flavonoide tricetina, extrato etanólico e frações (acetato de etila e hidrometanólica) do pólen, sendo ambos (pólen e geoprópolis) produzidos pela abelha sem ferrão *Melipona subnitida*, bem como o extrato etanólico, frações e uma epicatequina XACC-1 obtidos da casca do caule de *Ximenia americana*. Para tanto, modelos *in vivo* e *in vitro* foram utilizados, como: ensaio de contorções abdominais induzidas por ácido acético (COOLIER; DINNEN; SCHNEIDER, 1968); o ensaio de nocicepção induzida por formalina (HUNSKAAR; FASMER; HOLE, 1985; TJOLSEN et al., 1992) o ensaio de placa quente (KURAISHI et al., 1983); o ensaio de peritonite induzida por Zymosan A (FERRANDIZ; ALCARAZ, 1991).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

O presente trabalho tem como objetivo avaliar o potencial antinociceptivo e anti-inflamatório dos flavonoides PMT1 e PMT2 obtidos das partes aéreas de *P. montealegreanum*, o extrato etanólico e frações fenólicas de geoprópolis, bem como o extrato, frações (acetato de etila e hidrometanólica) e o flavonoide tricetina do pólen, sendo ambos (geoprópolis e pólen) coletados pela abelha *M. subnitida*, também foi avaliado o extrato etanólico, frações e o flavonoide epicatequina XACC-1 obtidos da casca do caule de *X. americana*, contribuindo assim para o estudo farmacológico desses produtos naturais.

### 2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a atividade antinociceptiva em modelos animais de nocicepção;
- Investigar uma possível ação antinociceptiva central no modelo de placa quente;
- Pesquisar a atividade anti-inflamatória em modelos animais de inflamação aguda;
- Sugerir alternativas para a elucidação do mecanismo de atuação XACC-1, na nocicepção e inflamação.

### 3 REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Considerações sobre a importância terapêutica dos produtos naturais

Os produtos naturais e seus derivados consistiram durante muito tempo a base da terapêutica adotada mundialmente. Há relatos na literatura que aproximadamente 3000 a.C., os povos orientais, em particular os chineses, já faziam uso de plantas e outros métodos terapêuticos naturais no tratamento de diversas enfermidades (CHANG; BUT, 1987).

A observação dos diferentes tipos populacionais em diversas regiões do mundo sobre o uso e a eficácia de uma gama de produtos naturais oriundos da fauna e flora contribuiu de forma relevante para a divulgação das virtudes terapêuticas destes compostos, utilizados com frequência pelos efeitos medicinais que produzem, apesar de amiúde não terem seus constituintes químicos conhecidos. Dessa forma, usuários de produtos naturais de todo o mundo, mantêm em voga uma prática medicinal que utiliza informações de terapêuticas que foram sendo acumuladas durante séculos (MEHTA, 2015).

As plantas representam uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais constituíram modelos para a síntese de um grande número de fármacos (VARANDA, 2006). A fantástica variedade e complexidade de metabólitos especiais biossintetizados pelas plantas teriam se formado e evoluído como mecanismo de defesa desses vegetais às condições ambientais ricas em microrganismos, insetos, animais e também às condições de adaptação e regulação (MONTANARI; BOLZANI, 2001).

A história do desenvolvimento das civilizações Oriental e Ocidental é rica em exemplos da utilização de recursos naturais na medicina, no controle de pragas e em mecanismos de defesa, merecendo destaque a civilização Egípcia, Greco-Romana e Chinesa (VIEGAS-JÚNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2006). A cultura chinesa tem-se utilizado do conhecimento popular de ervas medicinais durante os últimos cinco séculos. Há relatos, por exemplo, do uso de plantas com finalidades terapêuticas na obra *Pen Ts'ao* do chinês Shen Nung, que é reconhecidamente o fundador da medicina chinesa (FOGLIO et al., 2006; TUROLLA; NASCIMENTO, 2006). A medicina tradicional chinesa se desenvolveu com tal grandiosidade e eficiência que até hoje muitas espécies e preparados vegetais medicinais são estudados na busca pelo entendimento de seu mecanismo de ação e no isolamento dos princípios ativos (VIEGAS-JÚNIOR; BOLZANI; BARREIRO, 2006). No ano 78 d.C., o botânico grego Pedanios Dioscorides descreveu cerca de 600 plantas medicinais, além de

produtos minerais e animais no tratado *De Materia Medica*. Este tratado permaneceu como fonte de referência por mais de quatorze séculos (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006).

Até meados do século XX, os produtos naturais constituíam a base da terapêutica medicamentosa, quando a síntese química, que teve início no final do século XIX, iniciou uma fase de desenvolvimento vertiginoso (FOGLIO et al., 2006). No entanto, nas últimas décadas, uma importante mudança no paradigma das sociedades ocidentais fez com que os produtos naturais passassem novamente a ocupar papel de destaque por grandes contingentes populacionais de países desenvolvidos e em desenvolvimento. A indústria farmacêutica motivada, em parte, pela descoberta de quimioterápicos eficazes como vimblastina, vincristina, podofilotoxina e os análogos etoposídeo e teniposídeo, camptotecina e taxol, reativou o interesse pelos medicamentos de origem vegetal, principalmente pela busca de substâncias com estruturas moleculares complexas, praticamente impossíveis de serem obtidas por um processo sintético de custo racional (MONTANARI; BOLZANI, 2001).

O entusiasmo em relação ao estudo de produtos naturais vem crescendo na assistência à saúde em função de sua fácil aceitabilidade, disponibilidade e em muitos casos baixo custo (VARANDA, 2006). Atualmente cerca de 50% dos medicamentos utilizados são de origem sintética e cerca de 25% são de origem natural, isolados ou produzidos por semi-síntese, oriundos de nada mais do que 90 espécies vegetais, na utilização na terapia moderna (FOGLIO et al., 2006).

Em Cuba, a rica flora permite vasta tradição no uso de fitoterápicos, outrossim, na África do Sul, o uso comum e medicinal de plantas é vasto, com grande produção e obtenção de extratos, o que movimentava setores da economia. No Brasil, existe uma fauna e flora bastante diversificada em toda a sua extensão, com vegetações e agentes polinizadores de diferentes características e cujos princípios ativos são ainda desconhecidos (VARANDA, 2006).

Um exemplo recente de um medicamento produzido a partir de plantas medicinais é o anti-inflamatório fitoterápico Acheflan®, indicado no tratamento local de processos inflamatórios. Esse produto oriundo de pesquisa 100% nacional é encontrado nas formas farmacêuticas de aerosol e de creme, cada uma contendo 5,0 mg do óleo essencial de erva-baleeira (*Cordia verbenacea*, Boraginaceae), padronizado em 2,3-2,9% do terpeno  $\alpha$ -humuleno. Outras substâncias de origem vegetal, pertencentes às mais diversas classes químicas, possuem atividade anti-inflamatória comprovada cientificamente. Dentre elas, destacam-se terpenos, taninos, alcaloides, lignanas, saponinas, cumarinas e flavonoides (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009). Os exemplos citados configuram apenas

algumas dentre as diversas e importantes substâncias isoladas de plantas medicinais, corroborando a necessidade de se fortalecer os estudos voltados para o desenvolvimento de fármacos a partir de produtos naturais.

Entre os produtos naturais de destaque no Brasil, com propriedades terapêuticas podemos citar os produzidos pelas abelhas como: pólen e própolis. A própolis tem sido aplicada há séculos na medicina tradicional, bem como em dietas alimentares e suplementos (KROYER; HEGEDUS, 2001). É utilizada para curar doenças como resfriados, gripes, úlceras, envelhecimento precoce, anemia, colite, reações alérgicas e enterite (GRAIKOU et al., 2011; HANSSEN, 1979; SCAGNETTI; LYNNGHEIM, 1979; ULUSOY; KOLAYLI, 2013). O pólen apícola, constitui uma aglutinação do pólen e néctar floral, com as substâncias salivares da abelha, vem se destacando tanto pelas suas propriedades terapêuticas como atividade antioxidante e possibilidade de aplicação na indústria alimentícia na forma de alimentos funcionais ou suplemento alimentar. Os efeitos terapêuticos tem sido atribuídos aos diversos compostos fenólicos presentes nesse produto (FREIRE et al., 2012; SILVA et al, 2006).

As propriedades medicinais dos produtos apícolas se devem em grande parte ao arsenal vegetal utilizado pelas abelhas, que pela sua capacidade de vôo e de carregar grandes quantidades de pólen são excelentes agente polinizadores, podendo utilizar uma gama de plantas com atividade terapêutica para elaborar seus produtos. Outrossim, a espécie de abelha também influenciará na constituição química do produto natural, tendo-se em vista que os seus hábitos e substâncias salivares determinará modificações preponderantes no mel, pólen ou própolis produzidos (PESSON; LOUVEAUX, 1984).

Os produtos naturais desempenham, portanto, papel muito importante na medicina moderna. Primeiramente, porque podem fornecer fármacos extremamente importantes, os quais dificilmente seriam obtidos via síntese química, como por exemplo, os alcaloides da *Papaver somniferum* e os glicosídeos cardiotônicos da *Digitalis* spp. Em segundo lugar, as fontes naturais fornecem compostos que podem ser modificados, tornando-os mais eficazes ou menos tóxicos. Em terceiro lugar, os produtos naturais podem ser utilizados como protótipos para obtenção de fármacos com atividades terapêuticas semelhantes a dos compostos originais (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006).

### **3.2 Considerações sobre a espécie *Piper montealegreanum* Yuncker**



A família Piperaceae é composta por quatro grandes gêneros e cerca de 4000 espécies que são distribuídas em regiões tropicais e subtropicais em todo o mundo (REGASINI et al., 2008), sendo o gênero *Piper* o mais abundante, com cerca de 2000 espécies (CALLEJAS-POSADA; MIRANDA-ESQUIVEL, 2006; MIRANDA-ESQUIVEL, 2006; QUIJANO-ABRIL). Estudos fitoquímicos de espécies de *Piper* descreveram o isolamento de várias classes de metabólitos secundários, incluindo-se amidas, flavonoides e lignanas (PARMAR et al., 1997). Os flavonoides monoterpênicos são estruturas relativamente raras, caracterizadas pela sua complexidade estrutural e encontradas em poucas famílias de plantas, como Annonaceae e Piperaceae (ØYVIND; KENNETH, 2006). *P. montealegreanum* Yuncker é um pequeno arbusto pertencente à família Piperaceae e provenientes da região Amazônica. Não se conhece nenhum uso desta planta na medicina popular. Do ponto de vista químico-farmacológico, esta espécie foi pouco estudada. Das partes aéreas de *P. montealegreanum* foram previamente isolados dois flavonoides: (S)-8-formil-30,5-di-hidroxi-7-metoxi-6-metil-flavanona (PMT1) e 30-formil-3,40,60-tri-hidroxi-20-metoxi-50-methylchalcone (PMT2). Pinto, Prado e Carvalho (2011) demonstraram que PMT1 e PMT2 têm atividade antibacteriana contra a *Pseudomonas aeruginosa* resistentes à ampicilina. Estes dois flavonoides também mostraram efeito espasmolítico sobre anéis de aorta e de traqueia de ratos e cobaias (ALVES, 2004).

### 3.3 Considerações sobre pólen e geoprópolis de *Melipona subnitida* Ducke

Sendo o resultado da aglutinação do pólen e néctar florais, associados a substâncias salivares das abelhas, o pólen apícola é considerado um dos mais ricos e puros alimentos naturais, fonte de diversas substâncias, principalmente agentes antioxidantes como os flavonoides (FREIRE et al. 2012; PIETTA, 2000). Valendo-se ressaltar que o pólen apícola é coletado pela abelha *Apis mellifera*, sendo o objeto de estudo deste trabalho o pólen meliponícola que é o polen coletado principalmente pelas abelhas do gênero *Melipona* que não possuem ferrão. Existem mais de 300 espécies de abelhas sem ferrão no Brasil, sendo distribuídas por todo território nacional (SOUZA, 2012).

A abelha sem ferrão *Melipona subnitida* Ducke, conhecida como jandaíra, é uma das abelhas nativas e endêmica do semiárido do Nordeste brasileiro, destacam-se por se adaptarem bem em ambientes protegidos e por apresentarem baixa amplitude de vôo, sendo uma das mais utilizadas pelo homem da Caatinga. Esta espécie é comercialmente valorizada pela população local por causa das propriedades medicinais atribuídas ao seu mel e pólen. No

entanto, sua importância principal está ligada à conservação ambiental e produção de frutos através da polinização de espécies vegetais nativas e culturas cultivadas na Caatinga (SILVA et al., 2006; SILVA et al., 2009, SILVA et al., 2014).

Além disso, as abelhas jandaíra (*M. subnitida* Ducke) utilizam vários materiais para proteção e construção dos seus ninhos contra inimigos, tais como cera, barro e resina (KERR, 1987). O geoprópolis é um tipo especial de própolis preparada pelas abelhas sem ferrão (*Melipona*) que coletam resina das plantas e misturam com cera e terra (NOGUEIRA-NETO, 1997). Sua composição química é muito complexa, estando relacionada à diversidade vegetal encontrada ao redor da colmeia (PINTO; PRADO; CARVALHO, 2011). O conhecimento da origem botânica da geoprópolis é importante porque sua atividade biológica deve estar associada às substâncias provenientes das plantas visitadas por estas abelhas. A **Figura 1** demonstra o geoprópolis e a pólen de abelha jandaira (*M. subnitida*).

**Figura 1- Geoprópolis e potes com pólen de abelha jandaira (*M. subnitida*).**



Fonte: SILVA, 2010.

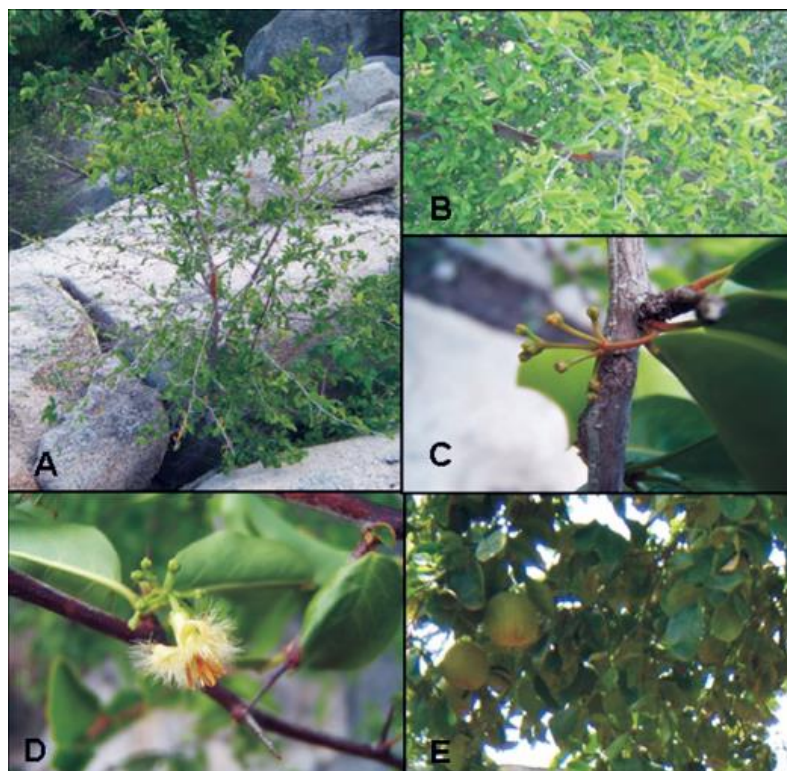
### 3.4 Considerações sobre a espécie *Ximenia americana* L.

Em meio a diversas espécies de plantas medicinais utilizadas na medicina popular no Brasil e no mundo (BASSO et al., 2005; CALIXTO; OTUKI; SANTOS, 2003; CALIXTO et

al., 2004), encontra-se a *X. americana* L. Espécie pertencente à família Olacaceae comumente encontrada na África, Índia, América Central e América do Sul. É uma planta cosmopolita tropical com ocorrência silvestre, inclusive nos tabuleiros litorâneos do Nordeste do Brasil (MATOS, 2007; POTT; POTT, 1994; SACANDE; VAUTIER, 2006).

A *X. americana* L. é caracterizada como um arbusto de 3-4 metros, podendo chegar aos 6 metros de altura, com espinhos de casca fina, avermelhada ou cinza, lisa ou pouco rugosa, com folhas pequenas, simples, inteiras e flores branco-amareladas, aromáticas, com as pétalas recurvadas, dispostas em racemos curtos, axilares ou terminais (BRASILEIRO et al., 2008). Os frutos são uma fonte rica em vitamina C, de formato arredondado, de 1,5-2,0 cm de diâmetro, suculento e apresentando uma única semente tipo amêndoa branca. A casca do fruto é uma película fina, facilmente retirada, quando o fruto está maduro (**Figura 2**). Quando verde, tem coloração da casca verde, e quando maduro, a cor da casca torna-se amarelo alaranjado. Considerando a polpa, ocorre mudança de coloração, passando da cor verde para a amarela, à medida que o fruto amadurece, possui consistência firme e sabor adocicado. Também é perceptível um aroma característico nos frutos maduros (EROMOSELE; EROMOSELE, 2002; SILVA et al., 2008).

**Figura 2 - *Ximenia americana* L.**



A: Hábito; B: Folhas; C: Caule lenhoso; D: Flor e espinho; E: Fruto de *X. americana* L.

Fonte: BRASILEIRO et al., 2008.

A *X. americana* L. é conhecida popularmente no Brasil como ameixa silvestre,ambuí, ameixa-da-baía, ameixa-brava, ameixa-de-espinho, sândalo-do-brasil entre outros nomes, conforme o local em que está adaptada (BRAGA, 1976; SILVA et al., 2008). Todas as partes desta planta têm indicações de uso na medicina popular (BRAGA, 1976; JAMES et al., 2007).

No Brasil a *X. americana* L. faz parte do extrato arbustivo-arbóreo da Caatinga, figurando como uma das principais espécies. No período seco, quando a maioria das espécies da Caatinga perde as folhas, essa planta destaca-se por apresentar-se com as folhas totalmente verdes, o que caracteriza uma planta resistente à seca (FERNANDEZ; BEZERRA, 1990).

Sua casca apresenta diversas atividades e vem sendo usada para diversos fins tais como: tratamento da lepra, malária, dor de cabeça, moluscicida, infecções da pele, hemorroidas e inflamações das mucosas (VERAS; MORAIS, 2004). A casca pulverizada também é recomendada para cicatrização de úlceras, como depurativo, regulador menstrual e nas enfermidades gástricas. A infusão das flores é empregada para amenizar diarreias e disenterias (BRAGA, 1976; HUTCHINSON; DAZIEL, 1954). As raízes são empregadas como anti-séptico, para doenças mentais, febre, icterícia e dor de cabeça, ao passo que as folhas são usadas para sarampo, dor de dentes e também como laxante (OMER; ELIMINA, 2003; SOFOWORA, 1982). Esta planta também é utilizada contra o reumatismo, câncer e muitos tipos de infecções (MEVY et al., 2006).

Estudos realizados com diferentes partes da espécie *X. americana* L. indicam que esta espécie apresenta atividade: antitumoral (VOSS; EYOL; BERGER, 2006), antimicrobiana (GEYID et al., 2005; KONÉ et al., 2004; OMER; ELNIMA, 2003), pesticida e moluscicida (FATOPE; ADOUM; TAKEDA, 2000; UCHOA et al., 2006) e anticonvulsivante (QUINTANS-JÚNIOR et al., 2002).

Tendo em vista as diversas propriedades medicinais atribuídas a *X. americana* L. estudos fitoquímicos foram realizados com esta espécie indicando a presença de metabólitos secundários em diferentes tipos de extratos desta planta. Alguns estudos relataram a ausência de alcaloides (JAMES et al., 2007; OGUNLEYE; IBITOYE, 2003), outros trabalhos como o realizado por Soro, Traore e Sakande (2008) indicaram a presença de alcaloides, taninos e flavonoides no extrato aquoso da casca do caule de *X. americana* L. Quintans-Júnior et al. (2002) atribuiu a possível atividade anticonvulsivante a alcaloides presentes no extrato etanólico bruto da espécie.

Resultados obtidos utilizando extratos aquosos e metanólicos das folhas, da casca do caule e da raiz indicaram constituintes presentes na planta como: carboidratos, na forma de açúcares e amido solúvel, exceto para o extrato aquoso das folhas. Saponinas, glicosídeos

cardiotônicos e antraquinonas estiveram presentes em todos os extratos, exceto nos extratos das folhas, onde não foram encontradas antraquinonas (JAMES et al., 2007). As cascas da *X. americana* L. apresentam elevado teor de taninos que ainda não foram identificados quimicamente (MATOS, 2007). Estudos com o óleo volátil das folhas de *X. americana* L. demonstraram que continha em sua composição, 69 % de compostos aromáticos, 12,5 % de compostos lipídicos e 13 % de terpenos (MEVY et al., 2006). O constituinte encontrado em maior quantidade foi o benzaldeído (63,5 %), seguido pelo cianeto de benzila (13 %) e isoforona (3,5 %). Outras partes como raiz, frutos e sementes também apresentaram óleos ricos em ácidos graxos essenciais como: linoleico, linolênico e araquidônico (EROMOSELE; EROMOSELE, 2002; MATOS, 2007).

Mwangie colaboradores (1993) isolaram da raiz de *X. americana* var. *caffra* compostos fenólicos como a catequina, epicatequina e ácido gálico, outros estudos também apontam a presença de flavonoides nesta espécie (BRASILEIRO et al, 2008; SORO; TRAORE; SAKANDE, 2008).

### **3.5 Considerações sobre os flavonoides e sua importância**

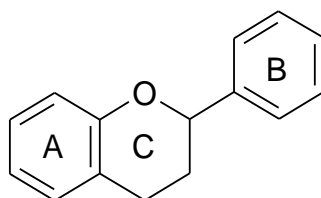
Os frutos e os vegetais são importantes na dieta humana por apresentarem componentes antioxidantes que protegem contra os radicais livres e têm sido associados à redução de risco de várias doenças degenerativas como aterosclerose, câncer, mal de Parkinson e Alzheimer (LODYATO et al., 2004; ZHANG; HAMAUZU, 2004). Os compostos responsáveis pela ação antioxidante são de origem endógena como as enzimas e proteínas e exógena como as substâncias de baixa massa molecular tais como: vitaminas, carotenoides, flavonoides, antocianinas e outros compostos fenólicos muito comuns em plantas (ARGOLO et al., 2004; ZHANG; HAMAUZU, 2004).

Os flavonoides representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural. Essa classe de metabólitos secundários é amplamente distribuída no reino vegetal (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009). Mais de 4000 flavonoides foram isolados a partir de plantas. Eles desempenham um papel importante no metabolismo vegetal e são consideradas substâncias bioativas relativamente não-tóxicas (ODONTUYA; HOULT; HOUGHTON, 2005; PATEL et al., 2008).

Flavonoides são compostos fenólicos de origem natural de considerável interesse científico e terapêutico. O termo flavonoide é um nome coletivo dado aos pigmentos de plantas derivados da benzo- $\gamma$ -pirona. Consistem de um esqueleto de difenil propano ( $C_6C_3C_6$ )

com dois anéis benzênicos (A e B) ligados a um anel pirano (C) (BEHLING et al., 2004). A **Figura 3** mostra o esqueleto estrutural básico dos flavonoides.

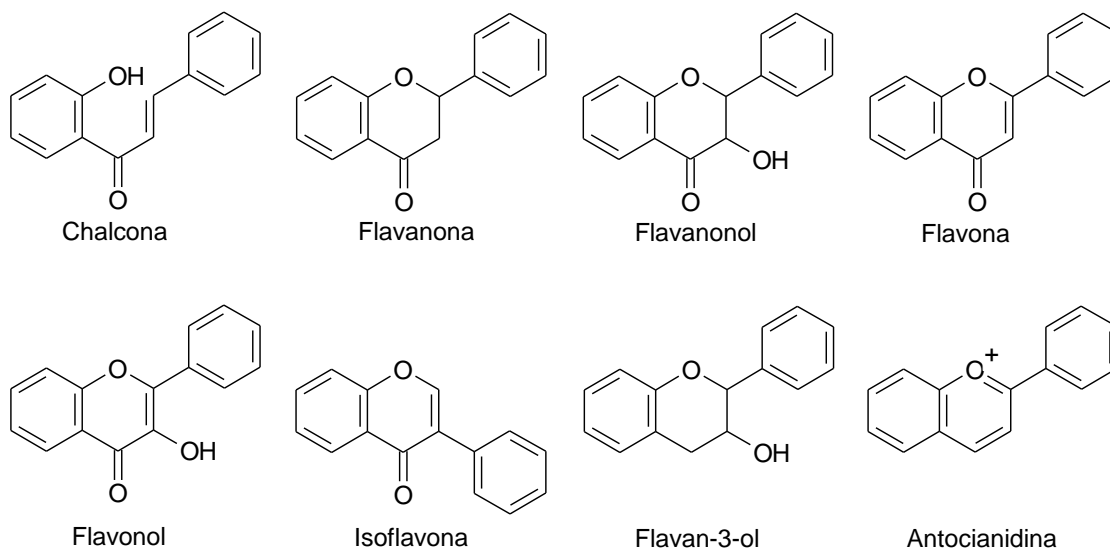
**Figura 3 - Estrutura básica dos flavonoides.**



Fonte: Adaptado de BEHLING et al., 2004.

Os flavonoides estão divididos em subclasses baseados nas conexões nos anéis B e C bem como no grau de saturação, oxidação e hidroxilação do anel C, conforme mostra a **Figura 4**. As características estruturais os dividem em chalconas, flavanolol, flavononas, flavonas, flavonóis, isoflavonoides, flavan-3-óis e antocianidinas (BEHLING et al., 2004; OLIVEIRA, 2005b; WILLAIN-FILHO et al., 2005).

**Figura 4 - Classificação dos flavonoides.**



Fonte: Adaptado de COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009.

Esse grupo de substâncias são metabólitos secundários amplamente distribuídos no reino vegetal, comumente encontrados em frutas, vegetais, grãos, flores, chá e vinho

(BEHLING et al., 2004; WILLAIN-FILHO et al., 2005). As flavononas ocorrem predominantemente em frutas cítricas, conferindo-lhes o sabor característico. As flavonas distribuem-se em ervas e grãos, contribuindo para o sabor e coloração dos tecidos vegetais. As isoflavonas estão presentes em grãos, como a soja, onde possuem atividade estrogênica. As antocianinas são encontradas em frutos, produzindo coloração azul e vermelha; as catequinas também estão presentes em frutos (CAMARGO, 2007).

Muitos flavonoides ocorrem naturalmente como flavonoides glicosilados, ou seja, apresentam açúcares simples ou complexos como substituintes nos anéis centrais; dentre eles destacam-se: D-glucose, L-raminose, glucoramnose, galactose, ligninas, arabinose. No entanto, alguns flavonoides podem ser encontrados na forma de aglicona, sem açúcares ligados aos anéis centrais (PIMENTEL, 2006).

Dentre as várias atividades farmacológicas atribuídas aos flavonoides, destacam-se as suas propriedades diuréticas, antiespasmódicas, anti-inflamatórias, antibacterianas, antiulcerativas, antivirais, antifibrótica, estrogênicas, antioxidante e antineoplásica, dentre outras (BEHLING et al., 2004; WILLAIN-FILHO et al., 2005; JAYASHREE et al., 2010; CHAHAR et al., 2011).

### **3.6 Dor e nocicepção**

A capacidade de detectar estímulos nocivos é essencial para a sobrevivência e bem-estar de um organismo (BASBAUM et al., 2009). O sistema nervoso sensorial é especializado em detectar e reagir a estímulos externos e, dependendo da evolução da complexidade genética característica de cada espécie, as proteínas transdutoras possibilitam diferenciar o estímulo agressivo do inócuo (KRAYCHET; CALASANS; VALENTE, 2006).

A dor pode ser definida como uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano tecidual potencial ou real (LIMA-JÚNIOR, 2005; TRACEY; MANTYH, 2007). Assim como a beleza não é inerente a uma imagem visual, a dor é uma experiência complexa que envolve não apenas a transdução dos estímulos de substâncias nocivas do ambiente, processamento cognitivo e emocional pelo cérebro (JULIUS; BASBAUM, 2001). Já a nocicepção é o processo pelo qual estímulos térmicos, mecânicos, ou químicos intensos são detectados por uma subpopulação de fibras nervosas periféricas, denominadas nociceptores (BASBAUM et al., 2009).

O sistema nervoso pode alterar os seus níveis de atividade em resposta a um estímulo nociceptivo, não sendo apenas um condutor de estímulos, mas sim reagindo a eles quando

persistentes, modificando-se anatômica e funcionalmente (neuroplasticidade) e também armazenando estas informações (memória) (BARROS, 2004). Os estímulos dolorosos são detectados e codificados, principalmente, por nociceptores aferentes nas fibras nervosas tipos A $\delta$  e C, que transmitem informações nocivas a medula espinal e ao cérebro (BASBAUM et al., 2009; IVERSEN; CHAPMAN, 2002).

Estes nervos têm terminações sensoriais nos tecidos periféricos e são ativados por estímulos de vários tipos (mecânico, térmico, químico) (JULIUS; McCLESKEY, 2006). Eles são diferenciados de outros tipos de receptores mecânicos e térmicos pelo seu limiar mais alto, pois normalmente são ativados somente por estímulos de intensidade nociceptiva – suficiente para causar algum grau de lesão tecidual. Registros da atividade em fibras aferentes isoladas em humanos mostraram que estímulos suficientes para excitar estas pequenas fibras aferentes também evocam uma sensação dolorosa. Muitas dessas fibras são fibras C não-mielinizadas, com baixas velocidades de condução; este grupo é conhecido como nociceptores polimodais C. Outras são fibras mielinizadas finas (A $\delta$ ) de condução mais rápida, mas que respondem a estímulos periféricos semelhantes. Os aferentes provenientes de músculos e vísceras também conduzem informação nociceptiva. Nos nervos destes tecidos, as fibras A $\delta$  estão conectadas a mecanoreceptores de limiar alto, enquanto as fibras não-mielinizadas estão conectadas com nociceptores polimodais C, como na pele (OLIVEIRA, 2005a).

Os corpos celulares das fibras aferentes nociceptivas espinais situam-se nos gânglios das raízes posteriores dos nervos raquidianos; as fibras penetram na medula através das raízes posteriores, terminando na substância cinzenta, nas seis lâminas do corno posterior da medula espinal. A maioria dos aferentes nociceptivos termina na região superficial do corno posterior, as fibras C e algumas fibras A $\delta$  inervando corpos celulares nas lâminas I e II, enquanto outras fibras A penetram mais profundamente no corno posterior (lâmina V). As células nas lâminas I e V dão origem às principais vias de projeção a partir do corno posterior tálamo (DICKENSON, 1995).

Os receptores nervosos periféricos da dor foram se desenvolvendo ao longo do tempo, de maneira a ampliar e facilitar a condução nervosa após estímulo de alto limiar, com o objetivo de evitar situações desagradáveis, manter as funções fisiológicas e preservar a vida. Entretanto, embora seja um processo natural, a dor é sempre referida como uma sensação desagradável e por vezes insuportável (FEIN, 2012; KRAYCHETE; CALASANS; VALENTE, 2006).



Quando intensos, os estímulos nociceptivos geram dor aguda, e na continuação dos danos persistentes, tanto componentes periféricos como do sistema nervoso central (SNC) da dor apresentam enorme plasticidade nas vias de transmissão, aumentando os sinais de dor e produção de hipersensibilidade. Quando a plasticidade facilita reflexos protetores, pode haver benefícios, mas quando as alterações persistem, pode-se resultar em uma condição de dor crônica. Além disso, quando estímulos dolorosos provocam dor de maior intensidade, há a indução da chamada hiperalgesia. Já quando estímulos normalmente inócuos, como toque, luz ou calor, são percebidos como dolorosos este fenômeno é referido como alodinia (BASBAUM et al., 2009; LATREMOLIERE; WOOLF, 2009).

A dor neuropática ocorre quando os axomas sensoriais ou as células nervosas estão danificados, causando uma mudança no sistema nervoso por hipersensibilidade, seja na área lesada ou no tecido circundante (TREEDE, 2008). A dor, nestes casos, tem característica de queimação, choque ou disestesia. O mecanismo deste tipo de dor não é nociceptivo, mas por descargas paroxísticas do SNC e periférico (CAMPBELL; MEYER, 2006; LOBO; MARRA; SILVA, 2007).

### **3.7 Dor e inflamação**

A inflamação é o mecanismo básico disponível para o reparo tecidual após uma lesão ou infecção, com o objetivo de remover e reparar o tecido danificado. A resposta inflamatória é uma reação da microcirculação, que é caracterizada pela translocação de proteínas séricas e migração de leucócitos do sangue para a área de injúria. Esses fenômenos são regulados pela liberação sequencial de substâncias vasoativas e mediadores quimiotáticos, que contribuem para os sinais cardinais da inflamação, os quais são calor, rubor, edema, dor e perda de função do tecido (LAWRENCE; WILLOUGHBY; GILROY, 2002; SCHMID-SCHÖNBEIN, 2006).

O processo inflamatório envolve uma série de eventos que podem ser desencadeados por numerosos estímulos (agentes infecciosos, isquemia, interações antígeno-anticorpo, lesão térmica ou outras lesões ocasionadas por agentes físicos e químicos) (KUMMER; COELHO, 2002; ROCHA, 1978). As respostas inflamatórias ocorrem em 3 fases distintas, sendo cada uma aparentemente mediada por diferentes mecanismos: (1) Uma fase transitória aguda, de reação inata, que engloba os eventos que ocorrem localmente no interior dos tecidos; caracterizada por vasodilatação e aumento da permeabilidade capilar: (2) Uma fase subaguda tardia, caracterizada proeminentemente pela infiltração dos leucócitos e células fagocíticas; a resposta imune é adquirida e específica, tornando a resposta de defesa a um microorganismo

invasor mais eficaz. (3) Uma fase proliferativa crônica, em que ocorre degeneração tecidual e fibrose (TLASKALOVA-HOGENOVA et al., 2005).

Existem muitos mecanismos diferentes envolvidos no processo inflamatório. Além disso, a capacidade de desencadear uma resposta inflamatória é essencial para a sobrevivência em vista dos patógenos e das lesões ambientais, embora, em algumas situações de doenças a resposta inflamatória seja exagerada e duradoura, sem qualquer razão benéfica aparente (GALLIN; GOLDSTEIN; SNYDERMAN, 1992; KELLEY et al., 1993).

A dor aguda inflamatória é caracterizada por hipernocicepção devido à sensibilização dos neurônios sensoriais primários nociceptivos, gerando hiperalgesia ou alodinia. Após a lesão tecidual, são liberados mediadores primários, que atuam sobre receptores metabotrópicos na membrana neuronal para desencadear a ativação de vias de segundos mensageiros. Na última década, tem sido demonstrado que estímulos inflamatórios não estimulam diretamente a liberação de mediadores primários hipernociceptivos, mas que a sua liberação é precedida por uma cascata de citocinas (CUNHA et al., 2005).

Os eicosanoides e as aminas simpáticas são os mediadores primários mais importantes. Estes mediadores ativam vias de segundos mensageiros, tais como monofosfato cíclico de adenosina (AMPC), proteína cinase A e a proteína cinase C (PKC), responsáveis pela redução do limiar de nociceptores, aumentando assim a excitabilidade da membrana neuronal. Neste estado, a ativação e transmissão do impulso pelos neurônios nociceptivos primários são facilitadas (CUNHA et al., 2005).

A vasodilatação local aumenta o fluxo sanguíneo regional para a área inflamada e, juntamente com um aumento da permeabilidade microvascular, resulta na perda de líquidos e proteínas plasmáticas do sangue para o tecido extravascular. Concomitantemente, há um aumento da expressão de moléculas de adesão nas células endoteliais e da liberação de fatores quimiotáticos do local injuriado, que facilita a aderência de células circulantes ao endotélio vascular e sua migração para a área afetada. Estes eventos resultam em um predomínio de neutrófilos na área inflamada no início da lesão, que posteriormente são progressivamente substituídos por células mononucleares, principalmente, os monócitos, que depois se diferenciam em macrófagos. Essas células fagocíticas, além de ingerirem estímulos nocivos como microrganismos e restos celulares, também liberam enzimas hidrolíticas e proteolíticas, que geram espécies reativas de oxigênio (EROs) (LAWRENCE; WILLOUGHBY; GILROY, 2002).

Idealmente, a resposta inflamatória aguda termina quando a homeostase é restabelecida, após eliminação do estímulo nocivo. No entanto, quando o fator de risco

continua a existir, a inflamação aguda deixa de ser um evento benéfico e evolui para inflamação crônica (KIELLAND; CARLSEN, 2010; SCHMID-SCHÖNBEIN, 2006; WU; WU, 2007).

A inflamação crônica envolve a liberação de diversos mediadores que não são proeminentes na resposta imune. Nas inflamações crônicas, além dos fenômenos exsudativos, estão presentes também os fenômenos produtivos, que consistem na proliferação de vasos e fibroblastos, como também na migração e proliferação de monócitos e linfócitos (SILVA et al., 2002).

Os mecanismos moleculares de doenças inflamatórias crônicas, como asma, doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC), artrite reumatoide e doença inflamatória intestinal, envolvem a infiltração e a ativação de processos inflamatórios e muitas células do sistema imunológico, que liberam vários mediadores inflamatórios que interagem e ativam as células estruturais no sítio inflamatório. O padrão de inflamação difere claramente entre estas doenças, com a participação de várias células e mediadores, mas todas são caracterizadas por aumento da expressão de várias proteínas inflamatórias, algumas das quais são comuns a todas as doenças inflamatórias, enquanto outras são mais específicas para uma determinada doença. Essa expressão aumentada de múltiplos genes inflamatórios característica da inflamação crônica é regulada por fatores de transcrição pró-inflamatórios, tais como fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) (BARNES, 2006).

O número crescente de relatos na literatura tem enfatizado o fato de que a inflamação, especialmente, a inflamação crônica, desempenha um papel importante na patogênese e progressão de doenças inflamatórias, incluindo as doenças degenerativas, câncer, doenças cardiovasculares, acidente vascular cerebral, insuficiência renal e DPOC (WU; WU, 2007).

A complexidade da resposta inflamatória exige que muitos de seus elementos funcionais sejam controlados coordenadamente em algumas situações e de forma independente, em outras. Esta regulação ocorre através da especificidade das células recrutadas e sua diferenciação, da sinalização e da expressão gênica (KIELLAND;CARLSEN, 2010).

### **3.8 Mediadores da dor e inflamação**

Após o estímulo desencadeador do processo inflamatório, ocorre a liberação de diversos mediadores que podem originar-se do plasma, das células ou dos tecidos lesionados podendo ser divididos em: aminas vasoativas (histamina e serotonina); proteases plasmáticas

(sistema de cinina – bradicinina, sistema do complemento, sistema de coagulação-fibrinolítico); eicosanoides; proteases lisossômicas; fatores ativadores das plaquetas (PAF); quimiocinas, citocinas, óxido nítrico (NO) dentre muitos outros (ALBERTINE et al, 2004; KUMAR; ABBAS; FAUSTO, 2005).

Cada mediador com seu papel específico, atua em estágios definidos da reação inflamatória. O entendimento dos mecanismos endógenos de ação de alguns importantes mediadores envolvidos na resposta inflamatória ajuda na compreensão e na busca de novos alvos terapêuticos para fármacos que atuem na resolução de processos patológicos que ocasionam dor e inflamação (MEDZHITOV, 2008).

Entre os mediadores da inflamação, encontram-se algumas citocinas, tais como IFN- $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-2, IL-6, IL-8 e o TNF- $\alpha$ , que exercem atividade pró-inflamatória, sendo essencial para iniciação, regulação e perpetuação da resposta inflamatória. Essas citocinas pró-inflamatórias são definidas como polipeptídios produzidos e liberados pelas células em resposta a uma variedade de estímulos inflamatórios tais como vírus, parasitos, bactérias e seus produtos, ou em resposta a outras citocinas. Tais mediadores pró-inflamatório induzem a expressão de moléculas de adesão e quimioatraentes, facilitando o influxo e ativação de leucócitos (BARSANTE et al., 2005; VERRI-JÚNIOR et al., 2006). Por exemplo, ligação da IL-1 $\beta$  ao receptor IL1-RI inicia uma série de eventos intracelulares, ativando fatores transcricionais, induzindo a expressão de COX-2, sintetase de óxido nítrico (NOS) e IL-1 $\beta$ , a IL-6 e o TNF- $\alpha$ . Assim, a IL-1 $\beta$  exerce ação direta e indireta nos nociceptores e há aumento da síntese de IL-1 $\beta$  na lesão de nervo periférico (SUNG et al., 2004).

Já as quimiocinas são um grupo grande de moléculas de citocinas que desempenham um papel importante no recrutamento de leucócitos na inflamação e na regulação da reposta imune do tipo Th1 e Th2. As quimiocinas são induzidas por citocinas (TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ ), espécies reativas de oxigênio, pela ativação de NF- $\kappa$ B, e pela via de sinalização dos receptores Toll (AKCAY; NGUYEN; EDELSTEIN, 2009). Embora as quimiocinas sejam consideradas citocinas (citocinas quimiotáticas), pertencem a um grupo específico de citocinas com propriedades químicas e funcionais específicas. Elas são geralmente menores que outras citocinas (8-10 kDa) e agem em receptores acoplados à proteína G (VERRI-JÚNIOR et al., 2006).

Já as aminas vasoativas (histamina e serotonina) têm sido classicamente envolvidas no processo de nocicepção em várias condições inflamatórias. As aminas vasoativas são produzidas, principalmente, quando mastócitos e plaquetas se degranulam. Essas substâncias apresentam complexos efeitos sobre a vasculatura, provocando aumento da permeabilidade

vascular, vasodilatação ou vasoconstrição dependendo do contexto. As consequências imediatas de sua liberação pelos mastócitos podem ser altamente prejudiciais em organismos sensíveis, resultando em colapso vascular e respiratório durante o choque anafilático (MEDZHITOV, 2008).

De importância primordial para geração da inflamação neurogênica são os neurônios sensoriais que possuem receptores vaniloides, os quais são ativados pela capsaicina (RICHARDSON; VASKO, 2002). Esses neurônios fazem partes de fibras nervosas do tipo C e, em menor quantidade, das fibras A $\delta$  (BASBAUM et al., 2009; KALIL-GASPAR, 2003). A capsaicina, substância irritante isolada da pimenta vermelha (*Capsidium annuum*), ativa prótons do receptor vaniloide-1 (VR-1), que estão localizados em neurônios sensoriais de pequenos diâmetros (CATERINA et al., 1997). Esta interação entre capsaicina e VR-1 resulta na ativação de canais de cálcio não seletivos, que ocorre através da despolarização induzida pelo sódio, aumentando cálcio intracelular (SZALLASI; BLUMBERG, 1999). Além da capsaicina, outros estímulos como altas temperaturas e pH ácido e alcalino também são capazes de ativar VR-1 (DHAKA et al., 2009).

Os neurônios sensoriais sensíveis à capsaicina transmitem informação nociceptiva ao SNC (função aferente), enquanto que suas terminações periféricas estão relacionadas com a liberação de uma variedade de neurotransmissores, aminoácidos e neuropeptídeos pró-inflamatórios (função eferente), onde exercem importante papel na modulação da transmissão nociceptiva (CARVALHO; LEMÔNICA, 1998; SZALLASI; BLUMBERG, 1999). Entre tais substâncias destacam-se os aminoácidos excitatórios glutamato e aspartato e diversos outros neurotransmissores e neuropeptídeos, incluindo as taquicininas, Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP), colecistocinina (CCK), somatostatina, NO, prostaglandinas (PGs), galanina, encefalinas e endorfinas. O CGRP e a substância P (SP) são os maiores iniciadores da inflamação neurogênica, e produzem sintomas por interagirem com células endoteliais, mastócitos, células do sistema imune e arteríolas (CARVALHO; LEMÔNICA, 1998; RICHARDSON; VASKO, 2002).

Outros mediadores inflamatórios importantes são as proteases plasmáticas, tais como a bradicinina, calidina e T-cinina, as quais são formadas no sangue e nos tecidos durante a lesão tecidual e estímulo nocivo. Bradicinina e calidina são formadas após clivagem proteolítica do cininogênio plasmático ou tecidual através da ação da serina protease calicreína. A bradicinina age em receptores B1 e B2, sensibiliza nociceptores periféricos (desinibindo receptor de potencial transiente vanilóide do tipo 1 – TRPV1), potencializa a transmissão sináptica para glutamato na medula espinal, estimula macrófagos a liberar citocinas, secreta

fatores quimiotáticos para neutrófilos e monócitos e facilita a liberação de histamina dos mastócitos (DUCHENE; AHLUWALIA, 2009; MEDZHITOV, 2008; WANG et al., 2005).

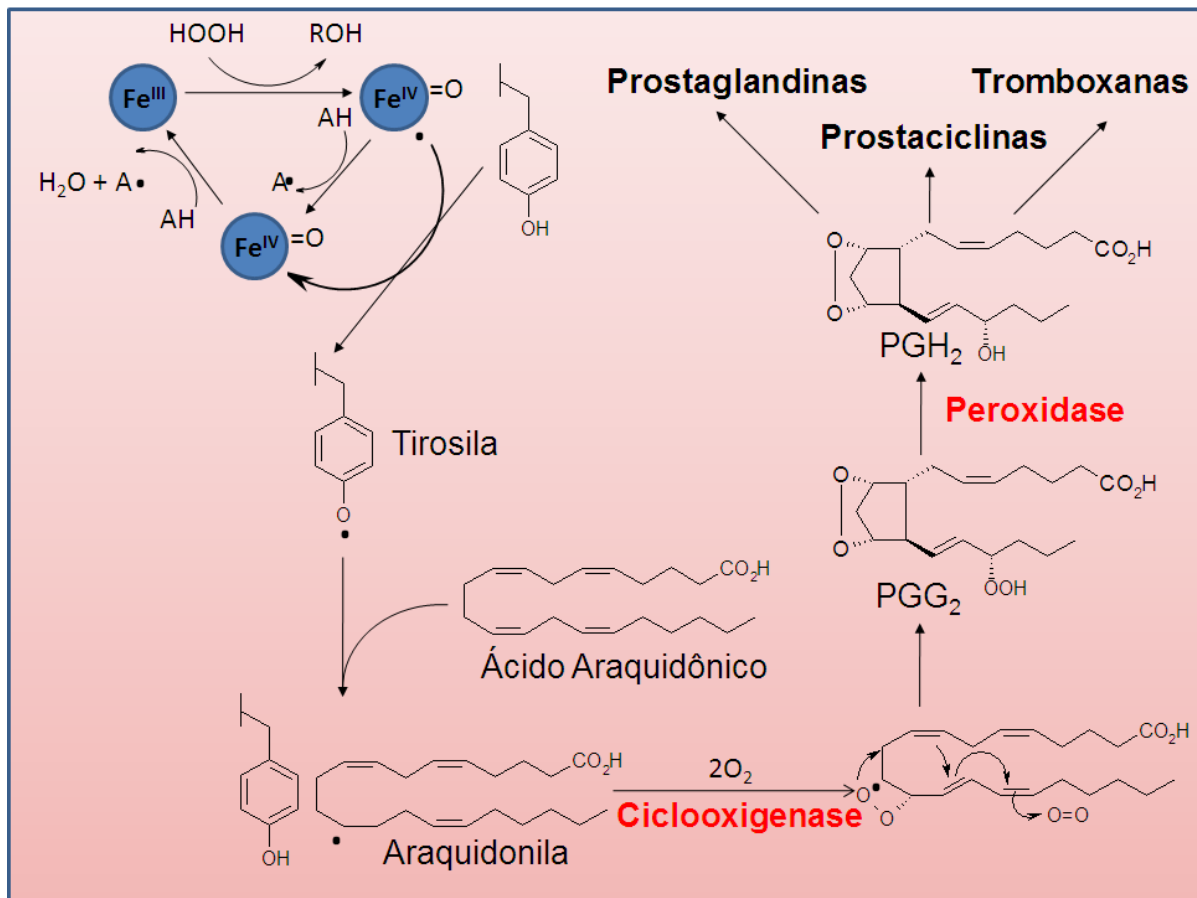
Além das proteases plasmáticas, existem também os eicosanóides, os quais são agentes homeostáticos envolvidos na manutenção da integridade dos sistemas inflamatório, cardiovascular e renal. Os eicosanoides são os metabólitos do ácido araquidônico e incluem as PGs, os tromboxanos (TXs) e os leucotrienos (LTs). A biossíntese dos eicosanoides é regulada em resposta a estímulos físicos, químicos e hormonais. Essas alterações levam as células a adquirirem comportamentos diferenciados, movimentos novos, alterações de forma e liberação enzimática e de substâncias farmacologicamente ativas que possuem efeitos intracelulares importantes nos líquidos teciduais, tanto em condições fisiológicas como patológicas. Como a concentração do araquidonato livre na célula é muito pequena, a biossíntese dos eicosanoides depende principalmente da sua disponibilidade para as enzimas que os sintetizam; essa disponibilidade depende de sua liberação a partir das reservas adiposas pelas hidrolases acíclicas, principalmente a fosfolipase A2 (PLA<sub>2</sub>) e a lipase do diacilglicerol (MACHADO et al., 2008).

O metabolismo do ácido araquidônico pode ocorrer através de três vias enzimáticas distintas: o ácido araquidônico pode ser convertido no precursor de prostanoídes pela ação da COX; pode ser substrato para a lipoxigenase (LOX), levando à produção de LTs; e ainda pode ser usado como substrato da enzima esfingomielinase, que converte a esfingomielina em seramida, um mediador da apoptose (CARNEIRO et al., 2004; SMITH; URADE; JAKOBSSON, 2011).

O desequilíbrio na homeostase de LTs pode resultar em respostas inflamatórias com distúrbios respiratórios, como asma e rinite alérgica, artrite e desordens inflamatórias no intestino. Similarmente, um desequilíbrio na síntese de PGs pode levar a doenças cardiovasculares e renais, resultando em aterosclerose e derrames (SILVA et al., 2002).

A enzima COX, também conhecida como sintase de prostaglandina H (PGHS), catalisa a bis-oxigenação do ácido araquidônico através da ação de dois sítios ativos diferentes da enzima. Inicialmente, o ácido araquidônico catalisa a ciclização e oxidação para formar PGG<sub>2</sub> no sítio cicloxigenase da COX (BURIAN; GEISLINGER, 2005; SMITH; URADE; JAKOBSSON, 2011). O modelo mecanicista, que explica a necessidade do sítio peroxidase para oxidação do heme e para catálise cicloxigenase do ácido araquidônico está exposto na **Figura 5**.

**Figura 5** - Síntese de prostanoides através da ação da COX.

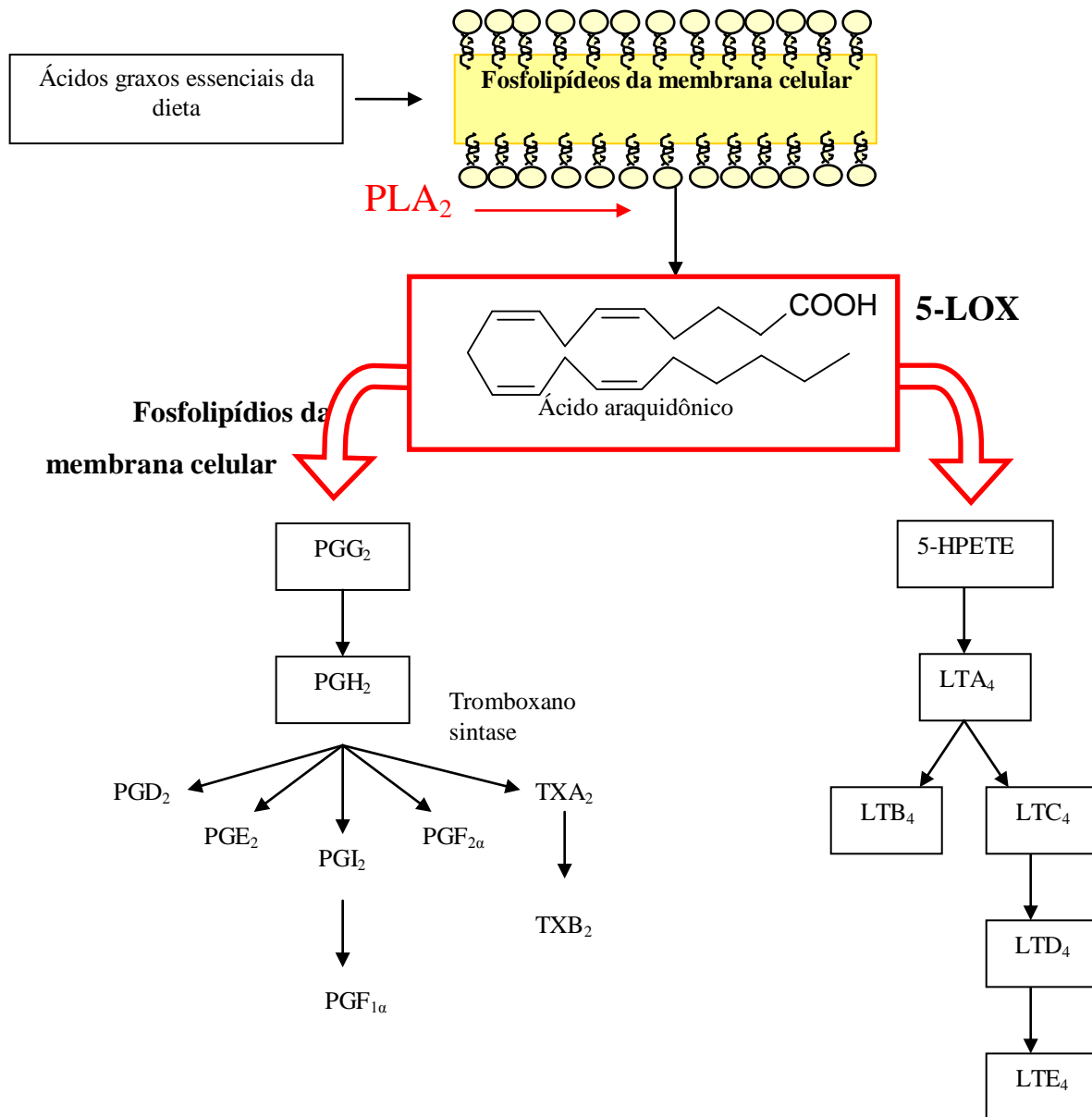


Fonte: Adaptado de ROUZER; MARNETT, 2009; SMITH et al., 2000.

Como mostrado na **Figura 5**, a oxidação do grupo heme no sítio peroxidase, por um hidroperóxido, gera Fe (IV) em um radical oxiferril, uma protoporfirina e um álcool derivado do peróxido oxidante. O radical oxiferril, por sua vez, oxida Tyr385 e cria um radical tirosil no sítio ciclooxigenase da COX, que é responsável pela formação do radical araquidonila que reage com o oxigênio molecular (O<sub>2</sub>). As duas moléculas de atacam os carbonos 9 e 11 do radical araquidonila para a produção de PGG<sub>2</sub>. PGG<sub>2</sub> é posteriormente reduzido a PGH<sub>2</sub> no sítio peroxidase, com a produção de um radical livre intermediário, que rapidamente se converte em um radical hidroxila reativo (•OH) (BINGHAM et al., 2006; BRENHOUSE et al., 2003; BURIAN; GEISSLINGER, 2005; ROUZER; MARNETT, 2009; SALZBERG-SMITH; URADE; JAKOBSSON, 2011).

A PGH<sub>2</sub> serve como substrato comum de sintases específicas para a produção de PGs (PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>), prostacilinas (PGI<sub>2</sub>) e TXs (TXA<sub>2</sub> e TXB<sub>2</sub>) (HÉTU; RIENDEAU, 2005) (**Figura 6**).

**Figura 6** - Biossíntese dos produtos do ácido araquidônico e posterior formação de leucotrienos e prostanoídeos.



Fonte: Adaptado de BINGHAM et. al., 2006; WERZ; STEINHILBER, 2006.

Estas PGs podem sofrer transporte facilitado para fora da célula por transportadores de prostaglandinas (TPG) e outros transportadores e exercer ações autócrinas ou parácrinas sobre uma família de receptores de PG na membrana celular, que foram nomeados DP, EP, FP, IP e TP, respectivamente. Há quatro subtipos do receptor EP (EP<sub>1</sub>, EP<sub>2</sub>, EP<sub>3</sub> e EP<sub>4</sub>), dois subtipos do receptor DP (DP<sub>1</sub> e DP<sub>2</sub>) e cada um dos receptores FP, IP e TP de representam os produtos de genes distintos (BURIAN; GEISSLINGER, 2005; FUJINO; REGAN, 2003; KAWAHARA et al., 2015).



Os receptores de PGs, com exceção do DP<sub>2</sub> que é um receptor quimioatraente, pertencem ao grupo de receptores acoplados à proteína-G. Os receptores IP, DP<sub>1</sub>, EP<sub>2</sub> e EP<sub>4</sub> são acoplados à proteína G<sub>s</sub> e exerce seus efeito através da formação de AMPc como segundo mensageiro. Os receptores EP<sub>1</sub>, FP e TP são acoplados à proteína G<sub>q</sub>, cujas ações são mediadas via elevação do cálcio intracelular. O receptor EP<sub>3</sub> é acoplado à proteína G<sub>i</sub> e diminui a formação de monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) (BURIAN; GEISLINGER, 2005; KAWAHARA et al., 2015).

Existem duas isoformas da COX, a isoforma constitutiva (COX-1) e uma isoforma induzível (COX-2). A COX-1 é constitutivamente expressa na maioria dos tecidos e sintetiza as PGs em níveis baixos e, portanto, presume-se que sua função esteja relacionada principalmente com manutenção das funções fisiológicas (GILROY, 2006; RAJAKARIAR; YAQOUB; SALZBERG-BRENHOUSE et al., 2003; SMITH; URADE; JAKOBSSON, 2011).

Por outro lado, a COX-2 é altamente induzida em resposta a estímulos pró-inflamatórios, citocinas e mitógenos, e sua função tem sido associada à liberação de PGs inflamatórias (RAJAKARIAR; YAQOUB; GILROY, 2006; SMITH; URADE; JAKOBSSON, 2011). No SNC, além dos estímulos inflamatórios, essa enzima também pode ser induzida por glutamato em células gliais e neurônios (SALZBERG-BRENHOUSE et al., 2003). Embora seja normalmente induzida por estímulos pró-inflamatórios, tem sido reportada a expressão de COX-2 constitutiva em alguns tecidos, incluindo cérebro, rins, pulmão, endotélio vascular e órgão do sistema reprodutor (RAJAKARIAR; YAQOUB; GILROY, 2006; SMITH; URADE; JAKOBSSON, 2011).

O aumento resultante na atividade da COX-2 pode contribuir para a neurodegeneração ou para o estresse oxidativo, ou para as ações neurotóxicas de PGs. A expressão aumentada de COX-2 está associada com uma série de doenças neurodegenerativas agudas e crônicas, incluindo convulsões, doença de Alzheimer e doença de Parkinson (SALZBERG-BRENHOUSE et al., 2003; SMITH; URADE; JAKOBSSON, 2011). Embora a indução da COX-2 por estímulos inflamatórios seja o principal responsável pelos altos níveis prostanoídes no local da inflamação, o papel da COX-1 em modular a resposta inflamatória não deve ser menosprezada (BURIAN; GEISLINGER, 2005).

Os prostanoídes são uma família de autacoídes que desempenham múltiplas funções biológicas. A quantidade e variedade de prostanoídes produzidos durante a inflamação, que pode contribuir para a sensibilização periférica, são determinadas pela natureza e pelo estado de ativação das células presentes na lesão inflamatória. Nas áreas de inflamação aguda, PGE<sub>2</sub>

e PGI<sub>2</sub> são produzidas pelos tecidos e vasos sanguíneos locais, enquanto os mastócitos liberam PGD<sub>2</sub>. Na presença de inflamação crônica, as células da série monócito/macrófago também liberam PGE<sub>2</sub> e TXA<sub>2</sub> (BURIAN; GEISLINGER, 2005; HÉTU; RIENDEAU, 2005).

As PGs, principalmente PGE<sub>2</sub> e PGI<sub>2</sub>, são importantes mediadores da dor, febre e inflamação (KIDD; URBAN, 2001; SMITH et al, 2009). A PGE<sub>2</sub>, a PGI<sub>2</sub> e a PGD<sub>2</sub> são poderosos vasodilatadores intrínsecos e atuam de modo sinérgico com outros vasodilatadores inflamatórios, como histamina e bradicinina. Essa ação dilatadora combinada sobre as arteríolas pré-capilares contribui para o eritema e aumento do fluxo sanguíneo observado nas áreas de inflamação aguda. Esses prostanoídes não aumentam diretamente a permeabilidade das vênulas pós-capilares, no entanto potencializam o efeito da histamina e da bradicinina. O TXA<sub>2</sub>, predominante das plaquetas, causa vasoconstrição, broncoconstrição e agregação plaquetária, sendo esta última seu principal efeito (BALLOU et al., 2000; SMITH et al, 2009).

PGE<sub>2</sub> e outras PGs são potentes agentes de sensibilização capazes de modular a via de transdução (efeito estimulante periférico), transmissão (efeito estimulante central) e da informação nociceptiva. O principal mecanismo envolvido na ação de hiperalgesia periférica das PGs é devido ao efeito de sensibilização sobre os nervos aferentes primários. Os efeitos diretos são mediados pela ação das PGs sobre os receptores EP / IP e modulação de canais iônicos em aferentes primários. Os efeitos indiretos são dirigidos no sentido de aumentar a sensibilidade dos neurônios sensoriais aos agentes nocivos, tais como calor e bradicinina, além de contribuir significativamente para a sensibilização periférica mediada por PG (BURIAN; GEISLINGER, 2005; KAWAHARA et al., 2015).

As propriedades de hiperalgesia central de prostanoídes foram estabelecidas principalmente em estudos experimentais com administração intratecal de PGE<sub>1</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>, PGI<sub>2</sub> e TxB<sub>2</sub>, que evocam a hiperalgesia térmica e mecânica e imitam a sensibilização central associada com a inflamação periférica (BURIAN; GEISLINGER, 2005; SMITH et al, 2009).

Há também outra isoforma de COX, uma variante da COX-1, sendo frequentemente denominada como COX-3, estando expressa principalmente no cérebro e está envolvida nos fenômenos de febre e dor na resposta inflamatória (CARNEIRO et al., 2004; CHANDRASEKHARAN et al., 2002; HÉTU; RIENDEAU, 2005; SANTOS et al., 2007).

LTs são mediadores lipídicos bioativos produzidos e liberados por leucócitos ativados, mediando seus efeitos via receptores específicos acoplados à proteína G (WERZ;

STEINHILBER, 2006). Na **Figura 6** está esquematizado o metabolismo do ácido araquidônico para formação de LTs e PGs.

A síntese dos LTs começa com a ação de várias LOXs, que catalisam a incorporação de O<sub>2</sub> ao ácido araquidônico. Essas enzimas são encontradas nos leucócitos, coração, cérebro, pulmão e baço (SILVA et al., 2002). 5-LOX catalisa a conversão de ácido araquidônico em LTA<sub>4</sub> e ácido 5-hidroperoxieicosatetraenoico (5-HPETE). LTA<sub>4</sub> pode então ser convertido em LTB<sub>4</sub> por LTA<sub>4</sub> hidrolase ou em LTC<sub>4</sub> por LTC<sub>4</sub>-sintase (WERZ; STEINHILBER, 2006).

LTB<sub>4</sub> é um potente quimiotático para neutrófilos, eosinófilos e monócitos levando a aderência dos fagócitos às paredes dos vasos, degranulação de neutrófilos e liberação de superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>). LTC<sub>4</sub> e do seu metabolito, LTD<sub>4</sub>, são broncoconstritores potente que o aumentam a permeabilidade vascular e estimulam a secreção de muco das vias aéreas. Essas propriedades biológicas sugerem um papel dos produtos da LOX tanto na inflamação quanto na broncoconstrição induzida por antígeno (SILVA et al., 2002; WERZ; STEINHILBER, 2006).

### **3.9 Fármacos analgésicos e anti-inflamatórios**

#### **3.9.1 Opioides**

Os opioides são os fármacos mais poderosos utilizados para dor aguda e crônica, embora os seus vários efeitos colaterais graves, como depressão respiratória, confusão mental, constipação, tolerância e dependência de capacidade produtiva, bem como a grande variabilidade nas respostas, limitem o seu uso seguro todos os dias (FÜRST, 2008). Opiáceos são substâncias derivadas do ópio e incluem a morfina, a codeína e vários outros semi-sintéticos derivados destas últimas e da tebaína. O termo opioide é mais abrangente e se aplica a todos os agonistas e antagonistas com atividade semelhante à da morfina, incluindo peptídeos opioides naturais e sintéticos (SARAIVA et al., 2004).

Os analgésicos opioides inibem as vias nociceptivas através da ligação com receptores opioides no sistema nervoso, onde modulam a atividade sensitiva, motora e psíquica (BARROS, 2004; JAN, 2010). Os receptores opioides pertencem à superfamília de receptores acoplados à proteína G<sub>i</sub>. Eles são ativados tanto por peptídeos opioides produzidos endogenamente como fármacos opioides administrados exogenamente, a exemplo da morfina. Há pelo menos quatro subtipos de receptores opioides ( $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\kappa$  e  $\nu$ ) e cada um deles apresentam seus ligantes (WALDHOER; BARTLETT; WHISTLER, 2004).

Os analgésicos exógenos apresentam em comum certas características, as quais são: um grupo amino terciário separado de um anel aromático por dois átomos, um átomo de carbono quaternário; e um anel fenílico ou isómero ligado ao átomo de carbono. O grupo farmacofórico N-metil-N-fenilpiperidina é a estrutura responsável pela ação farmacológica desta família de substâncias (FERREIRA; FACCIONE, 2005).

Os opioides são classificados como puros, como por exemplo a morfina e a metadona, ou agonistas parciais, como é caso da buprenorfina e nalbufina. A morfina, um agonista  $\mu$ , é a referência entre os opioides, sendo um agente padrão para o tratamento das dores agudas e crônicas (CARVALHO-JÚNIOR, 2006). Os opioides mais utilizados na prática clínica são os agonistas opioides, como codeína, morfina, metadona, fentanil e oxicodona (LOBO; MARRA; SILVA, 2007). Conforme sua potência analgésica, são utilizados para o tratamento da dor discreta ou moderada (opioídes fracos) ou da dor moderada ou intensa (opioídes fortes) (BARROS, 2004).

### 3.9.2 Anti-inflamatórios não-esteroidais

Os AINEs destacam-se entre os grupos farmacêuticos mais utilizados na prática médica devido a sua eficácia em suprimir dor e inflamação. Apresentam um amplo espectro de indicações terapêuticas, como: analgesia, anti-inflamação, antipirese, profilaxia contra doenças cardiovasculares. Além disso, muitas publicações científicas sugerem que poderiam ser eficazes na prevenção de doenças neurológicas, como Alzheimer, além de constituir-se uma opção terapêutica para casos de câncer (BRUM-JÚNIOR, 2006; ONG et al., 2007).

Os AINEs incluem uma diversidade de agentes que pertencem a diferentes classes químicas, no entanto muitos desses fármacos possuem três principais efeitos: anti-inflamatório, analgésico e antipirético. O mecanismo de ação dos AINEs baseia-se na inibição do sistema enzimático COX, responsável pela síntese dos diferentes tipos de eicosanoides (PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>, PGI<sub>2</sub>, TXA<sub>2</sub>), que são mediadores do processo inflamatório (BRUM-JÚNIOR, 2006; POUNTOS et al., 2011).

O ácido acetilsalicílico, ou aspirina, foi sintetizado por Hoffmann em 1898. Inicialmente, este simples composto químico foi usado como um agente antipirético e anti-inflamatório. Na década de 60 a aspirina emergiu como um potente agente que prolongava o tempo de sangramento e inibia a agregação plaquetária. A aspirina reduz a ativação plaquetária por meio da acetilação irreversível da COX-1, e, portanto, reduz a produção de TXA<sub>2</sub> pelas plaquetas. A inibição da COX-1 é rápida, saturável em baixas doses, irreversível

e permanente por toda a vida da plaqueta (TURNBULL et al., 2006; UNIDAS; BRUMMEL-ZIEDINS; MANN, 2007).

Desde a descoberta do ácido acetilsalicílico, foram desenvolvidos vários AINEs, com estruturas químicas diversas, mas que apresentam propriedades terapêuticas semelhantes. Os AINEs são classificados como tradicionais, os quais inibem não seletivamente ambas as isoenzimas COX-1 e COX-2, e inibidores seletivos de COX-2 (BRUM-JÚNIOR, 2006; CAPONE et al., 2013; ONG et al., 2007).

Embora os AINEs tradicionais sejam bastante efetivos no tratamento da dor e inflamação, o uso crônico de tais medicamentos está associado a lesões do trato gastrointestinal, anormalidade da coagulação e lesão renal (CARVALHO-JÚNIOR, 2006; ONG et al., 2007; POUNTOS et al., 2011). Com isso, os inibidores seletivos para COX-2 foram desenvolvidos para amenizar as complicações gastrointestinais dos AINEs tradicionais. A descoberta de inibidores da isoforma COX-2 levou a obtenção da segunda geração de AINEs, como celecoxibe, rofecoxibe, lumiracoxibe, entre outros. Entretanto, o rofecoxibe foi retirado do mercado em 2004 devido à constatação de efeitos cardiovasculares decorrentes, em parte, da inibição da isoforma COX-2 presente no endotélio vascular, levando a um desequilíbrio do processo homeostático entre a produção de prostaciclina no endotélio vascular e TXA<sub>2</sub> nas plaquetas (GROSSER; FRIES; FITZGERALD, 2006; POUNTOS et al., 2011; SANTOS et al., 2007).

Há ainda os analgésicos da classe da acetanilidas, cujo representante principal é o paracetamol, que apesar de serem classificados como AINEs, não reduzem inflamação, apresentando apenas efeitos analgésicos e antipiréticos. O mecanismo de ação do paracetamol está correlacionado com a inibição da COX-3 (AYOUB et al., 2004).

### 3.9.3 Anti-inflamatórios esteroidais

Os glicocorticoides são hormônios esteroides, sintetizados no córtex da glândula adrenal, que afetam o metabolismo dos carboidratos e reduzem a resposta inflamatória. A sua síntese e liberação ocorrem naturalmente pelo organismo, de acordo com sua necessidade, sob influência do hormônio adrenocorticotrófico (ACTH). A estrutura química desses compostos possui o núcleo básico ciclopentanoperidrofenantreno. Os glicocorticoides sintéticos, desenvolvidos pela indústria farmacêutica, são muito semelhantes aos naturais, caso considerada a sua estrutura química (BAVARESCO; BERNARDI; BATTASTINI, 2005).

Os corticosteroides constituem a terapia anti-inflamatória mais eficaz para muitas doenças inflamatórias crônicas, como asma. Os corticoides têm sido considerados como agentes inibidores da produção de PGs, pela ação inibitória que exercem sobre a PLA<sub>2</sub>, por meio da liberação de lipocortina-1, que é um mediador proteico anti-inflamatório. O resultado final da ação destes anti-inflamatórios é a parcial ou total redução da liberação dos mediadores pró-inflamatórios. A lipocortina-1 atua sequestrando o substrato fosfolipídico, além de inibir diretamente a PLA<sub>2</sub>. Os glicocorticoides exógenos inibem também a expressão da COX-2, reduzindo a geração de prostanoídes nas células inflamatórias, porém exercem pouco ou nenhum efeito sobre a enzima constitutiva COX-1 (BARNES, 2006; ONG et al., 2007).

### **3.10 Considerações sobre a atividade antioxidante, antinociceptiva e anti-inflamatória dos flavonoides**

Os fatores que limitam o uso dos AINEs, bem como o dos analgésicos opioides e corticosteroides justificam as pesquisas voltadas para a descoberta de fármacos tão eficazes quanto estes consagrados analgésicos e anti-inflamatórios, porém mais seguros no que se refere aos efeitos adversos prejudiciais, para serem utilizados no tratamento da dor e inflamação.

Desta forma, no que se refere à atividade anti-inflamatória, os flavonoides atuam modulando células envolvidas com a inflamação (por exemplo, inibindo a proliferação de linfócitos T), inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (por exemplo, TNF- $\alpha$  e IL-1), modulando a atividade das enzimas da via do ácido araquidônico, tais como PLA<sub>2</sub>, COX e LOX, além de modularem sintetase de óxido nítrico induzida (iNOS) (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009).

Muitos dos efeitos anti-inflamatórios e cardiovasculares, propostos por flavonoides e compostos fenólicos, interferem no metabolismo final do araquidonato, visto que são capazes de inibir os sistemas de enzimas, incluindo PLA<sub>2</sub>, COX e 5-LOX (CAMARGO, 2007; RATHEE et al., 2009; SILVA et al., 2002). Em relação à atividade inibitória da enzima PLA<sub>2</sub>, além de quercetina e kaempferol, destacam-se também miricetina e as flavanonas hesperetina e naringenina. Alguns flavonoides são conhecidos pela inibição da enzima LOX, tais como os flavonóis morina e miricetina, e outros pela inibição da enzima COX, tais como as flavonas crisina, apigenina, luteolina e os flavonóis morina, rutina e galangina. Outros, como quercetina e kaempferol apresentam significativa ação anti-inflamatória, que pode ser

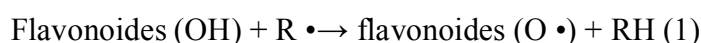
atribuída à inibição de ambas as enzimas LOX e COX (COUTINHO; MUZITANO; COSTA, 2009; ROUZER; MARNETT, 2009).

Além de inibir diretamente a síntese de eicosanoides por meio da inibição da atividade das enzimas LOX e COX, os flavonoides inibem indiretamente estas enzimas pela inibição da peroxidação não enzimática de ácidos graxos poliinsaturados, que também atuam na ativação dessas oxigenases (SILVA et al., 2002).

Sabe-se que durante a catálise do ácido araquidônico, é necessária a oxidação do grupo heme pelo sítio peroxidase, originando a formação de hidroperóxido, radical oxiferrila e, subsequente geração de radical tirosila no sítio ciclooxigenase da COX, que é responsável pela formação do radical araquidonila, o qual reage com o O<sub>2</sub> para a produção de PGG<sub>2</sub>. Posteriormente, PGG<sub>2</sub> é reduzida à PGH<sub>2</sub> no sítio peroxidase, com a produção de um intermediário de radicais livres que rapidamente se converte em um radical •OH (BINGHAM et al., 2006; HÉTU; RIENDEAU, 2005; SALZBERG-BRENHOUSE et al., 2003). Flavonoides podem atuar sequestrando radicais livres, inibindo assim de forma indireta a ação da COX. Além disso, flavonoides também são conhecidos por quelar o ferro, eliminando assim um fator causal para a produção de radicais livres (NIJVELDT, 2001).

A maior parte dos estudos envolvendo flavonoides se concentra em suas propriedades bioquímicas e fisiológicas relacionadas ao potencial antioxidante na proteção dos sistemas biológicos durante estresse oxidativo. A atividade antioxidante dos flavonoides depende da propriedade redox de seus grupos hidroxifenólicos e da relação estrutural entre as diferentes partes da estrutura química (PIMENTEL, 2006).

Tem sido proposto que flavonoides interrompem a reação em cadeia dos radicais livres, doando átomos de hidrogênio ao radical peroxila, formando um radical de flavonoide. O radical flavonoide, então, reage com o radical livre, terminando, assim, a propagação da reação em cadeia (SILVA et al., 2002). Em outras palavras, os flavonoides estabilizam as EROs pela reação com o radical. Devido à alta reatividade do grupo hidroxila dos flavonoides, os radicais são inativados, de acordo com a seguinte equação (NIJVELDT, 2001; RATHEE et al., 2009):



onde R é um radical livre e O • é um radical livre de oxigênio

Além disso, os altos níveis de NO (produzidos pela ação de iNOS) reage com os radicais livres, produzindo o peroxinitrito, altamente prejudicial porque pode oxidar

diretamente LDLs, resultando em dano irreversível à membrana celular. Quando flavonoides são utilizados como antioxidantes, os radicais livres são sequestrados e, portanto, não pode mais reagir com o NO resultando em menos danos (NIJVELDT, 2001; RATHEE et al., 2009).

O desequilíbrio na síntese de LTs e de PGs pode resultar em respostas inflamatórias como distúrbios respiratórios, doenças cardiovasculares e renais, respectivamente. Com isso, torna-se de grande importância o estudo do efeito farmacológico de compostos naturais, como flavonoides, com o objetivo de desenvolver novos fármacos para o tratamento dessas patologias, uma vez que várias pesquisas têm demonstrado que tais compostos apresentam atividade anti-inflamatória (RATHEE et al., 2009; SILVA et al., 2002).



## 1 ARTIGO 1

Natural Product Research, 2014  
<http://dx.doi.org/10.1080/14786419.2013.867444>



### SHORT COMMUNICATION

#### Antinociceptive and anti-inflammatory effects of flavonoids PMT1 and PMT2 isolated from *Piper montealegreanum* Yuncker (Piperaceae) in mice

Aline Cavalcanti de Queiroz<sup>a</sup>, Harley da Silva Alves<sup>b</sup>, Luiz Henrique Agra Cavalcante-Silva<sup>a</sup>, Thays de Lima Matos Freire Dias<sup>a</sup>, Mariana da Silva Santos<sup>a</sup>, Gabriela Muniz de Albuquerque Melo<sup>a</sup>, Eliane Aparecida Campesatto<sup>a</sup>, Maria Célia de Oliveira Chaves<sup>c</sup> and Magna Suzana Alexandre-Moreira<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Laboratório de Farmacologia e Imunidade, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, Av. Lourival Melo Mota, s/n, Cidade Universitária, Maceió, AL, CEP: 57072-900 Brazil; <sup>b</sup>Departamento de Farmácia, Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, PB, Brazil; <sup>c</sup>Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, PB, Brazil

(Received 21 July 2013; final version received 8 November 2013)

In this study, we identified the antinociceptive and anti-inflammatory effects of two flavonoids (PMT1 and PMT2) from *Piper montealegreanum*. The antinociceptive effect was evaluated using the classical tests: acetic acid-induced writhing, formalin and hot plate test. PMT1 and PMT2 (0.1, 1, 30 and 100  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.) reduced the writhings, with an  $\text{ID}_{50}$  of 0.58 and 0.44  $\mu\text{mol/kg}$ , respectively. Moreover, these flavonoids (100  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.) inhibited paw-licking time in the neurogenic phase of the formalin test, but only PMT2 was active in the inflammatory phase. However, PMT1 and PMT2 (100  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.) did not increase the latency time of the animals in the hot plate. In order to evaluate the anti-inflammatory effect of these flavonoids, capsaicin-induced ear oedema was carried out. Both flavonoids (100  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.) were active in this model. These results suggest that PMT1 and PMT2 have antinociceptive and anti-inflammatory activities.

**Keywords:** *Piper montealegreanum*; antinociceptive; anti-inflammatory; flavonoids

#### 1. Introduction

The family Piperaceae is composed of four major genera and nearly 4000 species which are distributed in tropical and subtropical regions in the world (Regasini et al. 2008). *Piper montealegreanum* Yuncker (Piperaceae) is a shrub from the Amazon region (Alves et al. 2011). From this plant, two flavonoids were isolated: (*S*)-8-formyl-3',5-dihydroxy-7-methoxy-6-methyl-flavanone (PMT1) and 3'-formyl-3,4',6'-trihydroxy-2'-methoxy-5'-methylchalcone (PMT2) (Figure 1). Few studies have been conducted with these flavonoids. Pinto et al. (2012) demonstrated that PMT1 and PMT2 have antibacterial activity against *Pseudomonas aeruginosa* resistant to ampicillin. Since flavonoids are compounds with antinociceptive and anti-inflammatory effects (Aquino et al. 2013), the aim of this study was to evaluate the antinociceptive and anti-inflammatory activities of these compounds in murine models.

#### 2. Results and discussion

Different animal models were used to investigate the potential antinociceptive and anti-inflammatory effects of the flavonoids PMT1 and PMT2 from *P. montealegreanum*.

---

\*Corresponding author. Email: [suzana.magna@gmail.com](mailto:suzana.magna@gmail.com); [magnasuzana@pq.cnpq.br](mailto:magnasuzana@pq.cnpq.br)

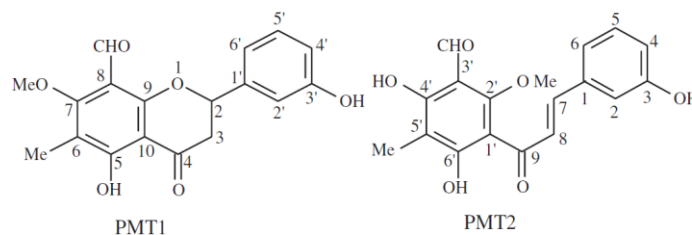


Figure 1. Chemical structures of PMT1 and PMT2 (Alves et al. 2011).

The abdominal constriction response induced by acetic acid is widely used for peripheral antinociceptive screening (Le Bars et al. 2001). The results presented in Figure 2 show that PMT1 and PMT2 (0.1, 1, 30 and 100  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.) produced a dose-related inhibition of acetic acid-induced abdominal constrictions in mice, with  $\text{ID}_{50}$  values of 0.58  $\mu\text{mol/kg}$  ( $E_{\text{max}} = 80.6\%$ ) and 0.44  $\mu\text{mol/kg}$  ( $E_{\text{max}} = 77.6\%$ ), respectively. For a comparison, the  $\text{IC}_{50}$  of dipyrone was calculated in 32.4  $\mu\text{mol/kg}$  ( $E_{\text{max}} = 87.8\%$ ). The values of  $\text{ID}_{50}$  showed that the two flavonoids were more potent than dipyrone. It has been reported that other flavonoids are able to decrease the nociception induced by acetic acid (Silva et al. 2013). Also, Meotti et al. (2006) demonstrated that the flavonoid myricitrin, given by i.p. route, inhibits the acetic acid-induced abdominal constrictions similarly to PMT1 and PMT2.

In order to evaluate a possible central antinociceptive effect of PMT1 and PMT2, hot plate test was carried out. This assay is commonly used to assess narcotic analgesics; however, other centrally acting drugs, including sedatives and muscle relaxants, have shown activity in this test (Le Bars et al. 2001). The treatment of animals with PMT1 and PMT2 (100  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.) did not induce any significant increase in baseline (data not shown), suggesting that these flavonoids do not modulate the supraspinal response. In a similar way, Queiroz et al. (2010) also assessed the central effect of another flavonoid (galetin 3,6-dimethyl ether) using hot plate test and found results similar to those obtained in this study.

Continuing the study, formalin test was carried out. Subcutaneous formalin injection into the mice hind paw produces a biphasic pain response: the neurogenic phase, which usually lasts < 5 min, which is due to the acute stimulation of nociceptors (Le Bars et al. 2001); the inflammatory phase is associated with plasma extravasation and is thought to involve the release of inflammatory mediators (Negus et al. 2006). In this test, PMT1 and PMT2 (100  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.) inhibited the neurogenic phase by 29.9% and 46.4%, respectively. However, it was observed that only PMT2 caused a significant inhibition of inflammatory phase by 83.65% (Figure 3). The fact that PMT1 acts only in neurogenic phase may be related to the antagonism of the substance P receptor (i.e. NK1 receptors) involved in this phase and writhing test (Santos & Calixto 1997), without acting on inflammatory mediators of second phase unlike PMT2.

Capsaicin-induced ear oedema is a classic model used to evaluate the anti-inflammatory activities of compounds. Capsaicin (8-methyl-*N*-vanillyl-6-nonenamide), the pungent component of red peppers in the genus *Capsicum*, is a pharmacological tool used to evoke neurogenic acute inflammatory responses such as axon reflex vasodilatation, plasma extravasation, coughing and painful sensitisation (Inoue et al. 1993). In this test, the inflammation was significantly reduced by pre-treatment with PMT1 and PMT2, which show an

Compound	$\text{ID}_{50}$ ( $\mu\text{mol/kg}$ )	$E_{\text{max}}$ (%)
PMT1	0.6	80.6%
PMT2	0.4	77.6%
Dipyrone	32.4	87.8%

Figure 2.  $\text{ID}_{50}$  and maximum effect values of PMT1 and PMT2 in acetic acid-induced writhing test in mice.

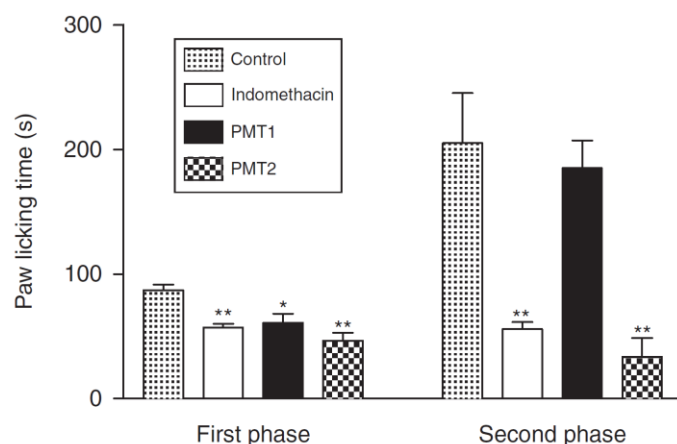


Figure 3. Effect of PMT1 and PMT2 in formalin-induced nociception (100  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.) in mice. The columns and bars represent means  $\pm$  SEM, respectively. Statistical differences between the treated and the control groups were evaluated by ANOVA followed by Dunnett's post-tests. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$ .

inhibition by 44.6% and 57.9%, respectively (Figure 4). The results demonstrate that PMT1 and PMT2 reduced significantly the ear oedema induced by capsaicin, showing that these flavonoids have anti-inflammatory effect. This result is in agreement with Aquino et al. (2013) who assessed the antinociceptive effect of another flavonoid (3,5,7,4'-tetrahydroxy-3'-methoxyflavone, namely isorhamnetin) under the same experimental conditions.

Based on the structure activity relationships of flavonoids to anti-inflammatory activity, Gautam and Jachak (2009) observed that both flavonoids PMT1 and PMT2 possess one hydroxyl group in B-ring. PMT2, which showed higher anti-inflammatory activity than PMT1 and was active in the second phase of formalin test, presented double bond between C7 and C8, beyond having OH at 4'- and 6'-position of A-ring. Moreover, the characteristic saturated heterocyclic C ring of PMT1 led to consequent lack of conjugation between A and B rings, and this torsion angle of the B ring with respect to the rest of the molecule strongly influences free radical scavenging ability of flavonoid (Vaya et al. 2003). Finally, chalcones as PMT2 also possess conjugated double bonds and a completely delocalised  $\pi$ -electron system on both benzene rings.

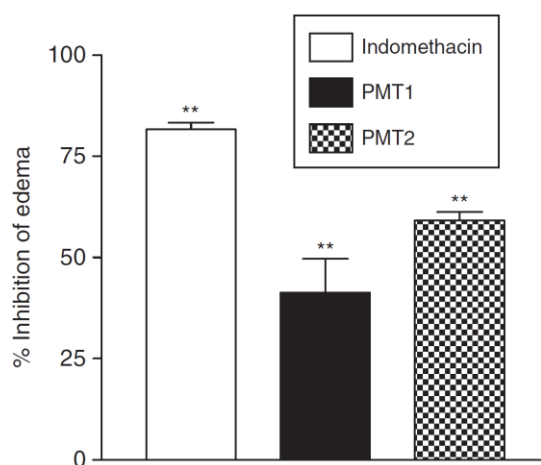


Figure 4. Effect of PMT1 and PMT2 in capsaicin-induced ear oedema (100  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.) in mice. The columns and bars represent means  $\pm$  SEM, respectively. Statistical differences between the treated and control groups were evaluated by ANOVA followed by Dunnett's post-tests. \*\* $p < 0.01$ .



Molecules possessing such a system have relatively low redox potentials and have a greater probability of undergoing electron transfer reactions (Yadav et al. 2011).

### 3. Conclusions

In summary, PMT1 and PMT2 showed considerable peripheral antinociceptive and anti-inflammatory activities. Thus, these flavonoids might be of interest in the development of new analgesic/anti-inflammatory drugs. However, more studies are needed to characterise and identify the molecular target responsible for these effects.

### Supplementary material

Supplementary details relating to this article are available online.

### Acknowledgements

The authors are grateful to the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) and the Ministry of Science and Technology (MCT) from Brazil for the joint funding of this research project. The authors wish to thank the Emilio Goeldi Museum for the plant material.

### References

- Alves HS, Souza MFV, Chaves MCO. 2011. Three new compounds from *Piper montealegreanum* Yuncker (Piperaceae). *J Braz Chem Soc.* 22:1610–1615.
- Aquino AB, Cavalcante-Silva LHA, Matta CBB, Epifânio WAN, Aquino PGV, Santana AEG, Alexandre-Moreira MS, Araújo-Júnior. 2013. The antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Aspidosperma tomentosum* (Apocynaceae). *Sci World J.* 2013:1–8.
- Gautam R, Jachak SM. 2009. Recent developments in anti-inflammatory natural products. *Med Res Rev.* 29:767–820.
- Inoue H, Nagata N, Koshihara Y. 1993. Profile of capsaicin-induced mouse ear oedema as neurogenic inflammatory model: comparison with arachidonic acid-induced ear oedema. *Br J Pharmacol.* 110:1614–1620.
- Le Bars D, Gozariu M, Cadden S. 2001. Animal models of nociception. *Pharmacol Rev.* 53:597–652.
- Meotti FC, Luiz AP, Pizzolatti MG, Kassuya CAL, Calixto JB, Santos ARS. 2006. Analysis of the antinociceptive effect of the flavonoid myricitrin: evidence for a role of the L-arginine-nitric oxide and protein kinase C pathways. *J Pharmacol Exp Ther.* 316:789–796.
- Negus SS, Vanderah TW, Brandt MR, Bilsky EJ, Becerra L, Borsook D. 2006. Preclinical assessment of candidate analgesic drugs: recent advances and future challenges. *J Pharmacol Exp Ther.* 319:507–514.
- Pinto DS, Duarte FM, Costa JIV, Almeida-Filho GG, Alves HS, Chaves MCO, Pessoa HLF. 2012. Antibacterial and hemolytic activities from *Piper montealegreanum* Yuncker (Piperaceae). *Antiinfect Agents Med Chem.* 10:1–5.
- Queiroz AC, Lira DP, Dias TLMF, Souza ET, Matta CBB, Aquino AB, Cavalcante-Silva LHA, Silva DJC, Mella EAC, Agra MF, et al. 2010. The antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Piptadenia stipulacea* Benth. (Fabaceae). *J Ethnopharmacol.* 128:377–383.
- Regasini LO, Cotinguiba F, Siqueira JR, Bolzani VS, Silva DHS, Furlan M, Kato MJ. 2008. Radical scavenging capacity of *Piper arboretum* and *Piper tuberculatum* (Piperaceae). *Lat Am J Pharm.* 27:900–903.
- Santos ARS, Calixto JB. 1997. Further evidence for the involvement of tachykinin receptor subtypes in formalin and capsaicin models of pain in mice. *Neuropeptides.* 31:381–389.
- Silva AD, Cavalcante-Silva LHA, Matta CBB, Silva DF, Araújo MV, Tavares JF, Silva MS, Alexandre-Moreira MS. 2013. Antinociceptive effect of 7-methoxyflavone isolated from *Zornia brasiliensis*. *Nat Prod Res.* 27:1–5.
- Vaya J, Mahmood S, Goldblum A, Aviram M, Volkova N, Shaalan A, Musa R, Tamir S. 2003. Inhibition of LDL oxidation by flavonoids in relation to their structure and calculated enthalpy. *Phytochemistry.* 62:89–99.
- Yadav VR, Prasad S, Sung B, Aggarwal BB. 2011. The role of chalcones in suppression of NF-κB-mediated inflammation and cancer. *Int Immunopharmacol.* 11:295–309.

## 2 ARTIGO 2

Sociobiology 61(4): 560-565 (December 2014)

DOI: 10.13102/sociobiology.v61i4.560-565



# Sociobiology

An international journal on social insects

## RESEARCH ARTICLE - BEES

## Chemical composition, antinociceptive and free radical-scavenging activities of geopropolis from *Melipona subnitida* Ducke (Hymenoptera: Apidae: Meliponini)

SA SOUZA<sup>1</sup>, TLMF DIAS<sup>2</sup>, TMG SILVA<sup>1</sup>, RA FALCÃO<sup>1</sup>, MS ALEXANDRE-MOREIRA<sup>2</sup>, EMS SILVA<sup>3</sup>, CA CAMARA<sup>1</sup>, TMS SILVA<sup>1</sup>

1- Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE, Brazil

2- Universidade Federal de Alagoas, Maceió, AL, Brazil

3- Universidade Federal do Vale de São Francisco, Petrolina, PE, Brazil

**Article History****Edited by**

Denise Araujo Alves, ESALQ-USP, Brazil  
 Received 23 September 2014  
 Initial acceptance 01 November 2014  
 Final acceptance 08 December 2014

**Keywords**

Stingless bees, phenolic, antioxidant.

**Corresponding author**

Tania Maria Sarmento Silva  
 Biofito - Depto. de Ciências Moleculares  
 Universidade Federal Rural de Pernambuco  
 Rua Dom Manoel de Medeiros, s/n, Dois  
 Irmãos, Recife, 52171-900, PE, Brazil  
 E-Mail: sarmentosilva@gmail.com

**Abstract**

Like many stingless bee species, *Melipona subnitida* Ducke uses geopropolis (a mixture of wax, plant resins, pollen grains and mud) for sealing small crevices in their nest cavities, in order to avoid the entry of air, and for defense against pathogenic microorganisms. The aim of this study was to evaluate the antinociceptive and free radical-scavenging activities of ethanolic extracts of six geopropolis samples from *M. subnitida* and the phenolic fractions obtained by C18-SPE extraction. The *in vivo* antinociceptive activity was analyzed on abdominal constriction induced by acetic acid in mice and *in vitro* free radical-scavenging activities by DPPH and ABTS assays. Additionally we analyzed the chemical composition of the phenolic fractions by HPLC-DAD. The six samples of geopropolis showed variations in the total phenolic content over the period, but not in the chemical profile observed by HPLC-DAD. Geopropolis is a rich source of bioactive compounds as phenolics 6-*O*-*p*-coumaroyl-*D*-galactopyranose, 6-*O*-cinnamoyl-1-*O*-*p*-coumaroyl- $\beta$ -*D*-glucopyranose, 7-*O*-methyl naringenin, 7-*O*-methyl aromadendrin, 7,4'-di-*O*-methyl aromadendrin, 4'-*O*-methyl kaempferol, 3-*O*-methyl quercetin, 5-*O*-methyl aromadendrin and 5-*O*-methyl kaempferol with potential antioxidant and antinociceptive activities. The antioxidant activity is related to the total phenolic content.

**Introduction**

Many stingless bee species (Meliponini) store in their nests a large amount of geopropolis, a mixture of wax, plant resins, pollen grains and mud (Nogueira-Neto, 1997). The bees use this material for sealing small crevices in their nest cavities, in order to avoid the entry of air, and for defense against pathogenic microorganisms (Simone-Finstrom & Spivak, 2010). However, despite its popular use in folk medicine, very little is known about its chemical composition and biological activity.

Recently, studies investigating geopropolis from native bees have indicated a potential for bioactive compounds and biological activities. Velikova et al. (2000) analyzed 21 samples of Brazilian geopropolis from 12 different species of stingless bees and observed the presence of compounds such as di- and triterpenes and gallic acid. The same samples showed activity against *Staphylococcus aureus* Rosenbach and cytotoxic activity.

Samples of *Melipona fasciculata* Smith geopropolis showed activity against *Streptococcus mutans* Clarke (Liberio et al., 2011) and antioxidant capacity (Dutra et al., 2014) and eleven compounds were tentatively identified as belonging to the classes of phenolic acids and hydrolysable tannins (gallotannins and ellagitannins). These compounds were responsible for the antioxidant activity and high phenolic content of the geopropolis produced by *M. fasciculata* (Dutra et al., 2014). Geopropolis produced by *Melipona scutellaris* Latreille has been shown to exhibit antimicrobial and antioxidant activities and has anti-inflammatory, antinociceptive and antiproliferative properties (Franchin et al., 2012; Cunha et al., 2013), and benzophenones have been identified as the major compounds (Cunha et al., 2013).

Previous investigations in our laboratory have found that the geopropolis from *Melipona subnitida* Ducke has antioxidant activity. This study led to the isolation and characterization of two phenylpropanoids, one of which was a new compound, and



seven flavonoids (Souza et al., 2013). These findings suggested that *M. subnitida* geopropolis is highly bioactive and deserved further study to identify other potential biological activities. Thus, the aim of this study was to evaluate the antinociceptive and free radical-scavenging activities of ethanolic extracts of six geopropolis samples from *M. subnitida* and its phenolic fractions. Additionally, we analyzed the chemical composition of the phenolic fractions obtained by C18-SPE extraction by HPLC-DAD.

## Materials and methods

### *Geopropolis samples and fractionation*

For this study, six samples of geopropolis from four *M. subnitida* nests were collected in March 2010 (1), July 2011 (2), January 2012 (3), April 2012 (4), June 2012 (5) and July 2012 (6) at Sítio Riacho Vieirópolis (a semi-arid region), Paraíba State, Brazil. Each sample (200 g) was extracted with 100 mL of ethanol (EtOH) in an ultrasonic water bath. The combined ethanolic extracts were completely evaporated under reduced pressure to a brown residue (2.7 g to 18.4 g). The EtOH extract (100 mg) was dissolved in 2 mL of distilled water, and the solution was adjusted to pH 2.0 by adding concentrated HCl while stirring with a magnetic stirrer at room temperature for 10 min. A C18 cartridge (SPE Strata 1 g, Phenomenex) was sequentially conditioned with 3 mL of MeOH and 6 mL of distilled deionized water without allowing the cartridge to dry. The samples of geopropolis were passed through the cartridge and rinsed with 6 mL of water and the phenolic compounds were eluted with 8 mL of HPLC-grade methanol. The eluate was dried under reduced pressure in a rotatory evaporator at 40 °C to yield 32 to 57 mg of phenolic fraction. These fractions were dissolved in methanol, filtered through a 0.45- $\mu$ m nylon syringe filter (Whatman) and injected into the HPLC system. The phenolic samples were reconstituted with Tween® 80 and carboxymethylcellulose and also to evaluation for their antinociceptive and antioxidant activities.

### *Reagents and standards*

All reagents used were of analytical grade. Folin-Ciocalteu's phenol reagent, DPPH (1,1-diphenyl-2-picryl hydrazyl), potassium persulfate and Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) were supplied by Acros Organics (Belgium). ABTS (2,2-azinobis 3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) was purchased from Fluka Chemie GmbH (Switzerland). Ascorbic acid was from Vetec (Brazil). Formic acid (Merck) and methanol (Tedia) were of analytical grade. Dipirone, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium (MTT), gallic acid, carboxymethylcellulose-CMC (Sigma); tween® 80 (Sigma-Aldrich, USA) and dimethyl sulfoxide (DMSO) were purchased from Sigma-Aldrich (USA). The compounds 6-*O-p*-coumaroyl-*D*-galactopyranose (1), 6-*O*-cinnamoyl-1-*O-p*-coumaroyl- $\beta$ -*D*-glucopyranose (2), 7-*O*-methyl naringenin (3), 7-*O*-methyl aromadendrin (4), 7,4'-*di-O*-methyl aromadendrin

(5), 4'-*O*-methyl kaempferol (6), 3-*O*-methyl quercetin (7), 5-*O*-methyl aromadendrin (8) and 5-*O*-methyl kaempferol (9) had been previously isolated and identified from *M. subnitida* geopropolis (Souza et al., 2013).

### *HPLC analysis of the phenolic*

All chromatographic analyses were performed using a Shimadzu Prominence LC-20AT equipped with a SPD-M20A diode array detector (Shimadzu Corp. Kyoto, Japan). The samples (20  $\mu$ L) were injected into a Rheodyne 7125i injector with a 20  $\mu$ L loop. The column heater was set at 40 °C. The chromatographic separation was performed with a Luna Phenomenex C-18 column (250 mm x 4.6 mm x 5  $\mu$ m). The compounds were separated using a mobile phase consisting of 1% aqueous formic acid (A) and methanol (B) at a flow rate of 1 mL/min. The mobile phase was delivered using the following solvent gradient: 0-10 min, 20-25% B; 10-20 min, 25-60% B; 20-30 min, 60-70% B; 30-35 min, 70-100% B. The injection volume was 20  $\mu$ L. Chromatograms were recorded at 290 nm and 340 nm. The identification of the compounds was based on their retention times and UV spectra with authentic markers.

### *Animals*

Male and female Swiss mice weighing 20-25 g were used and given access to water and food *ad libitum*. We used six mice per experimental group. The animals were housed at a temperature of 25-28°C with a 12 h light/12 h dark cycle. The procedures described were reviewed and approved by the local Animal Ethics Committee (CEUA UFAL process number 23065.004873/2011-01).

### *Determination of the total phenolic content*

The total phenolic content of the samples was determined with the Folin Ciocalteu reagent, according to the method of Slinkard and Singleton (1977), modified by using gallic acid as a standard phenolic compound. EtOH extracts (100  $\mu$ L) and phenolic fractions (1 mg/ml) were transferred to an Eppendorf tube with 1 mL of Folin Ciocalteu reagent (20  $\mu$ L), 820  $\mu$ L of distilled water were added and the contents of the flask were mixed thoroughly. After 1 min, 60  $\mu$ L of sodium carbonate (15%) was added and then the mixture was allowed to stand for 2 h. The absorbance was measured at 760 nm with an automatic Biochrom Asys UVM 340 microplate reader (Cambridge, UK). The amount of total phenolic compounds was determined in micrograms of gallic acid equivalents using the equation obtained from the standard gallic acid graph.

### *DPPH• radical scavenging assay*

The free radical-scavenging activity was determined using the DPPH assay, as described previously (Silva et al., 2006) with

modifications. The antiradical activity was evaluated using a dilution series to obtain five concentrations (1.0 to 80.0 µg/mL). This process involved mixing the DPPH solution (23.6 µg/mL in EtOH) with the appropriate EtOH extracts and phenolic fractions followed by homogenization. After 30 min, the remaining DPPH radicals were quantified by measuring the absorption at 517 nm with an automatic Biochrom Asys UVM 340 microplate reader (Cambridge, UK). The percentage of inhibition was given by the formula: percent inhibition (%) = [(A0 - A1)/A0] x 100, where A0 was the absorbance of the control solution and A1 was the absorbance in the presence of the sample and standards.

#### *ABTS<sup>•+</sup> radical cation decolorization assay*

The radical cation decolorization assay was based on the method described by Re et al. (1999) with modifications. ABTS was dissolved in water to yield a final concentration of 7 mM. The ABTS radical cation (ABTS<sup>•+</sup>) was produced by reacting the ABTS stock solution with 2.45 mM of potassium persulfate (final concentration) and allowing the mixture to stand in the dark at room temperature for 16 h before use. The ABTS<sup>•+</sup> solution was diluted to give an absorbance of 0.70 ± 0.05 at 734 nm with ethanol before use. Then, appropriate amounts of the ABTS<sup>•+</sup> solution were added into 0.5 mL of the sample solutions in ethanol at five concentrations (1-40 µg/mL). After 10 min, the percentage inhibition of the absorbance at 734 nm was calculated for each concentration with an automatic Biochrom Asys UVM 340 microplate reader (Cambridge, UK), relative to the blank absorbance (EtOH). The capability to scavenge the ABTS<sup>•+</sup> radical was calculated using the following equation: ABTS<sup>•+</sup> scavenging effect (%) = [(A0-A1)/A0] x 100, where A0 was the initial concentration of the ABTS<sup>•+</sup> and A1 was absorbance of the remaining concentration of ABTS<sup>•+</sup> in the presence of sample.

#### *Evaluation of activity ethanol extracts and fractions of geopropolis on abdominal constriction responses caused by acetic acid*

Abdominal constrictions (writhes) were induced by the i.p. injection of acetic acid (1.2%) and carried out according to the procedure described previously (Koster et al., 1959; Collier et al., 1968; Fontenele et al., 1996). Mice were treated with EtOH extracts and phenolic fractions (100 mg/kg, i.p.) or Dypirone (10 mg/kg, i.p.) 40 minutes before initiating nociceptive stimulus. Dypirone was used as a positive control and the vehicle (CMC/Tween® 80) (10 mL/kg, i.p.) was used as the negative control (the animals without treatment). The total numbers of writhes, which consisted of constriction of the flank muscles associated with inward movements of the hind limb or with whole body stretching, were counted cumulatively over a 20 min period. The antinociceptive activity was determined as the difference in number of writhes between the control group and the treated group.

#### *Statistical analysis*

All analyses were performed in triplicate. The results were expressed as the standard error of the mean (mean ± S.E.M.) and were analyzed using GraphPad Prism 5.0 program (DEMO). Comparisons between groups were made using analyses of variance (ANOVA) followed by Tukey's test. Significance was indicated by a *p* value ≤ 0.05. Pearson's correlation test was used to evaluate the correlations.

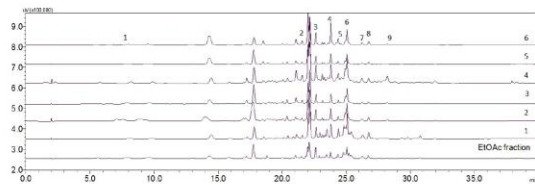
#### **Results and Discussion**

The aim of this study was to evaluate the antinociceptive activity of six samples of *M. subnitida* geopropolis collected over three years. EtOH extracts and the phenolic fractions were evaluated in a model of nociception, and the free radical-scavenging activity was evaluated using the DPPH and ABTS assays. The total phenolic content was determined by the Folin Ciocalteu reagent. In addition, chromatographic profiles were analyzed by HPLC-DAD, and the principal phenolics present in the geopropolis samples were identified.

This study was conducted by an extraction of phenolics using a C18-SPE cartridge as a simpler, less expensive and faster technique compared with the use of liquid-liquid solvent extraction. This technique has been used to determine flavonoid markers in honey (Hadjmohammadi et al., 2009). Interestingly, there is a correlation (*r*=0.85, *p*<0.05) between the total phenolic content present in the ethanolic extract and the amount of phenolics extracted by C18-SPE. These samples showed a total phenolic content two times higher when compared with the EtOAc fraction (which is rich in phenolic compounds) obtained by the liquid-liquid extraction of a sample of *M. scutellaris* geopropolis collected in January 2010 (Souza et al., 2013). The phenolic profiles of samples 1-6 also were analyzed by HPLC-DAD. The characterization of these compounds is important because they are associated with a variety of health benefits. The comparative analysis of the chromatograms (Fig 1) shows a similar profile between the six samples obtained by the SPE and the EtOAc fraction (Souza et al., 2013) of geopropolis, again demonstrating that SPE extraction is effective for extraction of phenolics. All phenols (phenylpropanoids and flavonoids) previously identified from EtOAc fraction (Souza et al., 2013) were verified in the samples of this study; the 6-*O-p*-coumaroyl-*D*-galactopyranose compounds (1), 6-*O*-cinnamoyl-1-*O-p*-coumaroyl-β-*D*-glucopyranose (2), 7-*O*-methyl naringenin (3), 7-*O*-methyl aromadendrin (4), 7,4'-*di-O*-methyl aromadendrin (5), 4'-*O*-methyl kaempferol (6), 3-*O*-methyl quercetin (7), 5-*O*-methyl aromadendrin (8) and 5-*O*-methyl kaempferol (9) were identified (Fig 1).

Further studies are necessary to quantify the compounds identified. The following plant species occur in the region and are resin-producing sources possibly collected by the bees for propolis production: *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Anacardiaceae), *Handroanthus impetiginosus* (Mart. & DC.) Mattos (Bignoniaceae), *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill.





**Fig 1.** Chromatograms (HPLC-DAD 320 nm) of the phenolic fractions of *Melipona subnitida* geopropolis (1-6) and of EtOAc fraction geopropolis collected in January 2010. Compounds identified were: 6-*O-p*-coumaroyl-*D*-galactopyranose (1), 6-*O*-cinnamoyl-1-*O-p*-coumaroyl- $\beta$ -*D*-glucopyranose (2), 7-*O*-methyl naringenin (3), 7-*O*-methyl aromadendrin (4), 7,4'-*O*-methyl aromadendrin (5), 4'-*O*-methyl kaempferol (6), 3-*O*-methyl quercetin (7), 5-*O*-methyl aromadendrin (8) and 5-*O*-methyl kaempferol (9)

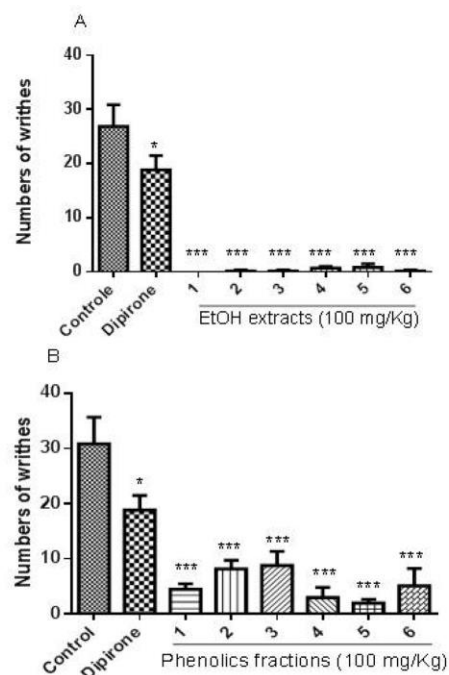
(Euphorbiaceae) and *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan (Fabaceae) (Maia-Silva et al., 2012). Other studies to verify the presence of pollen in *M. subnitida* geopropolis are required, because pollen analysis in addition to chemical analysis is a method used to characterize regionally different propolis samples. Pollen types that occur in low frequency in propolis samples can be regarded as an indicator of the botanical species supplying the resin (Matos et al., 2014). It is a good tool for defining the phytogeographical origin of resins and quality of the propolis (Barth et al., 2003). Barth et al. (1999) and Barth and Luz (2003) showed that there is a fairly equal number of pollen grains between the samples of propolis from *Apis* and geopropolis produced by Meliponini, but a wider richness of pollen types is characteristic of geopropolis. In this regard, the Meliponini visits more plant species than the *Apis* bees. Nevertheless, the occurrence of dominant and accessory pollen grains is more frequent in propolis samples, which reflects a higher generalization of honeybees.

Evaluating abdominal constrictions induced by acetic acid was initially used to evaluate the antinociceptive activity of the EtOH extracts (100 mg/kg) of geopropolis and their phenolics fractions (100 mg/kg). The results showed in Fig. 2A and Table 1 demonstrate that the EtOH extract (100 mg/kg), produced inhibition of abdominal constrictions induced by acetic acid in mice ( $p < 0.05$ ), with inhibitions of 96.9% (sample 5) to 100% (sample 1). Phenolic fractions at the same concentration also inhibited the number of writhes ( $p < 0.05$ ) from 71.4% (sample 3) to 93.5% (sample 5), Fig 2B and Table 1. The inhibitory properties of the EtOH extracts and the phenolic fractions versus the abdominal constrictions induced by acetic acid in mice is first suggestion of the antinociceptive potential of these materials. The acetic acid induced constrictions test is a typical model for inflammatory pain that has long been used as a screening tool for the assessment of analgesic properties. The fact that the EtOH extracts showed slightly greater antinociceptive activities than the phenolic fractions suggests that geopropolis contains other compounds responsible for this activity and should be chemically investigated. The phenolic fraction is probably principally responsible for this activity. No reports on antinociceptive activity have been found in the literature for the identified constituents of *M. subnitida* geopropolis.

**Table 1.** Effects of injections of ethanolic extracts and phenolic fractions of geopropolis on abdominal constrictions induced by acetic acid in mice.

Samples	Numbers of writhers			
	EtOH extracts		Phenolic fractions	
	Media $\pm$ S.E.M. <sup>a</sup>	% inhibition <sup>b</sup>	Media $\pm$ S.E.M. <sup>a</sup>	% de inhibition
Control	38.4 $\pm$ 2.7	-		
Dipirone	18.8 $\pm$ 2.7	29.9 *		
1	0.0 $\pm$ 0.0	100.0 ***	4.5 $\pm$ 1.0	85.4 ***
2	0.2 $\pm$ 0.2	99.4 ***	8.2 $\pm$ 1.6	73.5 ***
3	0.2 $\pm$ 0.2	99.4 ***	8.8 $\pm$ 2.5	71.4 ***
4	0.7 $\pm$ 0.3	97.5 ***	3.0 $\pm$ 1.9	90.3 ***
5	0.8 $\pm$ 0.6	96.9 ***	2.0 $\pm$ 0.7	93.5 ***
6	0.2 $\pm$ 0.2	99.4 ***	5.2 $\pm$ 3.1	83.2 ***

<sup>a</sup>Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM, n=6. <sup>b</sup>Symbols indicate significant difference (\*\* $P < 0.05$  and \*\*\* $P < 0.001$ , One Way ANOVA followed by Dunnett's test) compared to control group. Control was treated with vehicle (CMC/Tween® 80) (10 ml/kg, i.p.), dypirone 100 mg/kg, i.p. 40 minutes before initiating nociceptive stimulus.



**Fig 2.** Effects of injections of ethanolic extract of geopropolis and phenolic fractions on abdominal constriction induced by acetic acid in mice. Control groups included the mice treated with only vehicle (negative control) or dypirone (positive control) 40 min before initiating nociceptive stimulus. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM, n=6. Symbols indicate significant differences (\* $P < 0.05$  and \*\*\* $P < 0.001$ , One Way ANOVA followed by Dunnett's test) compared to the control group.



The free radical-scavenging activities of the EtOH extracts and phenolic fractions from geopropolis are shown in Table 2. The  $CE_{50}$  ranged from to 6.99-15.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (ABTS) and 13.3-39.2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (DPPH) for the EtOH extracts and 3.2-8.9  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (ABTS) and 7.5-17.1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (DPPH) for the phenolic fractions. The lower  $EC_{50}$  value indicates a higher antioxidant activity. The EtOH extracts and phenolic fractions showed a correlation between free radical-scavenging activity and the total phenolic content. The phenolic content ranged from 92.6-201.6 to EtOH extract and 205.5 to 305.3 to phenolic fractions. A correlation between DPPH-ABTS results for the EtOH extracts ( $r=0.91$ ) and the DPPH-ABTS results for the phenolic fraction ( $r=0.97$ ) was observed (Table 3).

These results suggest that total phenols, particularly the phenylpropanoids and flavonoids identified in *M. subnitida* geopropolis were responsible for the free radical-scavenging activity. Geopropolis obtained from the stingless bees showed important antioxidant activities (Silva et al, 2013; Dutra et al, 2014). In early studies other *M. subnitida* products such as the pollen (Silva et al, 2006) and honey showed (Silva et al, 2013) free radical-scavenging activity. The pollen collected by the stingless bees *Melipona rufiventris* Lepelletier (Silva et al, 2009) and honey produced by *Melipona seminigra merrillae* Cockerell (Almeida da Silva et al., 2013) also were reported as having important antioxidant activities.

**Table 2.** Total phenolic and free radical-scavenging activity of *M. subnitida* geopropolis samples.

Geo-propolis sample	Total phenolic content (mg GAE/g $\pm$ SD)		ABTS <sup>a</sup> $CE_{50}$ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )		DPPH <sup>a</sup> $CE_{50}$ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	
	EtOH extract	Phenolic fraction	EtOH extract	Phenolic fraction	EtOH extract	Phenolic fraction
	1	97.6 $\pm$ 5.7	273.9 $\pm$ 6.8	15.2 $\pm$ 0.8	4.3 $\pm$ 0.1	39.2 $\pm$ 0.9
2	92.6 $\pm$ 8.1	204.5 $\pm$ 7.4	13.4 $\pm$ 0.7	8.9 $\pm$ 0.7	31.7 $\pm$ 0.5	17.7 $\pm$ 0.2
3	172.6 $\pm$ 4.5	305.3 $\pm$ 5.0	7.7 $\pm$ 0.1	3.4 $\pm$ 0.1	15.9 $\pm$ 0.4	7.6 $\pm$ 0.1
4	150.7 $\pm$ 5.1	282.4 $\pm$ 1.5	10.3 $\pm$ 0.2	4.5 $\pm$ 0.2	16.1 $\pm$ 0.4	9.8 $\pm$ 0.1
5	201.6 $\pm$ 4.2	322.4 $\pm$ 6.4	6.9 $\pm$ 0.3	3.1 $\pm$ 0.1	13.3 $\pm$ 0.4	7.5 $\pm$ 0.1
6	139.3 $\pm$ 6.9	261.3 $\pm$ 5.8	15.2 $\pm$ 0.5	6.0 $\pm$ 0.1	28.9 $\pm$ 1.2	10.5 $\pm$ 0.1
Ascorbic acid			-		2.8 $\pm$ 0.0	2.8 $\pm$ 0.4
Trolox			3.21 $\pm$ 0.0	3.21 $\pm$ 0.0	-	-

<sup>a</sup>Mean value  $\pm$  standard deviation; n=3, Concentration of antioxidant required to reduce the original amount of the radicals by 50%.

**Table 3.** Pearson correlation coefficients between the total phenolic content and the antiradical activity DPPH and ABTS.

	DPPH		ABTS	
	EtOH extracts	Phenolic fractions	EtOH extracts	Phenolic fractions
Total Phenolic Content/EtOH extracts	-0.90		-0.85	
DPPH/EtOH extracts			0.91	
ABTS/EtOH extracts	0.91			
Total Phenolic Content/phenolic fractions		-0.94		-0.97
DPPH/phenolic fractions				0.97
ABTS/phenolic fractions		0.97		

## Conclusion

The present results from six samples of *M. subnitida* geopropolis collected over three years showed that there is a variation in the total phenolic content over the years but not in the chemical profile. Geopropolis is a rich source of bioactive compounds with potential antioxidant and antinociceptive activities. The antioxidant activity is related to the total phenolic content. The SPE extraction was effective for the extraction of phenolic from *M. subnitida* geopropolis.

## Acknowledgments

This work was financially supported by grants from CNPq (CNPq-PPBio 503285/2009-9), FACEPE (Grant no. PRONEM APQ-1232.1.06/10) and CAPES.

## References

- Almeida-Da-Silva, I.A., Silva, T.M. S., Camara, C.A., Queiroz, N., Magnani, M., Novais, J.S., Soledade, L.E.B., Lima, E.O., De Souza, A.L. & De Souza, A.G. (2013). Phenolic profile, antioxidant activity and palynological analysis of stingless bee honey from Amazonas, Northern Brazil. *Food Chem.* 141: 3552-3558. doi: 10.1016/j.foodchem.2013.06.072
- Barth, O.M. (1998). Pollen analysis of Brazilian propolis, *Grana* 37: 97-101. DOI: 10.1080/00173130310012512.
- Barth, O.M. & Luz, C.F.P. (2003). Palynological analysis of Brazilian geopropolis samples, *Grana* 42: 121-127. doi: 10.1080/00173130310012512
- Collier, H.O.J., Dinneen, J.C., Johnson, C.A. & Schneider, C. (1968). The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. *Brit. J. Pharmacol.* 32: 295-

310. Retrieved from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1570212/>

Cunha, M.G., Franchin, M., Galvão, L.C.C., Ruiz, A.L.T.G., Carvalho, J.E., Ikegaki, M., Alencar, S.M., Koo, H. & Rosalen, P.L. (2013). Antimicrobial and antiproliferative activities of stingless bee *Melipona scutellaris* geopropolis. *BMC Complement. Altern. Med.* 13: 23. doi: 10.1186/1472-6882-13-23

Dutra, R.P., Abreu, B.V.B., Cunha, M.S., Batista, M.C.A., Torres, L.M.B., Nascimento, F.R.F., Ribeiro, M.N.S. & Guerra, R.N.M. (2014). Phenolic acids, hydrolyzable tannins, and antioxidant activity of geopropolis from the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. *J. Agri. Food Chem.* 62: 2549-2557. doi: 10.1021/jf404875v

Fontenele, J.B., Viana, G.S.B., Xavier-Filho, J. & Alencar, J.W. (1996). Anti-inflammatory and analgesic activity of a water-soluble fraction from shark cartilage. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 29: 643-646.

Franchin, M., Cunha, M.G., Denny, C., Napimoga M.H., Cunha, T.M., Koo, H., Alencar, S. M., Ikegaki, M. & Rosalen, P.L. (2012). Geopropolis from *Melipona scutellaris* decreases the mechanical inflammatory hypernociception by inhibiting the production of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ . *J. Ethnopharmacol.* 143: 709-715. doi: 10.1016/j.jep.2012.07.040

Hadjmohammadi, M. R., Nazari, S. & Kamel, K. (2009). Determination of flavonoid markers in honey with SPE and LC using experimental design. *Chromatographia* 69: 1291-1297. doi: 10.1365/s10337-009-1073-4

Koster, R., Anderson, M. & De Beer, E.J. (1959). Acetic acid for analgesic screening. *Fed. Proc.* 18: 412-416.

Liberio, S.A., Pereira, A.L.A., Dutra, R.P., Reis, A.S., Aratijo, M.J.A.M., Mattar, N.S., Silva, L.A., Ribeiro, M.N.S., Nascimento, F.R.F., Guerra, R.N.M. & Monteiro-Neto, V. (2011). Antimicrobial activity against oral pathogens and immunomodulatory effects and toxicity of geopropolis produced by the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. *BMC Complement. Altern. Med.* 11:108. doi: 10.1186/1472-6882-11-108

Matos, V.R., Alencar, S.M. & Santos, F.A.R. (2014). Pollen types and levels of total phenolic compounds in propolis produced by *Apis mellifera* L. (Apidae) in an area of the semiarid region of Bahia, Brazil. *An. Acad. Bras. Cienc.* 86:407-418. doi: 10.1590/0001-376520142013-0109

Maia-Silva, C., Silva, C.I., Hmcir, M., Queiroz, R.T. & Imperatriz-Fonseca, V.L. (2012). Guia de plantas visitadas por abelhas na Caatinga. Fortaleza: Fundação Brasil Cidadão, 191 p.

Nogueira-Neto, P. (1997). Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão. São Paulo: Nogueirapis, 445 p.

Re, R., Pelegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Bio. Med.* 26: 1231-1237. doi: 10.1016/S0891-5849(98)00315-3

Silva, E.C.C., Muniz, M.P., Nunomura, R.C.S., Nunomura, S.M. & Zilse, G.A.C. (2013). Phenolic constituents and antioxidant activity of geopropolis from two species of amazonian stingless bees. *Quim. Nova.* 36:628-633. doi: 10.1590/S0100-40422013000500003

Silva, T.M.S., Camara, C.A., Lins, A.C.S., Agra, F.M., Silva, E.M.S., Reis, I.T. & Freitas B.M. (2009). Chemical composition, botanical evaluation and screening of radical scavenging activity of collected pollen by the stingless bees *Melipona rufiventris* (uruçu amarela). *An. Acad. Bras. Cienc.* 81: 173-178. doi: 10.1590/S0001-37652009000200003

Silva, T.M.S., Camara, C.A., Lins, A.C.S., Barbosa-Filho, J.M., Silva, E.M.S., Freitas, B.M. & Santos, F.A.R. (2006). Chemical composition and free radical scavenging activity of pollen loads from stingless bee *Melipona subnitida* Ducke. *J. Food Compos. Anal.* 19:507-511. doi: 10.1016/j.jfca.2005.12.011

Silva, T.M.S., Santos, F.P., Rodrigues, A.E., Silva, E.M.S., Silva, G.S., Novais, J.S., Santos, Francisco, A.R. & Camara, C.A. (2013). Phenolic compounds, melissopolynological, physicochemical analysis and antioxidant activity of jandaíra (*Melipona subnitida*) honey. *J. Food Compos. Anal.* 29: 10-18. doi: 10.1016/j.jfca.2012.08.010

Slinkard, K. & Singleton, V.L. (1977). Total phenol analyses: automation and comparison with manual methods. *Am. J. Enol. Viticult.* 28: 49-55.

Simone-Finstrom, M. & Spivak, M. (2010). Propolis and bee health: the natural history and significance of resin use by honey bees. *Apidologie* 41: 295-311. doi: 10.1051/apido/2010016.

Souza, S.A., Camara, C.A., Silva, E.M.S. & Silva, T.M.S. (2013). Composition and antioxidant activity of geopropolis collected by *Melipona subnitida* (Jandaíra) bees. *Evid. Based Complement. Alternat. Med.* 2013: 1-5. doi: 10.1155/2013/801383

Velikova, M., Bankovaa, V., Tsvetkovab, I., Kujungievb, A. & Marcuccic, M.C. (2000). Antibacterial *ent*-kaurene from Brazilian propolis of native stingless bees. *Fitoterapia* 71: 693-696. doi: 10.1016/S0367-326X(00)00213-6



## 3 ARTIGO 3

## Phytotherapy Research

**Anti-inflammatory and antioxidant activities of the  
monofloral pollen of the jandaíra stingless bee (*Melipona  
subnitida*)**

Journal:	<i>Phytotherapy Research</i>
Manuscript ID:	PTR-15-0082
Wiley - Manuscript type:	Full Paper
Date Submitted by the Author:	20-Jan-2015
Complete List of Authors:	Dias, Thays; Universidade Federal de Alagoas, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde da Silva, Girliane; UFRPE, Departamento de Ciências Moleculares da Natividade, Tamires; UFRPE, Departamento de Ciências Moleculares Silva, Amanda; Universidade Federal de Alagoas, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde Santos, Mariana; Universidade Federal de Alagoas, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde Leite, Anderson; Universidade Federal de Alagoas, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde Camara, Celso; Federal Rural University of Pernambuco, Department of Molecular Sciences Silva, Tania Maria; Federal Rural University of Pernambuco, Department of Molecular Sciences; da Silva, Eva Monica; Univasf, Departamento de Zootecnia Santos, Francisco de Assis; UFFS, Departamento de Ciências Biológicas Alexandre-Moreira, Magna; Magna Suzana Alexandre Moreira,
Keyword:	Bee pollen, stingless jandaíra, flavonoids, anti-inflammatory, antioxidant, antinociceptive

## Phytotherapy Research

### **Anti-inflammatory and antioxidant activities of the monofloral pollen of the jandaíra stingless bee (*Melipona subnitida*)**

Thays de Lima Matos Freire Dias<sup>a</sup>, Gírliane Regina da Silva<sup>b</sup>, Tamires Botelho da Natividade<sup>b</sup>, Amanda Evelyn da Silva<sup>a</sup>, Mariana da Silva Santos<sup>a</sup>, Anderson Brandão Leite<sup>a</sup>, Celso Amorim Camara<sup>b</sup>, Tania Maria Sarmento Silva<sup>b</sup>, Eva Monica Sarmento da Silva<sup>c</sup>, Francisco de Assis Ribeiro dos Santos<sup>d</sup>, Magna Suzana Alexandre-Moreira<sup>a\*</sup>

<sup>a</sup>Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, CEP 57072-900, Bahia, Brazil.

<sup>b</sup>Departamento de Ciências Moleculares, Universidade Federal Rural de Pernambuco, CEP 52171-900, Pernambuco, Brazil

<sup>c</sup>Colegiado de Zootecnia, Universidade Federal do Vale de São Francisco, CEP 56300-990, Pernambuco, Brazil.

<sup>d</sup>Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, CEP 44036-900, Bahia, Brazil.

\*Corresponding author: Tel.: +55 82 32141528, +55 82 88985792, +55 82 96711124

E-mail: [suzana.magna@gmail.com](mailto:suzana.magna@gmail.com), [magnasuzana@cnpq.br](mailto:magnasuzana@cnpq.br)



## Abstract

The anti-inflammatory and antioxidant effects of monofloral bee pollen collected by the *Senna sp.* stingless bee jandaíra (*Melipona subnitida*) were investigated. Monofloral pollen is important because only this type of pollen has a consistent composition and can thus be used successfully in nutrition and medicine. A palynological analysis showed that monofloral was the predominant pollen type obtained from the species *Senna sp.* (94.5%). The levels of the flavonoids apigenin, taxifolin, naringenin, tricetin, luteolin and kaempferol in the pollen were quantified by HPLC-DAD. The ethanolic extract, the fractions ethyl acetate (EtOAc) and hydromethanol (MeOH:H<sub>2</sub>O) and the flavonoid tricetin, when tested in mice, induced antinociceptive effects. The anti-inflammatory activity of the flavonoid tricetin was also confirmed. The extract and fractions exhibited significant potential antioxidant activity in DPPH, ABTS and  $\beta$ -carotene/linoleic acid tests.

Keywords: Bee pollen, stingless jandaíra, flavonoids, antinociceptive, anti-inflammatory, antioxidant.

## Introduction

Bee pollen is an agglomerate of pollen grains from various botanical sources, which are collected by the bees and mixed with nectar and secretions. Normally, beekeepers collect mixed pollen that is rich in protein, particularly free amino acids, and also enriched with carbohydrates, lipids, vitamins and minerals (Bogdanov, 2014). It is nutritionally well balanced and has been consumed as a perfect food. In addition to containing essential compounds that are increasingly used as health food supplements, the presence of flavonoids in bee pollen confers antioxidant properties, radical scavenging activities (Silva *et al.*, 2006; 2009; Freire *et al.*, 2012) and anti-inflammatory activities (Medeiros *et al.*, 2008; Maruyama *et al.*, 2010).

Inflammation and pain are pathophysiological responses to a variety of tissue injuries that can be caused by chemical, physical or biological agents. Although this is a natural defense mechanism of the body, the complex events and mediators involved in the inflammatory reaction can induce, maintain or worsen many diseases (Medzhitov, 2010). The search for pharmacological agents for anti-inflammatory and analgesic therapy is very important because the classes of drugs currently used as opioids and non-steroidal anti-inflammatory agents produce serious side effects. Recent reports indicate that many natural products, including flavonoids, are able to reduce nociceptive behavior and the inflammatory response (Calixto *et al.*, 2005; Queiroz *et al.*, 2014).

In this study, we investigated the anti-inflammatory and antioxidant effects of monofloral bee pollen collected by the jandaíra stingless bee.

Because flavonoids are phenolic compounds and some of them have shown anti-inflammatory activity, we evaluated the effect of the flavonoid tricetin, one of the compounds present in the pollen. Harvesting the unifloral pollen is important because only this type of pollen has a constant composition and can thus be used successfully in nutrition and medicine.

## Materials and methods

### *Reagents*

All solvents used were commercial HPLC grade.  $\beta$ -Carotene, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), linoleic acid, 6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid, Trolox, potassium persulfate, 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), gallic acid, and the Folin-Ciocalteu reagent. Apigenin (4',5,7-trihydroxyflavone), kaempferol (3,4',5,7-tetrahydroxyflavone), luteolin (3',4',5,7-tetrahydroxyflavone), tricetin (3',4',5,5',7,-pentahydroxyflavone), taxifolin (5,7,3',4'-tetrahydroxydihydroflavonol) and naringenin (3',4',5,7,-tetrahydroxydihydroflavanone) had been previously isolated and identified from the pollen loads (Silva *et al.*, 2006, Silva *et al.*, 2009). All solutions were freshly prepared immediately before use. Acetic acid, dypirone, indomethacin and Tween 20 were used for the anti-inflammatory assay. A solution of formalin (2.5%) was prepared with formaldehyde in saline solution (NaCl 0.9%). Extract, fractions and tricetin flavonoid were used as suspensions in Tween 20 (0.05%) and distilled water (vehicle) in all of the experiments.

### *Bee pollen and preparation of extract and fractions*

The bee pollen (palynothecca - *Senna* sp.) was identified by palynothecca's slide comparison of the Plant Micromorphology Laboratory (Universidade Estadual de Feira de Santana, Brazil) by Dr. Francisco de Assis Ribeiro dos Santos. The bee pollen (195.3 g) was extracted with ethanol in an ultrasonic water bath. The extract was concentrated under vacuum, which produced a white precipitate (33.0 g). A portion of the ethanolic extract (15.7 g) was suspended in MeOH:H<sub>2</sub>O and partitioned with hexane (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>) and EtOAc to yield the corresponding soluble fractions, which yielded C<sub>6</sub>H<sub>14</sub> (8.9 g), EtOAc (9.8 g) and MeOH:H<sub>2</sub>O (23.0 g) fractions. The EtOAc fraction that showed significant antioxidant activity was subjected to further HPLC analysis for the presence of flavonoids. For the isolation of flavonoids, the EtOAc fraction was subjected to column chromatography using Sephadex LH-20 and MeOH as the eluent.

### *HPLC analysis of flavonoids*

The chromatographic analyses were performed using a system that consisted of two solvent pumps (Model LC-6AD) that were equipped with an SPD-M20A diode array detector. The samples were injected into a Rheodyne 7125i injector with a 20- $\mu$ l loop. The chromatographic separation was performed with a C-18 Luna column (250 x 4.6 mm x 5  $\mu$ m). The flavonoids were separated using a mobile phase consisting of 1% aqueous formic acid (A) and methanol (B) at a flow rate of 1 mL/min. The mobile phase was delivered using the following



solvent gradient: 0-3 min 40% B, 5-15 min 45% B, 17-25 min 50% B, 27-35 min 55% B, and 35-40 min 70% B. The injection volume was 10  $\mu$ L. Chromatograms were recorded at 290 nm and 340 nm. The identification of flavonoids was based on the retention times and UV-spectra with authentic markers.

The flavonoids apigenin, taxifolin, naringenin, tricetin, luteolin and kaempferol were quantified using the external standard method based on the peak area. The analyses were performed by plotting a calibration curve. To construct the calibration curve for each flavonoid, working solutions with concentrations between 0.5 and 400 mg/mL were prepared from each stock solution by diluting appropriate volumes with methanol, which were then correlated with the measured area. For each sample, the quantitative analyses were performed in triplicate at 290 nm for naringenin and taxifolin (flavanone) and at 320 nm for apigenin, tricetin, luteolin (flavones) and kaempferol (flavonol).

#### *Determination of total phenolic content*

The total soluble phenolic content of the EtOH extract,  $C_6H_{14}$ , EtOAc and MeOH:H<sub>2</sub>O fractions (1 mg/mL) was determined with the Folin-Ciocalteu reagent according to the method of Slinkard and Singleton (1977) with a modification using gallic acid as a standard phenolic compound.

*DPPH<sup>\*</sup> radical scavenging assay, ABTS<sup>•+</sup> radical cation decolorization assay and antioxidant activity in a linoleic acid oxidation system*

The free radical scavenging activity of DPPH (Silva *et al.*, 2006), the radical cation decolorization assay ABTS (Re *et al.*, 1999), and the antioxidant activity in a linoleic acid oxidation system (Emmons, 1999) were determined for the EtOH extract, C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>, EtOAc, MeOH:H<sub>2</sub>O fractions and tricetin.

### *Animals*

Experiments were conducted using adult Swiss mice (both males and females) that were approximately 6-8 weeks old and weighing 20-30 g each. The mice were distributed in groups of 6-8 for treatment. All animals were obtained from the breeding unit of the BIOCEN – UFAL. The animals were maintained with free access to food and water and kept at 25-28 °C under a controlled 12 h light/dark cycle. All of the animals used in this work were treated according to the norms established by the Ethics Committee –UFAL (number: 23065.004873/2011-01) for animal handling.

### *Writhing test*

The writhing test was performed as described by Collier *et al.* (1968). Acetic acid (0.6%, v/v) was administered i.p. at a volume of 0.1 mL/10 g. The number of writhes, a response consisting of abdominal wall contractions and pelvic rotation followed by hind limb extension, was counted during continuous observation for 20 min, beginning 5 min after the acetic acid injection. The ethanolic (EtOH) extract (100 mg/kg, i.p.), ethyl acetate (AcOEt) and hydromethanol (MeOH:H<sub>2</sub>O) fractions (100 mg/kg, i.p.), as well as the tricetin

flavonoid (100  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.) or the reference drug (dypirone, 100  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.) were administered 40 min before the acetic acid injection. Control animals received only the vehicle (distilled water).

#### *Formalin-induced pain in mice*

The formalin-induced pain procedure used was essentially the same as that described previously (Hunskar and Hole, 1987). Animals received a 20- $\mu\text{L}$  dose of a 2.5% formalin solution (0.92% formaldehyde in saline) on the ventral surface of the right hind paw. The animals were observed from 0 to 5 min (neurogenic phase) and from 15 to 30 min (inflammatory phase), and the time that they spent licking the injected paw was recorded and considered as indicative of nociception. The animals were pre-treated 40 min before with one of the following: EtOH extract (100 mg/kg, i.p.), EtOAc and MeOH:H<sub>2</sub>O fractions (100 mg/kg, i.p.), and the flavonoid tricetin (100  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.) or the reference drug (indomethacin, 100  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.). Control animals received only the vehicle (distilled water).

#### *Carrageenan-induced paw edema in mice*

Acute inflammation was induced by subcutaneous injection of 0.05 ml of 1% freshly prepared solution of carrageenan (300  $\mu\text{g/paw}$ ) into the right hind paws of mice. The procedure used was similar to those described previously (Levy, 1969). The left hind paws were injected with saline (NaCl 0.9%) and used as controls. The inflammation was quantified by measuring the volume displaced

by the paw, using a plethysmometer (PanLab, Italy) 4 h after the carrageenan stimulus. Administration of the EtOH extract (100 mg/kg, i.p.), the AcOEt and MeOH:H<sub>2</sub>O fractions (100 mg/kg, i.p.), and the flavonoid tricetin (100 µmol/kg, i.p.) or the reference drug (indomethacin, 100 µmol/kg, i.p.) was conducted 1 h prior to the inflammatory stimulation. The results were expressed as the difference in volume between the carrageenan-injected and the saline-injected paws [ $\Delta$  paw volume (µL)].

#### *Statistical analysis*

For the antioxidant tests, all of the samples were analyzed in triplicate unless stated otherwise, and the results were expressed as the mean  $\pm$  standard deviation. All statistical analyses were performed using the Microsoft Excel software package. The data obtained from the animal experiments were expressed as the mean and standard error of the mean (mean  $\pm$  S.E.M.). Significant differences between the treatment groups and the control groups were evaluated by ANOVA and the Dunnett test, where \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 and \*\*\*P < 0.001 were considered to be significant.

#### **Results and discussion**

A palynological analysis showed that monofloral pollen was the predominant pollen type obtained from the *Senna sp.* (94.5%). The quantification of flavonoids identified from bee pollen is showed in Table 1. The flavonoids found in larger quantities were luteolin (363.9 mg/g pollen) followed by tricetin (136.9



mg/g pollen) and naringenin (82.4). Taxifolin, apigenin and kaempferol appeared in smaller quantities. The flavonoids luteolin, tricetin and kaempferol have been reported in samples of bee pollen collected by *Apis mellifera* and are of different botanical origins (Freire *et al.*, 2012). Naringenin has been isolated from the *Mimosa gemmulata* pollen, and tricetin was isolated from the Fabaceae pollen; both of these pollens are collected by *Melipona subnitida* bees (Silva *et al.*, 2006). Luteolin was isolated from the pollen type *Scoparia dulcis*, which is collected by *Melipona rufiventris* bees (Silva *et al.*, 2009).

In addition to its nutritional value, the *Senna* pollen collected by jandaíra bees is also observed to possess potential antioxidant activity. The total phenolic content and antioxidant activity were observed in major quantities for the EtOAc fraction in the three tests with DPPH, ABTS radicals and the beta carotene/linoleic acid system (Table 1). This activity can be attributed to a diversity of flavonoids (Table 2). The antioxidant activity was expected because literature reports detail antioxidant activity for all of the flavonoids (Freire *et al.* 2012; Pietta, 2000).

The antinociceptive activity of the EtOH extract, AcOEt fraction, MeO:H<sub>2</sub>O fraction and the flavonoid tricetin isolated from the *Melipona subnitida* bee pollen compared to a reference drug, dypirone, was initially evaluated by employing the acetic acid-induced abdominal writhing model in mice. An evaluation of the anti-inflammatory activity of the flavonoid luteolin, one of the flavonoids identified in greater amounts in the bee pollen of jandaíra bees (Ueda *et al.*, 2002), was also performed with tricetin, another abundant flavonoid found in bee pollen. As shown in Table 3, all products tested were administered intraperitoneally and produced marked inhibition of the acetic acid-

induced writhing response, when compared with the control group. The flavonoid tricetin isolated from the ethyl acetate fraction proved to be significantly active compared to the standard drug dipyron ( $***P<0.001$ ).

In the acetic acid-induced writhing assay, the ethanolic extract (90.9%), hydromethanol fraction (88.6%), ethyl acetate fraction (93.0%), all at a dose of 100 mg/kg, and the flavonoid tricetin (89.6%) at a dose of 100  $\mu$ mol/kg showed the inhibitory effect of nociception following intraperitoneal administration. As expected, dipyron (93.9%) also exhibited a significant antinociceptive effect (Table 3).

Table 4 shows the results obtained with the formalin test. The treatment of mice with the flavonoid tricetin (100  $\mu$ mol/kg, i.p.) and the standard drug indomethacin (30  $\mu$ mol/kg, i.p.) resulted in a significant inhibition of formalin-induced licking in the first phase (neurogenic pain). In the second phase of the formalin test (inflammatory pain), all products tested were administered intraperitoneally (100  $\mu$ mol/kg) and produced marked inhibition when compared with the control group. It is important to emphasize that the flavonoid tricetin (100  $\mu$ mol/kg, i.p.) proved to be significantly more active than the standard drug indomethacin (100  $\mu$ mol/kg, i.p.) in the inflammatory phase, with an extensive percentage of inhibition at 92.0% ( $***P<0.001$ ), as demonstrated in Table 4.

For the extract, the fractions and the tricetin flavonoid obtained from the bee pollen of *Melipona subnitida*, the inhibitory effects observed in the second phase of the formalin test (the inflammatory phase) led us to test these components on mouse paw edema induced by carrageenan, a model for the specific analysis of anti-inflammatory activity.

The treatment with the flavonoid tricetin (100  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.) was capable of reducing the paw edema, an effect observed at 240 min after the administration of the phlogistic agent carrageenan. As shown in Table 5, the standard drug indomethacin (10  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.) and flavonoid tricetin (100  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.) showed inhibition levels of 38.8 and 49.6% (\*\* $P < 0.001$ ), respectively.

We report here for the first time that the monofloral bee pollen from *Senna sp.* collected by jandaíra stingless bees exhibits antioxidant and anti-inflammatory activities.

Some traditional methods were used to evaluate the possible antinociceptive effect and the anti-inflammatory activity of the ethanolic extract, the ethyl acetate and hydromethanol fractions and the flavonoid tricetin isolated from bee pollen. Because flavonoids are also reported to be potent antioxidants and antinociceptive agents, much attention has been given to the relationship between the antioxidant and anti-inflammatory properties of flavonoids (Nijveldt *et al.*, 2001; Meotti *et al.*, 2006; Willain-Filho *et al.*, 2008).

The classic method of acetic acid-induced writhing was performed. This test is used currently as a pharmacological screening to evaluate the peripherally acting antinociceptive activity (Le Bars *et al.*, 2001). After the acetic acid injection, the mice show a response characterized by abdominal constriction, which is sometimes accompanied by twisting of the trunk followed by extension of the hind limbs (Cavalcante-Silva *et al.*, 2012). This behavior results from the activation of ASICs (acid-sensitive ion channels) and TRPV1 localized in the afferent primary fibers (Julius and Basbaum, 2001).

Although this writhing test is a nonspecific model, it is widely used and involves the local peritoneal receptors (cholinergic and histaminic receptors) and the mediators acetylcholine and histamine (Miranda *et al.*, 2001). The acetic acid causes pain by liberating endogenous substances such as serotonin, histamine, prostaglandins (PGs), bradykinins and substance P. The method has also been associated with prostanoids in general, including increased levels of PGE<sub>2</sub> and PGF<sub>2</sub> $\alpha$  in peritoneal fluids as well as in lipoxygenase products (Derardt *et al.*, 1980).

Furthermore, acetic acid injection induces a release of TNF- $\alpha$ , interleukin 1 $\beta$  and interleukin 8 by resident peritoneal macrophages and mast cells (Ribeiro *et al.*, 2000).

In this test, our findings showed a significant decrease in the number of writhings in the mice when subjected to the extract, fractions and flavonoids tested. The antinociceptive effect can be attributed to the flavonoids, such as tricetin, present in these samples. The pronounced action of the ethyl acetate fraction (greater than the flavonoid tricetin) suggests that the other flavonoids, including luteolin (Table 1), have antinociceptive activity. It has been reported that other flavonoids are able to decrease the nociception and inflammation response (Silva *et al.* 2013). Also, Queiroz *et al.* (2014) demonstrated that the flavonoid PMT1 and PMT2 given by i.p. route, inhibits the acetic acid-induced abdominal constrictions similarly to tricetin.

Some studies suggest that the inflammatory tissue damage is due to the liberation of reactive oxygen species formed by phagocytes invading the inflammation sites (Parke and Sapota, 1996).



There are also reports on the role of flavonoids as powerful antioxidant agents. Flavonoids have been shown to induce down-regulation of pro-inflammatory enzymes (COX-2 and iNOS) and to inhibit important enzymes, such as cyclooxygenase (COX), lipoxygenase (LOX) and microsomal monooxygenase, which are involved in nociceptive and inflammatory processes. The inhibition of COX by flavonoids can occur indirectly or directly. Indirectly, flavonoids can inhibit COX by a combination of sequestration of free radicals and interaction with the functions of enzymes (Yamamoto and Nozaki-Taguchi, 1996).

The ethanolic extract, hydromethanol, ethyl acetate fractions and flavonoid tricetin administration all induced antinociceptive activity in the late phase of the formalin test, confirming the activity observed in the acetic acid-induced writhing test in this study. The first phase (neurogenic) is most likely a direct result of the stimulation in the paw and reflects centrally mediated pain with the release of substance P, while the late phase (inflammatory) is due to the release of histamine, serotonin, bradykinin and prostaglandins (Hunskar and Hole, 1987). Drugs that act primarily on the central nervous system, such as morphine, inhibit both phases equally, while peripherally acting medications, such as anti-inflammatory non-steroidal and anti-inflammatory steroidal drugs, only inhibit the late phase. Similarly, the flavonoid tricetin produced significant inhibition of both the early and late phases in the formalin test. However, its effect was much greater in the second phase, indicating an important anti-inflammatory effect.

The inhibitory effects obtained in the inflammatory phase of the formalin test led us to test it on the specific model to detect anti-inflammatory activity. Carrageenan-induced paw edema in mice is widely used to determine the anti-inflammatory activity, and it has been fully characterized (Morris, 2003). Curiously, the ethyl acetate fraction and ethanolic extract were not able to reduce, in a significant manner, the mouse paw edema in this model; only the flavonoid tricetin significantly inhibited the formation of paw edema. As an inflammatory agent, carrageenan induces inflammation by releasing prostaglandin and increasing the levels of NO (Posadas *et al.*, 2004).

Our results indicate that the inhibitory effect of the flavonoid tricetin on carrageenan-induced paw edema is most likely due to the ability of flavonoids to inhibit important enzymes such as cyclooxygenase in nociceptive and inflammatory processes and for their antioxidant properties.

## Conclusion

Our results show that the ethanolic extract, the fractions (EtOAc and MeOH) and the flavonoid tricetin tested *in vivo* induce antinociceptive/anti-inflammatory and *in vitro* antioxidant action. These findings indicate the potential use of monofloral bee pollen from *Melipona subnitida* as an analgesic and anti-inflammatory agent. According to the results obtained, this effect can be attributed to the antioxidant action of the flavonoid tricetin, which is present in all of these samples. Once the results are confirmed, we will investigate other pathways and doses (using *in vivo* and *in vitro* models) to discover the therapeutic effects of these agents.

## Acknowledgments

FACEPE, CNPq-PPBio, INCT-INOVAR, INCT-AmbTropi, FAPEAL, FINEP and CAPES for financial support and fellowships.

## References

Bogdanov S. 2014. Pollen: Nutrition, Functional Properties, Health: A Review. *Bee Prod Sci* 1-35.

Calixto JB. 2005. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin American. *J Ethnopharmacol* **100**: 131-134.

Cavalcante-Silva LHA, Matta CBB, Araújo MV, Barbosa-Filho JM, Lira DP, Santos BVO, Miranda GEC, Alexandre-Moreira MS. 2012. Antinociceptive and anti-inflammatory activities of crude methanolic extract of red alga *Bryothamnion triquetrum*. *Mar Drugs* **10**: 1977-1992.

Collier HOJ, Dinneen JC, Johnson CA, Schneider C. 1968. The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. *Br J Pharmacol* **32**: 295–310.

Derardt R, Jongney S, Delevalcee F. 1980. Release of Prostaglandin E and F in an analgesic Reaction and its Inhibition. *Eur J Pharmacol* **51**: 17.

Emmons CL, Peterson DM, Paul GL. 1999. Antioxidant capacity of oat (*Avena sativa* L.) extracts. 2. In vitro antioxidant activity and contents of phenolic and tocol antioxidants. *J Agr Food Chem* **47**: 4894-4898.

Freire KRL, Lins ACS, Dórea MC, Santos FAR, Camara CA, Silva TMS. 2012. Palynological origin, phenolic content and antioxidant properties of honeybee-collected pollen from Bahia, Brazil. *Mol* **17**: 1652-1664.

Hunnskaar S, Hole K. 1987. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain* **30**: 103–114.

Julius D, Basbaum AI. 2001. Molecular mechanisms of nociception. *Nat* **413**: 203–210.

Le Bars D, Gozariu M, Cadden SW. 2001. Animal models of nociception. *Pharmacol. Rev* **53**: 597-652.

Levy L. 1969. Carrageenan paw oedema in the mouse. *Life Sci* **8**: 601–606.

Maruyama H, Sakamoto T, Araki Y, Hara H. 2010. Anti-inflammatory effect of bee pollen ethanol extract from *Cistus sp* of Spanish on carrageenan-induced rat hind paw edema. *BMC Complement Altern Med* 10-30.

Medeiros KCP, Figueiredo CAV, Figueredo TB, Freire KRL, Santos FAR, Alcantara-Neves NM, Silva TMS, Piuvezam MR. 2008. Anti-allergic effect of bee pollen phenolic extract and myricetin in ovalbumin-sensitized mice. *J Ethnopharmacol* **119**: 41-46.

Medzhitov R. 2010. Inflammation 2010: New adventures of an old flame. *Cell* **140**: 771-776.

Meotti FC, Luiz AP, Pizzolatti MG, Kassuya CAL, Calixto JB, Santos ARS. 2006. Analysis of the antinociceptive effect of the flavonoid myricitrin: evidence for a role of the l-arginine-nitric oxide and protein kinase C pathways. *J Pharmacol Exp Ther* **316** (2): 789-796.

Miranda FGG, Vilar JC, Alves IAN, Cavalcanti SCH, Antonioli AR. 2001. Antinociceptive and antiedematogenic properties and acute toxicity of *Tabebuia avellanedae* Lor. ex Griseb. inner bark aqueous extract. *BMC Pharmacol* **1**: 1-16.

Morris CJ. 2003. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. *Methods Mol Biol* **225**: 115-221.

Nijveldt RJ, Van-Nood E, Van-Hoorn DEC, Boelens PG, Van-Norren K, Van-Leeuwer PAM. 2001. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr* **74**: 418-425.

Parke DV, Sapota A. 1996. Chemical toxicity and reactive species. *Int J Occup Med Environ Health* **9**: 119-123.

Pietta PG. 2000. Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod* **63**: 1035-1042.

Posadas I, Bucci M, Roviezzo F, Rossi A, Parente L, Sautebin L, Cirino G. 2004. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. *Br J Pharmacol* **142**: 331-338.

Queiroz AC, Lira DP, Freire-Dias TLM, Souza ET, Matta CBB, Aquino AB, Silva LHAC, Silva DJC, Mella EAC, Agra MF, Barbosa-Filho JM, Araújo-Júnior JX,



Santos BV, Alexandre-Moreira MS. 2010. The antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Piptadenia stipulacea* Benth. (Fabaceae). *J Ethnopharmacol* **128**: 377-383.

Queiroz AC, Alves HS, Cavalcante-Silva LHA, Dias TLMF, Santos MS, Melo GMA, Campesatto EA, Chaves MCO, Alexandre-Moreira, MS. 2014. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of flavonoids PMT1 and PMT2 isolated from *Piper montealegreanum* Yuncker (Piperaceae) in mice. *Nat Prod Res* **28**:403-6

Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorisation assay. *Free Radic Bio Med* **26**: 1231-1237.

Ribeiro RA, Vale ML, Thomazzi SM, Paschoalato AB, Poole S, Ferreira SH, Cunha FQ. 2000. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. *Eur J Pharmacol* **387**: 111–118.

Silva AD, Cavalcante-Silva LHA, Matta CBB, Silva DF, Araújo MV, Tavares JF, Silva MS, Alexandre-Moreira MS. 2013. Antinociceptive effect of 7-methoxyflavone isolated from *Zornia brasiliensis*. *Nat Prod Res.* **27**:1–5.

Silva TMS, Camara CA, Lins ACS, Barbosa-Filho JM, Silva EMS, Freitas BM, Santos FAR. 2006. Chemical composition and free radical scavenging activity of pollen loads from stingless bee *Melipona subnitida* Ducke. *J Food Comp Anal* **19**: 507-511.

Silva TMS, Camara CA, Lins ACS, Agra MF, Silva EMS, Reis IT, Freitas BM. 2009. Chemical composition, botanical evaluation and screening of radical scavenging activity of collected pollen by the stingless bees *Melipona rufiventris* (Uruçu-amarela). *An Acad Bras Cienc* **81**: 173-178.

Slinkard K, Singleton VL. 1977. Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *Am J Enol Viticult* **28**: 49-55.

Ueda H, Yamazaki C, Yamazaki M. 2002. Luteolin as an anti-inflammatory and anti-allergic constituent of *Perilla frutescens*. *Biol Pharm Bull* **25**: 1197-1202.

Willain-Filho A, Cechinel-Filho V, Olinger L, Souza MM. 2008. Quercetin: further investigation of its antinociceptive properties and mechanisms of action. *Arch Pharmacol Res* **31**: 713-721.

Yamamoto T, Nozaki-Taguchi N. 1996. Analysis of the effects of cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 in spinal nociceptive transmission using indomethacin, a non-selective COX inhibitor, and NS-398, a COX-2 selective inhibitor. *Brain Res* **739**: 104-110.

**Table 1.** Quantitative analysis of the flavonoids identified in the monofloral pollen of jandaíra bees

Flavonoid	Flavonoid content (mg/100 g pollen)
Taxifolin	26.0
Tricetin	136.9
Naringenin	82.4
Luteolin	363.9
Kaempferol	14.7
Apigenin	6.7

**Table 2.** Total phenolic content and antioxidant activity of the extract, fractions and flavonoids isolated from the monofloral pollen of jandaíra bees<sup>a</sup>

Substance	Total phenolic content (mg GAE/g±SD)	DPPH (µg/mL±SD) <sup>b</sup>	CE <sub>50</sub>	ABTS (µg/mL±SD) <sup>b</sup>	β-Carotene (% I.O) <sup>c</sup>
EtOH	36.6±0.1	164.2±1.4		67.9±0.4	57.8±1.88
Hexane	5.9±0.3	>500 µg/mL		>500 µg/mL	43.7±2.57
EtOAc	56.9±0.1	80.6±1.8		29.1±0.0	66.1±2.02
MeO:H <sub>2</sub> O	26.5±0.1	>500 µg/mL		79.2±3.8	37.8±1.80
Tricetin		0.8±0.0		5.3±0.16	75.5±4.9
Trolox				2.6±0.0	86.5±2.92
Ascorbic acid		3.4±0.0			

<sup>a</sup>Mean value ± standard deviation: *n*=3.

<sup>b</sup>Concentration of antioxidant required to reduce the original amount of the radicals by 50%.

<sup>c</sup>Oxidation inhibition.



**Table 3.** Inhibitory effect of the EtOH extract (100 mg/kg, i.p.), EtOAc and MeOH:H<sub>2</sub>O fractions (100 mg/kg, i.p.), and the flavonoid tricetin isolated from the monofloral pollen of jandaíra bees (100 µmol/kg, i.p.) compared to the reference drug dypirone (100 µmol/kg, i.p.) on the acetic acid-induced writhings in mice.

Substance	Writhing number (mean ± S.E.M.)	% of inhibition
Control (vehicle)	23.4 ± 2.4	-
Dypirone	1.4 ± 0.7	93.9 ***
EtOH	2.1 ± 0.8	90.9 ***
MeO:H <sub>2</sub> O	2.7 ± 1.1	88.6 ***
AcOEt	1.4 ± 0.7	93.0 ***
Tricetin	2.4 ± 0.4	89.6 ***

Data are expressed as the mean ± S.E.M. Significant differences between the treated and the control groups were evaluated by ANOVA and Dunnett tests. \*\*\* P < 0.001.

**Table 4.** Inhibitory effect of the EtOH extract (100 mg/kg, i.p.), EtOAc and MeOH:H<sub>2</sub>O fractions (100 mg/kg, i.p.) and the flavonoid tricetin isolated from the monofloral pollen of jandaíra bees (100 µmol/kg, i.p.) compared to the reference drug dypirone (100 µmol/kg, i.p.) on formalin-induced nociception in mice

Substance	Time spent licking (s) (mean ± S.E.M.)		% of inhibition	
	1 <sup>st</sup> phase	2 <sup>nd</sup> phase	1 <sup>st</sup> phase	2 <sup>nd</sup> phase
Control (vehicle)	69.8 ± 4.4	195.9 ± 15.2	-----	-----
Indomethacin	46.1 ± 4.8	107.8 ± 14.5	34.0*	45.0***
EtOH	58.0 ± 6.5	76.1 ± 11.7	16.9	61.2***
MeO:H <sub>2</sub> O	66.4 ± 3.8	96.8 ± 9.8	4.9	50.6***
AcOEt	61.8 ± 4.6	23.2 ± 8.2	11.5	88.2***
Tricetin	35.3 ± 10.8	15.7 ± 8.9	48.7**	92.0***

Data are expressed as the mean ± S.E.M. Significant differences between the treated and the control groups were evaluated by ANOVA and Dunnett tests, and the asterisks denote the levels of significance in comparison with control groups. \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\* P < 0.001.

**Table 5.** Inhibitory effect of the EtOH extract (100 mg/kg, i.p.), EtOAc and MeOH:H<sub>2</sub>O fractions (100 mg/kg, i.p.) and the flavonoid tricetin isolated from the monofloral pollen of jandaíra bees (100  $\mu$ mol/kg, i.p.) compared to the reference drug indomethacin (30  $\mu$ mol/kg, i.p.) on carrageenan-induced paw edema

<b>Substance</b>	<b><math>\Delta</math> paw volume (<math>\mu</math>L) (mean <math>\pm</math> S.E.M.)</b>	<b>% of inhibition</b>
Control (vehicle)	58.3 $\pm$ 3.5	-
Indomethacin	35.74 $\pm$ 4.6***	38.8 ***
EtOH	50.0 $\pm$ 2.8	14.2
AcOEt	50.0 $\pm$ 4.5	14.2
Tricetin	29.4 $\pm$ 2.5***	49.6 ***

Data are expressed as the mean  $\pm$  S.E.M. Significant differences between the treated and the control groups were evaluated by ANOVA and Dunnett tests. \*\*\* P <0.001.

## 7 ARTIGO 4

*Antinociceptive and anti-inflammatory activities of the ethanolic extract, fractions and a catechin isolated from the stem bark of Ximenia americana L. (Oleaceae)*

Thays de Lima Matos Freire Dias<sup>1</sup>; Valdiléia Teixeira Uchoa<sup>2</sup>; Gabriela Muniz de Albuquerque Melo<sup>1</sup>; Yolanda Karla Cupertino da Silva<sup>1</sup>; Aline Cavalcanti de Queiroz<sup>1</sup>; Henrique Fonseca Goulart<sup>3</sup>; Magna Suzana Alexandre Moreira<sup>1</sup>; and Antônio Euzébio Goulart Santana<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>*LaFI - Laboratório de Farmacologia e Imunidade, Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, AL, Brazil*

<sup>2</sup>*LPqRN - Laboratório de Pesquisas em Recursos Naturais, Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Alagoas, Brazil*

<sup>3</sup>Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Alagoas, Rio Largo Alagoas, Brazil

**\*Corresponding author:**

Prof. Dr. Antônio Euzébio Goulart Santana, Universidade Federal de Alagoas - Instituto de Química e Biotecnologia – Cidade Universitaria 57.072-970 Maceió AL. Brazil; e-mail: aegs@qui.ufal.br; Phone: +55-82-3214-1388; fax: +55-82-3214-1503.

**Keywords:** Inflammation, Flavonoids, Writhingtest, Medicinal plant, Cyclooxygenase

## Abstract

The antinociceptive and anti-inflammatory action of the ethanolic extract, fractions and a catechin (XACC-1) isolated from *Ximenia americana L.* were determined utilizing *in vivo* models such as acetic acid-induced writhing, the formalin test, hot plate test, zymosan-induced peritonitis and an *in vitro* cyclooxygenase inhibition assay. The writhing test revealed inhibitory effects. The formalin test demonstrated an antinociceptive effect in both the early and late phases by XACC-1, while the chloroform fraction showed a lower antinociceptive effect in the early phase. The aqueous fraction and ethanolic extract of stem bark caused significant inhibition in the late phase. Treatment of mice with XACC-1 or the ethyl acetate fraction had no central antinociceptive effect in the hot plate test. Anti-inflammatory effects were determined for zymosan-induced peritoneal inflammation and the data indicated that XACC-1, the hydromethanol fraction, the ethanolic extract and the ethyl acetate fraction reduced the number of recruited cells. These results demonstrate that the extract, fractions and XACC-1 produce antinociceptive and anti-inflammatory responses. According to the results obtained in the *in vitro* cyclooxygenase inhibition assays, the effects observed for XACC-1 is related to inhibition of COX-1 and COX-2. The biological actions demonstrated in the present study lends to at least partial support for the ethnomedicinal use of this plant.

## 1. Introduction

Drugs currently in use to manage pain and inflammatory conditions are non-steroidal anti-inflammatory drugs, corticosteroids and opiate analgesics. All these drugs exhibit well known toxic side effects. In contrast, many medicines of plant origin have been used for long periods with no adverse effects. It is therefore essential that efforts should be made to introduce new medicinal plants for the development of less expensive drugs (Calixto, 2005). Plants represent a still largely untapped source of structurally novel compounds that may serve in the development of novel drugs (Pferschy-Wenzig & Bauer, 2015).

*Ximenia americana L.*, which belongs to the Oleaceae family, is a thorny bush very common in the state of Piauí (Brazil) and also found in tropical regions of America and Africa (Braga, 1960). In Brazil, it is commonly known as “ameixa-da-baía”, “ameixa-da-terra”, “ameixa-de-espinho”, and “sândalo-do-brasil” (Omer & Elnima, 2003). In north-eastern Brazil, it is used in folk medicine to treat several disorders including inflammation, fever, diarrhea and as a fertility regulating agent (Braga, 1960; Omer & Elnima, 2003). This plant is also active against rheumatism and many infections (Omer & Elnima, 2003). Several studies have demonstrated its pharmacological activity, e.g., antiviral activity (Parker et al., 2007), antimicrobial activity (Maikai et al., 2009), antitumor activity (Voss et al., 2006), antipyretic activity (Soro et al., 2009) and pesticidal properties (Fatope et al., 2000).

With the intention of identifying plants and natural products with pharmacological activities, our research group previously realized ethnopharmacological studies with many plants with antinociceptive and anti-inflammatory activity (De-Queiroz et al., 2010; Oliveira et al., 2012; Aquino et al., 2013; Da-Silva et al., 2013; De-Queiroz et al., 2014). Therefore, the purpose of this study was to evaluate evidence for the ethnobotanical properties of *X. americana L.* by means of *in vivo* experiments looking at antinociceptive and anti-inflammatory activities of its ethanolic extract of stem bark, fractions and one isolated compound.

## 2. Methods

### 2.1. Plant material

*Ximenia americana* L. stem was collected in April 2002 in the city of Campo Maior, state of Piauí and identified by Dr. Maria Edilene Alencar. A voucher specimen under the reference number 14407 was deposited at the Graziela Barroso Herbarium at the Federal University of Piauí (Teresina, PI, Brazil).

### 2.2. Extraction and Isolation

Stem bark (3.3 kg) of *X. americana* was dried at room temperature, then ground to a coarse powder (mesh size 2.5 mm) in a laboratory mill. The powdered bark (3.3 kg) was extracted with 95% ethanol (8 L) for 72 h, three consecutive times, in a stainless steel extractor at (26±1°C). The extracts were then pulled together and concentrated under reduced pressure in a rotary evaporator, yielding 620g (18.8%) of dry crude extract. A fraction of the ethanolic extract (500g) was suspended in a methanol:water (4:6) solution and extracted successively with 2 L each of *n*-hexane, chloroform and ethyl acetate, yielding respectively, hexane (10.75g; 2.15%), chloroform (7.20g; 1.44%), ethyl acetate (220g; 44.0%) and hydromethanol (240g; 48.0%) fractions.

The ethyl acetate fraction (200.0 g) was subjected to filtration over deactivated silica gel (800 g) eluted stepwise with 1000 mL of each solvent - ethyl acetate (1) F3.1 (46.54g; 23.27%), ethyl acetate (2) F3.2 (29.11g; 14.56%) and methanol F3.3 (76.66g; 38.33%). The ethyl acetate fraction (F3.1) (40.0g) was subjected to CC over silica gel (100 g) eluted stepwise with a volume of 500 mL of each chloroform, methanol, and a mixture of chloroform and methanol as eluants. The CHCl<sub>3</sub>:MeOH (20%) fraction, a wine-colored amorphous solid (2.8g) was treated with ethyl acetate and ethyl ether and was stored in a freezer for 24 hrs and then filtered through a Büchner funnel yielding a beige colored product dubbed XACC-1 (2.2g). Analysis of XACC-1 using NMR H<sup>1</sup> and NMR C<sup>13</sup> spectra allowed for the identification of a flavonoid of the catechin class known as epicatechins (Figure 1).

### 2.3. Pharmacological procedures

#### 2.3.1. Animals

Swiss mice of both sexes, 6–8 weeks of age with an average weight of 20–30 g, were obtained from the Central Animal House at the Federal University of Alagoas (Maceió, Brazil) and were used throughout the experiments. They were housed in single-sex cages under a 12-h light/dark cycle at constant temperature (22 ± 2 °C) conditions with free access to water and pellet food. The experiments were performed after approval of the protocol by the Ethics Committee-UFAL for animal handling. Animal care and research protocols were in accordance with the principles and guidelines for the care of laboratory animals and the ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals (Zimmerman, 1983).

#### 2.3.2. Drugs and Reagents

The following substances were used: acetic acid and indomethacin (Merck), dipyron (Sigma Chemical), morphine sulfate (Dimorf-Cristalia, Brazil) and Tween 20 (Sigma). A solution of 2.5% formalin was prepared with formaldehyde (Merck) in saline (NaCl 0.9%). The ethanolic extract, hydromethanol fraction, hexane fraction, chloroform fraction, acetate fraction and XACC-1 were suspended in Tween 20 (0.05%) and distilled water (vehicle) for all of the experiments.

### **2.3.3. Acetic acid-induced writhing in mice**

At the beginning of the experiment, the mice were administered the ethanolic extract, hydromethanol fraction, hexane fraction, chloroform fraction and ethyl acetate fraction (all in doses of 100 mg/Kg i.p.). The XACC-1 isolated from *X. Americana* L. and dipyrone were administered in doses of 300, 100, 30, 10 and 1  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p. Least-squares linear regression analysis of the log dose-response curves allowed for the calculation of the dose that produced 50% antinociception ( $\text{ID}_{50}$ ) by XACC-1 and the reference drug, which were injected 40 min before the intraperitoneal injection (i.p.) of acetic acid 0.6% (10 ml/Kg body wt.). The control animals received only the vehicle and acetic acid. Dipyrone (10 mg/Kg body wt.) was used as the standard drug. Five minutes after administration of acetic acid, the number of writhes was recorded over a period of twenty minutes (Koster, 1959).

### **2.3.4. Formalin test in mice**

The mice were pre-treated with XACC-1 (100  $\mu\text{mol/Kg}$ , i.p.), the ethanolic extract and the fractions from *X. americana* L. (all in doses of 100 mg/Kg, i.p.) with Indomethacin (100  $\mu\text{mol/Kg}$ , i.p.) as the standard drug. Control animals received the vehicle. Then, 40 minutes after pre-treatment the animals were given 20  $\mu\text{L}$  of a 2.5% formalin solution (0.92% formaldehyde, in saline) in the ventral surface of the right hind paw (i.pl.). They were then observed from 0 to 5 min (neurogenic phase) and from 15 to 30 min (inflammatory phase), and the time they spent licking the injected paw was recorded and considered as indicative of nociception (Tjolsen et al., 1992).

### **2.3.5. Hot plate test in mice**

The animals were placed on a hot plate ( $54 \pm 1^\circ\text{C}$ ). The reaction time (paw licking, jumping, shaking) was recorded 30, 60, 90 and 120 minutes after intraperitoneal administration of the ethyl acetate fraction (100 mg/Kg, i.p.) and XACC-1 (100  $\mu\text{mol/Kg}$ , i.p.) isolated from *X. americana* L. The vehicle and morphine (15  $\mu\text{mol/Kg}$ , i.p.) were used as the control and the standard drug (Eddy & Leimbach, 1953).

### **2.3.6. Zymosan-induced peritonitis in mice**

For this series of experiments, the method described by Doherty et al. (1985) and Kolaczowska et al. (2001), was used. Zymosan A (Sigma Aldrich) was freshly prepared (2 mg/mL) in sterile 0.9% w/v saline, and 0.5 mL was injected i.p. The animals were then killed by cervical dislocation. The peritoneal cavity was washed with 1.5 mL cold PBS, and after 6hrs of gentle manual massage, the exudate was retrieved and its volume measured. The exudate was collected and used freshly for cell counts and Cytospin preparations. The ethanolic extract and the fractions (100 mg/Kg, i.p.), XACC-1 (100  $\mu\text{mol/Kg}$ , i.p.), the vehicle (control, i.p.) and indomethacin (100  $\mu\text{mol/Kg}$ , i.p.) were administered 30 min before the zymosan A injection.

### **2.3.7. In vitro cyclooxygenase inhibition assay**

The flavonoid XACC-1 was also evaluated for its ability to inhibit COX in accordance with the method described by Uddin et al. (2004), using both the kit for determining the inhibition of sheep COX-1/COX-2 (Cayman Chemicals, MI, USA), and according to the manufacturer's instructions. Cyclooxygenase catalyzes the first step in the biosynthesis of arachidonic acid (AA) to  $\text{PGH}_2$ .  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , produced from  $\text{PGH}_2$  by reduction with stannous chloride, is measured by enzyme immunoassay (ACETM competitive EIA). The test compound solutions were prepared using DMSO as a solvent and reaction buffer (supplied in



the kit) to a concentration of 0.2  $\mu\text{M}$ . Thereafter, a series of supplied reaction buffer solutions (960IL, 0.1M Tris-HCl pH8.0 containing 5mM EDTA and 2mM phenol) were aliquoted into eppendorf tubes, which then had the enzyme COX-1 or COX-2 (10  $\mu\text{l}$ ) added in the presence of heme (10  $\mu\text{l}$ ). Later, 10  $\mu\text{l}$  of the XACC-1 solution and indomethacin (0.2  $\mu\text{M}$  in a final volume of 100  $\mu\text{l}$ ) were added. These solutions were incubated for a period of 5min at 37  $^{\circ}\text{C}$ . Thereafter, 10  $\mu\text{l}$  of a solution of arachidonic acid (100  $\mu\text{M}$ ) was added and the COX reaction stopped by the addition of 50  $\mu\text{l}$  of HCl (1M) after 2 min from the start of the reaction.  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , produced from  $\text{PGH}_2$  by reduction with stannous chloride was measured by enzyme immunoassay. This assay is based on the competition between PGs and a PG-acetylcholinesterase conjugate (PG tracer) for a limited amount of PG antiserum. The amount of PG able to connect to the PG antiserum is inversely proportional to the inhibition of COX, since the concentration of the PG-acetylcholinesterase conjugate is kept constant, while the concentration of PGs varies. This antibody-PG complex binds to an anti-monoclonal antibody previously placed in the wells of the plate. The plate is washed to remove any unbound reagents and the Ellman reagent, which contains the substrate for acetylcholine esterase, is then added to the well. The product of this enzymatic reaction produces a distinct yellow color that absorbs at 412nm. The intensity of this color, determined spectrophotometrically, is proportional to the amount of PG-acetylcholinesterase conjugate that is connected to the PG antiserum, which is inversely proportional to the amount of PGs present in the well during the incubation period (Uddin et al., 2004).

#### **2.4. Statistical analysis**

The percentages of inhibition are reported as the mean  $\pm$  S.E.M inhibition obtained in each individual experiment at the peak of the nociceptive or inflammatory response, depending on the experimental protocol. The data were compared statistically by analysis of variance (ANOVA) followed by the Dunnett's test. *P* values [ $p < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ ; \*\*\* $P < 0.001$ ] were considered significant. When appropriate, the mean  $\text{ID}_{50}$  values accompanied by their respective 95% confidence limits were determined by linear regression from individual experiments, using linear regression software.

### **3. Results**

#### **3.1. Acetic acid-induced writhing**

In the acetic acid-induced writhing assay (Table 1), the ethanolic extract (98.20%), hexane fraction (99.60%), chloroform fraction (95.00%), ethyl acetate fraction (95.30%) hydromethanol fraction (98.50%) (all at the dose of 100 mg/kg, i.p), and XACC-1 (98.50%) (at the dose of 100  $\mu\text{mol/kg}$ ) showed an inhibitory effect of nociception after intraperitoneal administration. Dipyrone (85.60%) also exerted a significant antinociceptive effect (Table 1).

Utilizing the writhing test a dose-response curve of XACC-1 was made. The results, depicted in Figure 2 and Table 2 show that XACC-1 ( $\text{ID}_{50}$ = 32.00  $\mu\text{mol/kg}$ , maximum effect=99.60%) produced the same order of potency as that observed for the antinociceptive activity of dipyrone ( $\text{ID}_{50}$ = 29.30  $\mu\text{mol/kg}$ , maximum effect= 83.50%).

#### **3.2. Formalin test**

The formalin test in mice revealed an antinociceptive effect (Table 3). The XACC-1 (100  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.) caused a significant reduction in nociceptive responses during both the neurogenic (64.23%) and the inflammatory (86.80%) phase. The chloroform fraction (100 mg/kg, i.p.) induced reduction (31.51%) in the neurogenic phase, but not in the inflammatory phase. Indomethacin (100  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.), the aqueous fraction and the ethanolic extract (all at doses of 100 mg/kg, i.p.) caused significant inhibition (49.86%, 73.68% and 82.40%,

respectively) in the inflammatory phase, but this effect was not observed in the neurogenic phase.

### 3.3. Hot plate test

The hot plate test was used to determine whether XACC-1 or the ethyl acetate fraction had any central antinociceptive effect, but they showed no significant activity (Table 4). Morphine was used as a positive control in the hot plate test.

### 3.4. Zymosan-induced peritonitis

The number of leukocytes in peritoneal exudates from mice treated with XACC-1, the hydromethanol fraction, the ethanolic extract and ethyl acetate fraction decreased by 46.02%, 35.06%, 41.45%, and 38.61%, respectively, when compared to exudates from the vehicle-treated control. The inhibition in response to indomethacin was 55.65% (Figure 3).

### 3.5. Inhibition of COX

The ability of XACC-1 to inhibit COX-1 and COX-2 was determined using an ovine enzyme immunoassay kit, according to the methodology described by Uddin et al (2004). These results are shown in figure 4.

It was observed that XACC-1 and indomethacin were able to significantly inhibit more COX-1 than COX-2 at a concentration of 0.2  $\mu$ M. Moreover, indomethacin decreases more COX-2 activity than XACC-1, but both treatments at this concentration inhibit COX-1 similarly.

## 4. Discussion

There is compelling evidence that many plants or their active principles used in traditional medicine may be useful for the treatment of pain or inflammatory conditions (Sen & Samanta, 2015). This work shows, for the first time, that the ethanolic extract, fractions and/or XACC-1 from *X. americana*, administered intraperitoneally in mice, produce significant antinociceptive and anti-inflammatory action against chemical models of nociception (acetic acid-induced writhing or formalin test) or zymosan-induced peritonitis.

It has been suggested that acetic acid acts by releasing endogenous mediators that stimulate the nociceptive neurons which are sensitive to nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) and to opioids (Collier et al., 1968), and that it is possible to quantify prostaglandins by radioimmunoassay in the peritoneal exudates of rats collected after intraperitoneal injection of acetic acid (Deraedt et al., 1980). The most important transmission pathways for inflammatory pain are those comprising peripheral polymodal nociceptors sensitive to protons, such as acid sensitive ion channels and via endogenous mediators, such as bradykinin, serotonin, histamine, substance P, cytokines and prostaglandins (Collier et al., 1968; Deraedt et al., 1980; Ribeiro et al., 2000; Ikeda et al., 2001; Julius & Basbaum, 2001).). Moreover, it was found that the intraperitoneal administration of acetic acid induces the release not only of prostaglandins but also of mediators of the sympathetic nervous system (Duarte et al., 1988). Although the writhing test had poor specificity (e.g., tricyclic antidepressants, anticholinergic, antihistaminic and other agents showed activity in this test), it is a very sensitive method for screening the antinociceptive effects of compounds (Collier et al., 1968; Alexandre-Moreira et al., 1999; Miranda et al., 2001). Our results show that the ethanolic extract, all the fractions and XACC-1 in mice induce antinociceptive effects. These findings are indicative for the potential use of *X. americana* as an antinociceptive agent. The thermal stimulus of the hot plate test is employed to evaluate antinociceptive activity via the central mechanism (Eddy & Leimbach 1953). In this model, the XACC-1 and ethyl acetate fraction did not significantly increase the latency time. These results allow us to infer that the XACC-1 and acetate fraction do not possess a central antinociceptive effect. Morphine

produced a marked and significant antinociception effect in the hot plate assay. Although the hot plate test is commonly used to assess narcotic analgesics, other centrally acting drugs, including sedatives and muscle relaxants or psychotomimetics have shown activity in this test (Eddy & Leimbach 1953). However, unlike morphine, indomethacin and other NSAIDs have no effect in the hot plate test (Santos et al., 1998; Miranda et al., 2012).

The formalin test is believed to represent a more valid model for clinical pain (Tjolsen et al., 1992). The formalin test is a very useful method for not only assessing antinociceptive drugs but also helping in the elucidation of the mechanism of action. The neurogenic phase (first phase) is probably a direct result of stimulation in the paw and reflects centrally mediated pain with release of substance P, while the late phase (second phase) is due to the release of histamine, serotonin, bradykinin and prostaglandins (Zeashana et al., 2009). Drugs that act primarily on the central nervous system, such as narcotics, inhibit both phases equally, while peripherally acting drugs such as anti-inflammatory non-steroidal and anti-inflammatory steroidal drugs only inhibit the late phase (García et al., 2004; Zeashana et al., 2009).

Previous results have shown that the formalin test involves the release of various inflammatory mediators (Hunnskaar & Hole, 1987). It is well known that NSAIDs (e.g., aspirin and diclofenac), which are known to inhibit cyclooxygenase (COX) activity, are largely ineffective or cause very weak inhibition against the early phase in the formalin test (Malmberg & Yaksh, 1992). Our results, however, show that XACC-1 administered via the intraperitoneal route induced a significant reduction in nociceptive response during both the neurogenic phase (64.23%) and the inflammatory phase (86.80%), while indomethacin, the aqueous fraction, and the ethanolic extracts caused significant inhibition of the inflammatory phase, and the chloroform fraction induced reduction only in the neurogenic phase of the formalin test in mice.

Another interesting result of the current study was the fact that XACC-1, the ethanolic extract and the acetate fraction inhibited cell migration in zymosan-induced peritonitis, confirming their anti-inflammatory activity. Zymosan A is an insoluble polysaccharide component of the cell wall of *Sacharomyces cerevisiae* yeast. Among other actions, zymosan induces mast cell degranulation and activates macrophages. When administered in the peritoneal cavity of mice, zymosan induces increased vascular extravasation, one of the main signs of inflammation. This is a key step in the formation of inflammatory exudate and is followed by a time-dependent recruitment of migratory cells, especially neutrophils (Doherty et al., 1985). There are many mediators that coordinate the initial events of acute inflammation, such as vasoactive amines, lipid-derived eicosanoids, chemokines, reactive oxygen species (ROS), nitric oxide, and cytokines.

In this test, the results showed that the ethanolic extract, ethyl acetate, hydromethanol fraction and XACC-1 of *X. americana* reduced the number of recruited cells, indicating that they contain active anti-inflammatory agents. When administered into the peritoneal cavity of mice, zymosan A induces an increase in vascular leakage, one of the primary signs of inflammation (Rao et al., 2006). In this model, pro-inflammatory cytokines, such as TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$ , activate the signaling pathway in endothelial cells, which regulates the expression of adhesion molecules to initiate the recruitment of both circulating leukocyte migrating cells and partially activated leukocyte cells (Leite et al., 2007).

Therefore, the ethanolic extract of stem bark, ethyl acetate, hydromethanol fractions and isolated XACC-1 of *X. americana* decreased leukocyte recruitment likely due to their ability to decrease production of pro-inflammatory cytokines. This probably occurs because flavonoids have an anti-inflammatory activity, which was verified by significant inhibition of inflammatory nociception in the formalin test. These data are consistent with results verified

by Soro & Sakande (2009) and Olabissi et al. (2011), when they respectively studied the antinociceptive activity of aqueous extract of stem bark and anti-inflammatory property of the aqueous ethanol of root bark of *X. americana*.

The inhibition of COX by flavonoids can occur indirectly or directly. Indirectly, flavonoids can inhibit COX by a combination of sequestrating free radicals and interaction with the functions of enzymes (Yamamoto & Nozaki-Taguchi, 1996). Multiple hydroxyl groups confer upon the molecule substantial antioxidant, chelating and pro-oxidant activity. Hydroxyl groups on the B-ring donate a hydrogen and an electron to the hydroxyl, peroxy, and peroxy nitrite radicals, stabilizing them and giving rise to a relatively stable flavonoid radical. Flavonoids with 5,7-*m*-dihydroxy arrangement in the A ring, such as XACC-1 described in this article, increase antioxidant effects and 5-OH enhances peroxy nitrite scavenging ability. The hydroxyl groups in positions 5 and 7 in the A ring, in combination with the 4-keto in the C ring give indications that isorhamnetin can inhibit NADPH-oxidase (Tjolsen et al., 1992; Nijveldt, 2001; Zeashana et al., 2009).

Free radical scavenging by flavonoids is highly dependent on the presence of a free 3-OH in the C-ring. The torsion angle of the B-ring with respect to the rest of the molecule strongly influences free radical scavenging ability. Flavonoids with a 3-OH are planar and this planarity permits conjugation, electron dislocation, and a corresponding increase in flavonoid phenoxyl radical stability (Tjolsen et al., 1992; Heim et al., 2002; Zeashana et al., 2009).

Directly, flavonoids can bind to COX and thereby inhibit the enzyme. As described in the literature, regarding the structural requirements of flavonoids for direct inhibition of PLA<sub>2</sub>, COX and LOX, it is the phenyl ring that is responsible for the inhibition of PLA<sub>2</sub>. The benzopyran ring is the portion which binds to COX, and both the ring and benzopyran hydroxyls at C5 and C7 of the A ring are the pharmacophore groups for inhibition of LOX (García et al., 2004).

As such, it was verified that the mechanisms of actions of antinociceptive and anti-inflammatory activities by XACC-1 involve the inhibition of COX using *in vitro* cyclooxygenase (COX) inhibition assays at a concentration of 0.2 µM. It was observed that XACC-1 inhibited COX-1 and COX-2. COX-2 is the inducible COX isoform expressed in inflammatory cells and tissues in response to cellular activation by endotoxins, cytokines, mitogens and other stimuli (Hunskar & Hole, 1987; Yang et al., 2008).

These data suggest that XACC-1, the aqueous fraction and the ethanolic extracts have antinociceptive and anti-inflammatory actions. This effect of the XACC-1 flavonoid occurs at least in part due to COX inhibition, and consequently, decreased prostaglandin synthesis. Also, it is reasonable to assume that the XACC-1 and the chloroform fraction may act in other ways, considering the action evidenced in the first phase of the formalin test.

Unpublished findings of our group also demonstrate that the treatment of mice with *X. americana* extracts, fractions or XACC-1 produces no changes in behavior, such as the appearance of involuntary movements, piloerection, stimulatory or sedative effects, respiratory depression or gastric toxic effects.

## 5. Conclusions

In conclusion, this study has shown that the extract, fractions and XACC-1 isolated from *X. americana* possess significant antinociceptive and anti-inflammatory effects in mice at the doses investigated. Our results support the traditional use of this plant for some painful and inflammatory conditions, and its activity is attributed to the flavonoid (XACC-1) reported here which is present in the ethyl acetate fraction of the stem bark extract of the plant. Furthermore, the antinociceptive and anti-inflammatory actions demonstrated in the present study support, at least partially, the ethnomedicinal uses of this plant.

### Acknowledgements

The authors are thankful to CNPq, FAPEAL, CAPES and IM-INOVAR (Project #420015/05-1) for their financial support and fellowship, and to Dr. Maria Edilene Alencar for plant identification.

### References

- Alexandre-Moreira, M.S.; Piuvezam, M.R.; Araújo, C.C.; Thomas, G. (1999). Studies on the anti-inflammatory and analgesic activity of *Curatella americana* L. *J. Ethnopharmacol.* 67, 171–177.
- Aquino, A.B., Cavalcante-Silva, L.H., Matta, C.B., Epifânio, W.A., Aquino, P.G., Santana, A.E., Alexandre-Moreira, M.S., Araújo-Júnior, J.X. (2013). The antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Aspidosperma tomentosum* (Apocynaceae). *Scientific World Journal* 2013, 218627.
- Braga, R., (1960). *Plantas do Nordeste Especialmente do Ceará*, fourth ed. Editora Universitária, Natal.
- Calixto, J.B. (2005). Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin American. *J. Ethnopharmacol.* 100, 131–134.
- Collier, H.O.J.; Dinneen, J.C.; Johnson, C.A.; Schneider, C. (1968). The abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. *Brit. J. Pharm. Chemoth.* 32, 295–310.
- Da-Silva, A.D., Cavalcante-Silva, L.H., da Matta, C.B., Silva, D.F., Araújo, M.V., Tavares, J.F., da Silva, M.S., Alexandre-Moreira, M.S. (2013). Antinociceptive effect of 7-methoxyflavone isolated from *Zornia brasiliensis*. *Nat. Prod. Res.* 27, 1695-1699.
- Deraedt, R., Jouquey, S., Delevallee, F., Flahaut, M. (1980). Release of prostaglandins E and F in an algogenic reaction and its inhibition. *Eur. J. Pharmacol.* 61, 17–24.
- De Queiroz, A.C., Lira, D.P. Freire-Dias, T.L.M., Souza, E.T., Matta, C.B.B., Aquino, A.B., Silva, L.H.A.C., Silva, D.J.C., Mella, E.A.C., Agra, M.F., Barbosa-Filho, J.M., Araújo-Júnior, J.X., Santos, B.V., Alexandre-Moreira, M.S. (2010). The antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Piptadenia stipulacea* Benth. (Fabaceae). *J. Ethnopharmacol.* 128, 377-383.
- De Queiroz, A.C., Alves, H.S., Cavalcante-Silva, L.H., Dias, T.L.M.F., Santos, M.S., Melo, G.M., Campesatto, E.A., Chaves, M.C., Alexandre-Moreira, M.S. (2014). Antinociceptive and antiinflammatory effects of flavonoids PMT1 and PMT2 isolated from *Piper montealegreanum* Yuncker (Piperaceae) in mice. *Nat. Prod. Res.* 28, 403-406.
- Doherty, N.X., Poubelle, P., Borgeat, P., Beave, T.H., Westrich, G.L., Schrader, N.L. (1985). Intraperitoneal injection of zymosan in mice induces pain, inflammation and the synthesis of peptidoleukotrienes and prostaglandin E2. *Prostaglandins.* 30, 769–789.

- Duarte, J.D.G., Nakamura, M., Ferreira, S.H. (1988). Participation of the sympathetic system in acetic acid induced writhing in mice. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 21, 341–343.
- Eddy, N.B., Leimbach, D., (1953). Synthetic analgesics. II. Dithienylbutenyland dithienylbutylamines. *J. Pharm. Exp. Ther.* 107, 385–393.
- Fatope, M.O., Adoum, O.A., Takeda, Y. (2000). C18 Acetylenic Fatty Acids of *Ximenia americana* with Potential Pesticidal Activity. *J. Agric. Food Chem.* 48, 1872-1874.
- García, M.D.; Fernández, M.A.; Alvarez, A.; Saenz, M.T. (2004). Antinociceptive and anti-inflammatory effect of the aqueous extract from leaves of *Pimenta racemosa* var. *ozua* (Mirtaceae). *J. Ethnopharmacol.* 91, 69–73.
- Heim, K.E., Tagliaferro, A.R., Bobilya, D.J. (2002). Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J. Nutr. Biochem.* 13, 572–584.
- Hunskar, S., Hole, K. (1987). The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain.* 30, 103–114.
- Ikeda, Y., Ueno, A., Naraba, H., Oh-Ishi, S. (2001). Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanoids in the acid-induced writhing responses of mice. *Life Sci.* 69, 2911–2919.
- Julius, D., Basbaum, A.I. (2001). Molecular mechanisms of nociception. *Nature* 413, 203–210.
- Kolaczowska, E., Seljelid, R., Plytycz, B. (2001). Role of mast cells in zymosan-induced peritoneal inflammation in Balb/c and mast cell-deficient WBB6F1 mice. *J. Leukoc. Biol.* 69, 33–42.
- Koster, R., Anderson, M., De Beer, E.J., (1959). Acetic acid for analgesic screening. *Fed. Proc.* 18, 418-420.
- Leite, D. F. P.; Echevarria-Lima, J.; Ferreira, S.C.; Calixto, J.B.; Rumjanek V.M. (2007). ABCC transporter inhibition reduces zymosan-induced peritonitis. *J. Leukoc. Biol.* 82,630-637.
- Maikai, V. A., Maikai, B. V., Kobo, P. I. (2009). Antimicrobial properties of stem bark extracts of *Ximenia americana*. *J. Agri. Sci.* 1, 30–34.
- Malmberg, A.B., Yaksh, T.L. (1992). Antinociceptive actions of spinal nonsteroidal anti-inflammatory agents on the formalin test in the rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 263, 136–146.
- Miranda, F.G.G.; Vilar, J.C.; Alves, I.A.N.; Cavalcanti, S.C.H.; Antonioli, A.R. (2001). Antinociceptive and antiedematogenic properties and acute toxicity of *Tabebuia avellanadae* Lor. ex Griseb. inner bark aqueous extract. *BMC Pharmacol.* 1, 1-16.
- Miranda, A.S., Bispo-Júnior, W., Silva, Y.K.C., Alexandre-Moreira, M.S., Castro, R.P., Sabino, J.R., Lião, L.M., Lima, L.M., Barreiro, E.J. (2012). Design, Synthesis,

Antinociceptive and Anti-inflammatory Activities of Novel Piroxicam Analogues. *Molecules*, 17, 14126-14145.

Nijveldt, J. R. (2001). Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am. J. Clin. Nutr.* 74, 418–425.

Olabissi, O.A., Moussa, O., Moustapha, O., Edgard, Z. F., Eléonore, K., Marius, L., Pierre, G.I. (2011). Acute toxicity and anti-inflammatory activity of aqueous ethanol extract of root bark of *Ximenia americana* L. (Olacaceae). *Afr. J. Pharm. Pharmacol.* 5, 806-811.

Oliveira MSO ; Aquino, A. B. ; Silva D L ; Pedro G. V. Aquino ; Santos, M. S. ; Porfirio, A.P.R., Goulart, A.E., Santos, B.V.O., Alexandre-Moreira, M.S., Araújo-Júnior, J.X.(2012). Antinociceptive and anti-inflammatory activity of hydroalcoholic extracts and fractions from *Erythrina mulungu*. *Rev. Brasi. Farmacogn.* 2, 125-138.

Omer, M.E.F.A., Elnima, E.I. (2003). Antimicrobial Activity of *Ximenia americana*. *Fitoterapia*. 74, 122-126.

Parker, M.E., Chabot, S., Ward, B. J., Johns T. (2007). Traditional dietary additives of the Maasai are antiviral against the measles virus. *J. Ethnopharmacol.* 114, 146–152.

Pferschy-Wenzig, E.M., Bauer, R. (2015). The relevance of pharmacognosy in pharmacological research on herbal medicinal products. *Epilepsy Behav.* doi: 10.1016/j.yebeh.2015.05.037.

Rao, Y.R.; Fang, S.H.; Tzeng, Y.M. (2005) Anti-inflammatory activities of flavonoids isolated from *Caesalpinia pulcherrima*. *J. Ethnopharmacol.* 100, 249–253.

Ribeiro, R.A., Vale, M.L., Thomazzi, S.M., Paschoalato, A.B., Poole, S., Ferreira, S.H., Cunha, F.Q. (2000). Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. *Eur. J. Pharmacol.* 387, 111–118.

Santos, A.R.S., Vedana, E.M.A., Freitas, G.A.G. (1998). Antinociceptive effect of meloxicam, in neurogenic and inflammatory nociceptive models in mice. *Inflamm. Res.* 47, 302–307.

Sen, T., Samanta, S.K. (2015). Medicinal plants, human health and biodiversity: a broad review. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 147, 59-110.

Soro, T.Y., Traoré, F., Datte, J. Y., Nene-Bi, A. S. (2009). Antipyretic activity of aqueous extract from *Ximenia americana*. *Phytotherapie* 7, 297–303.

Soro, T.Y., Traore, F., Sakande, J. (2009). Analgesic activity of the aqueous extract from *Ximenia Americana*. *C. R. Biol.* 332, 371-377.

Tjolsen, A., Berge, O.G., Hunskaar, S., Rosland, J.N., Hole, K. (1992). The formalin test: an evaluation of the method. *Pain.* 51, 5-17.



Uddin, J., Rao, P., Praveen, N., Knaus, E.E. (2004). Design and synthesis of acyclic triaryl (Z)-olefins: a novel class of cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors. *Bioorgan. Med. Chem.* 12, 5929–5940.

Voss, C., Eyol, E., Frank, M., Von der Lieth, C.W., Berger, M.R. (2006). Identification and characterization of riproximin, a new type II ribosome-inactivating protein with antineoplastic activity from *Ximenia americana*. *FASEB.* 20, 334-345.

Yang, H., Zhang, J., Andreasson, K., Chen, C. (2008). COX-2 oxidative metabolism of endocannabinoids augments hippocampal synaptic plasticity. *Mol Cell Neurosci.* 37, 682–695

Zeashana, H.; Amresha, G.; Raoa, C.V.; Singhb, S. (2009). Antinociceptive activity of *Amaranthus spinosus* in experimental animals. *J. Ethnopharmacol.* 122, 492–496.

Zimmerman, M., (1983) Ethical guidelines for investigation of experimental pain in conscious animals. *Pain.* 16, 109-110.

**Table1.** Antinociceptive effect of the extract, fractions and XACC-1 isolated from *X. americana* on acetic acid-induced writhing in mice.

Group	Dose (mg/kg) or $\mu\text{mol/kg}^{\#}$	Number of abdominal constrictions (M $\pm$ S.E.M.)	Inhibition (%)
Control (vehicle)	---	44.40 $\pm$ 1.86	---
Dipyron <sup>#</sup>	100	6.50 $\pm$ 0.50**	85.60
Ethanollic Extract	100	0.80 $\pm$ 0.58**	98.20
Hydromethanol fraction	100	2.00 $\pm$ 2.00**	98.50
Hexane Fraction	100	3.40 $\pm$ 0.98**	99.60
Chloroform Fraction	100	0.20 $\pm$ 0.20**	95.00
Acetate fraction	100	2.20 $\pm$ 1,36**	95.30
XACC-1 <sup>#</sup>	100	0.67 $\pm$ 0.67**	98.50

<sup>a</sup>Number of animals; \*\* $p < 0.01$  (One-way ANOVA followed by the Dunnett's test); n = 8.

**Table 2.** Power and efficacy of Dipyrone and XACC-1 in acetic acid-induced writhing in mice.

Substances	Dose (ID) <sub>50</sub>	Maximum Effect
Dipyrone	29.27 µmol/kg	83.50%*
XACC-1	32.03 µmol/kg	99.60%*

Number of animals (7-8); \* $p < 0.05$  (One-way ANOVA followed by the Dunnett's test).

**Table 3.** Anti-inflammatory profile of XACC-1, ethanolic extract and fractions of *X. americana* in the formalin test.

Group	Dose (mg/kg) or µmol/Kg#	n <sup>a</sup>	1 <sup>st</sup> phase neurogenic <sup>b</sup> Time (s)	1 <sup>st</sup> phase Inhibition (%)	2 <sup>nd</sup> phase inflammatory <sup>b</sup> Time (s)	2 <sup>nd</sup> phase Inhibition (%)
Control (vehicle)	---	10	65.70 ± 2.48	---	207.40 ± 24.67	---
Indomethacin <sup>#</sup>	100	8	51.20 ± 4.78	21.32	104.00 ± 1.38**	49.86
XACC-1 <sup>#</sup>	100	8	23.50 ± 7.05**	64.23	27.38 ± 12.77**	86.80
Ethanolic Extract	100	10	51.60 ± 5.20	21.46	36.50 ± 14.68**	82.40
Acetate Fraction	100	8	60.43 ± 5.52	8.02	181.70 ± 24.88	12.40
Hexane Fraction	100	8	61.33 ± 2.65	6.65	169.30 ± 12.68	18.37
Chloroform Fraction	100	8	45.00 ± 2.86*	31.51	203.20 ± 23.43	2.03
Hydromethanol Fraction	100	8	62.00 ± 8.49	5.63	54.60 ± 27.10**	73.68

<sup>a</sup>Number of animals; <sup>b</sup>Values are expressed as mean ± S.E.M, \*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$  (One-way ANOVA followed by the Dunnett's test).

**Table 4** – Effects of the ethyl acetate fraction and XACC-1 of *X. americana* in the hot plate test.

Group	Mean latency in the hot plate test (s)				
	Pre-treatment (min)	Post-treatment (min)			
		30 min	60 min	90 min	120 min
Control	2.75 ± 0.46	2.50 ± 0.44	2.03 ± 0.37	4.24 ± 0.71	3.28 ± 0.78
Morphine	1.89 ± 0.55	9.03 ± 1.64*	7.40 ± 0.89*	5.39 ± 0.85*	2.58 ± 0.23
Acetate Fraction	5.87 ± 0.89	4.35 ± 0.39	4.89 ± 1.28	6.63 ± 1.84	5.56 ± 0.92
XACC-1	4.32 ± 0.94	3.25 ± 0.48	4.59 ± 0.66	5.17 ± 0.92	5.64 ± 1.3

Data represented as mean ± S.E.M, (%) – Percent inhibition of total hot plate response, number of animals = 8, \* $p < 0.05$  (One-way ANOVA).

## Legends of Figures

**Figure 1.** Chemical structure of XACC-1

**Figure 2.** Dose-response curves of XACC-1(XM-Catechin) (▲) and dipyrone(■) (all in doses of 1, 10, 30, 100 and 300 µmol/Kg, i.p.) in the acetic acid-induced writhing assay. Data expressed as the inhibition percentage of total writhings calculated from eight animals. \*\* $p < 0.01$  (One-way ANOVA followed by theDunnett’s test).

**Figure 3.** Effect of indomethacin and XACC-1 (XM-Catechin) (both 100 µmol/kg, i.p.), and the ethanolic extract and ethyl acetate fraction (both 100 mg/kg, i.p.) on cell migration. Data represent mean ± S.E.M. from at least six animals. \*\* $p < 0.01$ .

**Figure 4.** *In vitro* inhibition of COX-1/COX-2 sheep enzymes by XACC-1 and indomethacin, both at concentrations of 0.2 µM. Values are expressed as mean ± S.E.M; \*\*\* $p < 0.001$ , \*\* $p < 0.01$  when compared to the control group using one-way ANOVA followed by the Dunnett’s test; # $p < 0.05$  when compared to the treatment against COX-1 versus COX-2 using the *t* student test; ++ $p < 0.01$  when compared to the inhibition of the COX isoform by treatment with indomethacin versus XACC-1 using the *t* student test.

Figure 1

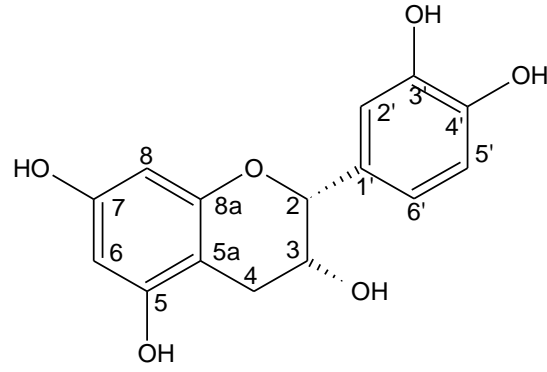


Figure 2

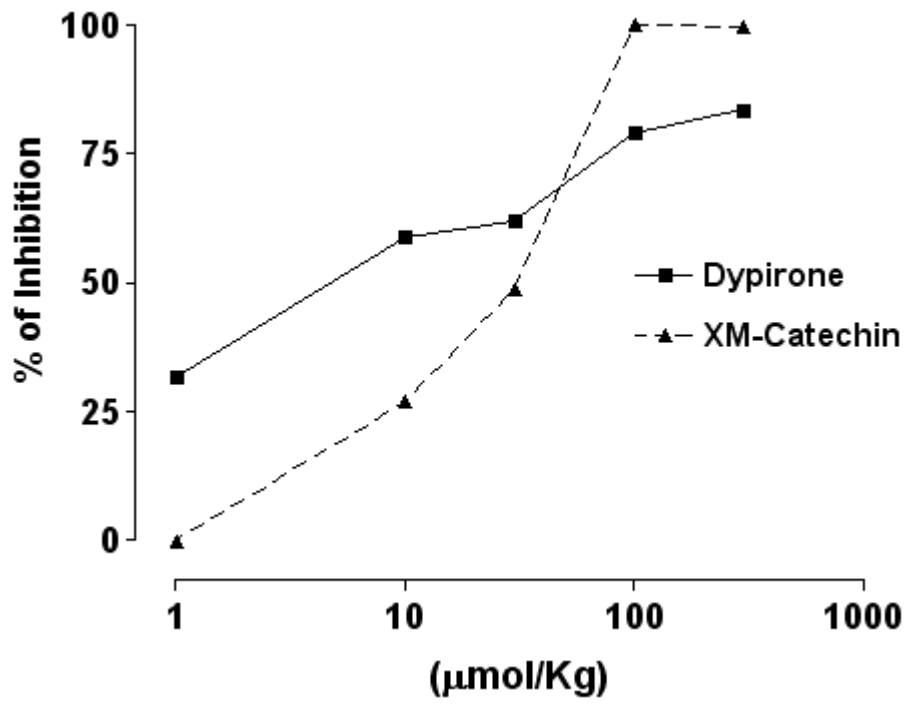


Figure 3

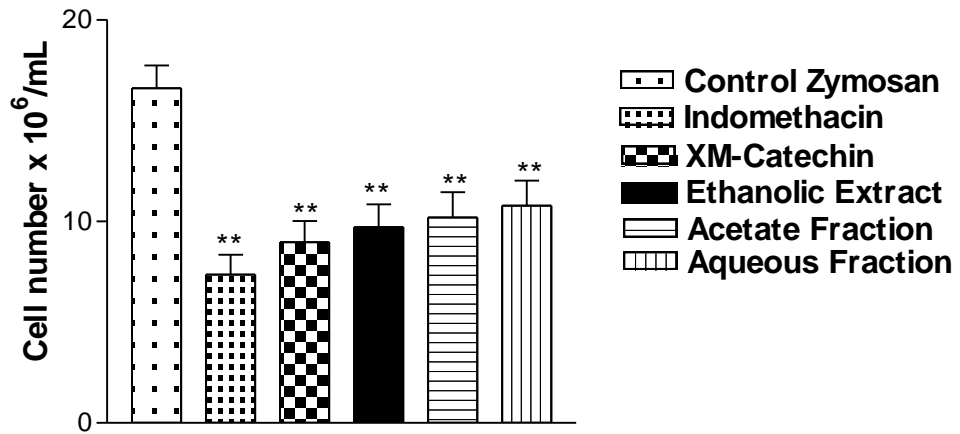
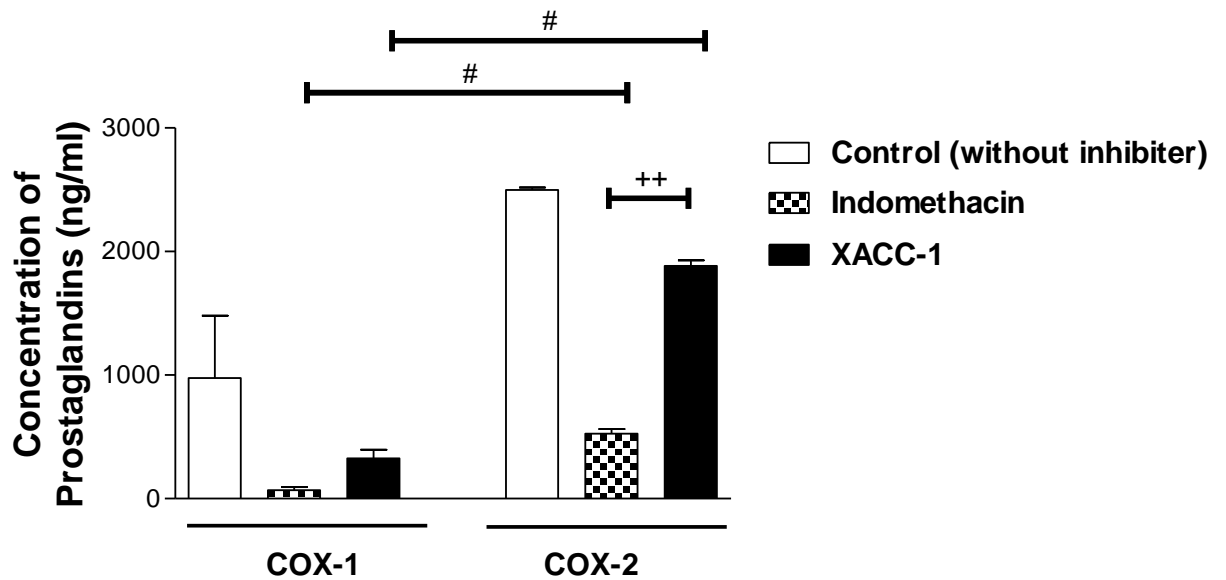


Figure 4



## 8 DISCUSSÃO

Há provas convincentes de que muitos produtos naturais com os seus princípios ativos utilizados na medicina tradicional podem ser úteis para o tratamento da dor ou condições inflamatórias (SEN; SAMANTA, 2015). O escopo deste trabalho concerne a avaliação em modelos funcionais de dor e inflamação *in vivo* e *in vitro* de produtos naturais oriundos da fauna e flora brasileira, bem como alguns isolados químicos (no caso, flavonoides). Entendendo-se que a análise da atividade antioxidante seja uma importante ferramenta nesta busca, tendo-se em vista o perfil oxidativo da resposta inflamatória. Neste sentido, foi realizado o estudo de dois flavonoides PMT1 e PMT2 isolados das partes aéreas da espécie *P. montealegreanum*, dos extratos etanólicos de diferentes períodos do geoprópolis e suas respectivas frações fenólicas, do extrato etanólico, frações (acetato e metanólica) e o flavonoide tricetina do pólen, ambos (geoprópolis e pólen) produzidos pela espécie de abelha sem ferrão *M. subnitida*, bem como o extrato etanólico, frações (aquosa, clorofórmica, hexânica e acetato) e a epicatequina XACC-1 da casca do caule de *X. americana*.

Inicialmente, realizou-se o estudo da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória dos flavonoides PMT1 e PMT2 isolados de *P. montealegreanum*. PMT1 e PMT2 são flavonoides novos isolados pela primeira vez e a identificação desses compostos é importante do ponto de vista quimiotaxonômico para a família Piperaceae. Diferentes modelos animais foram utilizados para investigar os potenciais efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório desses dois flavonoides. Sabe-se que, embora o ensaio de contorções abdominais induzidas por ácido acético tenha pouca especificidade (por exemplo, os antidepressivos tricíclicos, anticolinérgicos, agentes anti-histamínicos e outros mostraram atividade neste teste), é um método muito sensível para a triagem de efeitos antinociceptivos de compostos (ALEXANDRE-MOREIRA et al., 1999; COOLIER; DINNEN; SCHNEIDER, 1968; GOZARIU; CADDEN et al., 2001; LE BARS).

Tem sido sugerido que o ácido acético atua através da liberação de mediadores endógenos que estimulam os neurônios nociceptivos que são sensíveis aos AINEs e aos opioides (COOLIER; DINNEN; SCHNEIDER, 1968; DERAEDT et al., 1980). As vias de transmissão mais importantes para a nocicepção nesse modelo compreendem canais iônicos sensíveis a ácidos e mediadores endógenos, tais como a bradicinina, a serotonina, a histamina, a substância P, as citocinas e as PGs (COOLIER; DINNEN; SCHNEIDER et al., 1968; DERAEDT et al., 1980; FEIN 2009; IKEDA et al., 2001; JULIUS; BASBAUM, 2001; RIBEIRO et al., 2000). Além disso, verificou-se que a administração intraperitoneal de ácido

acético induz a liberação não só de PGs, mas também de mediadores do sistema nervoso simpático (DUARTE; NAKAMURA; FERREIRA,1988; IKEDA et al., 2001; RIBEIRO et al., 2000).

Os resultados apresentados na Figura 2 do Artigo 1 mostram que PMT1 e PMT2 (0,1; 1; 30 e 100  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.) produziram uma inibição de contorções abdominais induzidas por ácido acético de forma dose dependente, com valores  $\text{DI}_{50}$  de 0,58  $\mu\text{mol/kg}$  (efeito máximo de 80,6%) e 0,44  $\mu\text{mol/kg}$  (efeito máximo de 77,6%), respectivamente. Visando uma maior comparação, a dose inibitória de 50% ( $\text{DI}_{50}$ ) da dipirona também foi calculada em 32,4  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p. (efeito máximo de 87,8%), indicando que os dois flavonoides foram mais potentes do que a do fármaco padrão utilizado.

Além disso, tem sido relatado que outros flavonoides são capazes de diminuir a nocicepção induzida por ácido acético (SILVA et al. 2013). Por exemplo, Meotti et al. (2006) demonstraram que o flavonoide miricitrina, por via i.p., inibe as contorções abdominais induzidas por ácido acético de forma semelhante ao PMT1 e PMT2.

A fim de avaliar um possível efeito antinociceptivo central de PMT1 e PMT2, o teste da placa quente foi realizado. Este ensaio é utilizado para avaliar analgésicos narcóticos, como opioides; no entanto, outras drogas que atuam centralmente, incluindo sedativos e relaxantes musculares, mostraram atividade neste teste (LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001). Ao contrário de opioides, a indometacina e outros AINEs não produzem qualquer efeito no teste da placa quente (MIRANDA et al., 2012; SANTOS; VEDANA; FREITAS, 1998).

Os tratamentos de camundongos com PMT1 e PMT2 (100  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.) não induziram aumento significativo no tempo de latência dos animais na placa quente, sugerindo que estes flavonoides não modulam a resposta supra-espinhal, ao contrário da morfina, a qual induziu um efeito antinociceptivo significativo no ensaio de placa quente. De um modo semelhante, Queiroz et al. (2010) também avaliou o efeito central de outro flavonoide (galeatina 3,6-dimetil éter) utilizando o teste da placa quente e encontrou resultados semelhantes aos obtidos no presente estudo.

Posteriormente, realizou-se o teste de formalina, o qual induz uma resposta bifásica de nocicepção: a fase neurogênica, que geralmente dura 5 min e é ocasionada pela estimulação dos nociceptores (LE BARS; GOZARIU; CADDEN, 2001) e a fase inflamatória, que está associada com o extravasamento de plasma e liberação de mediadores inflamatórios (NEGUS et al., 2006). Acredita-se que o teste de formalina represente um modelo válido para a dor clínica (TJOLSEN et al., 1992). É um método muito útil não só para avaliar substâncias



antinociceptivas, mas também é uma importante ferramenta na elucidação do mecanismo de ação de tais substâncias. A fase neurogênica (primeira fase) é um resultado direto da estimulação na pata pela formalina e reflete a nocicepção mediada centralmente pela liberação de substância P; enquanto a fase tardia (segunda fase) é devido à liberação de histamina, serotonina, bradicinina e PGs (ZEASHANA et al., 2009). Os fármacos que atuam principalmente no sistema nervoso central, tais como narcóticos, inibem ambas as fases da mesma forma, enquanto fármacos que atuam periféricamente (como anti-inflamatórios esteroidais e não-esteroidais) inibem somente a fase inflamatória (EL HABAZI, et al., 2006; GARCIA et al., 2004; ZEASHANA et al., 2009).

Neste ensaio, PMT1 e PMT2 (100  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.) inibiram a fase neurogênica em 29,9% e 46,4%, respectivamente. No entanto, observou-se que apenas PMT2 causou uma inibição significativa da fase inflamatória de 83,65% (Figura 3 do Artigo 1). O fato de PMT1 atuar apenas na fase neurogênica pode estar relacionado com o antagonismo do receptor de SP (SANTOS; CALIXTO, 1997), sem agir em vias que envolvam mediadores inflamatórios liberados na segunda fase, ao contrário de PMT2, que age somente na fase inflamatória do teste de formalina.

O edema da orelha induzido por capsaicina foi outro modelo clássico usado para avaliar as atividades anti-inflamatórias dos flavonoides. A capsaicina (8-metil-N-6-vanililnonenamida), o componente pungente de pimentas vermelhas do gênero *Capsicum*, é uma ferramenta farmacológica usada para evocar respostas inflamatórias agudas neurogênicas, tais como vasodilatação, extravasamento de plasma e sensibilização dolorosa (INOUE; NAGATA; KOSHIHARA, 1993). Neste ensaio, a inflamação foi significativamente reduzida pelo pré-tratamento com PMT1 e PMT2 (100  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.), que mostraram uma inibição de 44,6% e 57,9%, respectivamente (Figura 4 do Artigo 1). Os resultados demonstram que PMT1 e PMT2 reduziram significativamente o edema de orelha induzido por capsaicina, indicando que estes flavonoides tem efeito anti-inflamatório. Este resultado está de acordo com Aquino et al. (2013), que avaliou o efeito antinociceptivo de outro flavonoide (isoramnetina) nas mesmas condições experimentais.

Sabe-se que a relação estrutura-atividade de flavonoides é bem documentada na literatura científica para atividade anti-inflamatória (GAUTAM; JACHAK, 2009). Desta forma, observa-se que ambos os flavonoides PMT1 e PMT2 possuem um grupo hidroxila no anel B. PMT2, que mostrou atividade anti-inflamatória maior do que PMT1 e foi ativo na segunda fase do teste de formalina, apresenta também ligação dupla entre C7 e C8, além de ter OH na posição 4 e 6 no anel A. Além disso, o anel C de PMT1 apresenta-se como um

heterocíclico saturado, o que gerou a conseqüente falta de conjugação entre os anéis A e B, diminuindo provavelmente o potencial antioxidante desse flavonoide em relação a PMT2 (VAYA et al., 2003). Finalmente, como chalconas, PMT2 também possui ligações duplas conjugadas e um sistema de elétrons em  $\pi$  completamente deslocados em ambos os anéis de benzeno. Moléculas que possuem esse sistema têm potencial redox relativamente baixos e têm maior probabilidade de sofrer reações de transferência de elétrons (YADAV et al. 2011).

Com relação ao pólen coletado pela abelha *M. subnitida*, as análises palinológicas demonstraram tratar-se de um pólen monofloral tendo-se em vista a predominância do pólen de *Senna* sp. (94,5%). Os flavonoides encontrados em maiores quantidades foram: luteolina (363,9 mg/g pólen) seguido pela tricetina (136,9 mg/g pólen) e naringenina (82,4). taxifolina, apigenina e kaempferol apareceram em menores quantidades. Os flavonoides luteolina, tricetina e kaempferol foram relatados em amostras de pólen coletado por abelhas *Apis mellifera* e são de diferentes origens botânicas (FREIRE et al., 2012). Naringenina foi isolada do pólen de *Mimosa gemmulata* e a tricetina foi isolada do pólen de plantas da família Fabaceae; ambos os pólenes são coletados por abelhas *Melipona subnitida* (SILVA et al., 2006). A luteolina foi isolada do pólen da *Scoparia dulcis*, o qual é coletado por abelhas *Melipona rufiventris* (SILVA et al., 2009).

Alguns métodos tradicionais foram utilizados para avaliar o possível efeito antinociceptivo e anti-inflamatório do extrato etanólico, frações acetato de etila e hidrometanólica, bem como do flavonoide tricetina isolado do pólen. Há muitos relatos que caracterizam os flavonoides como potentes agentes antioxidantes e anti-inflamatórios, muita atenção tem sido dada à relação entre as propriedades antioxidantes e antiinflamatórias dos flavonoides (MEOTTI et al., 2006; NIJVELDT et al., 2001; UMAMAHESWARI; SANGEETHA, 2015; WILLAIN-FILHO et al., 2008).

A atividade antinociceptiva do extrato EtOH, frações AcOEt e MeO: H<sub>2</sub>O e do flavonoide tricetina isolado do pólen da abelha sem ferrão *M. subnitida* foi avaliada inicialmente utilizando-se o ensaio de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético em camundongos. Ueda e Yamazaki, 2002 avaliaram a atividade anti-inflamatória do flavonoide luteolina, um dos flavonoides identificados em maior quantidade no pólen da abelha jandaíra, a tricetina também foi avaliada (outro abundante flavonoide encontrado no pólen das abelhas inclusive sendo um dos objetos de estudo do presente trabalho). Corroborando com estes estudos todos os produtos testados produziram significativa inibição do número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético quando comparados ao grupo controle. O flavonoide tricetina, isolado da fração acetato de etila, revelou-se significativamente ativo em

comparação com o fármaco padrão dipirona (\*\*\*)  $P < 0,001$ ). Seguido pelo extrato etanólico (90,9%), fração hidrometanólica (88,6%), fração acetato de etila (93,0%), todos em uma dose de 100 mg/kg, e o flavonoide tricetina (89,6%) na dose de 100  $\mu\text{mol/kg}$  i.p. Como esperado, a dipirona (93,9%) também apresentou um significativo efeito antinociceptivo. Neste modelo, a dor é gerada por mediadores endógenos como bradicinina, histamina, SP e PGs que agem por estimulação de neurônios nociceptivos periféricos. Estas fibras são sensíveis a narcóticos, como morfina e AINES (COOLIER; DINNEN; SCHNEIDER 1968). A injeção intraperitoneal de ácido acético produz uma inflamação peritoneal (peritonite aguda), que causa a resposta caracterizada pela contração do músculo abdominal. Este modelo foi associado ao aumento de PGs no fluido peritoneal (DERAEDT et al., 1980).

Com relação aos resultados observados no ensaio de formalina, o flavonoide tricetina (100  $\mu\text{mol/kg}$  i.p.) e o fármaco padrão indometacina (30  $\mu\text{mol/kg}$  i.p.) induziram uma inibição significativa da primeira fase (dor neurogênica) do ensaio de dor induzida por formalina em patas de camundongos. Na segunda fase do teste (dor inflamatória), todos os produtos testados foram administrados por via intraperitoneal (100  $\mu\text{mol/kg}$ ) e induziram acentuada inibição quando comparados ao grupo controle. É importante ressaltar que o flavonoide tricetina (100  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.) revelou-se significativamente mais ativo que o fármaco padrão indometacina (100  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.) na fase inflamatória, com uma percentagem de inibição de 92,0% (\*\*\*)  $P < 0,001$ ). Além disso, o flavonoide tricetina apresentou um efeito muito maior na segunda fase, indicando um importante efeito na dor inflamatória.

Os efeitos inibitórios observados na segunda fase do teste de formalina (fase inflamatória), com o extrato, as frações e o flavonoide tricetina obtidos do pólen de abelhas *M. subnitida*, levou-nos a testar esses componentes no ensaio de edema de pata induzido por carragenina em camundongos, um modelo para a análise específica da atividade anti-inflamatória. O tratamento com o flavonoide tricetina (100  $\mu\text{mol/kg}$  i.p.) foi capaz de reduzir o edema de pata, um efeito observado em 240 min após a administração do agente flogístico carragenina. O fármaco padrão indometacina (10  $\mu\text{mol/kg}$  i.p.) e o flavonoide tricetina (100  $\mu\text{mol/kg}$ , i.p.) mostraram níveis de inibição de 38,8 e 49,6% (\*\*\*)  $P < 0,001$ , respectivamente. Sendo este estudo o primeiro a apresentar a atividade antioxidante e anti-inflamatória do pólen monofloral de *Senna sp.* coletado pelas abelhas jandaíra.

O ensaio de edema de pata induzido por carragenina em camundongos é amplamente utilizado para determinar a atividade anti-inflamatória (MORRIS, 2003; UMAMAHESWARI; SANGEETHA, 2015). Curiosamente, a fração acetato de etila e extrato etanólico não foram capazes de reduzir, de forma significativa, o edema de pata neste

modelo; apenas o flavonoide tricetina induziu significativa inibição da formação do edema de pata. A carragenina atua como agente flogístico ao deflagrar um processo inflamatório induzindo a liberação de PGs e o aumento dos níveis de NO (POSADAS et al., 2004).

Os resultados indicam que o efeito inibitório do flavonoide tricetina sobre o edema de pata induzido por carragenina é mais provavelmente devido à capacidade dos flavonoides de inibir enzimas importantes, tais como a ciclo-oxigenase na nocicepção e processos inflamatórios e por suas propriedades antioxidantes.

No estudo da atividade antinociceptiva de seis amostras de geoprópolis de *M. subnitida* coletados ao longo de três anos, os resultados, expostos na Figura 2A e na Tabela 1 do Artigo 2, demonstram que o extrato EtOH (100 mg/kg) induziu inibição de contorções abdominais induzidas por ácido acético de forma significativa ( $p < 0,05$ ), com efeito de 96,9% (amostra 5) a 100% (amostra 1). Além disso, as frações fenólicas (100 mg/kg) também inibiram o número de contorções abdominais na proporção de 71,4% (amostra 3) a 93,5% (amostra 5) (Figura 2B e Tabela 1 do Artigo 2). O fato dos extratos mostrarem ligeiramente uma maior atividade antinociceptiva em relação às frações fenólicas sugere que o geoprópolis contém outros compostos responsáveis por esta atividade, além de compostos fenólicos, os quais devem ser investigados quimicamente. No entanto, os resultados indicam também que a fração fenólica seja, provavelmente, a principal responsável por essa atividade. Não há relatos sobre a atividade antinociceptiva na literatura científica dos componentes identificados no geoprópolis produzido pelas abelhas da espécie *M. subnitida*. Sabe-se também que as seguintes espécies de plantas ocorrem na região e são possivelmente fontes de produção de resina coletadas pelas abelhas para a produção de própolis: *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Anacardiaceae), *Handroanthus impetiginosus* (Mart & DC) Mattos (Bignoniaceae), *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill. (Euphorbiaceae) e *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan (Fabaceae) (MAIA-SILVA et al., 2012).

O interesse em se investigar o potencial antinociceptivo e anti-inflamatório da casca do caule da espécie *X. americana* L., consiste, principalmente, no corrente uso terapêutico popular desta espécie, em diferentes regiões do mundo (BRASILEIRO, 2008). As cascas do caule são utilizadas em diversas doenças inflamatórias, e está relacionada a uma potente ação cicatrizante (VERAS; MORAIS, 2004). Na literatura encontramos poucos relatos, isolados, da atividade antinociceptiva, anti-inflamatória e antioxidante de alguns extratos desta espécie, sendo este o primeiro trabalho a correlacionar estas atividades utilizando não só o extrato etanólico, mas também as frações provenientes deste extrato e a epicatequina (XACC-1)

isolada da fração acetato de etila da casca do caule de *X. americana* L. (BRASILEIRO, 2008; SORO; TRAORE; SAKANDE, 2008).

Tendo em vista o vasto uso na medicina popular desta espécie, a primeira etapa do presente trabalho consistiu na avaliação da atividade antinociceptiva do extrato etanólico da casca do caule, todas as frações obtidas e a XACC-1 provenientes da espécie *X. americana* no ensaio de contorções abdominais induzidas por ácido acético. Os resultados obtidos evidenciaram que o extrato etanólico, todas as frações testadas e a XACC-1 provenientes da espécie *X. americana* L. possuem atividade antinociceptiva. O que corrobora com os achados de SORO; TRAORE; SAKANDE (2008) que testou o extrato aquoso da casca do caule de *X. americana* L. e observou a indução de uma significativa inibição do número de contorções abdominais na dose de 100 mg/Kg, que foi capaz de inibir em 61,1% o número de contorções abdominais. No presente estudo pudemos demonstrar que a XACC-1, flavonoide isolado da fração acetato, proveniente do extrato etanólico da casca do caule de *X. americana* L. foi capaz de inibir 98,5% das contorções abdominais, utilizando-se a dose de 100 µmol/Kg. O que sugere que flavonoides como a epicatequina XACC-1, sejam importantes substâncias promotoras desta atividade antinociceptiva ocasionada por alguns extratos e frações oriundos desta planta. Além disso, os resultados obtidos a partir da determinação da curva dose-resposta mostram que a potência da XACC-1 ( $DI_{50} = 32,0 \mu\text{mol/Kg}$ ) é comparável a do fármaco padrão dipirona ( $DI_{50} = 29,3 \mu\text{mol/Kg}$ ), entretanto a XACC-1 possivelmente apresenta uma maior eficácia, pois foi capaz de atingir um efeito inibitório máximo, superior ao verificado para o fármaco padrão. Do ponto de vista da terapêutica a eficácia é um parâmetro farmacológico mais importante que a potência tendo-se em vista que a finalidade primordial de um fármaco é a sua maior capacidade de resolução de uma determinada patologia causando o menor dano possível à saúde do paciente.

Embora o ensaio de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético represente um modelo de nocicepção periférica, o qual consiste de estímulos de alta intensidade e a resposta nociceptiva de curta duração, este não é um modelo específico, uma vez que diferentes classes de substâncias são ativas neste modelo, como anteriormente mencionado (HENDERSHOT; FORSAITH, 1959; TAKAHASHI; PAZ, 1987; YEN, 1985). Este fato demonstra que a interpretação da redução da dor através do estímulo pelo ácido acético deve ser efetuada de forma cautelosa em conjunto com outros testes.

O ensaio de formalina é um modelo válido e confiável de nocicepção, sensível para várias classes de fármacos analgésicos. Como anteriormente mencionado, a injeção de formalina produz resposta bifásica distinta: uma primeira fase mediada por substâncias

neurogênicas e que representa o efeito irritante da formalina nas fibras sensoriais do tipo C, ocasionando uma dor neurogênica; e uma segunda fase mediada por substâncias pró-inflamatórias, por exemplo, as PGs, ocasionando uma dor de origem inflamatória. Os analgésicos de ação central como os opioides inibem as duas fases, enquanto substâncias de ação periférica, como os anti-inflamatórios não-esteroides e glicocorticoides, inibem somente a segunda fase (HUNSKAAR; HOLE, 1987). Este modelo é útil para detectar analgésicos do tipo não-esteroides, além de ser capaz de dissociar a dor do tipo inflamatória e não-inflamatória. Além disso, permite avaliar em animais a dor contínua de intensidade moderada causada pela lesão do tecido e o papel dos sistemas endógenos na regulação da dor (TJOLSEN et al., 1992). Nossos dados mostram que a XACC-1 foi capaz de inibir as duas fases do experimento mostrando-se ativa tanto na dor neurogênica quanto na dor inflamatória, com uma porcentagem de inibição superior a do fármaco padrão indometacina. O extrato etanólico e a fração aquosa inibiram significativamente a segunda fase do experimento sugerindo que estes produtos podem induzir antinocicepção periférica como os AINEs.

Baseando-se nestes resultados podemos inferir que o efeito antinociceptivo da XACC-1 pode ser atribuído a inibição tanto das PGs como de outros mediadores envolvidos neste modelo. No trabalho de Soro, Traore e Sakande (2008) no que se refere ao ensaio de formalina utilizando-se o extrato aquoso da casca do caule de *X. americana* L. verificou-se que uma dose de 50 mg/Kg induziu uma inibição do tempo de lambida da pata em 66,6% na segunda fase, porém não induziu uma inibição significativa da primeira fase do experimento, mesmo quando na dose de 100 mg/kg, a mesma utilizada neste trabalho, o que leva a crer que a epicatequina possui um importante papel na atividade antinociceptiva quando a casca do caule da *X. americana* L. foi utilizada.

Soro, Traore e Sakande (2008) avaliaram também a atividade antinociceptiva central do extrato aquoso da casca do caule de *X. americana* L. Para esta finalidade utilizaram o teste de retirada da cauda (D'AMOUR; SMITH, 1941; GRAY; OSTERBERG; SCUTE, 1970) que assim como o ensaio de placa quente (KURAIISHI et al., 1983) avalia a antinocicepção central a partir da utilização do estímulo térmico. Os mecanismos utilizados nestes ensaios estão relacionados a uma atividade primária na medula espinhal como também a processamento em regiões superiores do sistema nervoso central (principalmente o córtex) (YAKSH; RUDY, 1977). Apresenta diversas vantagens como alta sensibilidade a potentes analgésicos e baixo dano tecidual. Assim como no trabalho de Soro, Traore e Sakande (2008) não foi evidenciada nenhuma atividade central significativa da casca do caule da *X. americana* L.

Com o objetivo de avaliar a atividade anti-inflamatória do extrato, frações e epicatequina provenientes da casca do caule de *X. americana* L. no que se refere à migração celular foi realizado o ensaio de peritonite utilizando Zymosan A.

O Zymosan A é um polissacarídeo constituinte da parede celular do fungo *Sacharomyces cerevisiae* capaz de induzir a degranulação de mastócitos, liberando aminas vasoativas como serotonina e histamina, ativar macrófagos e de gerar produtos do metabolismo do ácido araquidônico, além de ativar a via alternativa do sistema complemento. Quando administrado na cavidade peritoneal do camundongo induz um aumento no extravasamento vascular, um dos sinais preliminares da inflamação (BOUGHTON-SMITH; GHELANI, 1995; RAO; FANG; TZENG, 1994). Esta é uma etapa chave na formação do exsudato inflamatório e é seguida por um recrutamento tempo dependente de células, especialmente neutrófilos (DOHERTY et al., 1985). Citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\beta$ , ativam a via de sinalização em células endoteliais, a qual regula a expressão de moléculas de adesão para iniciar o recrutamento de leucócitos circulantes e células migratórias parcialmente ativadas. Foi demonstrado neste trabalho que o extrato etanólico, frações acetato e aquosa bem como a XACC-1 induzem efeitos inibitórios sobre o recrutamento celular (LEITE et al., 2007).

Os resultados de atividade anti-inflamatória encontrados podem ser explicados, ao menos em parte, pela presença de flavonoides presentes na casca do caule de *X. americana* L. que são descritos como capazes de bloquear síntese de LTs, importantes na quimiotaxia e síntese de PGs, que são importantes na gênese de inflamação e dor (MORROW; ROBERTS, 2001). Diversas atividades biológicas já foram demonstradas para os flavonoides, entre elas atividade antinociceptiva e anti-inflamatória (MIDDLETON; KANDASWAMI; THEOHARIDES, 2000; SHETTAR et al., 2015), bloqueio da PLA<sub>2</sub>, inibição direta de ciclooxigenases e/ou de lipooxigenases, importantes para o metabolismo do ácido araquidônico e geração de PGs e LTs (KWAK et al., 2003; LINDAHL; TAGESSON, 1997; MIDDLETON; KANDASWAMI; THEOHARIDES, 2000).

Galvez et al., (1995) avaliaram a atividade antioxidativa de vários flavonoides sobre a peroxidação de membrana de células de fígado de rato induzidas pelo sistema enzimático do ácido araquidônico. Todos os flavonoides testados foram capazes de inibir a peroxidação lipídica induzida por ácido araquidônico, os flavonoides que apresentaram melhores resultados, em ordem decrescente, foram: delphinidina, epicatequina, catequina, kaempferol, quercetina, luteonina, naringenina e apigenina.



A atuação de flavonoides como a epicatequina XACC-1 em processos inflamatórios pode ser explicada pela sua estrutura química (Figura 1 do Artigo 4). A configuração das hidroxilas no anel B é determinante no processo de eliminação dos radicais livres (HARBORNE; WILLIANS, 2000), um importante mecanismo pelo qual os flavonoides inibem a formação de metabólitos do ácido araquidônico como as PGs e LTs.

Além disso, verificou-se neste estudo que um dos mecanismos de ação antinociceptiva e anti-inflamatória por XACC-1 envolve a inibição da COX *in vitro*. Essa inibição da COX foi determinada através de ensaio colorimétrico de inibição de COX, utilizando-se uma concentração de 0,2  $\mu\text{M}$  de XACC-1. Observou-se que XACC-1 inibiu COX-1 e COX-2. A COX-2 é a isoforma induzível da COX e está expressa em células inflamatórias e tecidos em resposta à ativação celular por endotoxinas, citocinas, agentes mitogênicos e outros estímulos (HUNSKAAR; HOLE, 1987; YANG et al., 2008).

A inibição da COX por flavonoides pode ocorrer diretamente ou indiretamente. Indiretamente, flavonoides podem inibir COX por uma combinação sequestro de radicais livres e interferência com as funções de enzimas (YAMAMOTO; NOZAKI-TAGUCHI, 1996). Vários grupos hidroxila conferem propriedades antioxidante, quelantes e atividade pró-oxidante substancial à molécula (NIJVELDT, 2001; TJOLSEN et al, 1992; ZEASHANA et al., 2009). A XACC-1 possui duas hidroxilas no anel B, nas posições B-3 e B-4. Possuindo então uma considerável capacidade doadora de elétrons neste anel, e confere uma maior estabilidade ao radical formado. O arranjo espacial dos substituintes presentes na molécula é um fator que também contribui bastante para a atividade antioxidante deste composto (HEIM; TAGLIAFERRO; BOBILYA, 2002; MARTÍNEZ-FLÓREZ et al., 2002).

Os flavonoides também pode se ligar diretamente à COX e, assim, inibir a enzima. Como descrito na literatura que se refere aos requisitos estruturais dos flavonoides para a inibição direta de PLA<sub>2</sub>, COX e LOX, é o anel fenila que é responsável pela inibição de PLA<sub>2</sub>, já o anel benzopirano é a porção que se liga a COX, e tanto o do anel benzopirano como as hidroxilas em C5 e C7 do anel A são os grupos farmacofóricos para inibição de LOX (GARCÍA et al., 2004).

Estes dados sugerem que XACC-1, a fração aquosa e os extratos etanólicos tem ação anti-nociceptiva e anti-inflamatória. Este efeito do flavonoide XACC-1 ocorre, pelo menos em parte, devido à inibição da COX e, por conseguinte, pela diminuição da síntese de PG. Além disso, é razoável assumir que XACC-1 e a fração clorofórmio podem atuar em outras vias, visto que apresentaram atividade na primeira fase do teste de formalina. Embora a epicatequina XACC-1 isolada da casca do caule de *X. americana* L. tenha apresentado

atividade antinociceptiva, anti-inflamatória, possuindo uma ação inibitória sobre o recrutamento celular, não podemos excluir a participação de compostos adicionais nos extratos e frações testados.

Tendo em vista que as plantas medicinais são capazes de exercer sua atividade terapêutica pela ação de metabólitos secundários como o flavonoide epicatequina (QUINTANS-JÚNIOR, 2000), apesar dos diversos estudos realizados com extratos obtidos das folhas, caule, raiz e frutos da *X. americana* L. encontrados na literatura, poucos evidenciam a atividade de constituintes isolados desta espécie. Uma minuciosa pesquisa objetivando-se encontrar dados que confirmem a presença deste flavonoide na espécie *X. americana* L. comprovou apenas o isolamento do flavonoide epicatequina na raiz da variante *X. americana caffra* (Sond) Andler por Mwangi et al., (1993), dado que reforça a importância do presente trabalho no intuito de explicitar a ação de constituintes de plantas utilizadas na medicina popular. Portanto, nossos resultados podem contribuir para um melhor conhecimento desta planta medicinal e da ação farmacológica antinociceptiva e anti-inflamatória do extrato etanólico, frações bem como da epicatequina XACC-1 provenientes da casca do caule de *X. americana* L. Estudos adicionais ainda serão necessários para confirmar a utilidade desta espécie no tratamento da dor e inflamação.

## 9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante do exposto, os resultados obtidos permitem concluir que:

- A atividade antinociceptiva de PMT1 e PMT2 de *P. montealegreanum*, extratos etanólicos de diferentes períodos do geoprópolis e suas respectivas frações fenólicas, extrato etanólico, frações (acetato e metanólica) e o flavonoide tricetina do pólen, ambos (geoprópolis e pólen) produzidos pela espécie de abelha sem ferrão *M. subnitida* bem como o extrato etanólico, frações (aquosa, clorofórmica, hexânica e acetato) e a epicatequina XACC-1 de *X. americana* foi demonstrada através dos ensaios de contorções abdominais induzida por ácido acético e/ou nocicepção induzida por formalina.
- Nenhuma das frações, extratos ou isolados testados apresentaram atividade antinociceptiva central, verificada através do ensaio de placa quente;
- Verificou-se uma atividade anti-inflamatória de PMT1 e PMT2 de *P. montealegreanum* nos modelo de edema de orelha induzido por capsaicina;
- Foi observada uma atividade anti-inflamatória de XACC-1, o extrato etanólico e a fração acetato de etila e hidrometanólica, de *X. americana* no modelo de recrutamento celular induzido por Zymosan A;
- Foi observada uma atividade anti-inflamatória do flavonoide tricetina isolado do pólen coletado pela espécie de abelha sem ferrão *M. subnitida* no modelo de edema de pata induzido por carragenina;
- A epicatequina XACC-1, provenientes da *X. americana* L. induziu inibição de COX-1 e COX-2 *in vitro*.

O conjunto de resultados obtidos neste trabalho sustenta a afirmativa de que PMT1 e PMT2 de *P. montealegreanum*, o extrato etanólico e suas respectivas frações fenólicas de geoprópolis, o extrato etanólico, frações (acetato e metanólica) e o flavonoide tricetina isolado obtido do pólen, ambos (geoprópolis e pólen) produzidos pela espécie de abelha sem ferrão *M. subnitida* e o extrato etanólico, todas as frações testadas e a epicatequina XACC-1 de *X. americana* são capazes de modular a resposta nociceptiva. Sustenta também que PMT1 e PMT2 de *P. montealegreanum*, o flavonoide tricetina do pólen da *M. subnitida* e o extrato etanólico, frações acetato de etila e hidrometanólica e a epicatequina XACC-1 de *X. americana* são capazes de modular a resposta inflamatória aguda.

## REFERÊNCIAS

AKCAY, A.; NGUYEN, Q.; EDELSTEIN, C.L. Mediators of inflammation in acute kidney injury. **Mediators of Inflammation**, v.2009, p. 137072, 2009.

ALBERTINE, R. et al. Effects of different protocol doses of low power galliumaluminum-arsenate (Ga-Al-As) laser radiation (650 nm) on carrageenan induced rat paw edema **Journal of Photochemistry and Photobiology**, v.74, p. 101, 2004.

ALEXANDRE-MOREIRA, M.S. et al. Studies on the anti-inflammatory and analgesic activity of *Curatella americana* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 67, p. 171–177, 1999.

ALVES, H.S. **Investigação fitoquímica de partes aéreas de *Piper montealegreanum* Yuncker (Piperaceae)**. Dissertação – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2004.

AQUINO, A. B.etal. The antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Aspidosperma tomentosum* (Apocynaceae). **The Scientific World Journal**, V. 2013,p. 1–8,2013.

ARGOLO, A. C. C. et al. Antioxidant activity of leaf extracts from *Bauhinia monandra*, **Bioresource Technology**, v.95, p. 229-233, 2004.

AYOUB, S.S. et al. Acetaminophen-induced hypothermia in mice is mediated by a prostaglandin endoperoxide synthase 1 gene-derived protein. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, p. 11165-11169, 2004.

BALLOU, L.R. et al. Nociception in cyclooxygenase isozyme-deficient mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 97, p. 10272-10276, 2000.

BARNES, P.J. How corticosteroids control inflammation: Quintiles Prize Lecture. **British Journal of Pharmacology**, v. 148, p. 245-154, 2006.

BARROS, N. Manifestações clínicas da dor crônica e princípios do tratamento. **Dor diagnóstico e tratamento**, v. 1, p. 3-10, 2004.

BARSANTE, M. M. et al. Anti-inflammatory and analgesic effects of atorvastatin in a rat model of adjuvant-induced arthritis. **European Journal of Pharmacology**, v. 516, p. 282-289, 2005.

BASBAUM, A. et al. Cellular and molecular mechanisms of pain. **Cell**, v. 139, p. 267-284, 2009.

BASSO, L. A. et al. The use of biodiversity as source of new chemical entities against defined molecular targets for treatment of malaria, tuberculosis, and T-cell mediated diseases – a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, p. 475-506.2005.

BAVARESCO, L.; BERNARDI, A.; BATTASTINI, A. M. O.; Glicocorticoides: usos clássicos e emprego no tratamento do câncer. **Infarma**, v. 17, p. 58-60, 2005.

BEHLING, E.B. et al. Flavonoide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. **Alimentos e Nutrição**, v. 15, p. 285-292, 2004.

BINGHAM, S. et al. The role of the cyclooxygenase pathway in nociception and pain. **Seminars in Cell and Developmental Biology**, v. 17, p. 544-554, 2006.

BOUGHTON-SMITH, N. K.; GHELANI, A. Role of induced nitric oxide synthase and increased NO levels in zymosan peritonitis in the rat. **Inflammation Research**, v. 44, p. S149-S150, 1995.

BRAGA, R. **Plantas do Nordeste especialmente do Ceará**. 3 ed. Mossoró, 1976.

BRASIL. Ministério da Saúde RENISUS 2009. **Relação nacional de plantas medicinais de interesse ao SUS, Espécies vegetais**. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf>>. Acesso em: 20 de fevereiro de 2015.

BRASILEIRO, M. T. et al. **Padronização, atividade biológica e desenvolvimento de formas farmacêuticas semi-sólidas à base de *Ximenia americana* L.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2008.

BRUM-JÚNIOR, L. **Metodologias para avaliação de etoricoxibe por cromatografia líquida e espectrometria de massas**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Santa Maria, 2006.

BURIAN, M.; GEISSLINGER, G. COX-dependent mechanisms involved in the antinociceptive action of NSAIDs at central and peripheral sites. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 107, p. 139–154, 2005.

CALDER, P. C. Marine omega-3 fatty acids and inflammatory processes: Effects, mechanisms and clinical relevance. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1851, p. 469–484, 2015.

CALIXTO, J. B. et al. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part II. Modulation of pro-inflammatory cytokines, Chemokines and adhesion molecules. **Planta Médica**, v. 70, p. 93-103, 2004.

CALIXTO, J. B.; OTUKI, M. F.; SANTOS, A. R. Anti-inflammatory compounds of plant origin. Part I. Action on arachidonic acid pathway, nitric oxide and nuclear factor kappa B (NF-Kappa B). **Planta Médica**, v. 69, p. 973-983, 2003.

CALIXTO, J. B. Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: A personal view. **Journal Ethnopharmacology**, v. 100, p. 131-134, 2005.

CAMARGO, C.A. **Efeito da quercetina nas atividades fosfatásicas e seu efeito protetor na hepatotoxicidade induzida pelo acetaminofeno em camundongos**. Tese (Doutorado em Fisiologia na área de Biologia Funcional e Molecular) – Universidade Federal de Campinas, Campinas, 2007.

CAMPBELL, J. N.; MEYER, R. A. Mechanisms of neuropathic pain. **Neuron**, v. 52, p. 77–92, 2006.

CAPONE, M.L. et al. Pharmacodynamic of cyclooxygenase inhibitors in humans. **Prostaglandins Other Lipid Mediators**, v. 82, p. 85–94, 2013.

CARNEIRO, L. A. et al. Ciclooxigenase-2 e câncer: uma breve revisão. **Pesquisa Médica**, v. 2, p. 39-45, 2004.

CARVALHO, W.A.; LEMÔNICA, L. Mecanismos centrais de transmissão e de modulação da dor: atualização terapêutica. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 48, p. 221-241, 1998.

CARVALHO-JÚNIOR, R.J. Técnicas farmacológicas de tratamento da dor. **Dor é coisa séria**, v. 53, p. 21-24, 2006.

CATERINA, M.J. et al. The capsaicin receptor: a heat activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, v. 389, p.816-824, 1997.

CHAHAR, M. K. et al., Flavonoid: A versatile sources of Anticancer drugs. **Pharmacogn Rev.** v. 5, n. 9, p. 1–12, 2011.

CHANDRASEKHARAN, N. V. et al. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: Cloning, structure, and expression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, p. 13926-13931, 2002.

CHANG, H. M.; BUT, P. P. Pharmacology and applications of Chinese material medica. **World Scientific**, v. 1. 1986 and v. 2, 1987.

COOLIER, H. O. J.; DINNEN, L. C.; SCHNEIDER, C. The abdominal constriction response and its supression by analgesic drugs in mice. **British Journal of Pharmacology**, v. 32, p. 285-310, 1968.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**, v. 1, p. 241-256, 2009.

CUNHA, T. M. et al. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, p. 1755–1760, 2005.

CUNHA, T. M. et al. Dual role of hydrogen sulfide in mechanical inflammatory hypernociception. **European Journal of Pharmacology**, v. 590, p. 127–135, 2008.

D'AMOUR, F. E.; SMITH, D. L.; A method for determining loss of pain sensation. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 72, p. 74–79, 1941.

DERAEDT, R. et al. Release of prostaglandins E and F in an algogenic reaction and its inhibition. **European Journal of Pharmacology**, v.61, p. 17–24. 1980.

DICKENSON, A. H. Spinal cord pharmacology of pain. **Brazilian Journal Anaesthesiology** v. 75, p. 193-200, 1995.

DHAKA, A. et al. TRPV1 senses both acidic and basic pH. **The Journal of Neuroscience**, v. 29, p. 153-158, 2009.



DOHERTY, N. X. et al. Intraperitoneal injection of zymosan in mice induces pain, inflammation and the synthesis of peptidoleukotrienes and prostaglandin E2. **Prostaglandins**, v. 30, p.769–789, 1985.

DUARTE, J. D. G.; NAKAMURA, M.; FERREIRA, S. H. Participation of the sympathetic system in acetic acid induced writhing in mice, **Journal of Medical and Biological Research**, v. 21, p. 341–343, 1988.

DUCHENE, J.; AHLUWALIA, A. The kinin B<sub>1</sub> receptor and inflammation: new therapeutic target for cardiovascular disease. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 9, p. 125–131, 2009.

EL HABAZI, K. et al., Study on the antinociceptive effects of *Thimus broussonetti* Boiss extracts in mice and rats. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 107, p. 406-411, 2006.

EROMOSELE, C. O.; EROMOSELE, I. C. Fatty acid compositions of seeds oils of *Haematostaphis barteri* and *Ximenia Americana*. **Bioresourch Technology**, v. 82, p. 303-304, 2002.

FATOPE, M. O.; ADOUM, O. A.; TAKEDA, Y. C18 Acetylenic Fatty Acids of *Ximenia americana* with potential pesticidal activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 1872-4, 2000.

FEIN, A. **Nociceptors and the Perception of Pain**. Connecticut: University of Connecticut – Health Center, 2012.

FERNANDEZ, A.; BEZERRA, P. **Estudo fitogeográfico do Brasil**. Fortaleza: Stylus comunicações, 1990.

FERRANDIZ, M. L.; ALCARAZ, M. J. Antiinflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. **Inflammation Research**, v. 32, p. 283–288, 1991.

FERREIRA, D. T.; FACCIONE, M. Opiáceos, opióides de ação analgésica e antagonistas. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 26, p. 125-136, 2005.

FOGLIO, M.A. et al. Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. **Multiciência: Construindo a história dos produtos naturais**, v. 7, p. 10-28, 2006.

FREIRE, K. R. L. et al. Palynological origin, phenolic content and antioxidant properties of honeybeecollectedpollen from Bahia, Brazil. **Molecules**,v. 17, p.1652-1664, 2012.

FUJINO, H.; REGAN, J. W. Prostanoid receptors and phosphatidylinositol 3-kinase: a pathway to cancer? **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 24, 335-340, 2003.

FÜRST, Z. Central and peripheral mechanisms in antinociception: current and future perspectives. **Neuropsychopharmacologia Hungarica**, v. 10, p. 127-130, 2008.

GALLIN, J. I.; GOLDSTEIN, I. M.; SNYDERMAN, R. **Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates**. 2 ed. New York: Raven Press, 1992.

GALVEZ, J. et al. Flavonoid inhibition of enzymic and nonenzymic lipid peroxidation in rat liver differs from its influence on the glutathione- related enzymes. **Pharmacology**,v. 51, p. 127-133, 1995.

GARCÍA, M. D. et al. 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.

GAUTAM, R.; JACHAK, S. M. Recent developments in anti-inflammatory natural products. **Medicinal Research Reviews**, v. 29, p. 767–820,2009.

GEYID, A. et al. Screening of some medicinal plants of Ethiopia for their anti-microbial properties and chemical profiles, **Journal of Ethnopharmacology**, v.97, p. 421–427, 2005.

GRAIKOU, K. et al. Chemical analysis of Greek pollen - Antioxidant, antimicrobial and proteasome activation properties. **Chemistry Central Journal**, v.5, p.33, 2011.

GRAY, W. D.; OSTERBERG, A. C.; SCUTE, J. T. Measurement of the analgesic efficacy and potency of pentazocine by the D'Amour and Smith method. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 172, p. 154–162, 1970.

GREENE, S. A. Chronic Pain: Pathophysiology and Treatment Implications. **Topics in Companion Animal Medicine**. v. 25, n. 1, February, 2010.

GROSSER, T.; FRIES, S.; FITZGERALD, G.A. Biological basis for the cardiovascular consequences of COX-2 inhibition: therapeutic challenges and opportunities. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 116, p. 4-15, 2006.

HANSEN, M. **The Healing Power of Pollen and Other Products from the Beehive.** Thorsons Publishers, Wellingborough 1979.

HARBORNE, B. J.; WILLIAMS, A. C. Advances in flavonoids research since 1992. **Phytochemistry**, v. 55, p. 481-504, 2000.

HENDERSHOT, L. C.; FORSAITH, J. Antagonism of the frequency of phenylquinone induced writhing in the mouse by weak analgesics and non analgesics. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.125, p.237-240, 1959.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 13, p. 572–584, 2002.

HÉTU, P.O.; RIENDEAU, D. Cyclo-oxygenase-2 contributes to constitutive prostanoid production in rat kidney and brain. **Biochemical Journal**, v. 391, n. 391, p. 561–566, 2005.

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

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory pain. **Pain**, v. 30, p. 103-114, 1987.

HUTCHINSON, J.; DALZIEL, J. M. **Flora of West Tropical Africa.** T. Nelson and Sons. London, 1954.

INOUE, H.; NAGATA, N.; KOSHIHARA, Y. Profile of capsaicin-induced mouse ear oedema as neurogenic inflammatory model: comparison with arachidonic acid-induced ear oedema. **British Journal of Pharmacology**, v. 110, p. 1614–1620, 1993.

IKEDA, Y. et al. Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanoids in the acid-induced writhing responses of mice. **Life Sciences**, v. 69, p. 2911–2919, 2001.

IVERSEN, L. CHAPMAN, V. Cannabinoids: a real prospect for pain relief? **Current Opinion in Pharmacology**, v. 2, p. 50-55, 2002.

JAMES, D. B. et al. Phytochemical and Antimicrobial Investigation of the Aqueous and Methanolic Extracts of *Ximenia americana*. **Journal of the Medical Sciences**, v. 2, p. 284-288, 2007.

JAN, S.A. Introduction: Landscape of Opioid Dependence. **Journal of Managed Care Pharmacy**, v. 16, S4-S8, 2010.

JAYASHREE, B, et al.,. Antioxidant and antibacterial activity of new 3- methylflavones. Indian. **J. Heterocy. Chem.** v. 19, n. 3, p. 237-40, 2010.

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

JULIUS, D.; Mc CLESKEY, E. W. **Cellular and molecular properties of primary afferent neurons**. 5 ed. In: McMAHON S. B., KOLTZENBURG M., Textbook of pain, Wall & melzack's, Elsevier, 2006. p. 35-48.

KALIL-GASPAR, P. Neuropeptídeos na pele. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 74, p. 483-498, 2003.

KAWAHARA, K. et al. Prostaglandin E2-induced inflammation: Relevance of prostaglandin E receptors. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1851, p. 414-421, 2015.

KELLEY, W. N. et al. **Textbook of Rheumatology**, 4 ed. Philadelphia, W.B. Saunders, 1993.

KERR, W. Abelhas indígenas brasileiras (meliponíneos) na polinização e na produção de mel, pólen, geoprópolis e cera. **Inf. Agropecuaria**, v.13, p. 15-27, 1987.

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

KIELLAND, A.; CARLSEN, H. Molecular imaging of transcriptional regulation during inflammation. **Journal of Inflammation**, v. 7, p. 20, 2010.

KONÉ, W. M. et al. Tradicional medicine in North Cote-d.Ivoire: screening of 50 medicinal plants for antibacterial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.93, p. 43-49, 2004.

KRAYCHETE, D. C.; CALASANS, M. T. A.; VALENTE, C. M. L. Citocinas pró-inflamatórias e dor. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 46, p. 199-206, 2006.

KROYER, G.; HEGEDUS, N. Evaluation of bioactive properties of pollen extracts as functional dietary food supplement. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v.2, p.171-174, 2001.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO, N. **Robbins e Cotran: patologia: bases patológicas das doenças**. 7 ed. São Paulo: Elsevier, 2005.

KUMMER, C. L.; COELHO, T. C. R. B. Anti-inflamatórios Não-Esteroidais Inibidores da Ciclooxigenase 2 (COX-2): Aspectos Atuais. **Revista Brasileira de Anestesiologia**. v. 52, n. 4, p. 498-512, 2002.

KURAIISHI, Y. et al. Separate involvement of the spinal noradrenergic and serotonergic systems in morphine analgesia: the differences in mechanical and thermal algescic tests. **Brain Research**, v. 273, p. 245-252, 1983.

KWAK, W. J. et al. Papyriflavonol A from *Broussonetia papyrifera* inhibits the passive cutaneous anaphylaxis reaction and has a secretory phospholipase A(2)-inhibitory activity. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 26, p. 299–302, 2003.

LATREMOLIERE, A.; WOOLF, C. J. Central sensitization: A generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. **Journal of Pain**, v. 10, p. 895–926, 2009.

LAWRENCE, T.; WILLOUGHBY, D. A.; GILROY, D. W. Anti-inflammatory lipid mediators and insights into the resolution of inflammation. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, p. 787-795, 2002.

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

LEITE, D. F. P. et al. ABCC transporter inhibition reduces zymosan-induced peritonitis. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 82, p. 630-637, 2007.

LIMA-JÚNIOR, R. C. P. **Efeitos antinociceptivo da mistura de triterpenos pentacíclicos  $\alpha$ - e  $\beta$ -amirina em modelos de nocicepção visceral em camundongos**. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2005.

LINDAHL, M.; TAGESSON, C. Flavonoids as phospholipase A2 inhibitors: importance of their structures for selective inhibition of group II phospholipase A2. **Inflammation Research**, v. 21, p. 347–356, 1997.

LODYATO, V. I. et al. Novel (3,5-di-tert-butyl-2-hydroxy-phenylcarbomoyl)-alkanoic acids as potent antioxidants, **Biorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.14, p. 4253-4256, 2004.

LOBO, C.; MARRA, V. N.; SILVA, R. M. G. Crises dolorosas na doença falciforme. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, v. 29, p. 247-258, 2007.

MACHADO, H. et al. Flavonoides e seu potencial terapêutico. **Centro de Biologia da Reprodução da Universidade Federal de Juiz de Fora**, v. 26, p. 37, 2008.

MAIA-SILVA, C. et al. **Guia de plantas visitadas por abelhas na Caatinga**. Fortaleza: Fundação Brasil Cidadão, p.191,2012.

MATOS, F. J. A. Plantas medicinais: guia de seleção e emprego das plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil. **Imprensa Universitária**, Fortaleza: p. 122-124, 2007.

MARTÍNEZ-FLÓREZ, S. et al. Los flavonoids: propiedades y acciones antioxidants. **Nutrición Hospitalaria**, v. 17, p. 271-278, 2002.

MCINNES I. B.; SCHETT G. The Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis **N. Engl. J. Med.** v. 365, p. 2205, 2011.

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

MEHTA et al., Pharmacokinetic profile of phytoconstituent(s) isolated from medicinal plants—A comprehensive review. **J. Tradit. Complement. Med.** v. 5, n. 4, p. 207–227, 2015.

MEOTTI, F. C. et al. Analysis of the antinociceptive effect of the flavonoid myricitrin: evidence for a role of the l-arginine-nitric oxide and protein kinase C pathways. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 316, p. 789–796, 2006.

MEVY, J. P. et al. Composition of the volatile oil from the leaves of *Ximenia Americana L.* **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 34, p. 549- 553, 2006.

MIDDLETON, E. J. R.; KANDASWAMI, C. Y.; THEOHARIDES, T. C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacological Reviews**, v. 52, p. 673-751, 2000.

MIRANDA, F. G. G. et al. Antinociceptive and antiedematogenic properties and acute toxicity of *Tabebuia avellanedae* Lor. ex Griseb. inner bark aqueous extract. **BMC Pharmacology**, v. 1, p. 1–16, 2001.

MIRANDA, A.S. et al. Design, Synthesis, Antinociceptive and Anti-inflammatory Activities of Novel Piroxicam Analogues. **Molecules**, v. 17, p. 14126-14145, 2012.

MONTANARI, C.A.; BOLZANI, V.S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, v. 24, p. 105-111, 2001.

MORRIS, C. J. Carrageenan-induced paw edema in the rat and mouse. **Methods in Molecular Biology**, v. 225, p.115-221, 2003.

MORROW, J. D.; ROBERTS II, L. J. Autacóides e fator de ativação das plaquetas. In: GOODMAN & GILMAN. **As bases farmacológicas da terapêutica**. 11. ed. Rio de Janeiro: McGraw-Hill, p. 503-516, 2006.

MWANGI, J. W. et al. Polyphenols of *Ximenia americana* var. *caffra*. **Fitoterapia**, v. 65, p. 185, 1994.

NATHAN, C, DING, A. Nonresolving Inflammation. **Cell**. v. 140, n. 6, p. 871–882. March, 2010.

NEGUS, S. S. et al. Preclinical assessment of candidate analgesic drugs: recent advances and future challenges. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 319, p. 507–514, 2006.

NIJVELDT, J. R. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **American journal of clinical nutrition**, v. 74, p. 418–425, 2001.

NOGUEIRA-NETO, P. **Vida e criação de abelhas indígenas sem ferrão**. Nogueirapis, São Paulo, Brasil, 446pp. 1997.

ODONTUYA, G.; HOULT, J. R. S. HOUGHTON, P. J. Structure–activity relationship for anti-inflammatory effect of luteolin and its derived glycosides. **Phytotherapy Research**, v. 19, p. 782–786, 2005.

OGUNLEYE, D. S.; IBITOYE, S. F. Studies of antimicrobial activity and chemical constituents of *Ximenia americana*. *Trop. Journal of Pharmaceutical Research*, v. 2, p. 239-241, 2003.

OLIVEIRA, G. L. **Mecanismos envolvidos na antinociceção causada pela agmatina em camundongos**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade do Vale do Itajaí, 2005a.

OLIVEIRA, M. A. **Extração de polifenóis da semente de cacau (*Theobroma Cacao*)**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005b.

OMER, M. E. F. A.; ELNIMA, B. E. I. Antimicrobial activity of *Ximenia americana*. *Fitoterapia*, v. 74, p. 122–126, 2003.

ONG, C. K. S. et al. An Evidence-Based Update on Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs. *Clinical Medicine & Research*, v. 5, p.19-34, 2007.

ØYVIND, M. A.; KENNETH, R. M. **Flavonoids: chemistry, biochemistry, and applications**. 1º ed. Library of Congress Cataloging-in- Publication Data. 2006.

PARMAR, V. S. et al. Phytochemistry of the genus *Piper*. *Phytochemistry*, v. 46, n. 4, p. 597-673, 1997.

PATEL, J. M. A review of potential health benefits of flavonoids. *Lethbridge Undergraduate Research Journal*, v. 3, n. 2, 2008.

PESSON, P.; LOUVEAUX, J. Pollinisation et productions végétales. **Institut National de la Recherche Agronomique - INRA**, p.663, 1984.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*, v.63, p.1035-1042, 2000.

PIMENTEL, F. O. **Atividade antioxidante de *Byrsonima crassa* Nied. e *Byrsonima fagifolia* Nied. em modelos de indução de úlcera gástrica**. Dissertação (Mestrado em Farmacologia)- Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

PINTO, L. M. A.; PRADO, N. R. T.; CARVALHO, L. B. Propriedades, usos e aplicações da própolis. *Revista Eletrônica de Farmácia*, v. VIII, n. 3, p. 76 - 100, 2011.



- POSADAS, I. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclooxygenase-2 expression. **British Journal of Pharmacology**, v. 142, p.331-338, 2004.
- POTT, A.; POTT, V. J. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, Plantas do Pantanal; **Centro de Pesquisa Agropecuária do Pantanal, Corumbá – Mato Grosso**, 1994.
- POUNTOS, T. et al. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs: prostaglandins, indications, and side effects. **International Journal of Interferon, Cytokine and Mediator Research**, v. 3, p. 19–27, 2011.
- QUEIROZ, A. C. et al. The antinociceptive and anti-inflammatory activities of *Piptadenia stipulacea* Benth.(Fabaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 128, p. 377–383, 2010.
- QUIJANO-ABRIL, M. A.; CALLEJAS-POSADA, R.; MIRANDA-ESQUIVEL, R. Areas of endemismo and distribution patterns for Neotropical *Piper* species. **Journal of Biogeography**, v. 33, n. 7, p. 1266-1278, 2006.
- QUINTANS-JÚNIOR, L. J. et al. Avaliação da Atividade Anticonvulsivante de Plantas do Nordeste Brasileiro. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v.21, p. 179-184, 2002.
- RAJAKARIAR, R.; YAQOUB, M.M.; GILROY, D.W. Cox-2 in inflammation and resolution. **Molecular Interventions**, v. 6, p. 199- 207, 2006.
- RAO, Y. R.; FANG, S. H.; TZENG, Y. M. Anti-inflammatory activities of flavonoids isolated from *Caesalpinia pulcherrima*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 249–253, 2005.
- RATHEE, P. et al. Mechanism of action of flavonoids as anti-inflammatory agents: a review, *Inflamm. Allergy Drug Targets*, v. 8, p. 229–235, 2009.
- REGASINI, L. O. et al. Radical scavenging capacity of *Piper arboretum* and *Piper tuberculatum* (Piperaceae). **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 27, p. 900–903, 2008.
- RIBEIRO, R. A. et al. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 387, p. 111–118, 2000.
- RICHARDSON, J. D; VASKO, M. R. Cellular Mechanisms of Neurogenic Inflammation. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 302, p. 839-845, 2002.

ROCHA, S. M. A brief survey of the history of inflammation. **Agents Actions**. v. 43, p. 86-90, 1978.

ROUZER, C. A.; MARNETT, L. J. Cyclooxygenases: structural and functional insights. **Journal of Lipid Research**, v. 50, p. S29-S34, 2009.

SACANDE, M.; VAUTIER, H. *Ximenia americana* L. **Forest & Landse Denm**. v. 112, p. 1-2, 2006.

SALZBERG-BRENHOUSE, H. C. et al. Inhibitors of Cyclooxygenase-2, but Not Cyclooxygenase-1 Provide Structural and Functional Protection against Quinolinic Acid-Induced Neurodegeneration. **The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics**, v. 306, p. 218–228, 2003.

SANTOS, A. R. S.; CALIXTO, J. B. Further evidence for the involvement of tachykinin receptor subtypes in formalin andcapsaicin models of pain in mice. **Neuropeptides**,v. 31, p. 381–389, 1997.

SANTOS, A. R. S.; VEDANA, E. M. A.; FREITAS, G. A. G. Antinociceptive effect of meloxicam, in neurogenic and inflammatory nociceptive models in mice. **Inflammation Research**, v. 47, p. 302–307, 1998.

SANTOS, J. L. et al. Síntese e modelagem molecular do novo derivado indolinônico como candidato a anti-inflamatório COX-2 seletivo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.28, p.235-240, 2007.

SARAIVA, J. et al. Receptores Opioides e Pré-Condicionamento Isquêmico do Coração. **Revista Portuguesa de Cardiologia**, v. 23, p. 1317-1333, 2004.

SCAGNETTI, J.; LYGHEIM, L. **Bee Pollen: Nature's Miracle Health Food**. Wilshire Book Company, Hollywood. 1979.

SCHMID-SCHÖNBEIN, G. W. Analysis of Inflammation. **Annual Review of Biomedical Engineering**, v. 8, p. 93-151, 2006.

SEN, T.; SAMANTA, S. K. Medicinal plants, human health and biodiversity: a broad review. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v. 147, p. 59-110, 2015.

SERHAN, C. N.; CHIANG, N.; DALLI, J. The resolution code of acute inflammation: Novel pro-resolving lipid mediators in resolution. **Seminars in Immunology**, v. 27, p. 200–215, 2015.

SHETTAR, A. K. et al. Evaluation of in vitro antioxidant and anti-inflammatory activities of *Ximenia americana* extracts. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**. v. 5, n. 11, p. 918-923, 2015.

SILVA, R. R. et al. Efeito de flavonoides no metabolismo do ácido araquidônico. **Medicina**, v. 35, p. 127-133, 2002.

SILVA, T. M. S. et al. Chemical composition and free radical scavenging activity of pollen loads from stingless bee *Melipona subnitida* Ducke. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 19, p.507, 2006.

SILVA, T. M. S. et al. Chemical composition, botanical evaluation and screening of radical scavenging activity of collected pollen by the stingless bees *Melipona rufiventris* (Uruçumarela). **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 81, p. 173, 2009.

SILVA, A. D. et al. Antinociceptive effect of 7-methoxyflavone isolated from *Zornia brasiliensis*. **Natural Product Research**, v. 27, p. 1–5, 2013.

SILVA, G. R., et al., New molecular evidence for fragmentation between two distant populations of the threatened stingless bee *Melipona subnitida* Ducke (Hymenoptera, Apidae, Meliponini). **J. Hymenopt. Res.** v. 38, p. 1–9, 2014.

SMITH, E. M. et al, Prostanoids in health and disease. **Journal of Lipid Research**, v. 50, p.S423–S428, 2009.

SMITH, W. L.; URADE, Y.; JAKOBSSON, P. J. Enzymes of the cyclooxygenase pathways of prostanoid biosynthesis. **Chemical Reviews**, v. 111, p. 5821–5865, 2011.

SOFOWORA, A. Medicinal Plants and Traditional Medicine in Africa. **John Wiley and Sons Limited**, 1982.

SORO, T. Y.; TRAORE, F.; SAKANDE, J. Activité analgésique de l'extrait aqueux de *Ximenia americana* (Linné) (Olacaceae). **Comptes Rendus Biologies**, p. 1-7, 2008.

SOUZA, S. A. **Estudo químico e avaliação da atividade antioxidante da geoprópolis da abelha sem ferrão jandaíra (*Melipona subnitida ducke*)**. Dissertação (Mestrado em Química de Compostos Bioativos) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2012.

SUNG, C. S. et al. Intrathecal Interleukin- 1beta administration induces thermal hiperalgesia by activating inducible nitric oxide synthase expression in the rat spinal cord. **Brain Research**, v. 1015, p. 145-153, 2004.

SZALLASI, A.; BLUMBERG, P.M. Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanisms. **Pharmacology Review**, v. 51, p.159-211, 1999.

TABAS, I. GLASS, C. K. Anti-Inflammatory Therapy in Chronic Disease: Challenges and Opportunities. **SCIENCE**. v.339, 2013.

TAKAHASHI, R. N.; PAZ, M. M. Influence of naloxone on analgesic effects of antidepressants in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 20, p. 607-610, 1987.

TJOLSEN, A. et al. The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**, v. 51, p. 5-17, 1992.

TLASKALOVA-HOGENOVA, H. et al. Involvement of innate immunity in the development diseases. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1051, p. 787-798, 2005.

TRACEY, I; MANTYH, P. W. The Cerebral Signature for Pain Perception and Its Modulation. **NEURON**. v. 55. p. 377-391, 2007.

TREEDE, R. D. et al. Neuropathic Pain: redefinition and grading system for clinical and research purposes. **Neurology**. v. 70, p. 1630-1635, 2008.

TURNBULL, C. M. et al. Mechanism of action of novel NO-releasing furoxan derivatives of aspirin in human platelets. **British Journal of Pharmacology**, v. 148, p. 517-526, 2006.

TUROLLA, M.S.R.; NASCIMENTO, E.S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, p.289-306, 2006.

UCHOA, V. T. et al. Ação Moluscicida da Madeira do Caule da *Ximenia americana* L. **In 29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**. 2006.

UEDA, H.; YAMAZAKI, C.; YAMAZAKI, M. Luteolin as an anti-inflammatory and anti-allergic constituent of *Perilla frutescens*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 25, p.1197-1202, 2002.

ULUSOY, E.; KOLAYLI, S. Composição de fenólicos e propriedades antioxidantes de pólen apícola de Anzer. **Journal of Food Biochemistry**, v.38, p.73-82, 2013.

UMAMAHESWARI, S.; SANGEETHA K. S. S. Anti-Inflammatory Effect of Selected Dihydroxyflavones. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**. v. 9, n. 5, p. FF05-FF07, maio, 2015.

UNDAS, A.; BRUMMEL-ZIEDINS, K. E.; MANN, G. K. Antithrombotic properties of aspirin and resistance to aspirin: beyond strictly antiplatelet actions. **Blood**, v. 109, p. 2285-2292, 2007.

USTULIN, M. et al. Commercialized medicinal plants in the Mercado Municipal of Campo Grande-MS. **Rev.Bras.Farmacogn.** v. 19, n. 3, p. 805–813, 2009.

VARANDA, E.A. Atividade mutagênica de plantas medicinais. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 27, p.1-7, 2006.

VAYA, J. et al. Inhibition of LDL oxidation by flavonoids in relation to their structure and calculated enthalpy. **Phytochemistry**, v. 62, p. 89–99, 2003.

VERAS, A. O. M.; MORAIS, S. M. Análise dos Constituintes químicos de *Ximena americana* Linn. In: **IX Semana Universitária e XIII Encontro de Iniciação Científica da Universidade Estadual do Ceará**. 2004.

VERRI-JÚNIOR, W. A. et al. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development? **Pharmacology and Therapeutics**, v. 112, p. 116–138, 2006.

VIEGAS-JÚNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, p. 326-337, 2006.

VOSS, C.; EYOL, E.; BERGER, M. R. Identification of potent anticancer activity in *Ximena americana* aqueous extracts used by African traditional medicine. **Toxicology and Applied Pharmacology**. v. 211, p. 177-187, 2006.

WALDHOER, M.; BARTLETT, S. E.; WHISTLER, J. L. Opioid receptors. **Annual Review of Biochemistry**, v. 73, p. 953–990, 2004.

WANG, H. et al. Bradykinin produces pain hypersensitivity by potentiating spinal cord glutamatergic synaptic transmission. **Journal of the Society for Neuroscience**, v. 25, p. 7986-7992, 2005.

WEISS, U. Inflammation. **Nature**, v.454, p.427, 2008.

WERZ, O.; STEINHILBER, D. Therapeutic options for 5-lipoxygenase inhibitors. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 112, p. 701–718, 2006.

WILLAIN-FILHO, A. et al. Quercetin: further investigation of its antinociceptive properties and mechanisms of action. **Archives of Pharmacal Research**, v. 31, p. 713–721, 2005.

WU, J. T.; WU, L. L. Acute and Chronic Inflammation: Effect of the Risk Factor (s) on the Progression of the Early Inflammatory Response to the Oxidative and Nitrosative Stress. **Journal of Biomedical and Laboratory Science**, v. 19, p. 71-75, 2007.

YADAV, V. R. et al. The role of chalcones in suppression of NF-kB-mediated inflammation and cancer. **International Immunopharmacology**, v. 11, p. 295–309, 2011.

YAKSH, T. L.; RUDY, T. A. Studies on the direct spinal action of narcotics in the production of analgesia in the rat. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 202, n.2, p. 411-428, 1977.

YAMAMOTO, T.; NOZAKI-TAGUCHI, N. Analysis of the effects of cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 in spinal nociceptive transmission using indomethacin, a non-selective COX inhibitor, and NS-398, a COX-2 selective inhibitor. **Brain Research**, v. 739, n. 1-2, p. 104-110, 1996.

YANG, H. et al. COX-2 oxidative metabolism of endocannabinoids augments hippocampal synaptic plasticity. **Molecular and Cellular Neuroscience**, v. 37, p. 682–695, 2008.

YEN, S. Y. Potentiation of pentazocine antinociception by tripeleminamine in the rat. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 235, p. 683-689, 1985.

ZHANG, D.; HAMAUZU, Y. Phenolics, ascorbic acid, carotenoids and antioxidant activity of broccoli and their changes during conventional and microwave cooking. **Food Chemistry**, v. 88, p. 503-509, 2004.

ZEASHANA, H. et al. Antinociceptive activity of *Amaranthus spinosus* in experimental animals. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 122, p. 492–496, 2009.

**ANEXOS****Anexo A: Aprovação do Comitê de Ética da UFAL**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

**PARECER CONSUBSTANCIADO**

**PROJETO Nº 014/2013**

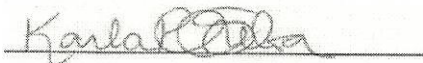
**TÍTULO:** Avaliação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória de novos derivados 3-amino-2-acilidrazonas-tiofeno

**RESPONSÁVEL:** Magna Suzana Alexandre Moreira

**OBJETIVO:** Avaliar o potencial antinociceptivo e anti-inflamatório de uma série de compostos planejados e sintetizados no LASSBio (Faculdade de Farmácia, UFRJ)

**SITUAÇÃO:** Aprovado

Maceió, 22 de janeiro de 2014.



Profª Karla Patrícia Chaves da Silva  
Coordenadora do CEUA, em exercício



**Anexo B: Artigos Publicados durante o doutorado**

1. SA Souza ; **DIAS, T. L. M. F.** ; TMG Silva ; RA Falcão ; Alexandre-Moreira M.S. ; EMS Silva ; CAMARA, C. A. ; SILVA, T. M. S. . Chemical composition, antinociceptive and free radical-scavenging activities of geopropolis from *Melipona subnitida* Ducke (Hymenoptera: Apidae: Meliponini). *Sociobiology*, v. 61, p. 560-565, 2015.
2. QUEIROZ, A. C. ; ALVES, H. S. ; CAVALCANTE, L. H. A. ; **DIAS, T. L. M. F.** ; SANTOS, M. S. ; MELO, G. M. A. ; CAMPESATTO, E. A. ; CHAVES, M. C. O. ; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S. Antinociceptive and anti-inflammatory effects of flavonoids PMT1 and PMT2 isolated from *Piper montealegreanum* Yuncker (Piperaceae) in mice. *Natural Products Research*, v. 2013, p. 1-4, 2014.
3. DE QUEIROZ, ALINE CAVALCANTI ; **DIAS, THAYS DE LIMA MATOS FREIRE** ; DA MATTA, CAROLINA BARBOSA BRITO ; CAVALCANTE SILVA, LUIZ HENRIQUE AGRA ; DE ARAÚJO-JÚNIOR, JOÃO XAVIER ; ARAÚJO, GIVANILDO BERNARDINO DE ; MOURA, FLÁVIA DE BARROS PRADO ; ALEXANDRE-MOREIRA, MAGNA SUZANA . Antileishmanial Activity of Medicinal Plants Used in Endemic Areas in Northeastern Brazil. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine (Online)*, v. 2014, p. 1-9, 2014.