

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS NATURAIS E EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
BIOQUÍMICA TOXICOLÓGICA

Gabriela de Campos Severo

**EXTRATO BRUTO DE *Hymenaea courbaril* L. APRESENTA
EFEITO ANTINOCICEPTIVO EM MODELOS DE DOR EM
CAMUNDONGOS**

Santa Maria, RS
2016

Gabriela de Campos Severo

**EXTRATO BRUTO DE *Hymenaea courbaril* L. APRESENTA EFEITO
ANTINOCICEPTIVO EM MODELOS DE DOR EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica**.

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Maribel Antonello Rubin
Co-orientadora: Prof^ª Dr^ª Sara Marchesan de Oliveira

Santa Maria, RS
2016

Gabriela de Campos Severo

EXTRATO BRUTO DE *Hymenaea courbaril* L. APRESENTA EFEITO ANTINOCICEPTIVO EM MODELOS DE DOR EM CAMUNDONGOS

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica.**

Aprovado em 29 de setembro de 2016:

Maribel Antonello Rubin, Dra (UFSM)
(Presidente/Orientadora)

Denis Broock Rosemberg, Dr (UFSM)

Flávia Karine Rigo, Dra (UNESC)

Santa Maria, RS

2016

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, meu agradecimento e gratidão a Deus e todos os bons espíritos que desde sempre me guiam e iluminam para que eu possa ir atrás dos meus objetivos.

Gostaria de agradecer a todos os professores e colegas que me ajudaram a trilhar este caminho de conhecimentos e amadurecimento, tanto pessoal quanto profissional, no período em que permaneci no LabNeuro.

As minhas professoras Maribel Antonello Rubin e Sara Marchesan Oliveira, o meu muito obrigada por todos os ensinamentos, e principalmente pela oportunidade de poder me juntar a este grupo de pesquisa e assim realizar o sonho de me tornar mestre.

Aos meus colegas, agradeço pelo companheirismo e pelas boas risadas que foram dadas nesse tempo em que compartilhamos, além de bons momentos, muitos aprendizados e ideias.

Meu eterno agradecimento a toda minha família, em especial aos meus pais Jaime Minini Severo e Lilian Campos Severo pelo companheirismo, amor e compreensão de sempre.

Agradeço também à Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas: Bioquímica Toxicológica pela oportunidade e ao CNPq pelo apoio financeiro.

RESUMO

EXTRATO BRUTO DE *Hymenaea courbaril* L. APRESENTA EFEITO ANTINOCICEPTIVO EM MODELOS DE DOR EM CAMUNDONGOS

AUTOR: Gabriela de Campos Severo
ORIENTADORA: Maribel Antonello Rubin
CO-ORIENTADORA: Sara Marchesan de Oliveira

Hymenaea courbaril L. (Fabaceae), popularmente conhecida no Brasil como "Jatobá", é uma espécie tropical da América do Sul. O gênero *Hymenaea* é comumente utilizado na medicina tradicional brasileira para o tratamento de inflamação, infecções bacterianas, reumatismo e anemia. Este estudo teve como objetivo, investigar o efeito antinociceptivo do extrato bruto da casca do caule de *H. courbaril* em um modelo de artrite reumatoide em camundongos. Para isto, foram utilizados camundongos Swiss machos adultos (maioria dos protocolos experimentais) e fêmeas (teste de toxicidade aguda) (25-30 g). Primeiramente, avaliamos o efeito antinociceptivo do extrato bruto de *H. courbaril* (HccE, 100 mg/kg, v.o.) e das suas frações acetato de etila (Eta, 100 mg/kg, v.o.) clorofórmio (Clo, 100 mg/kg, v.o.), e butanol (But, 100 mg/kg, v.o.) no teste da capsaicina. A artrite reumatoide foi induzida pela administração de adjuvante completo de Freund (CFA, do inglês *Complete Freund's adjuvant*; Mycobacterium tuberculosis, 1 mg/ml; 20 ul/pata), na superfície plantar da pata traseira direita do animal. Para avaliar o efeito antinociceptivo do HccE num modelo de artrite reumatoide (10-100 mg/kg, v.o.), foi utilizado o teste de von Frey. O antagonista de receptores opioides naloxona (2 mg/kg, i.p.) foi utilizado para investigar o possível envolvimento do sistema opioide no efeito antinociceptivo do HccE. Para avaliar a atividade antinociceptiva térmica do HccE, foi realizado o teste de imersão da cauda (tail-flick). Foram também realizados testes de atividade locomotora, lesão gástrica, trânsito gastrointestinal, temperatura corporal, para avaliar os possíveis efeitos adversos do tratamento com HccE, assim como testes para avaliar toxicidade. As frações HccE (100 mg/kg, v.o.), Clo e But (100 mg/kg, v.o.) causaram efeito antinociceptivo no teste da capsaicina. HccE (10-100 mg/kg, v.o.) causou efeito antinociceptivo no modelo de artrite reumatóide induzida por CFA, e naloxona não preveniu este efeito. No teste de tail-flick, HccE (100 mg/kg v.o.) aumentou a latência de retirada de cauda nos tempo de 1, 4 e 6 h. O HccE (100 mg/kg, v.o.) não alterou a atividade locomotora, temperatura corporal e função gastrointestinal, nem desenvolveu lesões gástricas. Estes resultados demonstram que *H. courbaril* tem efeito antinociceptivo num modelo de dor artrítica confirmando seu uso na medicina popular sem causar efeitos adversos.

Palavras-chave: alodínia; teste de von Frey; inflamação; Jatobá; plantas medicinais.

ABSTRACT

CRUDE EXTRACT OF *Hymenaea courbaril* L. PRESENTS ANTINOCICEPTIVE EFFECT IN PAIN MODELS IN MICE

AUTHOR: Gabriela de Campos Severo
ADVISOR: Maribel Antonello Rubin
CO-ADVISOR: Sara Marchesan de Oliveira

Hymenaea courbaril L. (Fabaceae), popularly known in Brazil as "Jatoba" is a tropical species of South America. *Hymenaea* genus is commonly used in Brazilian traditional medicine for the treatment of inflammation, bacterial infections, rheumatism and anemia. This study investigated the antinociceptive effect of crude extract from the bark of *H. courbaril* stem in a model of rheumatoid arthritis in mice. For this, adult male Swiss mice were used (most experimental protocols) and female (acute toxicity test) (25-30 g). First, we evaluate the antinociceptive effect of the crude extract of *H. courbaril* (HccE, 100 mg/kg, p.o.) and its fractions ethyl acetate (Eta, 100 mg/kg, p.o.) chloroform (Chlo, 100 mg/kg, p.o.), and butanol (But 100 mg/kg, p.o.) in the capsaicin test. Rheumatoid arthritis was induced by administration of complete Freund's adjuvant (CFA; Mycobacterium tuberculosis, 1 mg/ml; 20 ul/paw) into the plantar surface of the right hind paw of the animal. To evaluate the antinociceptive effect of HccE in the rheumatoid arthritis model (10-100 mg/kg, p.o.), von Frey test was used. The opioid antagonist naloxone receptor (2 mg/kg, i.p.) was used to investigate the possible involvement of opioid system in the antinociceptive effect of HccE. To evaluate the thermal nociceptive activity of HccE was performed the tail immersion test (tail-flick). They were also performed testing locomotor activity, gastric lesion, gastrointestinal transit, body temperature, to evaluate the possible adverse effects of treatment with HccE, as well as tests to assess toxicity. The HccE (100 mg/kg, p.o.), Chlo and But fractions (100 mg/kg, p.o.) caused antinociceptive effect in the capsaicin test. HccE (10-100 mg/kg, p.o.) caused antinociception in the CFA-induced rheumatoid arthritis model, and naloxone did not prevent this effect. In the tail-flick test, HccE (100 mg/kg p.o.) increased the tail withdrawal latency at 1, 4 and 6 h. The HccE (100 mg/kg, p.o.) neither alter locomotor activity, gastrointestinal function, and body temperature nor developed gastric lesions. These results demonstrate that *H. courbaril* has analgesic effect in an arthritic pain model confirming its use in folk medicine without causing adverse effects.

Keywords: allodynia; von Frey test; inflammation; Jatobá; medical plants.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Classificação da dor	13
Figura 2- Árvore <i>Hymenaea courbaril</i> L. (a), frutos na árvore (b) e frutos com a semente (c).....	21
Figura 3 - Conclusão ilustrativa dos efeitos do extrato bruto de <i>H. courbaril</i>	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINES	Anti-inflamatórios não esteroidais
AR	Artrite reumatoide
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
DMARDs	Drogas anti-reumáticas modificadoras do curso da doença
IFN- γ	Interferon Gama
CFA	Adjuvante Completo de Freund, do inglês <i>Complete Freund's Adjuvant</i>
CGRP	Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina, do inglês <i>Calcitonin gene-related peptide</i>
DRG	Gânglio da raiz dorsal, do inglês <i>Dorsal root ganglion</i>
HccE	Extrato bruto de <i>Hymenaea courbaril</i>
HTAB	Hexadeciltrimetilamônio
IL-1	Interleucina 1
IL-1 β	Interleucina 1 β
IL-6	Interleucina 6
IL-17	Interleucina 17
i.p.	Intraperitoneal
i.pl.	Intraplantar
mg/kg	Miligrama/quilograma
MMPs	Metaloproteinase de matriz, do inglês <i>matrix metalloproteinases</i>
MPO	Mieloperoxidase
PGs	Prostaglandinas
PWT	Latência de retirada de pata, do inglês <i>paw withdrawal threshold</i>
TMB	Tetrametilbenzidina
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral α , do inglês <i>Tumor Necrosis Factor α</i>
v.o.	Via oral

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
1.1 DOR.....	10
1.2 ARTRITE REUMATOIDE.....	14
1.2.1 Dor artrítica	15
1.3 TRATAMENTOS PARA ARTRITE REUMATOIDE	16
1.4 MODELO EXPERIMENTAL DE ARTRITE REUMATOIDE INDUZIDA POR CFA	17
1.5 PRODUTOS NATURAIS	18
2 OBJETIVOS	22
2.1 OBJETIVO GERAL.....	22
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	22
3 MANUSCRITO CIENTÍFICO	23
4 CONCLUSÕES.....	49
4.1 CONCLUSÕES PARCIAIS.....	49
4.2 CONCLUSÃO GERAL	49
5 PERSPECTIVAS.....	51
6 REFERÊNCIAS	52
7 CARTA DE ACEITE DO COMITÊ DE ÉTICA EM USO ANIMAL (CEUA)..	58

1 INTRODUÇÃO

1.1 DOR

A dor é considerada como uma experiência subjetiva do indivíduo, sendo composta por dimensões sensoriais, afetivas e cognitivas, fundamentalmente desagradáveis, que tem como objetivo proteger o organismo (NAVRATILOVA e PORRECA, 2014). Esta experiência é complexa e consciente, envolvendo não somente a transdução de estímulos nocivos, mas também cognitivos e emocionais processados pelo cérebro (JULIUS e BASBAUM, 2001, TRACEY, 2008).

A capacidade de detectar estes estímulos é essencial para a sobrevivência e bem-estar do organismo. Os processos neurais subjacentes à codificação e processamento dos estímulos nocivos são definidos como “nocicepção”, sendo um componente sensorial da dor e por isto, utilizada para avaliar a dor em modelos experimentais em animais. Neste processo, estímulos mecânicos, térmicos ou químicos são detectados por uma subpopulação de fibras nervosas, chamados de nociceptores. Estes são terminações nervosas livres de neurônios aferentes primários, sendo classificados como fibras A β e A δ ou C, que variam conforme sua mielinização e velocidade de condução do estímulo (WOOLF e MA, 2007; LOESER e TREEDE, 2008).

As fibras A β são neurônios mielinizados e de grande diâmetro, apresentando alta velocidade de condução a estímulos não-nocivos, portanto, não contribuindo para a dor. As fibras A δ , são neurônios de média mielinização e diâmetro, apresentando alta velocidade de condução ao local do estímulo doloroso, responsável pela sensação de dor rápida e aguda. Ainda, outra classe de nociceptores é constituída por fibras do tipo C, sendo neurônios de pequeno diâmetro e não mielinizados, apresentando velocidade de condução lenta do estímulo doloroso, regulando a dor lenta e pulsante. As fibras do tipo C podem ser peptidérgicas (liberam peptídeos como a Substância P e CGRP) ou não peptidérgicas (possuem receptores para a isolecitina B4 e para o fator neurotrófico derivado de células gliais). Tanto as fibras A δ quanto as fibras C estão envolvidas na nocicepção mecânica, térmica e química (BASBAUM et al., 2009; VOSCOPOULOS e LEMA, 2010). Os corpos celulares dos neurônios que inervam o tronco, os membros e as vísceras são encontrados no gânglio da raiz dorsal (DRG, do inglês *dorsal root ganglion*), enquanto que aqueles que inervam a cabeça, a cavidade oral e o pescoço estão no gânglio trigeminal e conduzem as informações nociceptivas até o corno dorsal

da medula espinhal e o núcleo trigeminal pars caudalis na ponte, respectivamente (MACINTYRE, 2010).

Estes nociceptores uma vez ativados são capazes de gerar potenciais de ação os quais são transmitidos ao corno dorsal da medula espinhal (principalmente lâminas I, II e V), através de neurônios aferentes primários de primeira ordem, onde irá ocorrer a liberação de neurotransmissores excitatórios como glutamato e substância P. Na sequência, estes neurotransmissores ativam neurônios de segunda ordem os quais conduzem as informações ao longo da medula espinhal para ascender no trato espinotalâmico, com fibras terminais localizadas predominantemente no tálamo. Após este sinal ter alcançado o tálamo, neurônios de terceira ordem são ativados, conduzindo o estímulo até o córtex somatossensorial, onde serão atribuídos os aspectos discriminativos-sensoriais da dor, podendo assim identificar o local e o tipo de estímulo doloroso. Desta maneira, é possível que ocorra a geração de uma resposta reflexa ao estímulo nocivo, com o intuito de afastar o membro afetado, da fonte do estímulo, ativando, então, um neurônio motor reflexo (MEYER et al., 2008, BASBAUM et al., 2009, GRACE et al., 2014). Igualmente, a percepção da dor pode ascender através de projeções do núcleo parabraquial e amígdala sendo convergidas para o córtex insular e córtex cingulado (via espinoparabraquial amigdalóide), podendo assim, ser atribuído o componente afetivo emocional associado à experiência dolorosa (BASBAUM et al., 2009). Os nociceptores são ativados quando as intensidades do estímulo forem nocivas, o que sugere que eles possuem propriedades biofísicas e moleculares que lhes permitem detectar seletivamente e responder aos estímulos potencialmente prejudiciais (MEYER et al., 2008).

Existem três maneiras distintas de diferenciar os tipos de dor (Figura 1). A dor nociceptiva ocorre como um sistema de proteção fisiológica e alerta essencial para detectar o contato com estímulos nocivos, tais como o calor e o frio, sendo um alto limiar de dor que se faz ativo somente em estímulos intensos (BASBAUM et al., 2009). O segundo tipo de dor é classificada como dor inflamatória, também adaptativa e protetora, que ocorre em decorrência de uma lesão tecidual e subsequente resposta inflamatória, causada pela ativação do sistema imunológico por lesão tecidual ou infecção, criando uma situação que desencoraja o contato físico e movimento do membro afetado e também auxilia na cicatrização da parte do corpo atingida (WOOLF, 2010). Além disso, o sistema nervoso central passa por mudanças em sua capacidade de resposta, onde estímulos normalmente inócuos passam a provocar dor (alodínia) e

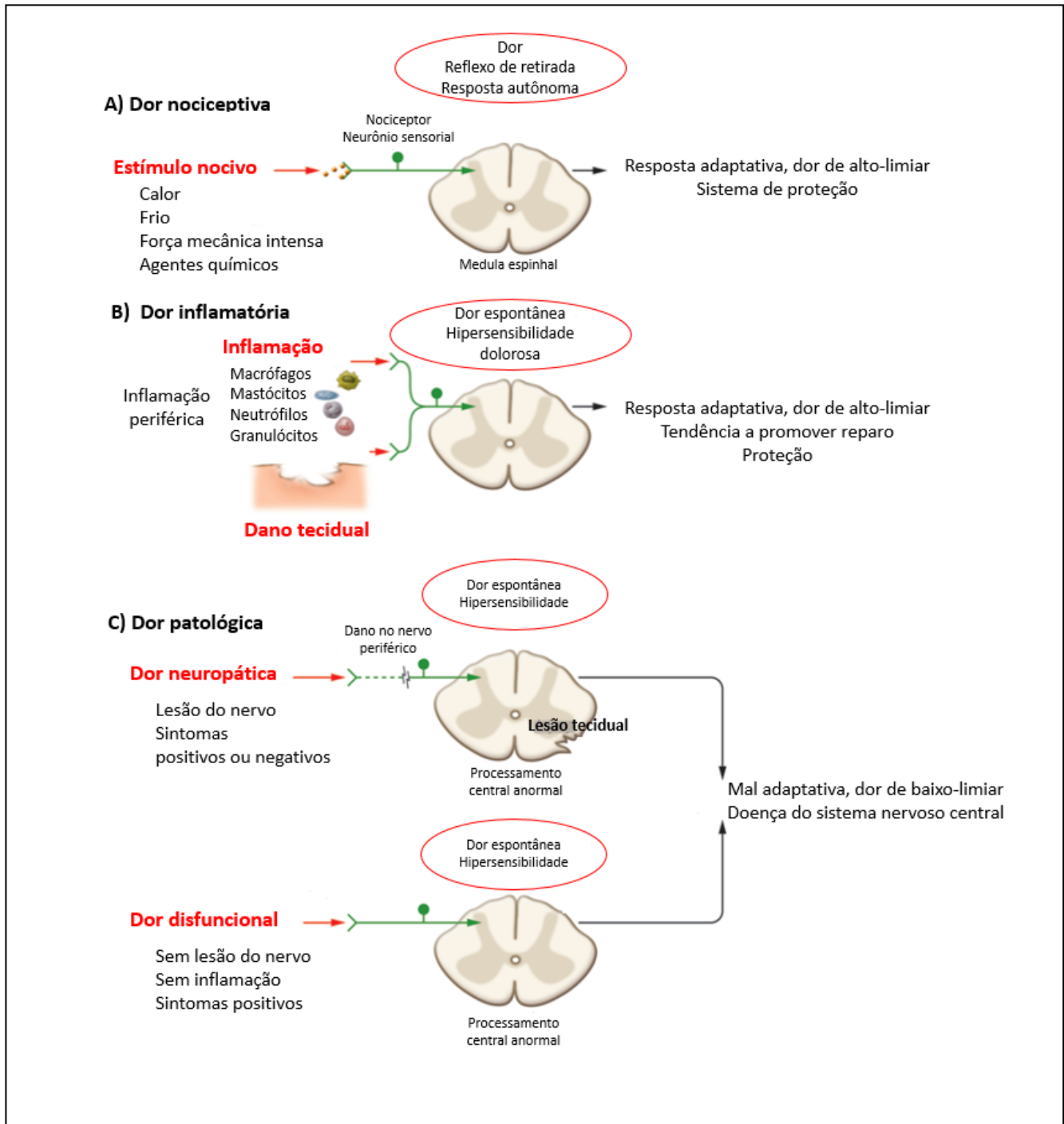
respostas a estímulos nocivos tornam-se exageradas e prolongadas (hiperalgesia) (LOESER e TREEDE, 2008; COSTIGAN et al., 2009).

As respostas inflamatórias são orquestradas por uma ampla gama de fatores químicos, sendo liberados para o meio extracelular, no tecido danificado, recrutando células do sistema imunológico. Após a lesão tecidual ocorre ativação de células residentes, como os mastócitos e infiltração de células inflamatórias, tais como os neutrófilos e macrófagos com consequente liberação de mediadores inflamatórios. Estes agentes químicos podem ser referidos como “sopa inflamatória”, incluindo bradicinina, substância P, histamina, ATP, prostaglandinas, fatores de crescimento, dentre outros. Estes mediadores são conhecidos como substâncias algogênicas, pois são capazes de provocar dor sensibilizando quer diretamente ou excitando terminais periféricos dos neurônios nociceptivos (SCHOLZ e WOOLF, 2002; LINLEY et al., 2010).

E por fim, há a dor que não é protetora e sim mal-adaptativa, resultante do funcionamento anormal do sistema nervoso (WOOLF, 2010). Esta dor patológica não é um sintoma de alguma doença, mas resultante de uma lesão ou doença que afeta o sistema somatosensorial, podendo ser central ou periférica, desta maneira, alterando sua estrutura e função promovendo alteração do processamento nociceptivo (WOOLF, 2010; GRACE et al., 2014).

Ainda podemos classificar a dor em aguda ou crônica. A dor aguda representa uma resposta protetora contra infecções ou danos teciduais, tendo um tempo de duração provavelmente limitado, apresentando uma relação temporal e causal identificável. Por outro lado, a dor crônica persiste além do curso esperado de um processo de doença e geralmente é definida como dor com duração maior do que seis meses. Esta dor se torna mais difícil de tratar por duas razões. Primeiro por se tratar de uma dor persistente e que presumidamente não foi resolvida espontaneamente com tratamentos convencionais, em segundo, pelo impacto da dor na vida do paciente (RUSSO e BROSE, 1998; WALKER et al., 2014). Esta dor crônica afeta cerca de 116 milhões de pessoas, incluindo pacientes com artrite reumatoide, sendo uma das principais razões para a procura de tratamentos (LEE, 2013).

Figura 1 - Classificação da dor. Fonte adaptada de Woolf, 2010.



1.2 ARTRITE REUMATOIDE

A artrite reumatoide (AR) é uma doença de caráter autoimune, progressiva e inflamatória crônica que tem como principal característica a inflamação nas articulações, assim como, danos na cartilagem e erosão óssea, podendo gerar incapacidade funcional, dentre outras manifestações sistêmicas (HELMICK et al., 2008; DAVIES e CHOY, 2014). Sua incidência mundial varia de 0,5 % a 1,0 % sendo mais prevalente em mulheres em comparação com homens. Os portadores desta doença podem apresentar dor persistente ou intermitente, podendo ser de grau moderada a grave. Os pacientes com AR sofrem limitações funcionais e consequente redução da qualidade de vida que está associada com significativa morbidade, tanto pessoal quanto social, assim como aumento de custos econômicos com a saúde (HELMICK et al., 2008; LAAR et al., 2012; DOLATI et al., 2016).

A manifestação dos sintomas da AR, que acomete majoritariamente pessoas entre 30-60 anos de idade, geralmente ocorrem no início do desenvolvimento da doença, com aquecimento matinal das articulações, especialmente as articulações das mãos e dos pés, seguido de rigidez e inchaço da articulação afetada. Além disso, a AR pode acometer uma parcela mínima de pacientes de forma assintomática (HAIR et al., 2012; KUMAR et al., 2016). Quando os sintomas da AR são dolorosos, os pacientes sentem dor em repouso, sendo pior do que quando em movimento. As experiências dolorosas das articulações na parte da manhã são presumidamente devido a inflamação e inatividade, tendo como consequência comum a mobilidade restrita e fadiga, seguido de baixo nível de atividade física, o que pode levar a deterioração do condicionamento físico (PEDERSEM e SALTIN, 2015).

Uma combinação de predisposição genética e fatores ambientais aumentam a susceptibilidade de desenvolver as manifestações clínicas da AR (KOURILOVITCH et al., 2014). Estes fatores genéticos estão associados com uma série de genes, especialmente aqueles que regulam o complexo principal de histocompatibilidade e alguns outros fatores, tais como promotores de citocinas, células T, e genes de sinalização (GREGERSEN et al., 1987). Estes genes sensíveis a AR humana podem ser expressos em resposta a infecções ou fatores ambientais, estabelecendo assim uma condição auto imune em que o sistema imunológico começa a produzir substâncias que são capazes de atacar as articulações (CORVAISIER et al., 2012). Vários componentes do sistema imunológico incluindo o sistema de imunidade inata e várias células (células

B e T), macrófagos e sinoviócitos, assim como fatores humorais (TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-17), quimiocinas, moléculas de adesão celular, e metaloproteinases da matriz (MMPs), têm sido postuladas para desempenhar um papel crítico na patogênese da AR (YOUSEFI et al., 2007). A ativação das células T e B resultam no aumento da produção de citocinas e quimiocinas, que conduzem a um circuito fechado de realimentação para a célula T adicional, macrófagos e interações com células B.

Além disso, para a apresentação de antígenos, os macrófagos são envolvidos em osteoclastogênese sendo uma importante fonte de citocinas. Dentro da membrana sinovial há um grande aumento nos sinoviócitos semelhantes a fibroblastos ativados, que também produzem citocinas inflamatórias, prostaglandinas (PGs) e MMPs, contribuindo para a destruição da cartilagem e osso. Os mecanismos por trás desta destruição são distintos, embora ambos são, pelo menos em parte, dependente de inflamação (SMOLEN et al., 2007; SMOLEN et al., 2014).

1.2.1 Dor artrítica

Na AR a dor resulta de mecanismos que podem ocorrer tanto com a estimulação mecânica da articulação (peso-rolamento, aplicação de pressão, o movimento articular) ou espontaneamente enquanto o conjunto está em repouso. Muitas vezes assume-se que a dor da AR é causada pela inflamação (BORENSTEIN et al., 2010). No entanto, esta pode ocorrer por múltiplos mecanismos, envolvendo não só a inflamação como também processamento periférico e central (WALSH e MC WILLIAMS, 2014).

Estudos sugerem que certas citocinas têm um papel direto na geração e manutenção da dor, contribuindo indiretamente através da geração da inflamação, mantendo os processos de doenças como artrite (SCHAIBLE, 2014). O reconhecimento de que as citocinas fazem parte do desenvolvimento da dor levou a modificações nas terapias que se baseiam na neutralização de citocinas pró-inflamatórias tais como TNF- α (MCINNIS et al., 2011). Ainda, que citocinas pró-inflamatórias, tais como IL-1 β , IL-6, e IL-17, também são mediadores da dor, agindo diretamente sobre o sistema nociceptivo (SCHAIBLE, 2014). Além do processo inflamatório, a dor na AR pode ter outras etiologias, incluindo causas periféricas, tais como dano estrutural conjunta, bem como causas centrais (BOYDEN et al., 2016).

O mecanismo de dor periférica envolve a ativação direta e/ou sensibilização dos nociceptores por mediadores inflamatórios liberados nas articulações afetadas. Entre os

mediadores inflamatórios recebem destaque algumas citocinas, fatores de crescimento e quimiocinas que estão em níveis aumentados em líquidos sinoviais de pacientes com AR. A dor também pode ser decorrente de danos estruturais, sendo as lesões periféricas (erosões, estreitamento do espaço articular) uma das mais importantes causas não inflamatórias da dor em indivíduos com artrite (BRENNAN e MCINNES, 2008; WALSH e MCWILLIAMS, 2014; BOYDEN et al., 2016).

Várias evidências indicam que o processamento central da dor está aumentando em pacientes com AR (BOYDEN et al., 2016). Estudos de sensibilidade à dor demonstraram que os limiares de dor frente à pressão são mais baixos em pacientes com AR, quando comparado com controles saudáveis. Ainda, que estes limiares são mais baixos em locais próximos ou não da região afetada, sugerindo alterações nos mecanismos de regulação de dor central, como perda da modulação da dor condicionada e sensibilização central, que podem mediar a dor generalizada na AR (LEE, 2013). A perda de modulação da dor condicionada pode ocorrer pelo comprometimento das vias opioidérgicas descendentes e/ou vias serotoninérgicas-noradrenérgicas que normalmente induzem analgesia, enquanto que a sensibilização central é definida como um aumento prolongado, mas reversível na excitabilidade e sináptica eficácia de neurônios em vias nociceptivas centrais (WOOLF, 2011).

1.3 TRATAMENTOS PARA ARTRITE REUMATOIDE

Existem três classes de fármacos usados para o tratamento da artrite reumatoide, que são os agentes anti-inflamatórios não esteroidais (AINES), os corticosteroides, e drogas anti-reumáticas modificadoras da doença (DMARDs) (FARDET et al., 2007).

O uso de AINES na reumatologia é devido a sua eficácia como anti-inflamatório e agente analgésico, sendo utilizado não só para o tratamento da AR como também osteoartrite e outras doenças artríticas caracterizadas por dor musculoesquelética crônica e diversas dores agudas. Os AINES se diferem em sua classe química, mas compartilham a propriedade de bloquear a produção de prostaglandinas (PGs) (CROFFORD, 2013). Da mesma maneira, os corticosteroides são utilizados no tratamento da AR. Seus efeitos farmacodinâmicos são mediados pela ligação de receptores glicocorticoides, estimulando a “up regulation” da proteína alvo (em particular Lipocortina), ocorrendo subsequente a inibição da fosfolipase A2, bem como a diminuição de citocinas pró-inflamatórias como IL-1, IFN- γ e TNF- α que participam

do processo de sensibilização dos nociceptores (TOWNSEND e SAAG, 2004). Entretanto, o tratamento dos pacientes com esses medicamentos provoca efeitos adversos que limitam o seu uso. Os AINEs podem provocar o desenvolvimento de úlceras gástricas, hemorragias, nefrotoxicidade e hepatotoxicidade (TAUBEN, 2015; BEAL e WALLACE, 2016), enquanto os corticosteroides provocam risco de fraturas, imunossupressão e alterações no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas (RENTERO et al., 2015; HATHOUT et al., 2016). Além disso, tanto AINES quanto os corticosteroides são incapazes de alterar o curso da doença (FARDET et al., 2007).

As DMARDs têm como alvo principal a redução do processo inflamatório e consequentemente a redução da progressão do dano estrutural. As DMARDs são de duas principais classes: biológicos e não biológicos (SMOLEN et al., 2014). A DMARDs não biológica mais comum é o metotrexato, sendo o medicamento de escolha para o tratamento de pacientes com AR, até a produção de agentes biológicos. Os agentes biológicos podem ser divididos em dois subgrupos: inibidores de TNF- α e antagonistas do receptor de IL-1 (GIBOFSKY, 2006). A utilização combinada de metotrexato e um DMARD biológico revolucionou o tratamento da AR, trazendo uma mudança no tratamento da doença, como a baixa da atividade e remissão clínica, estrutural e funcional (TANAKA, 2016).

1.4 MODELO EXPERIMENTAL DE ARTRITE REUMATOIDE INDUZIDA POR CFA

O Adjuvante completo de Freund (CFA, do inglês *Complete Freund's Adjuvant*), quando administrado por via intraplantar ou por via intra-articular em animais experimentais provoca um processo inflamatório agudo e/ou crônico, que vem sendo extensivamente utilizado para estudos de AR. A injeção de CFA induz uma inflamação caracterizada pela infiltração de células na membrana sinovial associada a destruição das articulações que se assemelha com a AR humana, com características de dor, hiperemia e edema (LI et al., 2005; ALMARESTANI et al., 2008; LIN et al., 2014). Além disso, o CFA produz alodínia mecânica e hiperalgesia térmica, com duração de até várias semanas após sua administração (OKUN et al., 2011).

1.5 PRODUTOS NATURAIS

A utilização de produtos naturais como recurso terapêutico é tão antiga quanto a civilização humana e, por muito tempo, produtos minerais, vegetais e animais constituíram o arsenal terapêutico (RATES, 2001). Durante o período anterior à era cristã, conhecida como civilização grega, vários filósofos se destacaram por suas obras relacionadas à história natural. Dentre esses, Hipócrates, considerado o pai da medicina moderna, que se caracterizou por tomar a natureza como guia na escolha dos remédios e Teofrasto (372 a.C.), discípulo de Aristóteles, que escreveu vários livros sobre a história das plantas (PINTO et al., 2002).

O farmacêutico Friedrich Wilhelm Adam Sertürner, em 1803, marcou o início do processo de extração de princípios ativos de plantas a partir do isolamento da morfina da *Papaver somniferum*. Desde então, outras substâncias foram isoladas, como a quinina e a quinidina obtidas da *Cinchona* spp, em 1819, e a atropina da *Atropa belladonna*, em 1831, que passaram a ser utilizadas em substituição aos extratos vegetais (SCHULZ et al., 2001).

Após a década de 1960, ocorreu um desinteresse da indústria farmacêutica e dos institutos de pesquisa pela busca de novas substâncias de origem vegetal. Isto ocorreu porque se acreditava que já haviam sido isoladas as principais substâncias ativas das drogas vegetais conhecidas, assim como, realizadas todas as possíveis modificações químicas de interesse destas substâncias (SCHENCKEL et al., 2000). Entretanto, a partir dos anos 1980, os avanços técnicos e o desenvolvimento de novos métodos de isolamento de substâncias ativas a partir de fontes naturais, permitiram maior rapidez na identificação de substâncias em amostras complexas como os extratos vegetais, ressurgindo o interesse pela pesquisa destas substâncias como protótipos para o desenvolvimento de novos fármacos (TUROLLA e NASCIMENTO, 2006). No cenário atual, os produtos naturais são amplamente utilizados em diversos países. Na África, por exemplo, 80% da população depende do uso destes medicamentos, os quais representam alternativas ao alto custo dos fármacos sintéticos (TUROLLA e NASCIMENTO, 2006). A natureza, de forma geral, tem produzido a maioria das substâncias orgânicas conhecidas, tendo o reino vegetal como maior fornecedor de metabólitos secundários, muitos destes de grande valor agregado devido às suas aplicações como medicamento (PINTO et al., 2002).

Para a Organização Mundial da Saúde, plantas medicinais são todas aquelas, silvestres ou cultivadas, utilizadas como recurso para a prevenção, alívio, cura ou modificação de um processo fisiológico normal ou patológico, ou ainda, como fonte de fármacos e de seus precursores. Por outro lado, que fitoterápicos são produtos medicinais acabados e etiquetados, cujos ingredientes ativos são formados por partes de plantas ou outro material vegetal, sem estar associado com substâncias ativas, do ponto de vista químico, sintéticas ou isoladas de plantas (ARIAS, 1999; RATES, 2001).

O fato de uma droga vegetal poder apresentar vários princípios ativos com o mesmo efeito pode possibilitar interações sinérgicas e, desse modo, ser superior em eficácia com relação aos componentes isolados. Os estudos sobre a medicina popular vêm merecendo uma atenção cada vez maior devido a quantidade de informações oferecidas a ciência, propiciado assim o uso destas como profilaxia e tratamento de doenças, ao lado da terapia convencional (SIXEL e PECINALLI, 2005; FRANÇA et al., 2008).

1.5.1. *Hymenaea courbaril* L. (Fabaceae)

Hymenaea courbaril L. (Fabaceae) (Figura 2), popularmente conhecida no Brasil como "jatobá", é uma espécie tropical de leguminosas arbóreas comumente encontradas em florestas da América do Sul. Dentre 14 espécies do gênero *Hymenaea* (Fabaceae), 9 são conhecidos por ser encontrada em diferentes regiões, incluindo ecossistema tropical da planície da Amazônia brasileira (GUPTA et al., 2014).

O gênero *Hymenaea* se originou na África há cerca de 65 milhões de anos. Espalhou-se e adaptou-se muito bem em regiões neotropicais, gerando muitas espécies diferentes. Dentro do gênero, a *H. courbaril* é considerada uma das mais bem sucedidas espécies, com 17 variedades diferentes em florestas tropicais variando da América do Norte (México) pela América Central para quase todos os países tropicais da América do Sul (LEE e LANGENHEIM, 1975).

A espécie *H. courbaril* é a mais amplamente distribuída, quase combinando com a área geográfica total do gênero *Hymenaea*, tendo também a maior importância econômica no gênero, devido à alta qualidade de sua madeira e sua resina. A resina da *H. courbaril* é utilizada por populações nativas como incenso, cimento, no fabrico de vernizes, e para fins medicinais (SOUZA et al., 2014).

Durante séculos, a espécie *H. courbaril* foi usada no Brasil para fins culinários e na medicina tradicional para tratar a artrite reumatoide, disfunção gástrica, inflamações e doenças respiratórias. Plantas do gênero *Hymenaea* são comumente usadas na medicina tradicional brasileira para tratamento de processos inflamatórios, infecções bacterianas, reumatismo, e anemia (GAZZANETO et al., 2005; GONÇALVES et al., 2005; AGRA et al., 2007).

Quase todas as partes da planta, incluindo raízes, folhas, frutos e, particularmente, o ritidoma (casca do caule) são usados tradicionalmente na medicina popular, por meio de infusões, para tratar uma ampla gama de doenças tais como anemia, problemas renais, dor de garganta, bronquite e asma (CARTAXO et al., 2010). O extrato da casca da *H. courbaril* e da polpa do fruto aliviam os sintomas e têm efeito sobre úlceras, dor gastrointestinal e diarreia, alívio da dor, efeito sedativo e anti-séptico. Além disso, estes extratos apresentam atividade antioxidante, devido a presença de taninos e flavonoides (LORENZI et al., 2002).

Sabe-se que o elevado conteúdo de compostos fenólicos no extrato de *H. courbaril* é devido à presença de procianidinas, que são taninos condensados, uma subclasse de flavonoides. Eles possuem alta atividade antimicrobiana, antifúngica e antioxidante, e são usados como anti-carcinogênico (mama, próstata, pele e estômago), anti-inflamatório, antirreumático, na proteção contra doenças renais ou hepáticas além de inibirem a transcriptase reversa do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (SCALBERT, 1991).

Ainda, extratos preparados a partir de casca de *H. courbaril* são amplamente utilizados na Amazônia para superar a fadiga, agir como alimento ou como um suplemento nutricional (SASAKI et al., 2009).

Como é de grande importância a busca por novas alternativas terapêuticas para o tratamento da dor relacionada a artrite reumatoide que causem menos efeitos adversos do que as disponíveis no mercado atualmente e diante do uso etnofarmacológico de *H. courbaril* entre a população, a *H. courbaril* poderia ser uma nova alternativa terapêutica para o tratamento da dor artrítica.

Figura 2 - Árvore *Hymenaea courbaril* L. (a), frutos na árvore (b) e frutos com a semente (c) (DIAS et al., 2013).



2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial antinociceptivo do extrato bruto e das frações clorofórmica, acetato de etila e butanólica do ritidoma de *H. courbaril* em modelos de dor em camundongos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 2.2.1 Avaliar se o extrato bruto e as frações da *H. courbaril* apresentam atividade antinociceptiva em um modelo de nocicepção induzido por capsaicina.
- 2.2.2 Averiguar o possível efeito antinociceptivo do extrato bruto de *H. courbaril* (HccE) em um modelo de dor artrítica induzida por CFA.
- 2.2.3 Investigar o possível envolvimento do sistema opioide nos mecanismos antinociceptivos induzidos por HccE.
- 2.2.4 Investigar a possível atividade anti-inflamatória do HccE sobre o edema de pata e a infiltração de células inflamatórias causadas por CFA.
- 2.2.5 Avaliar os possíveis efeitos adversos do tratamento com HccE.
- 2.2.6 Avaliar a possível toxicidade aguda do HccE.

3 MANUSCRITO CIENTÍFICO

A metodologia, os resultados e a discussão inseridos nesta dissertação apresentam-se sob a forma de manuscrito científico. O manuscrito “**Crude extract of *Hymenaea courbaril* L. promotes antinociceptive effect in a rheumatoid arthritis model in mice**” está organizado na mesma forma a qual foi submetido à revista científica Journal of Ethnopharmacology.



The screenshot displays the author dashboard for the Journal of Ethnopharmacology. At the top, there is a header with the journal's name and logo, along with links for 'Contact us' and 'Help'. Below the header is a navigation bar with 'Home' and 'Reports' tabs. The main content area is titled 'My Author Tasks' and features a prominent blue button labeled 'Start New Submission'. To the right of this button is a link that says 'Click here to view your submissions with a final decision'. Below this, there is a section titled 'My Submissions with Journal (1)' which contains a single submission entry. The entry title is 'Crude extract of *Hymenaea courbaril* L. promotes antinociceptive effect in a rheumatoid arthritis model in mice' and its current status is 'With Editor (12/Sep/2016)'.

Journal of ETHNOPHARMACOLOGY

Contact us  Help  

[Home](#) [Reports](#)

My Author Tasks

[Start New Submission](#) [Click here to view your submissions with a final decision](#)

My Submissions with Journal (1)

[Crude extract of *Hymenaea courbaril* L. promotes antinociceptive effect in a rheumatoid arthritis model in mice](#)

Current status: With Editor (12/Sep/2016)

Crude extract of *Hymenaea courbaril* L. promotes antinociceptive effect in
a rheumatoid arthritis model in mice

Gabriela de Campos Severo^a, Fernanda Regina Hamann^a, Camila Camponogara Dalla
Pozza^a, Henrique Faccin^b, Luciana Assis Gobo^b, Leandro Machado de Carvalho^b, Sara
Marchesan Oliveira^{a*}, Maribel Antonello Rubin^{a,c*}

^aGraduate Program in Biological Sciences: Toxicological Biochemistry, Center of
Natural and Exact Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

^bGraduate Program in Chemistry, Center of Exact and Natural Sciences, Federal
University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

^cGraduate Program in Pharmacology, Center of Health Sciences, Federal University of
Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

*Corresponding Authors:

MA Rubin, PhD, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Center of
Natural and Exact Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil,
97105-900. Tel: + 55 55 3220 8053, Fax: + 55 55 3220 8978. E-mail:
maribel.rubin@gmail.com

SM Oliveira, Department of Biochemistry and Molecular Biology, Center of Natural
and Exact Sciences, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil, 97105-
900. Tel: + 55 55 3220 8053, Fax: + 55 55 3220 8978. E-mail:
saramarchesan@hotmail.com

ABSTRACT

Ethnopharmacological relevance: The *Hymenaea courbaril* L. (Fabaceae), popularly known in Brazil as "Jatobá", is a tropical species of South America. *Hymenaea* genus of plants is commonly used in Brazilian traditional medicine for treatment of inflammation, bacterial infections, rheumatism, and anemia.

Aim of the study: Evaluate the antinociceptive effect of crude extract from the bark of *H. courbaril* stem in a model of rheumatoid arthritis in mice.

Materials and methods: Adult male Swiss mice (for most tests) and female (only for acute toxicity test) (25-30 g) were used. Arthritis was induced by administration of complete Freund's adjuvant (CFA - 1 mg/ml, 20 µl/paw) into the intraplantar surface of the hind paw of the animal. Firstly, was tested the antinociceptive effects of *H. courbaril* crude extract (HccE, 100 mg/kg, p.o.) and ethyl acetate (Eta, 100 mg/kg, p.o.) chloroform (Chlo, 100 mg/kg, p.o.), and butanol (But, 100 mg/kg, p.o.) fractions of *H. courbaril* in the capsaicin test. To evaluate the antinociceptive effect of HccE in a reumathoid arthritis model (10-100 mg/kg, p.o.), von Frey test was used. Naloxone (2 mg/kg, i.p.) was used to investigate the possible involvement of opioid system in the currently described effects of HccE. To avaluate the thermal nociceptive activity of HccE was performed the tail immersion test (tail-flick). The locomotor activitiy, gastric lesion, gastrointestinal transit, body temperature, were conducted to evaluate the possible adverse effects of treatment, as well as tests to assess toxicity.

Results: HccE (100 mg/kg, p.o.), Chlo and But fractions (100 mg/kg, p.o.) caused antinociception in the capsaicin test. HccE (10-100 mg/kg, p.o.) also caused antinociception in the CFA-induced rheumatoid arthritis model, and naloxone did not prevent this effect. In the tail-flick test, HccE (100 mg/kg p.o.) increased the tail withdrawal latency at 1, 4 and 6 h. The HccE (100 mg/kg, p.o.), neither alter locomotor activity, body temperature and gastrointestinal function nor developed gastric lesions.

Conclusion: *H. courbaril* has antinociceptive effect in a model of arthritic pain confirming its use in folk medicine whitout causing adverse effects.

Keywords: allodynia; von Frey test; inflammation; Jatobá; medical plants.

1. Introduction

Rheumatoid arthritis (RA) is a chronic, progressive, inflammatory and autoimmune disease characterized by pain (especially mechanical allodynia, characterized as pain in response to a non-nociceptive stimulus), swelling and stiffness of the synovial joints (Loeser and Treede, 2008; Watanabe, et al., 2016). The exact etiology of this debilitating disease is not known, but it is believed to be the result of an autoimmune response of the body, which can be triggered, by a variety of external and genetic factors (Nair et al., 2011; Longo et al., 2013). The goals of RA treatment are to relieve the pain and arrest joint inflammation and damage (Li et al., 2012). The therapy used to treat rheumatoid arthritis includes nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), glucocorticoids, and modifying antirheumatic drugs (DMARDs). Nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) produce good results in terms of pain relief and reduction of joint inflammation, while corticosteroids regulate immune system activity when NSAIDs are no longer able to control the symptoms (Fardet et al., 2007; Wang et al., 2013). However, both NSAIDs as glucocorticoids present side effects that limit their use, such as gastrointestinal disorders and an increased risk of fractures, respectively (Jung et al., 2015; Rentero et al., 2015). Thus, there is a constant search for more effective and safe analgesic drugs.

In this context, natural products are considered the major targets for the discovery of novel analgesics, in addition to being important for the discovery of modulating pain pathways and receptors involved in these pathways analgesic, yet used in clinical (Calixto et al., 2000; Golçalvez et al., 2005). Currently, many drugs prescribed worldwide are obtained from plants, and there is a growing interest in the use of plants for the search for new therapeutic agents (Atanasov et al., 2015).

The *Hymenaea courbaril* L. (Fabaceae), popularly known in Brazil as "Jatobá", is a tropical species of South America. For centuries, the species has been used in Brazil for culinary purposes and in traditional medicine to treat rheumatoid arthritis, dysfunction gastric, respiratory diseases and inflammation. Plants of the *Hymenaea* genus are commonly used in Brazilian traditional medicine for treatment of inflammation, bacterial infections, rheumatism, and anemia (Gazzaneo et al., 2005; Koehn et al., 2005; Agra et al., 2007). However, there is a lack of preclinical studies investigating whether *H. courbaril* or its components have analgesic and/or anti-inflammatory activity. Thus, the aim of this study was to investigate the antinociceptive

and anti-inflammatory effect of the crude extract of *H. courbaril* in mice submitted to CFA-induced arthritis model. We also investigated the possible mechanism of action and adverse effects of the crude extract of *H. courbaril* in mice.

2. Materials and methods

2.1 Plant material

The stem bark of *H. courbaril* was acquired in the Mercado Adolfo Lisboa located in Manaus (AM, Brazil). The stem bark of *H. courbaril* was macerated in hydroalcoholic solution (3: 7 v/v) in airtight containers. The macerated was submitted to daily manual agitation, for a period of seven days. At the end of this period the contents were filtered through cotton, and concentrated in a rotary evaporator for elimination of ethanol (temperature below 40 °C), resulting in the aqueous remainder. Part of the aqueous remainder was dried in an oven (temperature below 40 °C), obtaining the *H. courbaril* crude extract (HccE) (Boligon et al., 2013).

The other part of the aqueous remainder was partitioned in separation funnels by sequential extraction using increasingly polar solvents: chloroform, ethyl acetate and n-butanol. These fractions were concentrated in a rotary evaporator and dried in an oven and will lead the chloroform (Chlo), ethyl acetate (Eta) and butanol (But).

2.2 Drugs and reagentes

The following reagents were purchased from Sigma: Complete Freund's Adjuvant (CFA - 1 mg/ml of heat killed Mycobacterium tuberculosis oil suspension), hexadecyltrimethylammonium bromide (HTAB), 5-(N,N-diethylamino)-pentyl-3,4,5-trimethoxybenzoate (TMB). Naloxone and morphine sulfate were purchased from Cristália, São Paulo, Brazil. All other reagents were of analytical grade and were purchased from local supplier.

2.3 Analysis of phenolic compounds in plant extracts

Separations were carried out on a UHPLC 1260 Infinity Binary system (Agilent, Santa Clara, CA, USA), which was able to operate at pressures up to 600 bar. A Zorbax SB-C18 Rapid Resolution HD column (2.1 × 50 mm, 1.8 µm, Agilent) was used at a temperature of 40 °C. The injection volume was 5 µL, and the injected aliquots were acidified to a final concentration of 0.1% acetic acid (v/v). The phenolic compounds

were separated using a gradient elution composed of 0.1% acetic acid in water (A) and acetonitrile (B) as the mobile phase at a constant flow rate (0.8 ml/min) according to the following elution program: 8.0% B (0.00–0.10 min); 8.0–25.8% B (0.10–3.45 min); 25.8–54.0% B (3.45–6.90 min); 54.0–100.0% B (6.90–7.00 min); and 100.0% B (7.00–9.00 min). The detection of the phenolic compounds by tandem mass spectrometry (MS/MS) was carried out by using an electrospray ionization source (ESI) as described elsewhere (Faccin et al., 2016). The determination of triterpenes was performed using a gradient elution that consisted initially of 70% acetonitrile/water from 0 to 3.5 min followed by a ramp gradient, which achieved the end condition of 100% acetonitrile after 4.0 min. This condition was maintained until the end of the run (8 min). The flow rate was 0.6 ml/min during the first 4.5 min and was increased up to 0.8 ml/min at 5 min run. The flow rate was maintained at 0.8 ml/min until the end of the chromatographic run. The detection of the triterpenic compounds by tandem mass spectrometry (MS/MS) was carried out by using an atmospheric pressure photoionization source (APPI) as described elsewhere (Gobo et al., 2016).

2.4 *Animals*

Adult male Swiss (for most tests) and female (only for acute toxicity test) (25-30 g) mice were used. The animals was kept under controlled temperature (22 ± 1 ° C), in a light/dark cycle of 12 hours with food and water *ad libitum*. The present study was conducted in accordance with the internationally accepted principles for laboratory animal use and care, and all procedures were approved by the local Ethics Committee (process number 116/2013). The number of animals and the intensity of nociceptive stimuli used were the minimum necessary to demonstrate the consistent effects of drug treatments. The behavior evaluation was performed blindly with respect to drug administration.

2.5 *Antinociceptive parameters*

2.5.1 *Capsaicin-induced nociception*

HccE or Eta, Chlo and But fractions of *H. courbaril* (100 mg/kg, p.o.) or vehicle (10 ml/kg, p.o.) were given orally 1 h before injection of capsaicin (1 nmol/paw, i.pl.), into the right hind paw. Immediately after capsaicin injection, the mice were observed individually for 5 min. The amount of time each mice spent licking its injected paw was

recorded with a chronometer as indicative of time of nociception. The procedure used was similar to Oliveira et al. (2008).

2.5.2 Complete Freund's adjuvant (CFA)-induced arthritis model

The antinociceptive activity of HccE was evaluated in mice submitted to the CFA-induced paw inflammation, an animal model of arthritic pain. Firstly, was measured the mechanical paw withdrawal threshold (PWT) of animals using von Frey filaments. After, the animals were anesthetized with isoflurane and CFA (1 mg/ml; 20 μ L/paw) or saline (20 μ L/paw) was injected intraplantarly (i.pl.) into the right hind paw of the mice (Oliveira et al., 2014). After 48 h of the CFA injection, the mechanical PWT of the animals was again measured and vehicle (10 ml/kg, p.o.) or HccE (10, 30 or 100 mg/kg) were given orally. Mechanical allodynia was defined as a reduction in the PWT (g) when compared with the baseline values.

All the drug suspensions were freshly prepared in 5% of polyethylene glycol (PEG) in 95% of NaCl 0.9% (vehicle) at the time of administration. Vehicle (10 ml/kg, p.o.) or HccE (10, 30 or 100 mg/kg) were orally (p.o.) administered.

The measurement of the PWT in von Frey test was carried out using the Up-and-Down paradigm as described previously by (Chaplan et al., 1994), with some modifications (Oliveira et al., 2011). The mechanical PWT response was then calculated from the resulting scores as described previously by (Dixon, 1980) and expressed in grams.

2.5.3 Tail-flick test

In this test, the rodent's tail was immersed in a 48°C bath, and the latency of tail withdrawal was recorded (Oliveira et al., 2008). The baseline latency was determined before testing, and a 30 s maximum latency was used to avoid tissue damage. The tail withdrawal latency was measured at 1 h after administration of the vehicle (10 ml/kg, p.o.), HccE (100 mg/kg, p.o.) or morphine (10 mg/kg, p.o.; used as positive control). The results were expressed as latency of response (in seconds; reflexive withdrawal of the distal half of the tail after its immersion in water).

2.6 Investigation of opioid system participation in the HccE effect

To investigate the participation of the opioid system in the antinociceptive effect of HccE, mice were pre-treated (15 min before) with naloxone (2 mg/kg, i.p.) or vehicle

(10 ml/kg, p.o.). Firstly, the animals received intraplantar CFA injection (1 mg/ml, 20 µl, i.pl.) and after 48 h the mechanical PWT was again evaluate. The effect of naloxone or vehicle on antinociceptive action caused by HccE was evaluated at 1 h after treatment with HccE (100 mg/kg p.o.) by the von Frey test.

2.7 Inflammatory parameters

2.7.1 Edema evaluation

Paw thickness (in millimeter - mm) was measured before and 48 h after the intraplantar CFA injection (20 µl/paw, i.pl.) in the right hind paw. Forty eight hours after CFA injection the animals received HccE (100 mg/kg, p.o.) or vehicle (10 ml/kg, p.o.) and paw thickness was again measured using a digital caliper (Rossato et al., 2014). The results were expressed as the baseline and test value of the paw thickness.

2.7.2 Myeloperoxidase (MPO) assay

To assess the leukocyte infiltration in the paw tissue 48 h after intraplantar CFA injection, we verified the MPO enzyme activity, a neutrophil infiltration marker (Suzuki, 1983). To evaluate the effect of HccE (100 mg/kg, p.o.) on leukocyte infiltration on the tissue, six hours after treatment, the animals were anesthetized with sodium pentobarbital (100 mg/kg, i.p.), perfused with NaCl 0.9% and the paw tissue samples were collected and frosted until analysis. The samples were homogenized with sodium acetate buffer (pH 5.4) plus HTAB 0.5% and centrifuged (11,200 x g at 4 °C for 20 min), and the supernatants were collected. The MPO activity was performed as Oliveira et al. (2014), with some modifications. Values were expressed as optical densities and corrected by homogenized tissue grams (OD/g tissue).

2.7.3 Histology

Separate groups of mice were used to verify the histological changes in the paw tissue 48 h after intraplantar CFA injection (20 ul/paw, i.pl.) and 1 h after HccE (100 mg/kg, p.o.) and vehicle (10 ml/kg, p.o.). Mice were euthanized and the plantar surface of the hind paw was removed and fixed in an alfac solution (16:2:1 mixture of ethanol 80%, formaldehyde 40% and acetic acid). Each sample was embedded in paraffin wax, sectioned at 5 µm and stained with hematoxylin–eosin. A representative area was

selected for qualitative light microscopic analysis of the inflammatory cellular response with a 20x and 40x objectives (Oliveira et al., 2014).

2.8 Adverse effects

2.8.1 Locomotor activity

To evaluate a possible motor incoordination effect of HccE, we verified spontaneous or forced locomotor activity of animals through of the open field and rotarod tests, respectively (Oliveira et al., 2008; Trevisan et al., 2012). The locomotor activity was measure at 1 h after the vehicle (10 ml/kg, p.o.) or HccE (100 mg/kg, p.o.) administration.

2.8.2 Body temperature measurement

Rectal temperature was measured 1 h after administration of vehicle (10 ml/kg, p.o.), HccE (100 mg/kg, p.o.) or dipyrone (50 mg/kg, p.o.; used as positive control). Mice were restrained, and a lubricated thermistor probe was inserted 0.5 cm into the rectum for 10-15 s needed to stabilize the temperature read on the digital thermometer (DT 203 LN: 630203) (Trevisan et al., 2012).

2.8.3 Gastric lesion

To investigate whether the treatments promoted gastric lesions in the animals, they were euthanized at 6 h after treatments. The animals received vehicle (10 ml/kg, p.o.), HccE (100 mg/kg, p.o.) or sodium diclofenac (50 mg/kg, p.o.; used as positive control). After euthanasia, the stomachs of animals were removed, cut open along the lesser curvature and rinsed with saline at 4°C. Gastric damage index was evaluated using a magnifying glass and is assigned a score as the gastric damage index (Oliveira et al., 2008). The lesion index was rated by a score assessing the size and thickness of the lesion according to Magistretti (1988).

2.8.4 Gastrointestinal transit

The mice were fasted for 18-24 h (water ad libitum) prior to analysis gastrointestinal transit according to Hamann et al. (2016) with some modifications. Fifty-five min after administration of morphine (10 mg/kg, p.o.; used as positive control) or HccE (100 mg/kg, p.o.) animals received a charcoal solution (5% carbon, 20% gum arabic, 0.5 mL, p.o.). Five minutes after administration of charcoal solution,

the animals were euthanized and their stomachs and small intestine were removed to measure the total length of the intestine (from the pyloric sphincter to the ileo-caecal junctions), and the distance travelled by the charcoal meal. The intestinal propulsive activity was determined by the percentage of gastrointestinal traveled charcoal, calculated as: traveled % = 100 x (charcoal traveled distance (cm)/total length of the intestine (cm)).

2.8.5 Toxicity studies of the plant extract

Evaluation of acute oral toxicity of HccE was carried out according to the OECD guidelines for testing of chemicals – 425 (OECD, 2001). A limit test (2000 mg/kg body weight) was performed using six adult female Swiss mice, according to the protocol due to a small difference in sensitivity between the sexes. After oral administration of the HccE, the animals were observed at 6 and 12 h after the treatment and every day for 14 days. Death, occurrence of tremors, convulsions, abdominal writhes, locomotion, salivation, diarrhea and lethargy were considered. All the animals were observed for behavioral changes and mortality till 14 days after HccE administration. After 14 days gastric damage was evaluated and blood was collected from the cardiac puncture and was centrifugation (4000 rpm for 10 min) to obtain serum, which was utilized for the assessment of AST (aspartate aminotransferase), ALT (Alanine aminotransferase) activities, Urea, Creatinine and Glucose levels.

2.9 Statistical analysis

Results were expressed as the means \pm standard error of the mean (S.E.M.). The data were analyzed by Student's t test, one-way or two-way ANOVA followed by Bonferroni *post-hoc* test. $p < 0.05$ was considered statistically significant.

3. Results

3.1 LC-MS/MS determination of phenolic and triterpenic compounds as active markers in *Hymenaea courbaril*

Table 1 shows that among the phenolic and triterpenic compounds found in extracts of *H. Courbaril*, sitosterol, catechin, luteolin, quercetin, quercitrin, α -amyrin, β -amyrin, betulinic acid, chlorogenic acid, were determined as major compounds. As

can be seen, catechin ($1320.4 \pm 42.7 \mu\text{g/g}$) and luteolin ($352.1 \pm 13.9 \mu\text{g/g}$) were found to be the most abundant phenolic compounds (Table 1) among the 24 compounds screened by the UHPLC-MS/MS method (Faccin et al., 2016). In addition, sitosterol ($1679.15 \pm 12.4 \mu\text{g/g}$) was determined as the most abundant triterpenic compound among the 12 compounds screened by the UHPLC-MS/MS method (Gobo et al., 2016). Considering both methodologies used for characterizing the extracts by UHPLC-MS/MS, one can see in Fig 1 a total of 16 molecules identified and quantified as active compounds in *H. Courbaril*.

Table 1

Phenolic and triterpenic compounds determined in crude extract of *H. courbaril* (HccE).

Bioactive compounds	Concentration ($\mu\text{g/g}$)
<i>Phenolic compounds</i>	
p -coumaric acid	3.0 ± 0.3
Chlorogenic acid	108.2 ± 9.8
Vanilic acid	65.9 ± 7.7
Galic acid	10.3 ± 6.4
Trans-cinnamic acid	27.0 ± 4.2
Rutin	18.1 ± 3.7
Quercetin	184.8 ± 8.8
Quercitrin	175.7 ± 1.3
Luteolin	352.1 ± 13.9
Apigenin	34.6 ± 1.2
Catechin	1320.4 ± 42.7
<i>Triterpenic compounds</i>	
Betulinic acid	110.4 ± 14.3
Lupeol	92.4 ± 8.2
Sitosterol	1679.1 ± 12.4
α -amyrin	159.7 ± 7.8
β -amyrin	96.9 ± 1.4

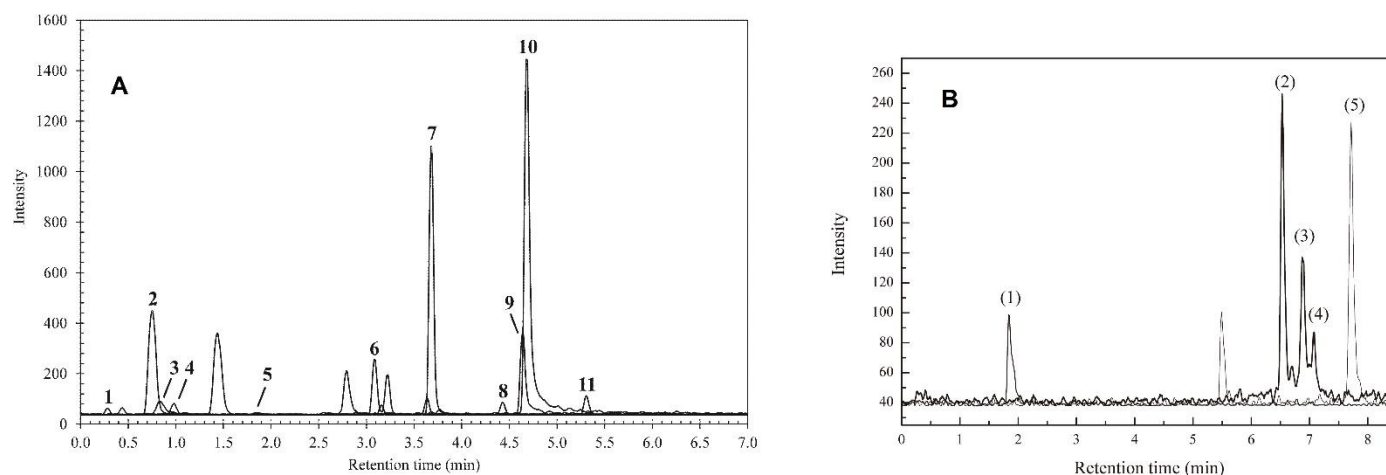


Figure 1: Chromatograms obtained from the UHPLC-MS/MS analysis of the crude extract of *H. courbaril*; **(A)** Phenolic compounds: (1) gallic acid, (2) catechin, (3) chlorogenic acid, (4) vanilic acid, (5) ρ -coumaric acid, (6) rutin, (7) quercitrin, (8) *trans*-cinnamic acid, (9) quercetin, (10) luteolin, (11) apigenin; **(B)** Triterpenic compounds: (1) betulinic acid, (2) lupeol, (3) β -amyryn , (4) α -amyryn, (5) sitosterol. UHPLC-MS/MS and sample conditions as described in Experimental section (Faccin et al., 2016; Gobo et al., 2016).

3.2 Nociceptive parameters

3.2.1 Antinociceptive effects of HccE and *H. courbaril* fractions on capsaicin-induced nociception

The antinociceptive potential of HccE and *H. courbaril* fractions was investigated in animals submitted to intraplantar injection of capsaicin (1 nmol/paw, i.pl.). HccE and Chlo and But (100 mg/kg, p.o.) fractions, prevented capsaicin-induced nociception, with inhibitions of $60.13 \pm 10.81\%$, $40.9 \pm 6.27\%$ and $54.4 \pm 7.9\%$, respectively (Fig. 2). Only Eta (100 mg/kg, p.o.) treatment showed no significant difference compared with the vehicle group (Fig. 2).

The capsaicin test is used as a screening test for new analgesics. Once HccE presented better antinociceptive effect than the Chlo and But fractions, we tested its effects in a CFA-induced arthritis model in order to prove their use in folk medicine to rheumatism treatment.

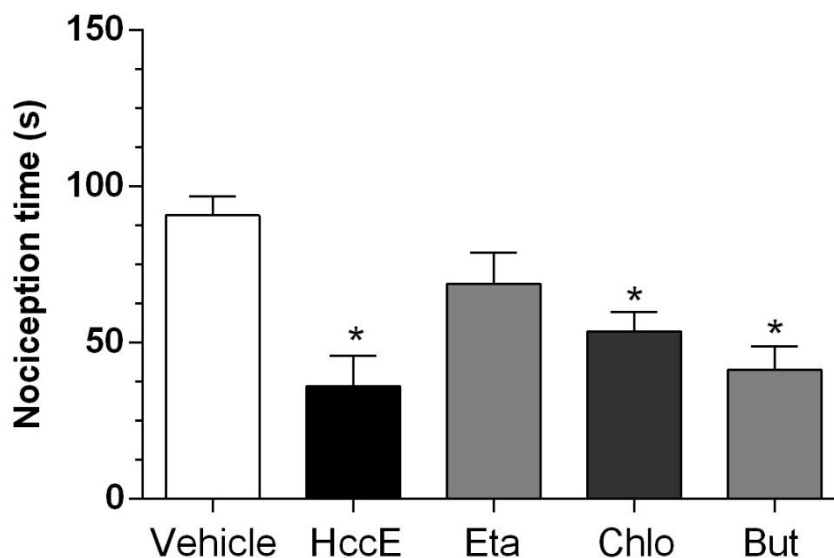


Figure 2. Effect of the HccE (100 mg/kg, p.o.), ethyl acetate (Eta, 100 mg/kg, p.o.), chloroform (Chlo, 100 mg/kg, p.o.) and n-butanol (But, 100 mg/kg, p.o.) fractions of *H. courbaril* or vehicle (10 ml/kg, p.o.) on the nociception induced by intraplantar capsaicin injection (0.2 nmol/site) in mice. The nociception was evaluated immediately after capsaicin. Data are expressed as the mean \pm S.E.M. of the nociception time (s) of 5-6 mice in each group. * $p < 0.05$ compared with the vehicle group (one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post-hoc* test).

3.2.2 Effects of HccE on CFA-induced arthritis model

We evaluated the antinociceptive effect of HccE in a CFA-induced arthritic pain model. Animals that received an intraplantar CFA injection of (20 μ L/paw, i.pl.) developed mechanical allodynia, characterized by a significant reduction of the PWT (Fig. 3). HccE (100 mg/kg, p.o.) reversed the mechanical allodynia CFA-induced at 1 ($58.2 \pm 14.2\%$) and 2 h ($52.5 \pm 6.1\%$) after its administration (Fig. 3A). Thus, we choose the time of 1 h after HccE administration to investigate the effect of different doses of HccE (10–100 mg/kg; p.o.) on a mechanical allodynia CFA-induced (Fig. 3B). All doses of HccE reversed the mechanical allodynia CFA-induced with maximal inhibition of 100% (30 mg/kg).

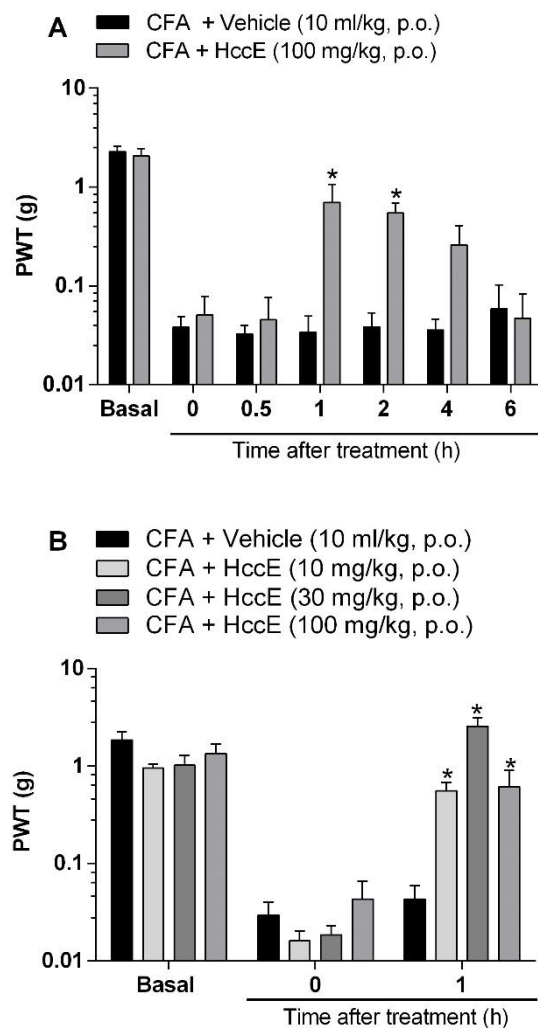


Figure 3. Effect of the crude extract of *H. courbaril* (HccE, 10-100 mg/kg, p.o.) or vehicle (10 ml/kg, p.o.) on the nociception induced by intraplantar CFA injection (1 mg/ml, 20 μ l/paw). Time course (A) and dose-response curves (B) effect produced by HccE on mechanical allodynia. Basal values were observed before CFA injection. Data are expressed as the mean \pm S.E.M. of the paw mechanical threshold of 5-6 mice in each group. * $p < 0.05$ when compared with the intraplantar vehicle group (A), * $p < 0.05$ when compared with the respective dose in time 0 h (B) (two-way ANOVA followed by Bonferroni's *post-hoc* test).

3.2.3 HccE-induced antinociception in tail-flick test

HccE (100 mg/kg, p.o.) increased the tail withdrawal latencies at 1, 4 and 6 h after treatment in the tail-flick test, a model sensitive to drugs that act at central nervous

system. Likewise, morphine (10 mg/kg, p.o., used as a positive control) increased tail withdrawal latencies just at 1 h after treatment (Fig. 4).

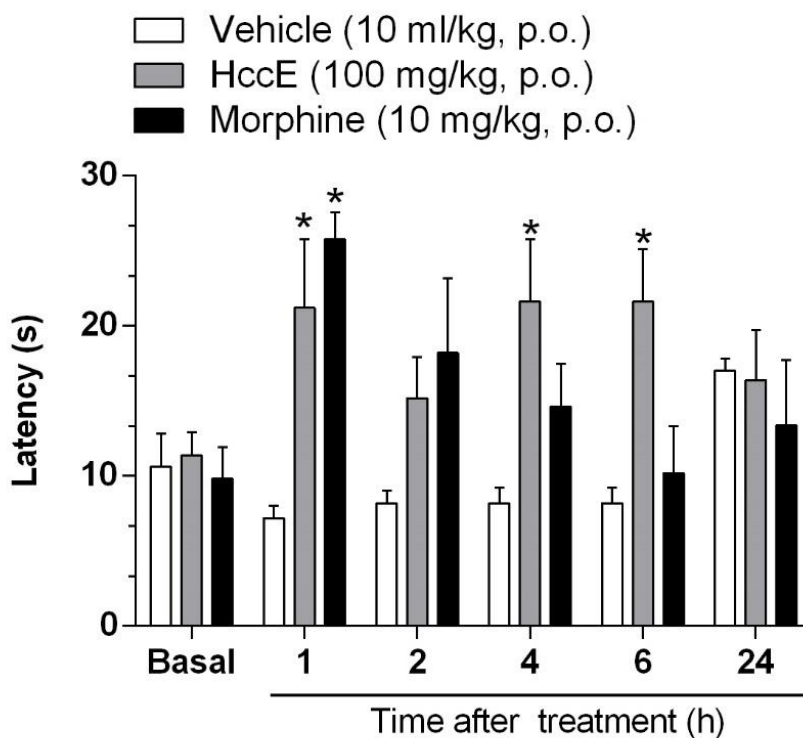


Figure 4. Effect of the vehicle (10 ml/kg, p.o.), HccE (100 mg/kg, p.o.) or morphine (10 mg/kg, p.o.) on tail flick test. The tail withdrawal latency was evaluated at different time points (1, 2, 4, 6 and 24 h) after treatment with the HccE or morphine. Basal values were observed before HccE or morphine administrations. Data are expressed as the mean \pm S.E.M. of the latency time (s) of 5-6 mice in each group. * $p < 0.05$ compared with the vehicle group (two-way ANOVA followed by Bonferroni's *post-hoc* test).

3.3 Investigation of opioid mechanisms in HccE effect

Pre-treatment with the opioid receptor antagonist naloxone (2 mg/kg, i.p.) did not prevent the antinociceptive effect of HccE (100 mg/kg, p.o.; Fig. 5). This result suggests that the opioid system is not involved in the antinociceptive effect of HccE.

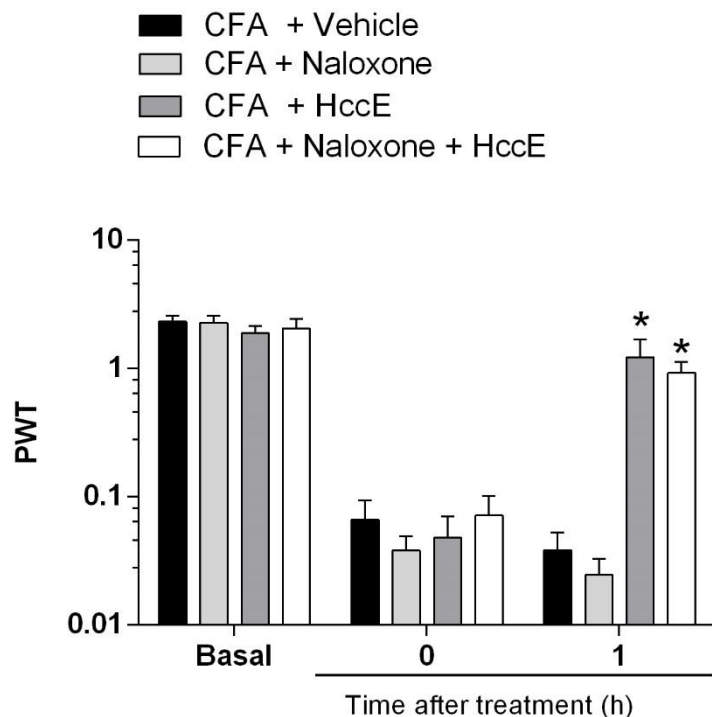


Figure 5. Effect of naloxone (2 mg/kg, i.p.) on the antinociceptive effect caused by HccE (100 mg/kg, p.o.) on mechanical allodynia induced by intraplantar CFA injection (1 mg/ml, 20 μ l/paw). Basal values were observed before CFA injection. Data are expressed as the mean \pm S.E.M. of the paw mechanical threshold of 5-6 mice in each group. * $p < 0.05$ compared with the respective dose in time 0h (two-way ANOVA followed by Bonferroni's *post-hoc* test).

3.4 Inflammatory parameters

3.4.1 Effect of HccE on CFA-induced inflammation

The intraplantar CFA injection, but not saline, increased paw thickness (edema) and MPO activity in the paw tissue of the animals. HccE (100 mg/kg, p.o.) did not reduce paw edema and MPO activity at 1 h after their administration in animals treated with CFA (data not shown).

3.4.2 Histological analysis

We confirmed by histological procedure the results of MPO activity. HccE (100 mg/kg, p.o.) was unable to reverse the neutrophils infiltration CFA-induced when compared with vehicle-treated animals (Fig. 6).

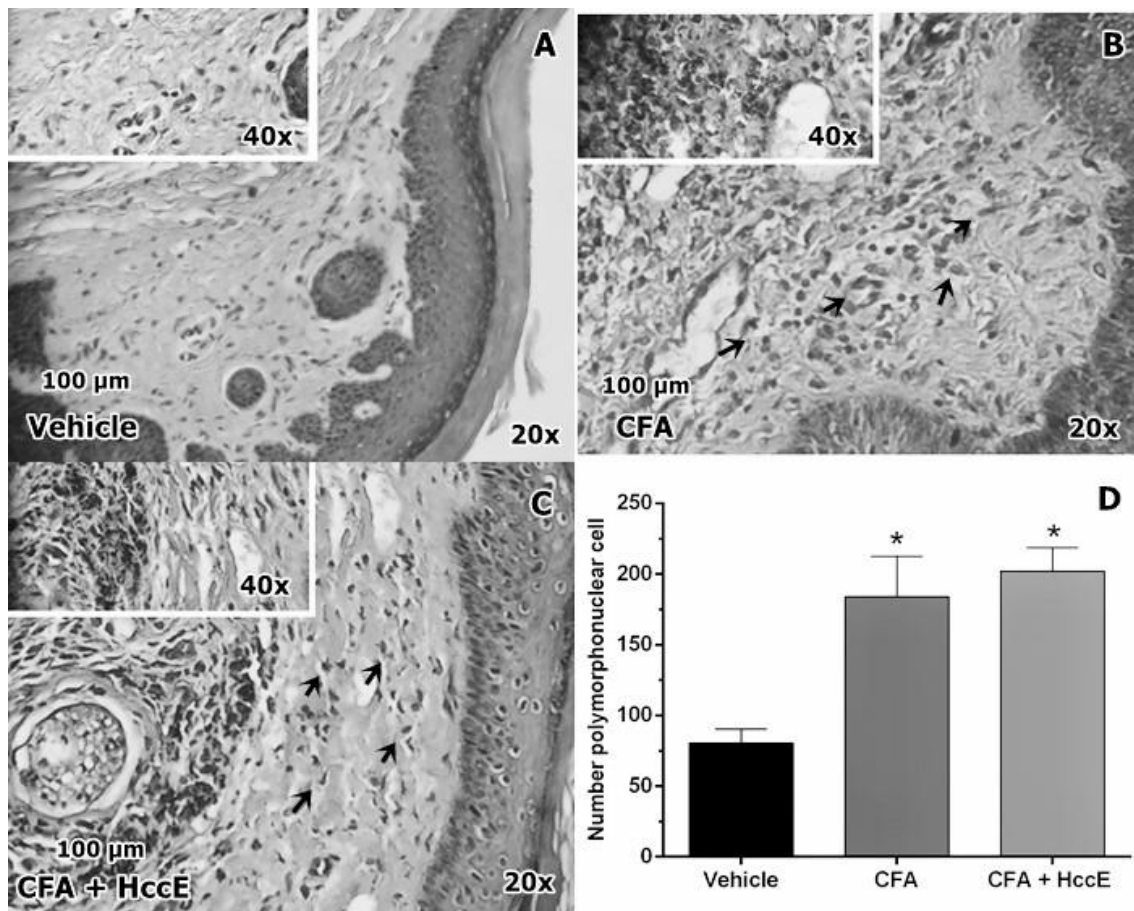


Figure 6. Representative light microphotograph (A, B, C) or quantification of polymorphonuclear cells per field (D) of paw tissue of mice 48 h after intraplantar CFA injection (1 mg/ml, 20 μl/paw) and at 1h after treatment with vehicle (10 ml/kg, p.o.) or HccE (100 mg/kg, p.o.). Data are expressed as the mean ± S.E.M. of the number of polymorphonuclear cells of 5-6 mice in each group (D). * $p < 0.05$ compared with the vehicle group (one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post-hoc* test).

3.5 Assessment of the possible adverse effects

3.5.1 Assessment of the adverse effects of HccE

Oral treatment with HccE (100 mg/kg, p.o.), neither alter spontaneous locomotor activity (crossing and rearing) in the open-field test nor forced locomotion in the rotarod test, when compared with the vehicle-treated animals (Table 2). Likewise,

gastrointestinal motility, change in temperature (data not shown) and gastric lesions were not observed (Table 3), when compared with the vehicle-treated animals.

Table 2

Effect of *H. courbaril* crude extract (HccE, 100 mg/kg, p.o.) or vehicle on spontaneous (open-field test) and forced (rotarod test) locomotor activity in mice 1 h after treatment.

Treatment	Open field		Rotarod
	Crossing	Rearing	Latency (s)
Vehicle	35.4 ± 3.6	28.6 ± 3.6	54.8 ± 5.2
HccE	53.2 ± 7.8	30.4 ± 5.6	60.0 ± 0.0

Data are expressed as the mean ± S.E.M. of the number of crossing and rearing in the open-field test and latency to first fall in the rotarod test of 5-6 mice in each group (Student's t-test).

Table 3

Assessment of gastric lesion and gastrointestinal transit measurement after *H. courbaril* crude extract (HccE, 100 mg/kg, p.o.) treatment.

Treatment	Gastric lesion index	Gastrointestinal transit
Vehicle	0.2 ± 0.2	56.5 ± 3.5
Diclofenac Sodium (50 mg/kg, p.o.)	4.4 ± 0.4*	ND
Morphine (10 mg/kg, p.o.)	ND	29.3 ± 2.8*
HccE (100 mg/kg, p.o.)	0.6 ± 0.2	57.7 ± 4.5

ND = not determined.

Data are expressed as the mean ± S.E.M. of 5-6 mice in each group. * $p < 0.05$ compared with the vehicle group (one-way ANOVA followed by Bonferroni's *post-hoc* test).

3.5.2 Acute toxicity study

The administration of the HccE (2000 mg/kg, p.o.) did not produce mortality or other behavioral abnormalities in test animals. Gastric lesions were not observed, and there was none difference in weight between the vital organs, showing no evidence of toxicity during the necropsy of the animals and was marginal increase in body weight (data not shown). Biochemical parameters showed no change AST/ALT enzyme activities and creatinine/glucose levels. In contrast, urea level was increased when compared to vehicle-treated animals (Table 4).

Table 4

Assessment of adverse effects after acute administration in female mice of *H. courbaril* crude extract (HccE, 2000 mg/kg, p.o.).

Treatment	AST(U/l)	ALT (U/l)	Urea(mg/dl)	Creatinine(mg/dl)	Glucose(mg/dl)
Vehicle	24.7 ± 3.5	19.7 ± 3.5	8.6 ± 1.7	0.8 ± 0.5	115.1 ± 1.0
HccE	23.8 ± 1.5	21.2 ± 1.4	26.6 ± 11.6*	0.5 ± 0.1	124.4 ± 5.9

Data are expressed as the mean ± SEM of 3 mice in each group. * $p < 0.05$ compared with the vehicle group (Student's t-test).

4. Discussion

In the current study, we showed that oral administration of HccE and the Chlo and But fractions caused antinociception in the capsaicin-induced spontaneous nociception test. In addition, oral HccE administration caused antinociception in the CFA-induced arthritic pain model and naloxone did not prevent this effect. Further, HccE increased the tail withdrawal latencies after treatment in the tail-flick test. This antinociceptive effect found can be attributed to the active constituents present in the *H. courbaril*. HccE neither altered locomotor activity, body temperature and gastrointestinal function nor developed gastric lesions.

Firstly, we demonstrated through liquid chromatography-tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) analysis the presence of polyphenols and triterpenes,

including a greater amount of catechin, luteolin and sitosterol in the *H. courbaril* crude extract. In sequence we verified that the HccE and its Chlo and But fractions were able to reduced the capsaicin-induced spontaneous nociception. These results are according to others studies which demonstrated that luteolin and sitosterol has analgesic activity in the capsaicin test (Carvalho and Carvalho, 2001; Guilhon et al., 2015).

Since the *H. courbaril* is used in the folk medicine to treat inflammation and rheumatism and the HccE presented better antinociceptive effect in the capsacin test, we tested the HccE antinociceptive effect in the arthritic pain model CFA-induced in mice. The animals presented mechanical allodynia and paw inflammation after intraplantar CFA injection, similar to patients with rheumatoid arthritis that show decreased in the pain threshold in inflamed joints and also in non-inflamed tissues (Meeus et al., 2012). We verify that HccE was able to reverse the mechanical allodynia CFA-induced which is clinically relevant since patients seek medical care for treat the painful symptoms (Oliveira et al., 2014). This antinociceptive effect can be due presence of catechin in the extract, since catechin, a constituent of extract, is a major polyphenols studied for the treatment of arthritic pain and has shown good analgesic effects arthritic pain model in mice and rats (Adcocks et al., 2002; Aguirre et al., 2006; Taghi et al., 2013). Furthermore, animal studies revealed that epigallocatechin-3-gallate (EGCG), a biologically active catechins present in green tea, ameliorated inflammatory arthritis in an adjuvant-induced arthritis model (Kim et al., 2008; Yang et al 2014).

Beyond the painful process, the CFA administration causes inflammation with infiltration of inflammatory cells, especially neutrophils (Almarestani et al., 2008). Here, we demonstrated that intraplantar CFA injection promoted paw edema and increased the MPO enzyme activity (marker for neutrophils infiltration) which was confirmed by histological procedure. On the other hand, HccE was not able to reduce the inflammatory parameters CFA-caused indicating that the anti-inflammatory pathways are not involved in the antinociceptive effects of HccE.

The effect of HccE also was verified in the tail-flick test, a sensitive test drug acting on the central nervous system, in which thermal stimuli is used as an important parameter in the evaluation of antinociceptive activities (D'amour and Smith, 1941). The oral administration of HccE increased tail withdrawal latencies of mice, suggesting that the HccE antinociceptive effect involves a central nervous component, since the test evaluates spinal reflexes and central anti-nociceptive pathways (Mohammadi et al., 2016; Jensen et al., 1986). Our results are according to Akkol et al. (2010) and

Backhouse et al. (2012), that demonstrated the antinociceptive effect of extracts containing large concentrations of luteolin and derived from catechin (4 methyl gallate) in tail-flick test. In fact, the tail-flick test is a test used to find drugs that act on the central nervous system as well as opioid analgesics (Vanderah et al., 2008). Nevertheless, the pretreatment with naloxone opioid antagonist did not reverse the analgesic effect of HccE, discarding the possibility that the antinociceptive effect of HccE occurs via the opioid system. In contrast, studies have shown that luteolin and EGCG cross the blood-brain barrier exhibiting central effects which are associated with GABAergic transmission, which plays important roles in nociceptive processing of a wide range of pain conditions (Hara et al., 2014; Raposo et al., 2015). Therefore, it is possible that the effect of HccE in the tail-flick test is being mediated through GABAergic receptors. However, more experiments are necessary to investigate HccE action mechanism.

One of the concerns in experiments to assess analgesic action of new pharmacologic agents is that the treatment can promote motor incoordination, which can be falsely interpreted as analgesia (Oliveira et al., 2008; Trevisan et al., 2012). We demonstrated that the treatment with HccE does not cause locomotor alterations in the mice when evaluated in the rotarod and open-field test, proving that there is no locomotor interference in the antinociceptive effect of HccE.

We also investigated other possible adverse effects caused by oral treatment with HccE such as body temperature, and gastrointestinal transit, since, treatment with cyclooxygenase inhibitors (specially COX-3) and opioid analgesic (such as dipyron and morphine) produce hypothermia and constipation, respectively (Tomazetti et al., 2005; Anselmi et al., 2015). As expected, dipyron and morphine (used as positive controls) developed hypothermia and constipation in the animals. This effect was not observed in the group treated with HccE.

Although NSAIDs are recommended for the treatment of joint pain and inflammation, their chronic use is limited by adverse effects development including nausea, nephrotoxicity, gastrointestinal bleeding and ulcer perforation (Tauben, 2015). In our study HccE did not cause gastric alterations. Moreover, a previous study showed that the methanol extract of jatoba tree bark and the fruit pulp alleviate symptoms and have a healing effect on ulcers, gastrointestinal pain and diarrhea (Orsi et al., 2012), showing its protector effect on gastric mucosa. In addition we showed that oral acute administration of the HccE (2000 mg/kg, p.o.), as recommended by the OECD 425, did

not generated acute symptoms of toxicity, behavioral changes and/or other symptoms associated with its administration in female mice. Likewise, the food consumption and body weight gain of the group treated with HccE were similar when compared to the control group and no mortality was observed after 14 days of treatment. This result showed the lack of acute toxicity caused by HccE and, although medicinal plants present low toxicity, its inadequate use can lead to serious problems associated with other risk factors (Silveira et al., 2008). The kidney plays a key role in the removal of metabolic wastes such as urea and creatinine, promoting the homeostasis maintenance of the body (Ramachandran et al., 2012). Biochemical assessment of acute treatment with HccE (2000 mg/kg, p.o.) showed an increase in urea levels indicating a possible renal dysfunction. However, the therapeutic window for treatment with HccE is large, keeping its distal toxic effective dose. Therefore ensuring that treatment for arthritic pain does not cause renal disorders.

Thus, our results demonstrate that the crude extract of *H. courbaril* (HccE) can be used as a treatment for rheumatoid arthritis, confirming its use in folk medicine.

5. Conclusion

The current study revealed that the crude extract of *H. courbaril* (HccE) as well as Chlo and But fractions promote antinociception effect in central and peripheral level. It is possible that phenolic and triterpene compounds catechins, luteolin and sitosterol, known chemical components of stem bark extract of *H. courbaril* contribute for the antinociceptive activity found. Our results suggest that it may be an interesting analgesic for the treatment of chronic painful conditions such as arthritic pain.

Conflicts of interest

The authors have no conflicts of interest to declare.

Acknowledgements

This study was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) (306468/2014-0) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do

Rio Grande do Sul (FAPERGS). We also acknowledge fellow ships from CNPq and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) (Brazil).

References

- Adcocks, C., Collin, P., Buttle, D.J., 2002. Catechins from green tea (*Camellia sinensis*) inhibit bovine and humancartilage proteoglycan and type II collagen degradation in vitro. *J. Nutr.* 132, 341-346.
- Agra, M.F., Freitas, P.F., Filho, J.M., 2007. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. *Rev. Bras. Farmacogn.* 17, 114-140.
- Aguirre, M.C., Delporte, C., Backhouse, N., Erazo, S., Letelier, M.E., Cassels, B.K., Silva, X., Alegria, S., Negrete, R., 2006. Topical anti-inflammatory activity of 2 alphas-hydroxy pentacyclic triterpene acids from the leaves of *Ugni molinae*. *Bioorg. Med. Chem.* 14, 5673-5677.
- Akkol, E.K., Orhan, I., Kartal, M., Yesilada, E., 2010. Bioactivity guided evaluation of anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Arceuthobium oxycedri* (D.C.) M. Bieb. *J. Ethnopharmacol.* 128,79-84.
- Almarestani, L. Longo, G. Silva, A.R. 2008. Autonomic fiber sprouting in the skin in chronic inflammation. *Mol. Pain.* 4:56.
- Anselmi, L., Huynh, J., Vegezzi, G., Sternini, C., 2013. Effects of methylnaltrexone on guinea pig gastrointestinal motility. *Naunyn. Schmiedebergs. Arch. Pharmacol.* 386, 279-286.
- Atanasov, A.G., Waltenberger, B., Pferschy-Wenzig, E.M., Linder, T., Wawrosch, C., Uhrin, P., Temml, V., Wang, L., Schwainger, S., Heiss, E.H., Rollinger, J.M., Schuster, D., Breuss, J.M., Bochkov, V., Mihovilovic, M.D., Kopp, B., Bauer, R., Dirsch, V.M., Stuppner, H., 2015. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. *Biotechnol. Adv.* 33, 1582-1614.
- Backhouse, N., Delporte, C., Apablaza, C., Farías, M., Goity, L., Arrau, S., Negrete, R., Castro, C., Miranda, H., 2008. Antinociceptive activity of *Buddleja globosa* (matico) in several models of pain. *J. Ethnopharmacol.* 119, 160-165.
- Boligon, A.A., Brum, T.F., Zadra, M., Piana, M., Alves, C.F., Fausto, V.P., Júnior, V. dos S., Vaucher, R. de A., Santos, R.C., Athayde, M.L., 2013. Antimicrobial activity of *Scutia buxifolia* against the honey bee pathogen *Paenibacillus larvae*. *J Invertebr. Pathol.* 112, 105-107.
- Calixto, J.B., Beirith, A, Ferreira, J., Santos, A.R., Filho, V.C., Yunes, R.A., 2000. Naturally occurring antinociceptive substances from plants. *Phytother. Res.* 14, 401-418.
- Carvalho, G.J.A., Carvalho, M.E., 2001. Diterpenes, triterpenes and steroids from flowers of *Wedelia paludosa*. *Quimica Nova.* 24, 24-26.
- Chaplan, S. R., Bach, F. W., Pogrel, J. W., Chung, J. M., Yaksh, T. L., 1994. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw. *J. Neurosci. Methods.* 53, 55-63.
- D'amour F.E., Smkith D.L., 1941. A method for determining loss of pain sensation. *J Pharmacol. Exp. Ther.* 72, 74-79.
- Dixon, W.J., 1980. Efficient analysis of experimental observations. *Annu Rev Pharmacol. Toxicol.* 20, 441-62.
- Faccin, H., Viana, C., Nascimento, P.C., Bohrer, D., Carvalho, L.M., 2016. Study of ion suppression for phenolic compounds in medicinal plant extracts using liquid

- chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *J. Chromatography. A* 1427, 111–124.
- Fardet, A., Kassar, J., Cabane, A., Flahault., 2007. “Corticosteroid-induced adverse events in adults: frequency, screening and prevention,”. *Drug Safety* 10, 861–881.
- Gazzaneo, L.R., Luneca, R.F., Albuquerque U.P., 2005. Knowledge and use of medicinal plants by local specialists in an region of Atlantic Forest in the state of Pernambuco (Northeastern Brazil). *J. Ethnobiol. Ethnomed.* 1, 9.
- Guilhon, C.C., Abdul Wahab, I.R., Boylan, F., Fernandes, P.D., 2015. Central antinociceptive and mechanism of action of *Pereskia bleo Kunth* leaves crude extract, fractions, and isolated compounds. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* 915927, 1-12.
- Gobo, L., Viana, C., Lameira, O. A., Carvalho, L. M., 2016. A liquid chromatography-atmospheric pressure photoionization tandem mass spectrometric (LC-APPI-MS/MS) method for the determination of triterpenoids in medicinal plant extracts. *J. Mass. Spectrom* (in press).
- Gonçalves, A.L., Filho, A.A., Menezes, H., 2005. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. *Arq. Inst. Biol.* 72, 353-358.
- Hamann, F.R., Zago, A.M., Rossato, M.F., Beck, V.R., Mello, C.F., de Brum, T.F., de Carvalho, L.M., Faccin, H., Oliveira, S.M., Rubin, M.A., 2016. Antinociceptive and antidepressant-like effects of the crude extract of *Vitex megapotamica* in rats. *J. Ethnopharmacol.* 192, 210-216.
- Hara, K., Haranishi, Y., Terada, T., Takahashi, Y., Nakamura, M., Sata, T., 2014. Effects of intrathecal and intracerebroventricular administration of luteolin in a rat neuropathic pain model. *Pharmacol. Biochem.* 125, 78-84.
- Jensen TS, Yaksh TL., 1986. Comparison of antinociceptive action of morphine in the periaqueductal gray, medial and paramedial medulla in rat. *Brain. Res.* 363, 99–113.
- Jung, E., Han, K., Hwang, S.G., Kwon, H., Patnaik, B.B., Kin, Y.H., Han, M. 2015. Brazilin isolated from *Caesalpinia sappan* L. inhibits rheumatoid arthritis activity in a type-II collagen induced arthritis mouse model. *BMC. Complement. Altern. Med.* 15, 124.
- Kim, H.R., Rajaiyah, R., Wu, Q.L., Satpute, S.R., Tan, M.T., Simon, J.E., Berman, B.M., Moudgil, K.D., 2008. Green tea protects rats against autoimmune arthritis by modulating disease-related immune events. *J. Nutr.* 138, 2111–2116.
- Koehn, F.E., Carter, G.T., 2005. The evolving role of natural products in drug discovery. *Nat. Rev. Drug. Discov.* 4, 206–220.
- Li, L., Wu, J., Liu, B., Sun, J., Gong, W., Lv, Y., Zhang, H., Luo, Q., Wu, X., Dong, J., 2012. Baicalin is anti-inflammatory in cigarette smoke-induced inflammatory models in vivo and in vitro: a possible role for HDAC2 activity. *Int. Immunopharmacol.* 13,15–22.
- Loeser, L.D., Treede, R.D., 2008. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. *Pain.* 137, 473-477.
- Longo, G., Osikowicz., M, Ribeiro., A., 2013. Sympathetic fiber sprouting in inflamed joints and adjacent skin contributes to pain-related behavior in arthritis. *J. Neurosci.* 24, 33-24.
- Magistretti, M. J., Conti, M., Cristoni, A., 1988. Antiulcer activity of na anthocyanidin from *Vaccinium myrtillus*. *Drug. Res.* 38, 686- 690.
- Meeus, M., Vervisch, S., De Clerck, L.S., Moorkens, G., Hans, G., Nijs, J., 2012. Central sensitization in patients with rheumatoid arthritis: a systematic literature review. *Semin. Arthritis. Rheum.* 41, 556-567.

- Mohammadi, S., Mohammad Z., Mohammad M.Z., Salehi, I., 2016. Effect of hydroalcoholic leaves extract of *Rhus Coriariaon* pain in male rats. *Anesth. Pain. Med.* 6, e32128.
- Nair, V., Singh, S., Gupta, Y.K. 2011. Evaluation of the disease modifying activity of *Colchicum luteum* Baker in experimental arthritis. *J. Ethnopharmacol.* 133, 303–307.
- OEDC., 2001. Guideline for Testing of Chemicals. Guidance no. 423. Acute Oral Toxicity: Acute Toxic Class Method. Paris.
- Oliveira, S.M., Gewehr, C., Damolin, G.D., Cechinel, C.A., Wentz, A., Lourega, R.V., Sehnem, R.C., Zanatta, N., Martins, M.A, Rubin, M.A., Bonacors, H.G., Ferreira, J., 2008. Antinociceptive Effect of a Novel Tosylpyrazole Compound in Mice. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 104, 122–129.
- Oliveira, S.M., Drewes, C.C., Silva, C.R., Trevisan, G., Boschen, S.L., Moreira, C.G., de Almeida Cabrini, D., Da Cunha, C., Ferreira, J., 2011. Involvement of mast cells in a mouse model of postoperative pain. *Eur. J. Pharmacol.* 672, 88–95.
- Oliveira, S.M., Silva, C.R., Wentz, A.P., Paim, G.R., Correa, M.S., Bonacorso, H.G., Prudente, A.S., Otuki, M.F., Ferreira, J., 2014. Antinociceptive effect of 3-(4-fluorophenyl)-5-trifluoromethyl-1H-1-tosylpyrazole. A Celecoxib structural analog in models of pathological pain. *Pharmacol Biochem Behav.* 124, 396–404.
- Orsi, P.R., Bonamin, F., Severi, J.A., Santos, R.C., Vilegas, W., Hiruma-Lima, C.A., Stasi, L.C.D., 2012. *Hymenaea stigonocarpa* Mart. ex Hayne: a brazilian medicinal plant with gastric and duodenal anti-ulcer and antidiarrheal effects in experimental rodent models. *J. Ethnopharmac.* 143, 81–90.
- Ramachandran, S., Rajasekaran, A., Manisenthilkumar, K., 2012. Investigation of hypoglycemic, hypolipidemic and antioxidant activities of aqueous extract of *Terminalia paniculata* bark in diabetic rats. *Asian. Pac. J. Trop. Biomed.* 2, 262–268.
- Raposo, D., Morgado, C., Terra, P.P., Tavares, I., 2015. Nociceptive spinal cord neurons of laminae I-III exhibit oxidative stress damage during diabetic neuropathy which is prevented by early antioxidante treatment with epigallocatechin-gallate (EGCG). *Brain Res. Bull.* 110, 68-75.
- Rentero, M.L., Amigo, E., Chozas, N., Prada, M.F., Fernández, L.S., Hernandez, M.A.A., Barrera, J.M.R., Montes, J.P., and on behalf of the GHDP study group., 2015. Prevalence of fractures in women with rheumatoid arthritis and/or systemic lupus erythematosus on chronic glucocorticoid therapy. *BMC Musculoskeletal Disord.* 16, 300.
- Rossato, M.F., Hoffmeister, C., Tonello, R., de Oliveira Ferreira, A.P., Ferreira, J., 2014. Anti-inflammatory effects of vitamin e on adjuvant-induced arthritis in rats. *Inflammation* 38, 606-615.
- Silveira, P.F., Bandeira, M.A.M., Arrais, P.S.D., 2008. Pharmacovigilance and adverse reactions to the medicinal plants and herbal drugs: a reality. *Braz. J. Pharm.* 18, 618–626.
- Tabarelli, Z., Rubin, M.A., Berlese, D.B., Sauzem, P.D., Missio, T.P., Teixeira, M.V., 2004. Antinociceptive effect of novel pyrazolines in mice. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 37, 1531-1540.
- Taghi, M.M., Naghizadeh, B., Ghorbanzadeh, B., Farbood, Y., 2013. Central and peripheral antinociceptive effects of ellagic acid in different animal models of pain. *Eur. J. Pharmacol.* 707, 46–53.
- Tauben, D., 2015. Nonopioid medications for pain. *Phys. Med. Rehabil. Clin. N. Am.* 26, 219-248.

- Tomazetti, J., Avila, D.S., Ferreira, A.P., Martins, J.S., Souza, F.R., Royer, C., Rubin, M.A., Oliveira, M.R., Bonacorso, H.G., Martins, M.A., Zanatta, N., Mello, C.F., 2005. Baker yeast-induced fever in young rats: characterization and validation of an animal model for antipyretics screening. *J. Neurosci. Methods.* 147, 29–35.
- Trevisan, G., Rossato, M. F., Walker, C.I.B., Klafke, J.Z., Rosa, F., Oliveira, S.M., Tonello, R., Guerra, G.P., Boligon, A.A., Zanon, R.B., Athayde, M.L., Ferreira, J., 2012. Identification of the plant steroid α -spinasterol as a novel transiente receptor potential vanilloid 1 antagonist with antinociceptive properties. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 343, 258–269.
- Suzuki, K., Ota, H., Sasagawa, S., Sakatani, T., Fujikura, T., 1983. Assay method for myeloperoxidase in human polymorphonuclear leukocytes. *Anal. Biochen.* 15, 345-352.
- Vanderah, T.W., Largent-Milnes, T., Lai, J., Galyean, R., Scteingart, C., Junien, J.-L., Trojnar, J., Rivière, P.J.-M., 2008. Novel D -amino acid tetrapeptides produce potente antinociception by selectively acting at peripheral kappa-opioid receptors. *Eur. J. Pharmacol.* 583, 62-72.
- Wang, Q., Kuang, H., Su, Y., Sun, Y., Feng, J., Guo, R., Chan, K., 2013. Naturally derived anti-inflammatory compounds from Chinese medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* 146, 9-39.
- Watanabe, T., Takahashi, N., Hirabara, S., Ishiquro, N., Kojima, T., 2016. Hyaluronan Inhibits Tlr Dependent RANKL Expression in Human Rheumatoid Arthritis Synovial Fibroblasts. *PLoS One* 11, e0153142.
- Wolfe, F., Cathey, M.A., 1991. The assessment and prediction of functional disability in disability in rheumatoid arthritis. *J. Rheumatol.* 18, 1298-1306.
- Yang, E., Lee, J., Lee, S., Kim, E., Moon, Y., Jung, Y., Park, S., Cho, M., 2014. EGCG Attenuates Autoimmune Arthritis by Inhibition of STAT3 and HIF-1a with Th17/Treg Control. *PLoS ONE* 9, e86062.

4 CONCLUSÕES

4.1 CONCLUSÕES PARCIAIS

4.1.1 O extrato bruto de *H. Courbaril* (HccE) e suas frações clorofórmica e butanólica apresentaram efeito antinociceptivo no teste da capsaicina.

4.1.2 O HccE apresentou efeito antinociceptivo em um modelo de dor artrítica induzida por CFA, comprovando seu uso popular.

4.1.3 O sistema opioide não está envolvido com o efeito antinociceptivo do HccE, uma vez que a naloxona não reverteu este efeito.

4.1.4 O HccE não reverteu o edema de pata e nem o aumento da atividade da mieloperoxidase induzidos por CFA, mostrando não apresentar efeito anti-inflamatório.

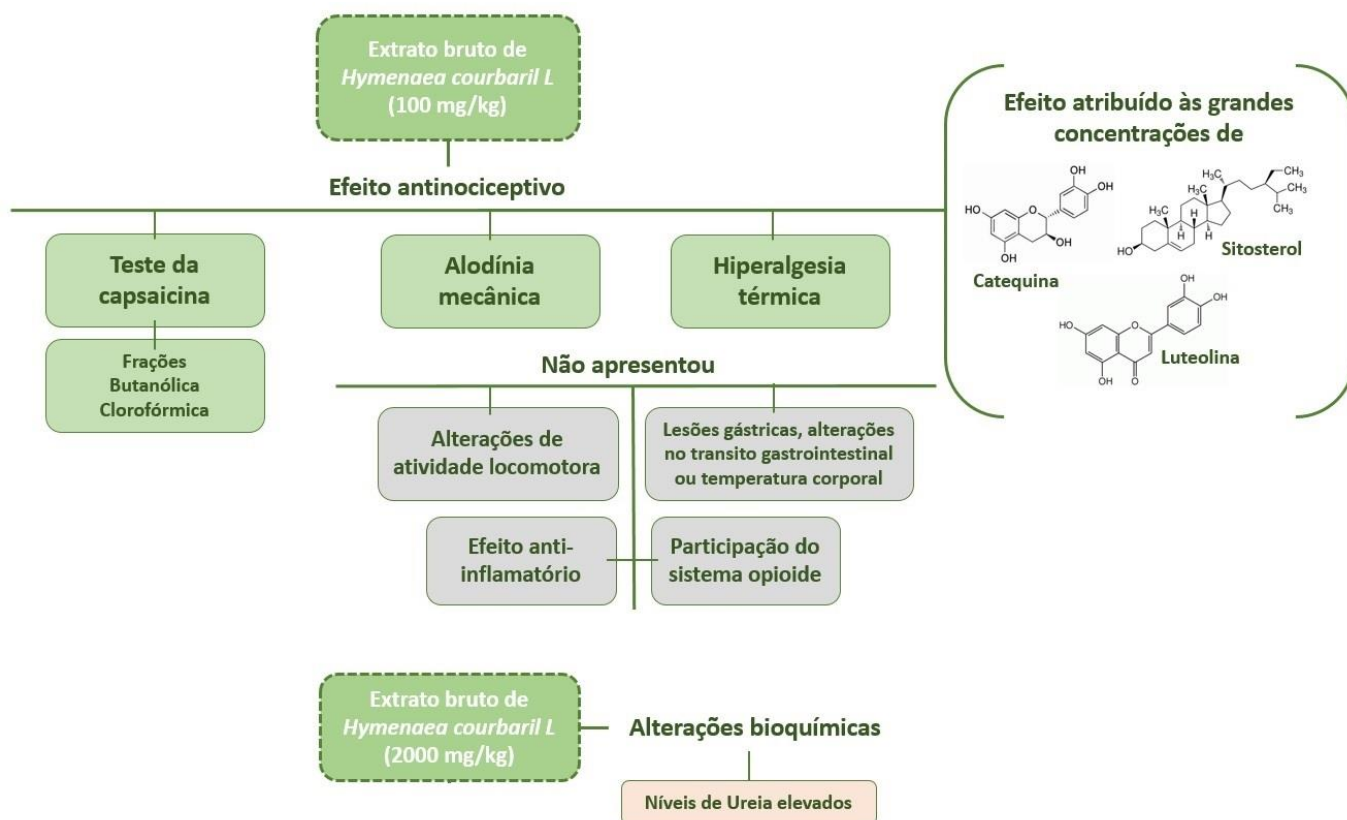
4.1.5 O HccE não alterou a atividade locomotora, a temperatura corporal, a função gastrointestinal, e não causou lesões gástricas nos animais, descartando o desenvolvimento destes efeitos adversos.

4.1.6 O HccE parece alterar a função renal dos animais no teste de toxicidade aguda mas não altera a função hepática dos mesmos.

4.2 CONCLUSÃO GERAL

O extrato bruto de *H. Courbaril* L. apresentou efeito antinociceptivo em um modelo de dor artrítica induzido por CFA, confirmando seu uso popular. Apesar da alteração renal causada por uma alta dose do HccE, seu uso na dose testada torna-se seguro devido sua alta janela terapêutica (Figura 3).

Figura 3 - Conclusão ilustrativa dos efeitos do extrato bruto de *H. courbaril*.



5 PERSPECTIVAS

- ✓ Verificar outros possíveis mecanismos de ação para o efeito antinociceptivo do extrato bruto de *H. courbaril*.
- ✓ Analisar o efeito isolado dos compostos majoritários encontrados na espectrometria de massa de cromatografia líquida (LC-MS / MS).

6 REFERÊNCIAS

AGRA, M.F. et al. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.17, p. 114-140, 2007.

ALMARESTANI, L., LONGO, G., SILVA, A.R. Autonomic fiber sprouting in the skin in chronic inflammation. **Molecular Pain**, 4:56, 2008.

ARIAS, T.D. Glosario de medicamentos: desarrollo, evaluación y uso. **Organización Mundial de La Salud**, 1999.

BARS, L.D. et al. Diffuse noxious inhibitory controls (DNIC). I. Effects on dorsal horn convergent neurones in the rat. **Pain**, v.6, p. 283-304, 1979.

BEAL, B.R.; WALLACE, M.S. An overview of pharmacologic management of chronic pain. **Medical Clinics of North America**, v.100, p. 65-79, 2016.

BORENSTEIN, D. et al. Report of the American College of Rheumatology Pain Management Task Force. **Arthritis Care Research**, v.62, p. 590-9, 2010.

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

BOYDEN, S.D. et al. Non-inflammatory Causes of Pain in Patients with Rheumatoid Arthritis. **Current Rheumatology Reports**, 18: 30, 2016.

BRENNAN, F.M., MCINNES, I.B. Evidence that cytokines play a role in rheumatoid arthritis. **Journal of Clinical Investigation**. v.118, p. 3537–3545, 2008.

CAMPOS, M.A.A, UCHIDA, T. Influência do sombreamento no crescimento de mudas de três espécies amazônicas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira** v.37, p. 281-8, 2002.

CARTAXO, S.L. et al. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semiarid northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacol**, v.13, p. 326-342, 2010.

CAZZOLA, M. et al. Physiopathology of pain in rheumatology. **Reumatism**, v.66, p.4-13, 2014.

CORVAISIER, M. et al. IL-26 is over expressed in rheumatoid arthritis and induces proinflammatory cytokine production and Th17 cell generation. **PLoS Biol**, v.10 e1001395, 2012.

COSTIGAN, M. et al. Neuropathic pain: a maladaptive response of nervous system to damage. **Annual Review of Neuroscience**. v. 32, p. 1-32, 2009.

CROFFORD, L.J. Prostanoid Biology and Its Therapeutic Targeting. **Pharmacology of antirheumatic drugs**, v.59, p. 871-893, 2013.

- CUNHA, T.M. et al. An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. **Brazilian Journal Of Medical and Biological Research**, v. 37, p. 401- 407, 2004.
- D' AMOUR, F.E., SMKITH, D.L. A method for determining loss of pain sensation. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.72, p. 74-79, 1941.
- DAVIES, R., CHOY, E. Clinical experience of IL-6 blockade in rheumatic diseases- Implications on IL-6 biology and disease pathogenesis. **Seminars in Immunology**, v.26, p, 97-104, 2014.
- DIAS, L.S. et al. Physicochemical and bioactive properties of *Hymenaea courbaril* L. pulp and seed lipid fraction. **Industrial Crops and Products**, v.49, p. 610– 618, 2013.
- DIXON, W.J. Efficient analysis of experimental observations. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v.20, p. 441-462, 1980.
- DOLATI, S. et al. Utilization of nanoparticle technology in rheumatoid arthritis treatment. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 80, p. 30–41, 2016.
- FARDAT, A. et al. “Corticosteroidinduced adverse events in adults: frequency, screening and prevention”. **Drug Safety**, v. 10, p. 861–881, 2007.
- FISCHER, L.G. et al. Further antinociceptive properties of extracts and phenolic compounds from *Plinia glomerata* (Myrtaceae) leaves. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 31, p. 235-239, 2008.
- FRANÇA, I.S.X. et al. Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v.61, p. 201-208, 2008.
- GAZZANETO, L.R et al. Knowledge and use of medicinal plants by local specialists in an region of Atlantic Forest in the state of Pernambuco (Northeastern Brazil). **Journal Ethnobiology Ethnomedicine**. 1:9, 2005.
- GIBOFSKY, A. “Combination therapy for rheumatoid arthritis in the era of biologicals,” **HSS Journal**, v.2, p. 30-41, 2006.
- GONÇALVEZ, A.L., FILHO, A.A., MENEZES, H. Estudo comparativo da atividade antimicrobiana de extratos de algumas árvores nativas. **Arquivo do Instituto Biológico**. v.72, p. 353-358, 2005.
- GUPTA, D. et al. Biochemical analysis of ‘kerosene tree’ *Hymenaea courbaril* L. under heat stress. **Plant Signaling & Behavior**, v. 10, e972851-9, 2014.
- GRACE, P.M. et al. Pathological pain and the neuroimmune interface. **Nature Reviews Immunology**, v. 14, p. 217-231, 2014.
- GREGERSEN, P.K. et al. The shared epitope hypothesis. Na approach to understanding the molecular genetics of susceptibility to rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheumatology**, v.30, 1205e13, 1987.

HAIR, M.J. et al. The clinical picture of rheumatoid arthritis according to the 2010 American College of Rheumatology/European League against Rheumatism criteria: is this still the same disease? **Arthritis Rheumatology**, v.64, p. 389-93, 2012.

HATHOUT, et al. Serum pharmacodynamic biomarkers for chronic corticosteroid treatment of children. **Scientific Reports**, 6:31727.

HELMICK, C.G. et al. Estimates of the prevalence of arthritis and other rheumatic conditions in the United States. Part I. **Arthritis Rheumatology**, v.58, p.15–25, 2008.

JULIUS, D., BASBAUM, I. A. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**. 413, 2001.

KOURILOVITCH, M. et al. Diagnosis and classification of rheumatoid arthritis. **Journal of Autoimmunity** v.48, p. 26-30, 2014.

KUMAR, D.R. et al. Advancement in contemporary diagnostic and therapeutic approaches for rheumatoid arthritis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.79 p.52–61, 2016.

LAAR, M.V. et al. Pain Treatment in Arthritis-Related Pain: Beyond NSAIDs. **The Open Rheumatology Journal**, v.6, p. 320-333, 2012.

LEE, Y.C. Effect and Treatment of Chronic Pain in Inflammatory Arthritis. **Current Rheumatology Reports**, v.15, 300, 2013.

LEE, Y., LANGENHEIM, JH. Systematics of the genus *Hymenaea* L. (Leguminosae, Caesalpinioideae, Detarieae). **University of California Publications in Botany**, v. 69, 1975.

LI, W.M. et al. Analgesic effect of electroacupuncture on complete Freund's adjuvant-induced inflammatory pain in mice: a model of antipain treatment by acupuncture in mice. **The Japanese Journal of Physiology**, v. 55, p. 339-344, 2005.

LIN, B. et al. Anti-arthritic activity of *Xanthium strumarium* L. extract on complete Freund's adjuvante induced arthritis in rats. **Journal of Ethnopharmacology**. v.155, p. 248–255, 2014.

LINLEY, J.E. et al. Understanding inflammatory pain: ion channels contributing to acute and chronic nociception. **European Journal of Physiology**, v. 459, p. 657–669, 2010.

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

LORENZI, F.J.A., MATOS. Medicinal plants in Brazil, in: Native and Exotics, Plantarum Institute, Nova Odessa, SP, Brazil, 2002.

- MACINTYRE, P.E., et al. Acute pain management: scientific evidence. **Australian and New Zealand College of Anaesthetists and Faculty of Pain Medicine**. 3^a Ed., p.1- 533, 2010.
- MEYER, R.A. et al. Peripheral mechanisms of cutaneous nociception. **In Wall and Melzack's Textbook of Pain**, p. 3-34, 2008.
- MCINNES, I.B., SCHETT, G. The pathogenesis of rheumatoid arthritis. **The New England Journal of Medicine**, v.365, p. 2205–2219, 2011.
- NAVRATILOVA, E.; PORRECA, F. Reward and motivation in pain and pain relief. **Nature Neuroscience**, v. 17, p. 1304-1312, 2014.
- OKUN, A. et al. Transient inflammation-induced ongoing pain is driven by TRPV1 sensitive afferents. **Molecular Pain**, 7:4, 2011.
- OLIVEIRA, S. M. et al. Antinociceptive Effect of a Novel Tosylpyrazole Compound in Mice. **Journal Compilation**. v.104, p.122–129, 2008.
- PEDERSEN, B.K., SALTIN, B. Exercise as medicine – evidence for prescribing exercise as therapy in 26 different chronic diseases. **Scandinavian journal of medicine & Science in sports**, v.25, p.1-72, 2015.
- PINTO et al. Produtos naturais: Atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v.1, p. 45-61, 2002.
- RATES, S.M.K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de Farmacognosia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.2, p.57-69, 2001.
- RUSSO, C.M., BROSE, W.G. Chronic pain. **Annual Review of Medicine**, v. 49, p. 123-33, 1998.
- SASAKI, K. et al. High-Performance Liquid Chromatographic Purification of Oligomeric Procyanidins, Trimers up to Nonamers, Derived from the Bark of Jatoba (*Hymenaea courbaril*). **Bioscience, Biotechnol, and Biochemistry**, v.73, p.1274–1279, 2009.
- SCALBERT, A. Antimicrobial properties of tannins. **Phytochemistry**, v.30, p. 3875-3883, 1991.
- SCHAIBLE, H.G. Nociceptive neurons detect cytokines in arthritis. **Arthritis Research & Therapy**, v.16, p. 470, 2014.
- SCHENKEL, E.P. et al. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, v.15, p.291-320, 2000.
- SCHULZ, V. et al. Rational phytotherapy: a physician's guide to herbal medicine. v.1, p.1-39. 2001.

SCHOLZ, J.; WOOLF, C.J. Can we conquer pain? **Nature Neuroscience** v. 5, p. 1062-1067, 2002.

SILVA, et al. Modelos experimentais para avaliação da atividade antinociceptiva de produtos naturais: uma revisão. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.94, p. 18-23, 2013

SIXEL, P.J., PECINALLI, N.R. Características farmacológicas gerais das plantas medicinais. **Informa**, v.15, p.13-14, 2005.

SMOLEN, J.S. et al. New therapies for treatment of rheumatoid arthritis. **Lancet** v. 370, p. 1861-74, 2007.

SMOLEN, J.S. et al. Proposal for a new nomenclature of disease-modifying antirheumatic drugs. **Annals of the Rheumatic Diseases**, v.73, p.3-5, 2014.

SOUZA, I.M et al. Morphological analyses suggest a new taxonomic circumscription for *Hymenaea courbaril* L. (Leguminosae, Caesalpinioideae). **Phyto Keys**, v.38, p.101–118, 2014.

TANAKA, Y. Current concepts in the management of rheumatoid arthritis. **The Korean Journal of Internal Medicine**, v.31, p.210-218, 2016.

TRACEY. Imaging pain. **British Journal of Anaesthesia**, v.101 p. 0-32, 2008.

TAUBEN, D. Nonopioid medications for pain. **Physical Medicine and Rehabilitation Clinics of North America**, v. 26, p. 219–248, 2015.

TOWNSEND, H.B., SAG, K.G. Glucocorticoid use in rheumatoid arthritis: Benefits, mechanisms, and risks. **Clinical and Experimental Rheumatology**, v.22 p.77-82, 2004.

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.

VOSCOPOULOS, C.; LEMA, M. When does acute pain become chronic? **British Journal of Anaesthesia**, v. 105, p. 69-85, 2010.

WALKER, A.K. et al. Neuroinflammation and Comorbidity of Pain and Depression. **Pharmacological reviews**, v. 66, p. 80-101, 2014.

WALSH, D.A., MCWILLIAMS, D.F. Mechanisms, impact and management of pain in rheumatoid arthritis. **Nature Reviews Rheumatology**, v.10, p.581-92, 2014.

WOOLF, C.J. Evidence for a central component of post-injury pain hypersensitivity. **Nature**, v.306, p. 686-8, 1983.

WOOLF, C.J. What is this thing called pain? **The Journal of Clinical Investigation**, v. 120, p. 3742–3744, 2010.

WOOLF, C.J. Central sensitization: implications for the diagnosis and treatment of pain. **Pain**, v. 152, (3 Suppl): S2-15, 2011.

WOOLF, C.J., MA, Q. Nociceptors- noxious stimulus detectors. **Neuron**, v.55, p.353-359, 2007.

YOUSEFI, B. et al. The role of leukotrienes in immunopathogenesis of rheumatoid arthritis, *Mod. Rheumatology*, v.24, p. 225–235, 2007.

7 CARTA DE ACEITE DO COMITÊ DE ÉTICA EM USO ANIMAL (CEUA)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS-UFSM

CARTA DE APROVAÇÃO

A Comissão de Ética no Uso de Animais-UFSM, analisou o protocolo de pesquisa:

Título do Projeto: "Avaliação do efeito analgésico, anti-inflamatório, tipo-antidepressivo e da toxicidade de extratos de plantas da flora brasileira"

Número do Parecer: 116/2013

Pesquisador Responsável: Prof.^a Dr.^a Maribel Antonello Rubin

Este projeto foi **APROVADO** em seus aspectos éticos e metodológicos. Toda e qualquer alteração do Projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente a este Comitê.

OBS: Anualmente deve-se enviar à CEUA relatório parcial ou final deste projeto.

Os membros da CEUA-UFSM não participaram do processo de avaliação dos projetos onde constam como pesquisadores.

DATA DA REUNIÃO DE APROVAÇÃO: 10/04/2014.

Santa Maria, 10 de abril de 2014.

Prof. Dr. Alexandre Krause
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais- UFSM