



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

Laís da Rosa Moreira

**AÇÃO ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DA FRAÇÃO
ACETATO DE ETILA DA CASCA DA *Scutia buxifolia* Reiss EM
CAMUNDONGOS**

Santa Maria, RS, Brasil

2016

Laís da Rosa Moreira

**AÇÃO ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DA FRAÇÃO ACETATO DE
ETILA DA CASCA DA *Scutia buxifolia* Reiss EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao curso de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof Dr. Ricardo Brandão
Coorientadora: Prof^a Dr^a. Sara Marchesan de Oliveira

**Santa Maria, RS, Brasil
2016**

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Moreira, Laís da Rosa
AÇÃO ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DA CASCA DA *Scutia buxifolia* Reiss EM CAMUNDONGOS / Laís da Rosa Moreira.-2016.
76 p.; 30cm

Orientador: Ricardo Brandão
Coorientadora: Sara Marchesan de Oliveira
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, RS, 2016

1. Inflamação 2. Nocicepção 3. Dor pós operatória 4. *Scutia buxifolia* Reiss 5. Camundongos I. Brandão, Ricardo II. Oliveira, Sara Marchesan de III. Título.

Laís da Rosa Moreira

**AÇÃO ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DA FRAÇÃO ACETATO DE
ETILA DA CASCA DA *Scutia buxifolia* Reiss EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao curso de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovado em 12 de Fevereiro de 2016:

Ricardo Brandão

Ricardo Brandão (UFPE)
(Presidente/Orientador)

Sara Marchesan de Oliveira

Sara Marchesan de Oliveira (UFSM)
(Coorientadora)

Gabriela Trevisan

Gabriela Trevisan dos Santos (UNESC)

Liliane de F. Bauermann

Liliane Bauermann (UFSM)

**Santa Maria, RS
2016**

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais Leonel e Mara, que incansavelmente me apoiaram em cada passo que dei, e me ensinaram que confiar em Deus sempre é a melhor escolha.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente louvo a Deus pela vida e a possibilidade de encerrar mais um ciclo, por propiciar tantas oportunidades de estudos e por colocar em meu caminho pessoas que me ensinaram, me acolheram e pelas amizades que conquistei nesse processo.

Ao Prof Dr. Ricardo Brandão, por depositar sua confiança em mim e me conceder a oportunidade de subir mais um degrau na vida acadêmica, por ser além de orientador, um amigo e sempre estar disposto para escutar minhas dúvidas e saná-las.

A Prof Dr^a Sara Marchesan por ter me acolhido, pela infinita disponibilidade, por todos os ensinamentos, pela paciência, críticas construtivas e por ter me guiado na execução deste trabalho.

A meu querido esposo, Ewerton, por ser tão importante na minha vida. Sempre ao meu lado me fazendo acreditar que posso mais que imagino. Devido a seu companheirismo, amizade, paciência, compreensão, apoio, alegria e amor, este trabalho pôde ser concretizado. Obrigada por ter feito do meu sonho o nosso sonho!

Aos meus pais Leonel e Mara, por acreditarem e investirem no meu conhecimento. Pai, seu abraço foi uma forma de me sentir protegida, e saber que você estava ao meu lado em todos os momentos, sua palavra nos momentos difíceis me incentivou e me fez acreditar que os sonhos são possíveis. Mãe, por seu amor e compreensão, por sempre estar disposta a ouvir, e sempre ter uma palavra de ânimo, me ajudando a compreender que a vontade de Deus sempre é o melhor, como diz aquele versículo “todas as coisas cooperam para o bem daqueles que amam a Deus”.

Aos meus irmãos Luan e Levi e minha cunhada Adri, pelo companheirismo. Obrigada por sempre estarem ao meu lado me incentivando em tudo. Por muitas

vezes me tirarem gargalhadas e deixarem as dificuldades mais leves e fáceis de serem enfrentadas. Vocês são tudo pra mim!

A Vó Sofia, ao Vô Fredo e toda família Moreira, por compreenderem a demora das minhas visitas.

Aos meus amigos, é com vocês que compartilho angústias, alegrias, felicidades. Obrigada por entenderem o meu objetivo, o sumiço, a falta de tempo e o cansaço.

As minhas colegas e amigas de laboratório: Eve, Andreia, May, Tai, Michelli, Paula, Lílian, Helena e Indiara pelo companheirismo, e por sempre estarem dispostas a ajudar. Em especial a Eve que percorreu esse caminho comigo e sentiu de perto as dificuldades, tristezas, alegrias e conquistas. Além de colega é uma grande amiga, obrigada por todas as conversas, ajuda e ensinamentos que tivemos uma com a outra, você com certeza é um dos presentes que Deus me deu durante o período do mestrado e sei que vai continuar me orgulhando.

A todos os colegas que diretamente ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, o meu muito obrigada.

Agradeço aos professores do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, que contribuíram de alguma forma para a minha formação.

Enfim, agradeço a Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas pela possibilidade da realização deste curso, bem como a CAPES pelo apoio financeiro.

“O temor a Deus é o princípio do conhecimento.”

Provérbio 1.7

RESUMO

AÇÃO ANTINOCICEPTIVA E ANTI-INFLAMATÓRIA DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DA CASCA DA *Scutia buxifolia* Reiss EM CAMUNDONGOS

AUTORA: Laís da Rosa Moreira

ORIENTADOR: Prof Dr. Ricardo Brandão

COORIENTADORA: Prof^a Dr^a. Sara Marchesan de Oliveira

A dor e a inflamação são processos fisiológicos, que ao persistirem podem ser prejudiciais à saúde. A dor quando inadequadamente tratada pode tornar-se dor crônica. Já a inflamação pode estar envolvida na patogênese e progressão de muitas doenças inflamatórias. Nos últimos anos tem sido demonstrado que os produtos naturais podem ser fontes de diversas moléculas conduzindo a descoberta de drogas atualmente utilizadas na medicina moderna, especialmente no tratamento da dor. Dados da literatura demonstram que a espécie *Scutia buxifolia* Reiss, popularmente chamada de “coronilha”, apresenta compostos fenólicos em sua composição, entre eles os flavonoides, que são capazes de capturar radicais livres e prevenir doenças decorrentes do estresse oxidativo. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a ação antinociceptiva e antiinflamatória da fração acetato de etila da casca da *Scutia buxifolia* Reiss (Eta) em camundongos. Para isso foram realizados modelos de triagem para novos analgésicos induzidos por estímulo químico (formalina, ácido acético, capsaicina) e térmico (placa quente). Também foi analisada a atividade da Eta frente ao processo inflamatório causado pela carragenina, através de dosagens de marcadores inflamatórios (fator de necrose tumoral, interleucinas, proteína c reativa e interferon γ). E por fim foi investigada a atividade antinociceptiva da Eta em um modelo de dor pós-operatória. A administração oral de Eta inibiu a nociceção causada por ácido acético (I_{max} 59±2,3%), formalina (I_{max} 91±9,0%) e capsaicina (I_{max} 89,3±3,2%). Além disso, a administração de Eta inibiu o aumento da atividade da enzima mieloperoxidase (I_{max} 98±0,2%), dos níveis de óxido nítrico (I_{max} 68±0,6%) e interleucina (IL)-1 (I_{max} 100%), IL-6 (I_{max} 100%), fator de necrose tumoral-α (I_{max} 100%), interferon-γ (I_{max} de 100%) e proteína C reativa (I_{max} 98±0,05%), e foi capaz de aumentar os níveis de IL-10 (I_{max}

95±3,3%) na inflamação induzida por carragenina em camundongos. A Eta também reduziu a hiperalgesia mecânica e um modelo de dor pós operatória. No entanto, a Eta não inibiu a hiperalgesia térmica no teste da placa quente, e seu efeito antinociceptivo no teste da capsaicina não foi revertido pelo antagonista dos receptores opioides naloxona. Estes resultados demonstraram que a Eta apresenta atividade antinociceptiva e anti-inflamatória em camundongos independente do sistema opióide e sem apresentar efeitos adversos significativos como alterações na atividade locomotora, na temperatura corporal ou causando lesões gástricas. Além disso, administração da Eta não alterou as atividades das enzimas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), nem os níveis de creatinina ou uréia. Tomados em conjunto, nossos resultados suportam a utilização da Eta para o tratamento de condições dolorosas, especialmente dor pós-operatória.

Palavras-chaves: inflamação, nocicepção, camundongos, *Scutia buxifolia* Reiss, mediadores inflamatórios, dor pós-operatória.

ABSTRACT

ANTINOCICEPTIVE AND ANTI-INFLAMMATORY EFFECT OF THE *Scutia buxifolia* Reiss ETHYL ACETATE FRACTION

AUTHOR: Laís da Rosa Moreira

ADVISOR: Prof Dr. Ricardo Brandão

SUPERVISED: Prof^a Dr^a. Sara Marchesan de Oliveira

Pain and inflammation are physiological processes, which when persist can be harmful to health. The pain when improperly or left untreated can become chronic pain. Moreover, the inflammation can be involved in the pathogenesis and progression of many inflammatory diseases. Over the years, it has been shown that natural products can be sources of several molecules diversity leading to drug discovery currently used in modern medicine, especially in the treatment of pain. Published data show that this species *Scutia buxifolia* Reiss, popularly called “coronilha”, presents phenolic compounds in its composition, including flavonoids, which are able to capture free radicals and prevent diseases resulting from oxidative stress. The objective of this work was to evaluate the antinociceptive and anti-inflammatory action of ethyl acetate fraction (Eta) from the bark of the stem of *Scutia buxifolia* Reiss in mice. For this screening were performed templates to new analgesic-induced chemical stimulus (formalin, acetic acid, capsaicin) and thermal (hot plate). It was also analyzed Eta activity against inflammation caused by carrageenan through dosages of inflammatory markers (tumor necrosis factor, interleukins, protein c reactive and interferon γ). Finally antinociceptive activity was investigated in a model Eta postoperative pain. Oral administration Eta inhibited nociception caused by acetic acid (I_{max} 59%±2.3), formalin (I_{max} 91±9.0%) and capsaicin (I_{max} 89.3±3.2%). In addition, the Eta administration inhibited the increase of mieloperoxidase activity (I_{max} 98%±0.2), the levels of nitric oxide (I_{max} 68±0.6%) and interleucina (IL)-1 (I_{max} 100%), IL-6 (I_{max} 100%), tumor necrosis factor-α (I_{max} 100%), interferon-γ (I_{max} 100%) and C-reactive protein (I_{max} 98±0.05%) and was able to increase IL-10 levels (I_{max} 95±3.3%) in the carrageenan-induced inflammation in mice. Eta also reduced the mechanical hyperalgesia in a model of postoperative

pain. However, Eta did not inhibit the thermal hyperalgesia in the hot plate test and its antinociceptive effect in the capsaicin test was not reversed by naloxone opioid receptor antagonist. These results demonstrated that Eta presents antinociceptive and anti-inflammatory activity in mice independent of opioid system and without causing significant adverse effects such as changes in locomotor activity, body temperature or causing gastric lesions. In addition, Eta neither alter alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) enzymes activities, nor creatinine or urea levels. Taken together, these results support the use of the Eta for the treatment of painful conditions, especially postoperative pain.

Keywords: inflammation, nociception, mice, *Scutia buxifolia Reiss*, inflammatory mediators, postoperative pain.

LISTA DE ABREVIATURAS

- AINEs: anti-inflamatórios não esteroidais
COX: ciclooxygenase
C5a: fator do complemento 5a
DRG: glânglio da raiz dorsal
EROs: espécies reativas de oxigênio
Eta: fração acetato de etila da casca da *Scutia buxifolia* Reiss
FAP: fator de ativação de plaquetas
GTPases: guanosinas trifosfatas
i.p.: intraperitoneal
IASP: Associação Internacional para o Estudo da Dor
IL: interleucina
IP-3K: fosfoinositol-3 quinase
LT: leucotrienos
MPO: mieloperoxidase
NO: óxido nítrico
NOs: Óxido nítrico sintetase
OCDE: Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
PCR: proteína C reativa
PGs: prostagandinas
s.c.: subcutânea
SNC: sistema nervoso central
SP: substância P
TNF- α : Fator de necrose tumoral α
TX: tromboxanos
v.o.: via oral
VCAM-1: molécula de adesão celular

LISTA DE FIGURAS

Manuscrito

Figura 1 - Representative high performance liquid chromatography profile of Eta.....	51
Figura 2 -The effect of Eta on acetic acid-induced abdominal writhing and the effect of Eta on capsaicin-induced nociception.....	52
Figura 3 -Time-course curve of paw withdrawal threshold (PWT) in a postoperative pain model.....	53
Figura 4 -The effect of naloxone on Eta and morphine -induced antinociception in the intraplantar capsaicin test.....	53
Figura 5 - The effect of Eta on the myeloperoxidase activity and NO _x , IL-1 and IL-6 levels in the inflammation induced by carrageenan.....	54
Figura 6 - The effect of Eta on the levels of TNF- α , INF- γ , PCR and IL-10in the inflammation induced by carrageenan.....	55

LISTA DE TABELAS

Manuscrito

Tabela 1 - Composition of <i>S. buxifolia</i> ethyl acetate fraction.....	50
Tabela 2 - Effect of oral administration of Eta on formalin-induced nociception in mice.....	50

Material suplementar

Tabela 1S - Effect of the administration of Eta (800 mg/kg) on the hot-plate test.....	63
Tabela 2S - Effect of the administration of Eta (800 mg/kg) on the number of crossings and rearings in open-field test and locomotor activity in rota-rod test.....	63
Tabela 3S - Effect of the administration of Eta (800 mg/kg) on the body temperature and gastric lesion.....	64
Tabela 4S - Effect of the administration of Eta (800 mg/kg) on urea and creatinine levels and AST and ALT activities.....	64

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	20
2.1 Nociceção	20
2.2 Inflamação.....	22
2.3 Dor Pós-Operatória	27
2.4 Anti-Inflamatórios E Analgésicos	28
2.5 <i>Scutia Buxifolia</i> Reiss	30
3 OBJETIVOS.....	33
3.1 objetivo geral	33
3.2 objetivos específicos	33
4 MANUSCRITO	34
5 CONCLUÇÕES.....	68
6 PERSPECTIVAS.....	69
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	70

APRESENTAÇÃO

No item introdução está descrita uma revisão sobre os temas trabalhados na dissertação.

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados sob a forma de artigo, o qual se encontra no item MANUSCRITO. As seções Materiais e Métodos, Resultados, Discussão, Referências Bibliográficas e material suplementar encontram-se no próprio manuscrito e representam a íntegra deste estudo.

Os itens CONCLUSÕES e PERSPECTIVAS encontrados no final desta dissertação apresentam interpretações e comentários gerais sobre o manuscrito contido neste trabalho.

As REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS referem-se somente as citações que aparecem nos itens INTRODUÇÃO e REVISÃO BIBLIOGRÁFICA desta dissertação.

1 INTRODUÇÃO

A inflamação pode ser provocada por estímulos endógenos ou exógenos, sendo ela uma resposta de proteção, cujo objetivo é livrar o organismo da causa inicial e das consequências do dano celular (IP e MEDZHITOV, 2015). Embora a inflamação seja um processo essencialmente fisiológico e benéfico, processos inflamatórios não resolvidos podem estar envolvidos na patogênese e progressão de muitas doenças inflamatórias, incluindo asma, aterosclerose, artrite reumatóide, esclerose múltipla, rinite e a lesão de isquemia-reperfusão (ALESSANDRI et al., 2013; CHUNG, 2012; ELTZSCHIG e ECKLE, 2011; MANDHANE et al., 2011; MCFARLAND e MARTIN, 2007; NATHAN e DING, 2010; WALDBURGER e FIRESTEIN, 2010). A reação inflamatória é reconhecida por cinco sinais cardinais que são o calor, o rubor (vermelhidão), o tumor (inchaço), a dor e a perda de função do membro afetado (FREIRE e DYKE, 2013). O primeiro passo da cascata inflamatória inicia por uma resposta vascular com hiperemia e aumento da permeabilidade da parede dos vasos. Inicialmente, é observada uma vasoconstrição arteriolar que é promovida pela contração dos músculos lisos vasculares. Posteriormente, ocorre a vasodilatação arteriolar que leva ao aumento do fluxo sanguíneo para a área danificada, resultando em hiperemia local. Nesta fase inicial, alterações no endotélio vascular são facilmente detectáveis com consequente exsudação de proteínas do plasma para o tecido, seguida pela migração de leucócitos da circulação para o tecido danificado (ALESSANDRI et al., 2013; GILROY e MAEYER, 2015).

A dor inflamatória ocorre em resposta a uma lesão tecidual ou a uma resposta inflamatória. Na tentativa de reparação da parte do organismo atingida o sistema nervoso sensorial passa por uma mudança em sua capacidade de resposta, onde os estímulos que normalmente são inócuos vão produzir dor (alodinia) e as respostas a estímulos nocivos são ampliadas e prolongadas (hiperalgesia) (COSTIGAN et al., 2009; LOESER e TREDE, 2008). Essa dor é resultante da ativação de células residentes, como os mastócitos, da infiltração de células inflamatórias, como por exemplo, os neutrófilos, e da liberação de mediadores inflamatórios, tais como cininas, aminas, prostanoïdes, fatores de crescimento e citocinas. Essas alterações promovem a redução do limiar de ativação e amplificação na resposta dos nociceptores que inervam o tecido danificado (sensibilização periférica). Além

dessas mudanças periféricas, pode ocorrer uma resposta aumentada dos neurônios nociceptivos do sistema nervoso central (SNC; sensibilização central) (LATREMOLIERE E WOOLF, 2009; LOESER E TREEDDE, 2008; SCHOLZ e WOOLF, 2001; WOOLF, 2010). Um exemplo de dor inflamatória é a dor pós-operatória a qual tem sido reconhecida como uma questão importante na área da saúde e apesar da introdução de novas normas, diretrizes e ações educativas, os dados de todo o mundo sugerem que a dor pós-operatória continua inadequadamente tratada (WU e RAJA, 2011).

Os principais medicamentos utilizados para produzir analgesia são os opióides e os antiinflamatórios não esteroidais (AINES) (BRUNE e PATRIGNANI, 2015; MOORE et al, 2015). Mesmo admitindo que os opióides são rotineiramente utilizados na dor pós cirúrgica, seu uso muitas vezes é questionado, devido aos efeitos adversos, como náuseas, vômitos, sedação, constipação, tonturas, depressão respiratória e o risco de dependência (JAMISON e MAO, 2015; LEE et al., 2015; MACINTYRE et al., 2010; MOORE et al., 2015; RAWAL, 2015). As principais preocupações com o uso dos AINES em pacientes cirúrgicos é a interferência na função plaquetária, podendo ocorrer hemorragias e dificuldade na cicatrização, bem como no desenvolvimento de úlceras gastroduodenais (ARGOFF, 2014; BUTTERWORTH et al., 2013; SCARPIGNATO e HUNT, 2010). Assim, terapias mais seguras para o tratamento da dor pós-operatória são necessárias.

As plantas medicinais são utilizadas para o tratamento de vários tipos de dor, muitas têm sido objeto de estudos, resultando na delimitação dos seus efeitos farmacológicos, como por exemplo, os flavonoides que possuem uma variedade de ações farmacológicas e podem ser utilizados no tratamento da dor (CHEN et al., 2015; OLTEAN et al., 2014). Dados da literatura demonstram que a espécie *Scutia buxifolia* Reiss (*S. buxifolia*) apresenta compostos fenólicos em sua composição, entre eles os flavonoides, que são capazes de capturar radicais livres e prevenir doenças decorrentes do estresse oxidativo (BOLIGON et al, 2009). Além dos compostos fenólicos, também foi detectado nas raízes da *S. buxifolia* a presença de alcalóides os quais apresentaram atividade antimicrobiana (MOREL et al., 2005) e vasodilatadora (DA SILVA et al., 2012). Também foi comprovado o efeito hipotensor e diurético das cascas da *S. buxifolia* (DA SILVA et a., 2015). Além desses efeitos a casca do caule da *S. buxifolia* apresenta ação antiulcerogênica frente ao dano causado por etanol (BOLIGON et al., 2014b). Em um estudo recente Boligon e

colaboradores mostraram que o extrato aquoso liofilizado das folhas e cascas do caule da *S. buxifolia* possuem efeito antiagregante plaquetário, o qual pode estar relacionado com sua ação anti-inflamatória, uma vez que muitos anti-inflamatórios exercem sua ação através da inibição da enzima ciclooxigenase (COX), que além de produzir prostaglandinas (PGs) responsáveis por causar dor, febre e inflamação também produzem tromboxanos (TX) que promovem a agregação plaquetária (BOLIGON et al., 2014a; BRUNE e PATRIGNANI, 2015; RIBEIRO et al., 2015).

Tendo em vista os efeitos nocivos causados pela dor inflamatória, e o grande investimento em pesquisas para o desenvolvimento de novos medicamentos a partir de produtos naturais, juntamente com as comprovações de propriedades biológicas presentes na *S. buxifolia* (BOLIGON et al.; BOLIGON et al, 2009, 2014a; IP e MEDZHITOV, 2015; JAYASURIYA, 1999), é de grande importância avaliar o seu possível potencial antinociceptivo e anti-inflamatório.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 NOCICEPÇÃO

A dor segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) é uma experiência sensorial e emocional desagradável que está associada a lesões teciduais reais ou potenciais, ou descrita em termos que sugerem tal lesão (LOESER e TREEDE, 2008). No entanto, o termo nocicepção é o processo de codificação neural e processamento de estímulos nocivos que são detectados por uma subpopulação de fibras nervosas periféricas, denominadas nociceptores (BRAZ et al., 2014). Baseado nestes conceitos, o termo dor é melhor aplicado a seres humanos do que aos animais, pelo fato deste termo envolver um componente emocional, o qual não é avaliado em animais experimentais (LOESER E TREEDE, 2008).

De acordo com a sua duração, a dor pode ser classificada como aguda ou crônica. A dor aguda comumente é definida como “dor de inicio recente” e de duração limitada tem função de alerta e é fisiologicamente importante para proteger o organismo de agentes agressores. Por outro lado, a inflamação crônica, persiste além do período de cura de uma lesão e frequentemente pode não ter causa claramente identificável (RUSSO E BROSE, 1998). Além da dor ser classificada conforme a sua duração, ela também poder ser classificada de três diferentes formas: dor nociceptiva, inflamatória e neuropática (WOOLF, 2010).

A dor nociceptiva atua como um sistema de alerta, protegendo o organismo de um perigo iminente tal como uma agressão tecidual (HEHN et al., 2012; WOOLF, 2011). O processo nociceptivo é decorrente da transdução, transmissão e modulação de sinais neurais gerados em resposta a um estímulo externo através da ativação de nociceptores (terminações nervosas livres de neurônios nociceptivos) por estímulos químicos, mecânicos ou térmicos (LARSSON, 2009; SCHOLZ e WOOLF, 2002). A detecção de estímulos nocivos tais como calor, frio ou percepção de algumas substâncias químicas requer ativação dos nociceptores que são excitados somente quando o estímulo alcança o seu limiar de ativação, mostrando que os mesmos possuem propriedades biofísicas e moleculares capazes de detectar

e responder seletivamente a danos potenciais, essas fibras estão amplamente distribuídos por todo o corpo (pele, músculos, articulações, víceras e meninges) e transmitem tanto informações nociceptivas quanto informações não nociceptivas para a medula espinhal (KUNER, 2010; BRAZ et al., 2014). Os nociceptores são fibras sensoriais aferentes capazes de conduzir estímulos sensoriais e podem ser classificadas em três tipos: fibras A β , fibras A δ e fibras C, sendo as duas últimas de maior importância na nocicepção. Os corpos celulares dos nociceptores que inervam o tronco, os membros e as víceras estão localizados no gânglio da raiz dorsal (DRG), enquanto que aqueles que inervam a cabeça, a cavidade oral e o pescoço estão no glânglio trigeminal pars caudalis na ponte, respectivamente. Podendo seus axônios ser mielinizados ou não mielinizados (COSTIGAN et al., 2009). As fibras A β são sensores táteis mielinizados de grande diâmetro com velocidade de condução muito rápida. As fibras A δ possuem médio diâmetro, são mielinizadas e conduzem o estímulo doloroso de maneira rápida. O tipo de nocicepção conduzida por estas fibras é característico da dor aguda, bem localizada, e sua ativação pode ser decorrente de estímulos mecânicos, térmicos e químicos. Enquanto as fibras C não são mielinizadas, possuem um diâmetro pequeno, e velocidade de condução lenta. Neste caso, o tipo de dor conduzida é vaga e em queimação, mas assim como as fibras A δ , são fibras polimodais, capazes de responder a estímulos mecânicos, térmicos ou químicos (BASBAUM et al., 2009; BRAZ, et al., 2014).

A dor de origem inflamatória ocorre em resposta a uma lesão tecidual e subsequente resposta inflamatória. Na tentativa de reparação da parte do organismo atingido, o sistema nervoso sensorial passa por uma mudança em sua capacidade de resposta, onde os estímulos que normalmente são inócuos vão produzir dor e as respostas a estímulos nocivos são ampliadas e prolongadas (COSTIGAN et al., 2009; LOESER e TREEDE, 2008). A migração de leucócitos associada à inflamação é responsável por secretar mediadores químicos que podem causar dor (HEHN et al., 2012). A hipersensibilidade é a principal característica da dor inflamatória (patológica) e resulta de alterações drásticas na função do sistema nervoso. Este conjunto de alterações denominadas plasticidade do sistema nervoso, é um fenômeno que acontece tanto perifericamente, promovendo redução do limiar de ativação dos nociceptores (sensibilização periférica), bem como centralmente (sensibilização central), apresentando uma resposta aumentada da medula espinhal aos estímulos sensoriais (BASBAUM et al., 2009; MULEY et al., 2015).

Perante as circunstâncias fisiológicas normais, estímulos mecânicos, térmicos e químicos ativam nociceptores presentes em fibras A δ e C, levando a informação ao sistema nervoso central, que discrimina este estímulo como um estímulo nocivo. Cada estímulo está associado com certo grau de inflamação que inicia uma cascata de sensibilização periférica com eventos celulares e subcelulares. Células lesadas e fibras aferentes primárias liberam uma série de mediadores químicos, incluindo substância P, neurocinina A e peptídeo relacionado ao gene da calcitonina, que têm efeitos diretos sobre a excitabilidade de fibras sensoriais. Estes mediadores também promovem vasodilatação com extravasamento de proteínas plasmáticas e o recrutamento de células inflamatórias. Mastócitos, macrófagos, linfócitos e plaquetas, contribuem para a formação de um ambiente, composto por mediadores inflamatórios, como íons hidrogênio e potássio, norepinefrina, bradicinina, histamina, citocinas, serotonina, fator de crescimento neural, óxido nítrico e produtos das vias da ciclooxygenase e lipooxygenase do metabolismo do ácido araquidônico. Parece que estas moléculas agem melhor sinergicamente do que isoladamente, gerando o que se chama “sopa sensibilizadora” que efetivamente desencadeia a resposta para ativação das fibras A δ e C, aumentando a sensibilidade dos neurônios a estímulos dolorosos químicos, térmicos e mecânicos (BRAZ et al., 2014; COSTIGAN, 2009; HEHN et al., 2012; MULEY et al., 2015).

A dor também pode ser decorrente de patologias, não apresentando um caráter protetor (BRAZ et al., 2014; KUNER, 2010). Um exemplo clássico deste tipo de dor é a dor neuropática que resulta de uma lesão ou doença que afeta o sistema somatosensorial, promovendo alterações no processamento nociceptivo. Neste caso a dor pode ocorrer na ausência de estímulos ou respostas para estímulos anteriormente inócuos/nocivos podem apresentar-se exacerbados (COSTIGAN, 2009; HEHN et al., 2012).

2.2 INFLAMAÇÃO

A inflamação é uma resposta imune causada pelo dano tecidual e/ou celular por estímulos físicos, químicos, imunológicos ou microbianos e tem como objetivo defender o organismo, tanto da causa inicial da agressão celular quanto das consequências da mesma (SERHAN et al., 2014). Cornelius Celsus, no século

primeiro, descreveu os quatro primeiros sinais cardinais da inflamação, que são rubor, tumor, calor e dor. Posteriormente Cláudio Galeno acrescentou o quinto sinal que é a perda da função do membro afetado (FREIRE e DYKE, 2013).

As mudanças fisiológicas que acompanham o processo da inflamação apresentam algumas características principais e envolvem uma sequência de eventos, com vasodilatação que leva a um aumento no fluxo sanguíneo, alterações estruturais na microcirculação, as quais permitem o extravasamento de proteínas plasmáticas para o interstício em forma de exsudato inflamatório e na migração de leucócitos da microcirculação e seu acúmulo no local de lesão inicial (ALESSANDRI et al., 2013; WHO, 2009).

Os agentes efetores da inflamação fazem parte do exsudato e do infiltrado celular. O exsudato é composto por um conjunto de substâncias que extravasam pelas paredes dos vasos da microcirculação na área agredida, enquanto o infiltrado é o conjunto de células que chega até a área agredida por atravessar a parede das vênulas e capilares e se “infiltrar” nos espaços teciduais. Os componentes do exsudato inflamatório incluem mediadores de iniciação e manutenção dos fenômenos vasculares e exsudativos, mediadores com ação direta sobre o agressor e mediadores para a manutenção da inflamação e atração dos leucócitos (SERHAN et al., 2014).

O início da inflamação geralmente é determinado pelos macrófagos, fibroblastos e células endoteliais que estão presentes na região agredida. A liberação de mediadores, especialmente as citocinas, por estas células desencadeia uma resposta no organismo quase que imediatamente, pelo aumento da síntese hepática de proteínas, que, por sua vez, irão modular a função das células do sistema imune. Os principais mediadores indutores da síntese aumentada das proteínas de fase aguda pelo fígado são a interleucina-1, interleucina-6 e o fator de necrose tumoral (TNF) (SERHAN et al., 2014).

Logo após a resposta inicial, ocorre vasodilatação e aumento da permeabilidade endotelial, provocando aumento da pressão hidrostática e diminuição da pressão osmótica do plasma, pela saída de líquido rico em proteínas. A perda de líquido resulta em concentração elevada de hemácias e aumento da viscosidade sanguínea, deixando o fluxo mais lento (estase), e contribuindo para que os leucócitos (especialmente os neutrófilos) se movam para as camadas mais

periféricas da corrente sanguínea, iniciando a chamada marginação leucocitária ao longo do endotélio vascular (IP e MEDZHITOY, 2015).

Posteriormente, tanto células endoteliais quanto os leucócitos são ativados pelas substâncias inflamatórias circulantes. Inicia-se, então, a fase de rolamento dos leucócitos. Este processo é mediado predominantemente por selectinas (moléculas de adesão glicoproteicas) presentes em leucócitos (por exemplo, L-selectina) e em células endoteliais (por exemplo, E-selectina) e os seus ligantes de hidratos de carbono (PSGL-1, ESL-1 e CD34). Os leucócitos que rolam sobre o endotélio são agora capazes de interagir com os fatores quimioatrativos, incluindo o fator do complemento 5a (C5a), IL-8/CXCL8, fator ativador de plaquetas (FAP) e leucotrieno (LT), que se aderem na superfície luminal do endotélio, promovendo a adesão frouxa entre eles (ALESSANDRI et al., 2013; WHO, 2009). A P-selectina, participa apenas da fase de rolamento, enquanto a E-selectina participa tanto no rolamento quanto na adesão de leucócitos ao endotélio. Em seguida, o processo segue para a forte adesão, quando participam as integrinas nos leucócitos e as imunoglobulinas nas células endoteliais. As integrinas são proteínas transmembrana da superfície celular que reagem a sinais de ativação celular e se ligam às imunoglobulinas e à matriz extracelular. São importantes, pois podem interagir com a molécula de adesão vascular (VCAM-1) e assim promover a adesão leucocitária ou ainda desempenhar um papel primordial na diapedese de todos os leucócitos (ALESSANDRI et al., 2013; PETRI et al., 2008).

Após a forte adesão ao endotélio, os leucócitos migram através de junções interendoteliais (diapedese) e se dirigem aos sítios de inflamação guiados pelos fatores quimiotáticos (ALESSANDRI et al, 2013). Tanto a adesão como a diapedese leucocitária são afetadas por mediadores químicos da inflamação, os quais, além do efeito quimiotático, podem gerar uma cascata capaz de ampliar e liberar outros fatores estimulantes. A quimiotaxia envolve a ligação de mediadores químicos ou agentes quimiotáticos a receptores específicos na superfície da proteína G de leucócitos que ativa a via da inositolfosfato-3 quinase (IP-3K). Essas alterações causam aumento do cálcio citosólico e ativam as guanosinas trifosfatases (GTPases), favorecendo a apresentação de pseudópodes e o movimento leucocitário. Além da locomoção, os agentes quimiotáticos também induzem à ativação dos leucócitos com todas suas consequências, produção de metabólitos do ácido araquidônico; degranulação e secreção de enzimas lisossômicas; secreção de

citocinas, assim como maior expressão de moléculas de adesão e maior exposição das integrinas (ALESSANDRI et al., 2013; IP e MEDZHITOY, 2015).

Durante o processo inflamatório ocorre a liberação de vários mediadores inflamatórios como aminas vasoativas (histamina, serotonina), metabólitos do ácido araquidônico (prostaglandinas, leucotrienos e lipoxinas), proteínas plasmáticas (sistemas do complemento, das cininas e da coagulação), fator de ativação das plaquetas, citocinas (TNF e IL-1), óxido nítrico (NO), componentes lisossômicos dos leucócitos e espécies reativas de oxigênio (EROs). Destes, os produtos do metabolismo do ácido araquidônico, fragmentos do complemento e as citocinas parecem ter ação fundamental na quimiotaxia (ALESSANDRI et al., 2013; PINHEIRO et al., 2015).

Entre os mediadores inflamatórios secretados pelas células inflamatórias estão as citocinas, capazes de interagir com receptores específicos de membranas celulares. As citocinas são produzidas principalmente por linfócitos e macrófagos, mas também por células endoteliais, e possuem fundamental importância no processo da inflamação, contribuindo para o recrutamento dos subtipos de leucócitos, regulação da epiteliação, remodelamento tecidual e angioënese (MULEY et al., 2015; PINHEIRO et al., 2015).

A IL-1 e o TNF α são conhecidos como citocinas pró-inflamatórias, por induzirem a expressão de outras citocinas e de mediadores que promovem a inflamação. Entretanto, sua principal importância na imunidade reside em sua capacidade de intensificar a ativação dos linfócitos T auxiliares por células apresentadoras de antígeno (ALESSANDRI et al., 2013). A IL-6 proporciona efeitos sinérgicos com a IL-1 e o TNF α , porém não induz a produção de qualquer outra citocina e possui efeito direto relativamente pequeno sobre as células imunes em concentrações fisiológicas. Alguns autores sugerem que sua principal função imunológica consiste em potencializar os efeitos de outras citocinas (YAO et al., 2014).

Já a IL-10 é uma citocina reguladora chave do sistema imune e merece destaque por limitar a resposta inflamatória que poderia causar um dano tecidual, modulando a produção de mediadores inflamatórios, como a dos neutrófilos, monócitos e macrófagos, limitando a secreção de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 e IL-12 (SARAIVA e O'GARRA, 2010; ZHANG et al., 2010).

Uma das principais proteínas de fase aguda é a proteína C reativa (PCR) a qual apresenta-se em concentrações elevadas em resposta a um processo inflamatório. Uma das principais funções fisiológicas da PCR é de se ligar a fosfocolina que está expressa na superfície de células mortas, de modo a ativar o sistema do complemento, especialmente o complemento C5a, principal mediador quimiotático para os polimorfonucleares. Assim, a PCR participa da depuração de células anormais e danificadas. Essa proteína é sintetizada pelo fígado, induzida principalmente por um aumento na concentração plasmática de citocinas, tais como a IL-6, que é predominantemente produzida por macrófagos e pelo TNF- α (ALESSANDRI et al., 2013).

Outro mediador da resposta inflamatória que também age alterando o tônus e a permeabilidade vascular além de ser agente quimiotático é o óxido nítrico (NO). O NO é sintetizado pela enzima óxido nítrico sintetase (NOS), presente no endotélio, que é ativada pelo aumento do cálcio intracelular ou pelos macrófagos após indução por determinadas citocinas, como interferon- γ . Além da vasodilatação, da inibição da agregação e adesão plaquetárias, o NO também atua como um mecanismo compensatório para reduzir o recrutamento leucocitário (PINHEIRO et al., 2015).

Uma enzima chave na imunidade inata e que está presente nos grânulos dos neutrófilos é a enzima mieloperoxidase (MPO). Em um processo inflamatório, ocorre a ativação dos neutrófilos com consequente liberação do conteúdo dos grânulos azurófilos dos neutrófilos que contém a enzima MPO. Primeiramente, o complexo enzimático NADPH oxidase presente na membrana do neutrófilo converte o oxigênio molecular no radical ânion superóxido (O_2^-), que por ser reativo e instável, é rapidamente convertido em peróxido de hidrogênio (H_2O_2). A enzima MPO por sua vez, catalisa a reação do H_2O_2 com o íon cloreto (Cl^-), produzindo o ácido hipocloroso ($HClO^-$) que promove a destruição de agentes invasores (DELPORTE et al., 2013).

Diante do exposto, a resposta inflamatória é benéfica quando atua na tentativa de controlar os danos teciduais locais. No entanto, quando não há a reparação dos danos causados pela mesma, ela pode trazer graves consequências ao organismo.

2.3 DOR PÓS-OPERATÓRIA

A dor pós-operatória está relacionada a própria intervenção cirúrgica que implica em lesão do tecido, manipulação de estruturas e órgãos e também pode ser consequência do processo inflamatório que ocorre após o processo cirúrgico, e é uma causa comum da dor persistente e de hiperalgesia em humanos e um dos maiores problemas enfrentados pelos pacientes após as cirurgias (MACINTYRE et al., 2010).

O controle eficaz da dor pós-operatória é uma preocupação primordial para o paciente e muitas vezes negligenciado por médicos e pelo sistema de saúde. O tratamento inadequado da dor pós-operatória continua a ser um importante problema clínico, não somente no período pós-operatório imediato, mas também ocorrendo o risco de progredir para um processo doloroso persistente (LOVICH-SAPOLA et al., 2015; REDDI, 2016).

A dor pós-operatória aguda é uma resposta normal à intervenção cirúrgica, mas pode progredir para dor crônica quando inadequadamente ou não tratada (MACINTYRE et al., 2010). A dor aguda que se torna intratável e persiste é referida como dor pós-operatória crônica, essa pode ter um impacto significativo na qualidade de vida e atividades diárias do paciente, incluindo distúrbios do sono e do humor (MACINTYRE et al., 2010; REDDI, 2016). Entre 10% a 50% dos indivíduos após procedimentos cirúrgicos comuns relatam que a dor persistiu mais de um mês após a cirurgia, e 2% a 10% destes pacientes tem evolução para um quadro de dor crônica. Apesar da ampla gama de fármacos analgésicos utilizados, aproximadamente metade dos pacientes cirúrgicos relatam alívio inadequado da dor (GROSU e KOCK, 2011; NOSAMAN et al., 2010).

O trauma no tecido após cirurgia provoca a liberação de mediadores inflamatórios locais, que podem produzir hiperalgesia ou alodinia. Outros mecanismos que contribuem para a hiperalgesia e alodinia incluem a sensibilização dos receptores periféricos no tecido lesionado (hiperalgesia primária) e aumento da excitabilidade de neurônios do sistema nervoso central, que ocorre no tecido circulante não lesionado (hiperalgesia secundária) (KODALI e OBEROI, 2014; LOVICH-SAPOLA et al., 2015).

Modelos de dor pós icisional têm sido muito úteis para investigar a fisiopatologia da dor pós operatória (SAAD et al., 2016). Um dos melhores modelos

de dor pós incisão é o desenvolvido por Brennan et al (1996), onde a incisão da pata traseira de ratos provoca o desenvolvimento de dor espontânea e dor causada por estímulo, o que é evidenciado em pacientes submetidos a procedimentos cirúrgicos (OLIVEIRA et al., 2014; SAAD et al., 2016). Do mesmo modo Oliveira e colaboradores (2014), utilizaram este modelo de dor pós-operatória em camundongos, conduzindo a estados de hiperalgesia na pata operada.

A lesão tecidual produzida pela cirurgia desencadeia uma cascata de eventos que leva a liberação de mediadores inflamatórios no local da lesão, assim causa uma redução do limiar das terminações nervosas aferentes, de modo que um estímulo menor é suficiente para ativar nociceptores, causando portanto, a produção de hipersensibilidade no local da lesão. Além disso, o dano tecidual provoca a liberação de conteúdo intracelular de células inflamatórias (REDDI, 2016).

Ao serem ativadas as células inflamatórias liberam seus mediadores inflamatórios, como macrófagos que liberam interleucinas (IL-1, IL-6, entre outras) e o TNF- α . O período pós-operatório está associado com uma produção aumentada de várias citocinas pró-inflamatórias, conhecidas por aumentar a sensibilidade dolorosa. O TNF- α , o INF- γ , entre outras são encontradas em níveis elevados após um trauma cirúrgico. Essas células inflamatórias juntamente com outros mediadores inflamatórios desencadeiam a resposta para ativação das fibras A δ e C, aumentando a sensibilidade dos neurônios a estímulos dolorosos químicos, térmicos e mecânicos (BRAZ et al., 2014; HEHN et al., 2012; MULEY et al., 2015).

A dor pós-operatória muitas vezes interfere no bem estar do paciente, e em alguns casos se torna de difícil tratamento (REDDI, 2016). Por este motivo, estudos de novas terapias para combatê-la são de grande importância para aumentar o conforto do paciente e assim acelerar sua recuperação.

2.4 ANTI-INFLAMATÓRIOS E ANALGÉSICOS

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs) são os fármacos mais utilizados atualmente na terapêutica. Sua ação consiste na inibição da enzima ciclooxygenase (COX) impedindo a formação de prostaglandinas (PGs) que são mediadores do processo inflamatório (BRUNE e PATRIGNANI, 2015; WEHLING, 2014).

O diclofenaco de sódio, derivado do ácido fenilacético, é um anti-inflamatório não esteroidal (AINE), e tem alto índice de prescrição. Esse fármaco que possui propriedades analgésica e anti-inflamatória tem demonstrado eficácia no tratamento de uma variedade de dores agudas e crônicas e doenças inflamatórias (GAN,2010). Assim como todos os AINEs tradicionais, o diclofenaco exerce sua ação pela redução da síntese de prostaglandinas através da inibição da COX que tem grande importância na resposta inflamatória (BRUNE e PATRIGNANI, 2015; GAN, 2010).

A COX, também chamada de prostaglandina H₂ sintetase (PGHS), é a enzima chave necessária para a conversão do ácido araquidônico a prostaglandinas, e possui três isoformas que são nomeadas de COX-1, COX-2 e COX-3. A COX-1 (constitutiva) está presente em praticamente todos os tecidos normais e acredita-se que seja responsável pela manutenção da homeostase renal e plaquetária, incluindo manutenção do tônus da musculatura lisa e proteção da mucosa gástrica. Ela apresenta-se sutilmente elevada em processos inflamatórios. A segunda isoforma é a COX-2 (indutiva) a qual é constitutivamente expressa em poucos tecidos como os ossos e certas áreas renais e no SNC. Entretanto, a atividade da enzima COX-2 é induzida predominantemente em estados inflamatórios, como por exemplo, por citocinas inflamatórias. Ela também pode contribuir tanto para o reparo tecidual como para o desenvolvimento de uma lesão crônica (BRUNE e PATRIGNANI, 2015). A última isoforma a ser descoberta foi a COX-3, que é uma variante da COX-1 e está presente no cérebro e medula espinhal e sua ação é inibida pelo acetaminifeno. Estas enzimas são inibidas por substâncias anti-inflamatórias não esteroidais (KAM e SO, 2009; OKSUZ et al., 2015; ZHANG, 2009). Porém, o uso de AINEs não seletivos aumenta o risco de úlceras gastroduodenais, sangramento pós-operatório e a cicatrização de feridas pode ser prejudicada. Já os inibidores COX-2, estão associados com um risco cardiovascular, aumento da probabilidade de insuficiência renal e podem causar hipovolemia e hipotensão arterial (BRUNE e PATRIGNANI, 2015).

Além dos AINEs, outros fármacos analgésicos muito utilizados são os opióides, os quais são utilizados no tratamento da dor moderada à intensa (MERCADANTE, 2015). Receptores opióides específicos estão localizados na periferia e nas estruturas espinhais e supraespinhais, sendo os receptores μ e κ os de maior importância clínica reforçando a ação fisiológica das endorfinas e a das vias inibitórias noradrenérgicas e serotoninérgicas (WANG et al., 2010). A eficácia

analgésica dos opióides pode variar segundo a característica, duração de intensidade do estímulo; dosagem e espécie. Os opióides bloqueiam a transmissão periférica e central da via nociceptiva aferente e por isso, tornam-se bastante eficientes no tratamento da dor inflamatória aguda (MERCADANTE, 2015). No entanto o tratamento com essa classe de fármaco apresenta muitos efeitos colaterais, tais como sedação, prurido, náusea, vômito, constipação, depressão respiratória, tolerância analgésica, além de estar vinculada ao uso abusivo (CHANG et al., 2007, 2011).

2.5 *Scutia buxifolia* Reiss

A espécie *S. buxifolia*, pertencente à família Rhamnaceae, é uma planta nativa do Sul do Brasil, Norte da Argentina e do Uruguai (WASICKY et al., 1964; MENEZES et al., 1995).

A espécie é comumente conhecida como “coronilha, canela-de-espinho ou espinho-de-touro”. No Rio Grande do Sul, seu habitat é principalmente em florestas junto com a Araucária, florestas ribeirinhas na Serra do Sudeste e do Litoral Sul (SOBRAL et al., 2006). No Brasil suas cascas são usadas na forma de infusão em água, sendo popularmente utilizada como anti-hipertensiva e diurética (WASICKY et al., 1964).

Estudos fitoquímicos da *S. buxifolia* indicaram a presença de cumarinas, ácidos orgânicos, heterosídeos flavônicos, heterosídeos cianogênicos, fenóis e alcalóides. A fração acetato de etila da casca da planta, que é obtida a partir do fracionamento do extrato hidroalcoólico dos ramos, apresenta forte atividade antioxidante, superior à apresentada pelo ácido ascórbico e outras frações da planta (extrato bruto, fração diclorometano e butanólica), e um alto conteúdo de polifenóis e de flavonoides. A quantificação de compostos derivados de flavonoides por cromatografia líquida de alta performance (HPLC) indicou a presença de quercetrina, rutina, quercetina e isoquerquitina, sendo a quercetrina o flavonoide encontrado em maior concentração (BOLIGON et al., 2009).

Os flavonoides possuem uma variedade de ações farmacológicas e podem ser utilizados no tratamento de várias doenças, tais com, alergias (SHAIK et al., 2006), diabetes mellitus (HABIBUDDIN et al., 2008), câncer (MILLER et al., 2009),

em processos de infecções virais (DROEBNER et al., 2007), na nociceção (FILHO et al., 2008), em processos inflamatórios (CHARAMI et al., 2008), e atuam como antioxidantes (BOOTS et al., 2008). Eles são conhecidos por eliminar radicais livres, modular a produção de NO pelo endotélio vascular do sistema imune (HUANG et al., 2004), e apresentam um papel importante na diminuição da permeabilidade capilar, e na exsudação e migração de leucócitos (PATHAK et al., 1991), mecanismos que estão intimamente correlacionados com o processo inflamatório.

A quercetina, um dos principais flavonoides com ação anti-inflamatória, é amplamente distribuída pelo reino vegetal. Essa ação pode ser atribuída à inibição das enzimas COX-2 e NOs (MUTOH et al., 2000; RASO et al., 2001; FILHO et al., 2008). Friesenecker et al. (1995) descrevem que flavonoides, como a quercetina, podem reduzir a ativação do sistema complemento, diminuindo a adesão de células inflamatórias ao endotélio, resultando em uma redução da resposta inflamatória. Também pode inibir a secreção de citocinas, como por exemplo, o TNF- α e IL-1, que são as principais citocinas envolvidas na inflamação (CAZAROLLI et al., 2008; RIBEIRO et al., 2015). Filho e colaboradores (2008) demonstraram que a quercetina inibiu a nociceção causada por capsaicina, glutamato e animais que sofreram adrenolactomia tiveram essa ação inibida. Assim eles sugeriram que a atividade do composto pode estar sendo mediada pelos sistemas glutamatérgicos, adrenérgicos, serotoninérgico e/ou dopaminérgico.

As propriedades apresentadas pela *S. buxifolia* são descritas na literatura, como antimicrobiana (MOREL et al., 2005), antioxidante (BOLIGON et al., 2009) e, vasodilatadora (DA SILVA et al., 2012), hipotensora e diurética (DA SILVA et al., 2015). Recentemente foi comprovado que a *S. buxifolia* inibe a agregação plaquetária, sugerindo que esta possa apresentar uma possível ação anti-inflamatória, que estaria relacionada com a inibição da enzima COX (BOLIGON et al., 2014a). Os inibidores de COX apresentam ação anti-inflamatória e analgésica e são utilizados para o tratamento da dor, como por exemplo a dor pós operatória (LOVICH-SAPOLA et al., 2015). A inibição das enzimas COX-1 e COX-2 impede a conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas, inibindo o processo inflamatório e nociceptivo (BRUNE e PATRIGNANI, 2015). Apesar dos efeitos benéficos de extratos de plantas, há provas substanciais sugerindo sua toxicidade potencial. Neste sentido, foram realizados estudos de toxicidade aguda da fração acetato de etila da *S. buxifolia*, onde ela não provocou toxicidade aparente. Os

estudos de toxicidade foram baseados nas diretrizes da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE). Onde, uma dose única de 2000 mg/Kg da Eta foi administrada oralmente em camundongos machos e fêmeas. A taxa de mortalidade, mudanças de comportamento e os parâmetros bioquímicos, hematológicos e histológicos foram avaliados, os resultados obtidos demonstraram que a Eta pode ser classificada como segura de acordo com o guia da OCDE (DA SILVA et al., 2014).

Tendo em vista os efeitos nocivos causados pela dor inflamatória ou pelos medicamentos utilizados para tratar esse tipo de dor, e o grande investimento em pesquisas para o desenvolvimento de novos medicamentos a partir de produtos naturais, juntamente com as comprovações das propriedades biológicas presentes na *S. buxifolia*, sem causar toxicidade aguda (BOLIGON et al.; BOLIGON et al, 2009, 2014a; IP e MEDZHITOV, 2015; JAYASURIYA, 1999), é de grande importância avaliar o seu possível potencial antinociceptivo e anti-inflamatório.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a ação antinociceptiva e anti-inflamatória da fração acetato de etila da casca da *Scutia buxifolia* Reiss (Eta) em camundongos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o perfil fitoquímico do Eta em HPLC.
- Avaliar a capacidade antinociceptivada Eta em modelos de triagem para novos analgésicos induzidos por estímulo químico (formalina, ácido acético, capsaicina) e térmico (placa quente) em camundongos.
- Averiguar a atividade da Eta frente ao processo inflamatório causado pela carragenina em camundongos, através da dosagem de marcadores inflamatórios (óxido nítrico, enzima mieloperoxidase, fator de necrose tumoral, interleucinas, proteína c reativa e interferon γ).
- Investigar atividade antinociceptiva da Eta em um modelo de dor clinicamente relevante (dor pós-operatória).
- Verificar o possível mecanismo de ação opióide da Eta frente a nocicepção induzida por capsaicina utilizando um antagonista opióide (naloxona).
- Investigar alguns dos possíveis efeitos adversos de Eta em camundongos.

4 MANUSCRITO

Os resultados que fazem parte desta dissertação estão apresentados na forma de manuscrito. Os itens Materiais e Métodos, Resultados e Discussão dos resultados encontram-se no próprio manuscrito. O manuscrito está disposto na forma em que foi enviado para a revista **Phytomedicine**.

ANTINOCICEPTIVE AND ANTI-INFLAMMATORY EFFECT OF THE *Scutia buxifolia* Reiss ETHYL ACETATE FRACTION

Laís da Rosa Moreira¹, Evelyne da Silva Brum¹, Andreia Regina Haas da Silva¹, Mayara Lutchemeyer de Freitas¹ Taiane Piccini Teixeira¹, Aline Augusti Boligon¹, Margareth Linde Athayde², Thiago Duarte³, Marta Maria Medeiros Frescura Duarte⁴, Sara Marchesan Oliveira⁵, Ricardo Brandão^{6*}

¹Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Health Sciences Centre, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

²Department of Industrial Pharmacy, Photochemistry Research Laboratory, Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Health Sciences Centre, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

³Biogenetic Laboratory, Health Sciences Centre, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

⁴Department of Health Sciences, Lutheran University of Brazil, Santa Maria, RS, Brazil.

⁵Department of Biochemistry and Molecular Biology, Graduate Program in Biological Sciences: Toxicological Biochemistry, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, RS, Brazil.

⁶Department of Pharmaceutical Sciences, Health Sciences Centre, Federal University of Pernambuco, Brazil.

*Corresponding author: Ricardo Brandão, Department of Pharmaceutical Sciences, Health Sciences Center, Federal University of Pernambuco, 50740-521, Recife, PE, Brazil

Tel: +558121268511; fax: +558121268511

E-mail address: ricardo_br79@yahoo.com.br (R. Brandão)

Abbreviations

S. buxifolia, *Scutia buxifolia* Reiss; Eta, ethyl acetate fraction; CNS, central nervous system; COX, cyclooxygenase; PGs, prostaglandins; LOD, limit of detection; LOQ, limit of quantification; IL, interleukins; IFN-γ, interferon-γ; TNF-α, tumor necrosis factor-α; CRP, c-reactive protein; MPO, myeloperoxidase; NOx, nitrite and nitrate; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay; AST, aspartate aminotransferase; ALT,

alanine aminotransferase, I_{max} , maximal inhibition; ID 50%, inhibitory dose 50%; NSAIDs, nonsteroidal anti-inflammatory drugs; NO, nitric oxide.

Abstract

Background: The *Scutia buxifolia* Reiss (Rhamnaceae) has been extensively studied for its phenolics groups, which are able to capture free radicals; being therefore, considered promising as an antioxidant in preventing diseases resulting from oxidative stress.

Hypothesis: *Scutia buxifolia* Reiss ethyl acetate fraction (Eta) presents antinociceptive and anti-inflammatory effect in mice.

Study Design: Eta (400-800 mg/kg) was tested in different pain models to investigate its antinociceptive and anti-inflammatory action.

Methods: It was carried out the abdominal writhing test, capsaicin test, thermal hyperalgesia and incisional pain. The inflamed tissue by carrageenan was used for the analysis of interleukins (IL), interferon- γ (IFN- γ), tumor necrosis factor- α (TNF- α), c-reactive protein (CRP), nitrite and nitrate (NOx) determination and myeloperoxidase (MPO) activity. Furthermore, we evaluate the possible action mechanism of Eta using naloxone in capsaicin test.

Results: Eta prevented the nociception caused by acetic acid, formalin and capsaicin test. However, neither the Eta prevented the thermal hyperalgesia in hot-plate test, nor the naloxone reversed the Eta antinociceptive effect in capsaicin test. Furthermore, the administration of Eta prevented significantly the increase of MPO activity, the NOx content, and the levels of IL-1, IL-6, TNF- α , INF- γ and CRP and was able to increase the IL-10 levels after the inflammation induced by carrageenan in mice. In addition, Eta prevented mechanical hyperalgesia in a postoperative pain model.

Conclusion: The Eta presents great antinociceptive and anti-inflammatory activity in mice but this effect not seem to have its action mechanism like opioids. It is possible that its antinociceptive effects are associated with levels decrease of inflammatory mediators.

Keywords: Rhamnaceae; pain; inflammatory mediators; antinociception; *Scutia buxifolia* Reiss.

Introduction

Inflammation can be caused by endogenous or exogenous stimuli, being intended to protect the body of the cause and the cellular damage consequences. Although the inflammation is essential and the physiological process are beneficial, if the damage is not recovered, it may be involved in the pathogenesis and progression of many inflammatory diseases, including postoperative pain, atherosclerosis, rheumatoid arthritis, multiple sclerosis and ischemia injury reperfusion (Alessandri *et al.*, 2013).

The inflammatory pain occurs in response to tissue injury and inflammatory response. In an attempt to repair the affected part of the body, the sensory nervous system undergoes a change in its response capacity, where the stimuli that are normally harmless will produce pain responses (alodinia) and the response to noxious stimuli will be enlarged and extended (hiperalgesia) (Loeser and Treede, 2008; Woolf, 2010). The inflammatory pain results from activation of resident cells such as mast cells, infiltration of inflammatory cells such as neutrophils, and the release of inflammatory mediators such as kinins, amines, prostanoids, growth factors and cytokines. These changes promote a threshold reduction and amplify the response of nociceptors that innervate the damaged tissue. Beyond these peripheral changes, also may induced a response increased the nociceptive neurons of the central nervous system (CNS) (Loeser and Treede, 2008; Woolf, 2010).

The species *Scutia buxifolia* Reiss (*S. buxifolia*; Rhamnaceae family) is popularly known as “coronilha”. This plant is native to South America, in highest proportion in Brazil, Argentina and Uruguay and is used as cardiotonic, hypotensive and diuretic in medical practice (Menezes, 1995). This species possess phenolics groups, including flavonoids, which are able to capture free radicals; being therefore, considered promising for use as an antioxidant in preventing diseases resulting from oxidative stress. The *Scutia buxifolia* Reiss ethyl acetate fraction (Eta) had higher antioxidant activity than those of other fractions (dichloromethane, butanolic) and also better result than ascorbic acid, used as a positive control (Boligon *et al.*, 2009). Recently, Boligon and coworkers observed that this plant has antiplatelet effect, which can be related to an anti-inflammatory action, since many anti-inflammatory drugs exert their action by inhibiting the enzyme cyclooxygenase (COX), which is

responsible to produce prostaglandins (PGs), which cause pain, fever and inflammation, and produces thromboxane, which causes platelet aggregation (Alessandri et al., 2013; Boligon et al., 2014). The ethyl acetate fraction was chosen for the tests because it has the highest concentration of flavonoids and present higher yield in extraction compared with the crude extract, even with higher costs for their extraction.

In view of the harmful effects caused by, together with the characterization profile of *S. buxifolia* and knowing that this plant presents several biological properties (Boligon et al., 2009; 2014), is relevant to study the possible antinociceptive and anti-inflammatory potential of the ethyl acetate fraction (Eta) of the *Scutia buxifolia* Reiss stem bark.

Materials and methods

The online supplementary material provides more detailed descriptions of all the procedures mentioned below.

Plant collection, extraction and fraction preparation

The stem barks of *S. buxifolia* were collected in Dom Pedrito (Rio Grande do Sul State of Brazil) in March 2013 (coordinates 30°59'09"S and 54°27'44"W). A dried voucher specimen is preserved in the herbarium of the Department of Biology at Federal University of Santa Maria (SMBD 12355). The plant stem barks were dried, powdered in a knife mill and obtained powder was macerated at room temperature with 70% ethanol for a week with a daily shake-up. After filtration, the extract was evaporated under reduced pressure to remove the ethanol. The extract was suspended in water and partitioned successively with ethyl acetate to obtain the Eta. The extract was dissolved in saline and both the plant and the vehicle were administered 10 ml/kg.

Quantification of compounds by HPLC-DAD

Quantification was carried out using the DAD-chromatograms obtained at 270 nm for gallic acid, 280 nm for caffeine, catechin, epicatechin and epigallocatechin, 327 nm for caffeic, ellagic and chlorogenic acids, and 366 nm for quercetin, isoquercitrin, quercitrin, rutin, luteolin and kaempferol, by means of external standard calibration curves. Stock solutions of standards references were prepared in the HPLC mobile phase at a concentration range of 0.020 – 0.250 mg/ml. The chromatography peaks were confirmed by comparing its retention time with those of reference standards and by DAD spectra (200 to 600 nm). All chromatography operations were carried out at ambient temperature and in triplicate. The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were calculated based on the standard deviation of the responses and the slope using three independent analytical curves. LOD and LOQ were calculated as $3.3\sigma/S$ and $10\sigma/S$, respectively, where σ is the standard deviation of the response and S is the slope of the calibration curve (Boligon *et al.*, 2013).

Animals

Adult male Swiss mice (25–35 g) were obtained from the animal house of the Federal University of Santa Maria (UFSM) and were randomly distributed into different experimental groups. The animals were housed in polypropylene cages at an ambient temperature of $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ and 45–55% relative humidity, with a 12:12 h light/dark cycle, provided with commercial food pellets and water *ad libitum* and were adapted to local conditions for at least 72 h before the experiment. All experimental protocols were approved by the Ethics Animal Committee of Universidade Federal de Santa Maria (CEUA UFSM; Protocol 079/2012). The number of animals and intensities of noxious stimuli used were the minimum necessary to demonstrate the consistent effects of the treatments.

Nociceptive parameters

Acetic acid-induced abdominal writhing

Abdominal constrictions were induced by intraperitoneal acetic acid injection (Oliveira *et al.*, 2009).

Formalin test

The formalin test was carried out as described by Milano *et al.* (2008a).

Capsaicin test

For the capsaicin test, mice received an intraplantar capsaicin injection (Trevisan *et al.*, 2012).

Hot-plate test

The hot-plate test was carried out according to Milano *et al.* (2008b).

Model of incisional pain

The incisional pain model was carried out as previously described by Oliveira *et al.* (2014).

Possible opioid action mechanism

To verify if Eta possess a similar action mechanism to opioids we followed the protocol preconized by Trevisan *et al.* (2013).

Inflammatory parameters

Carrageenan-induced peripheral inflammation

The carrageenan-induced peripheral inflammation model was used to determine anti-inflammatory activity (Winter *et al.*, 1962). The right hind paw tissue was collected for the determination of enzyme myeloperoxidase (MPO) activity and it was expressed as optical density/g of protein (Oliveira *et al.*, 2013). The serum was used for assay of serum nitrite and nitrate determination (NOx) was performed as Miranda *et al.* (2001), interleukins (IL), tumor necrosis factor (TNF- α), interferon- γ

(IFN- γ) and c-reactive protein (CRP). The cytokines measurement (IL-1, IL-6, IL-10, TNF- α , IFN- γ and CRP) was assessed by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

Adverse effects

The spontaneous and forced locomotor activity was assessed in the open-field and rotarod test, respectively (Oliveira *et al.*, 2014). The body temperature of animals was verified with the aid of a digital thermometer (Trevisan *et al.*, 2012). The possible damage gastric mucosal were evaluated as described by Oliveira *et al.* (2009). Creatinine and urea levels and aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) activities were assessed using commercial kits.

Statistical analysis

Results are expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM) or mean \pm standard deviations (SD) except for inhibitory doses 50% (ID 50%) values, which are reported as geometric means accompanied by their respective 95% confidence limits, and gastric lesion scores, which are reported as medians followed by their 25th and 75th percentiles. The time-response data from incisional test and the pain caused by capsaicin were analyzed by two-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni test. All other data were analyzed by one-way ANOVA followed by Tukey test. *p* values less than 0.05 (*p*<0.05) were considered as indicative of significance. The calculations were performed using the statistical software GraphPad Prism version 6.00 (San Diego, California, USA).

Results

The online supplementary material provides more detailed descriptions of all the procedures mentioned below.

HPLC analysis

The HPLC analysis revealed that flavonoids (quercetin, quercitrin, isoquercitrin, luteolin, rutin and kaempferol), tannins (caffeine, catechin, epicatechin and epigallocatechin) and phenolics acids (gallic, chlorogenic, ellagic and caffeic acids) are present in the Eta (Fig. 1 and Table 1).

Antinociceptive activity

Formalin test

The formalin intraplantar injection caused nociception in the first and second phase of test in mice. The treatment with Eta caused antinociception in the second phase, but not in the first phase with maximal inhibition (I_{max}) of $91\pm9.0\%$ (800 mg/kg) (Table 2). Diclofenac sodium (40 mg/kg, i.p.), also decreased the time spent licking the hind paw, only in the second phase ($I_{max} 73\pm25.3\%$).

Acetic acid-induced abdominal writhing

The acetic acid was able to induce successive abdominal writhing when intraperitoneally administrated in mice. The number of writhing was significantly lower in the groups treated with Eta with I_{max} of $59\pm2.3\%$ (800 mg/kg). Morphine ($99\pm0.2\%$) reduced the abdominal writhing when compared to vehicle group (Fig. 2A). The Eta showed an inhibitory dose 50% (ID_{50}) of 649 (563-747 mg/kg).

Capsaicin test

The capsaicin intraplantar administration induced spontaneous nociception in mice. Both diclofenac sodium and Eta inhibited the nociception caused by capsaicin when compared to vehicle group with I_{max} of 49.4 ± 8.8 and $89.3\pm3.2\%$, respectively (Fig. 2B).

Hot-plate test

In the hot-plate test, the treatment with Eta did not showed increase in latency response to thermal stimuli when compared to vehicle group (Supplementary Table 1S).

Inhibition of incisional pain

The plantar incision produced a marked mechanical hyperalgesia in the injured paw at all of the time points measured in mice treated with vehicle, when compared with the baseline values (B). The treatment with Eta or diclofenac significantly decreased the hyperalgesia after the treatments with I_{\max} of $91 \pm 0.7\%$ and $88 \pm 0.5\%$ at 1 h after treatment, respectively (Fig. 3).

Possible opioid action mechanism

In order to investigate the possible action mechanism of Eta antinociceptive effect, we used opioid receptor antagonist naloxone. The pretreatment with naloxone prior to morphine or Eta, fully prevented the morphine antinociceptive effect but not Eta in the capsaicin test, suggesting that Eta does not has its mechanism like opioids (Fig. 4).

Anti-inflammatory activity

Assessment of MPO activity in inflamed paw tissue

The group that received Carr presented increased MPO activity when compared to the vehicle group (saline). The oral administration with Eta markedly suppressed the MPO activity with I_{\max} of $98 \pm 0.2\%$ (600 mg/kg), when compared with Carr group. Diclofenac also caused a decrease in MPO activity ($96 \pm 0.06\%$) (Fig. 5A).

Determination of NOx content

The nitrite and nitrate serum levels were increased significantly, when compared to vehicle group (Fig. 5B). Eta prevented the increase of the serum NOx level with I_{\max} of $68 \pm 0.6\%$ (600 mg/kg) with ID_{50} of 698 (468-1040 mg/kg). The diclofenac sodium also prevented this increase, by $62 \pm 0.7\%$.

Measurement of serum cytokines

Data from ELISA assay showed that IL-1 (Fig. 5C), IL-6 (Fig. 5D), TNF- α (Fig. 6A), INF γ (Fig. 6B) and CRP (Fig. 6C) levels were increased in the serum of mice that received Carr, while the IL-10 were decreased (Fig. 6D), when compared to vehicle group. However, Eta decreased the levels of IL-1 (I_{max} of 100%; 800 mg/kg) with ID₅₀ of 441 (385-506 mg/kg), IL-6 (I_{max} of 100%; 800 mg/kg) with ID₅₀ of 468 (441-532 mg/kg), TNF- α (I_{max} of 100%; 800 mg/kg) with ID₅₀ of 441 (385-507 mg/kg), INF- γ (I_{max} of 100%; 800 mg/kg) with ID₅₀ of 302 (131-698 mg/kg) and CRP (I_{max} of 98±0.05%; 800 mg/kg) with ID₅₀ of 661 (609-718 mg/kg). Furthermore, Eta increased the IL-10 levels (I_{max} of 95±3.3%; 600 mg/kg), when compared to vehicle group. The diclofenac sodium caused reduction of IL-1 (61±1.1%), IL-6 (77±1.7%), TNF- α (82±2.5%), INF- γ (70±11.9%) and CRP (55±0.2%) levels, and increased the IL-10 (49±14.9%) levels.

Adverse effects

Eta neither altered the number of crossing and rearings in open field test nor the number of falls in the rotarod test (Supplementary Table 2S). Also it was unable to alter body temperature or cause gastric lesions in mice (Supplementary Table 3S). Eta did not causes any alterations in creatinine and urea levels or AST and ALT activity, when compared to vehicle group (Supplementary Table 4S).

Discussion

Phytochemical screening of the leaves and stem bark of *S. buxifolia* crude extract and its fractions revealed the presence of flavonoids, alkaloids, phenolics, and steroids compounds (BOLIGON et al., 2009). Moreover, results obtained by Boligon et al. (2013) showed that *S. buxifolia* has a great potential to prevent diseases caused by the over production of free radicals, and it can be used as a potential source of natural antioxidant agents.

The intraperitoneal injection of acetic acid is a preliminary test used to screen new analgesic drugs that act in peripheral, spinal and supraspinal level. The

nociceptive response of this test is modulated by release cytokines such as TNF- α and IL-1 β of macrophages and mast cells residing in the abdominal cavity, and also involves the release of arachidonic acid and PGs biosynthesis (Oliveira et al., 2009; Yi et al., 2010; Pinheiro et al., 2015). The Eta was able to reduce the abdominal writhing number acetic acid-induced antinociceptive action, which may be linked to the inhibition of the synthesis of prostaglandins or acceleration of the production of its metabolites. Moreover, the capsaicin when applied locally in paw surface initiates a series of hyperalgesic and inflammatory reactions leading to activation of afferent sensory neurons that conduct the nociceptive information to the CNS (Trevisan et al., 2012). In accordance with the above data, both Eta and diclofenac sodium reduced the nociception capsaicin-induced, supporting again the peripheral antinociceptive action of the Eta.

The formalin test can distinguish two distinct phases, neurogenic and inflammatory phases and the action of analgesic drugs is different in both phases. Opiates, which act centrally for the most part, inhibit both phases similarly, while NSAIDs, as diclofenac sodium, present antinociceptive effect particularly in the second phase (Milano et al., 2008a). Eta, such as diclofenac sodium, inhibited only the inflammatory phase, indicating that the analgesic effect may be related to inhibition of inflammatory agents, since it is well known that there is a release of histamine, serotonin, prostaglandin and excitatory amino acids in this phase of test (Pinheiro et al., 2015).

We also investigated the possible antinociceptive effect of Eta in the hot plate test which is a pain model that uses an acute noxious stimulus to screen new analgesic drugs and is used to investigate substances that act on the CNS, such as opioid agonists (Milano et al., 2008a; Zhang et al., 2009; Yi et al., 2012). The Eta, different from morphine (a non-selective opioid agonist), was not able to prevent this type of pain, suggesting that its antinociceptive effect is independent of the CNS action. Thus, Eta seems only to reduce nociception related with a pathological (inflammatory) process, but not with a physiological (thermal) of noxious stimuli.

Carrageenan-induced inflammation is a test widely used to investigate the action mechanisms of NSAIDs and steroids drugs, as well as to screen novel anti-inflammatory or analgesic compounds (Posadas et al., 2004; Oliveira et al., 2009). Since some studies demonstrate that this substance causes the release of inflammatory mediators such as NO_x, myeloperoxidase, interleucinas and TNF- α

(Pinheiro *et al.*, 2015), we tested the effect of Eta on these parameters. The IL-1 and TNF- α are pro-inflammatory cytokines which induce the expression of other cytokines and mediators promoting an inflammatory process while IL-6 provides effect synergistic with IL-1 and TNF- α , without induce cytokine production (Alessandri *et al.*, 2013). Moreover, IL-10 modulates the inflammatory mediator production by neutrophils, monocytes, and macrophages, limiting the secretion of pro-inflammatory cytokines such as TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 and IL-12 (Zhang *et al.*, 2010). The CRP is considered one of the acute phase proteins, and its concentration increases in response to inflammation and other cytokines as IL-6 (Alessandri *et al.*, 2013). Moreover, the nitric oxide (NO) is another inflammatory mediator that acts by changing the tone and vascular permeability, and act as a chemotactic agent (Pinheiro *et al.*, 2015), while the MPO (a marker of neutrophil infiltration) is a key enzyme in innate immunity and is present in the neutrophils granules (Alessandri *et al.*, 2013).

The Eta was able to decrease the levels of MPO, NOx, IL-1, IL-6, TNF- α , IFN- γ and CRP and increase the IL-10 levels, front the administration of carrageenan, suggesting that its antinociceptive action can be related to the inhibition of inflammatory mediators release. The inflammatory pain results from activation of resident cells such as mast cells, infiltration of inflammatory cells such as neutrophils, and the release of inflammatory mediators such as kinins, amines, prostanooids, growth factors and cytokines. These changes promote the reduction of activation threshold and amplify the response of nociceptors that innervate the damaged tissue (Luo *et al.*, 2008; Woolf, 2010). The antinociceptive and anti-inflammatory activity of Eta can be associated with the presence of some components such as quercetin, gallic acid and rutin but also other compounds present in the fraction (other than those found compounds) may contribute to the activity found. Boots (2008) disclose that flavonoids as quercetin may reduce the activation of the complement system, decreasing the adhesion of inflammatory cells to the endothelium, inhibit secretion of cytokines such as TNF- α and IL-1, resulting in a reduction of the inflammatory response. In recent studies, it was demonstrated that the gallic acid and rutin inhibits the inflammatory response by reducing the expression of the COX-2 enzyme (Mansour *et al.*, 2014; Yang *et al.*, 2015). However, the possible participation of other compounds present in this species, such as steroids, tannins, and alkaloids, cannot be ruled out. In tests which were performed with different extract doses lower dose

(200 mg/kg) already has maximum effect, and even with the increase in concentration significant effect increase non is observed, this could be due to the compounds present in the extract reach the interaction boundary drug-receptor, thereby not presenting best action due to the increase in dose (Kelly, 2013).

After to confirm the Eta anti-inflammatory and antinociceptive effects in screening tests in mice, our aim was to prove its effectiveness in a clinical model of pain. For this, we choose the postoperative pain model, because the treatment of this type of pain is recognized as an important issue in relation to health care and its remains inadequately treated (Wu and Raja, 2011). The main drugs used in the treatment of postoperative pain are opioids and NSAIDs, but its causes adverse effects which limits its use (Derry *et al.*, 2015). Eta administered after surgery was able to reverse the postoperative pain in mice without cause significant adverse effects (sedation, excitation, gastric damage, or changes on urea and creatinine levels or AST and ALT activities). Although Eta has presented inactivity on hot-plate test, we decided to investigate the participation of opioid receptor in the mechanism of Eta action, since the opioid receptors on peripheral terminals of afferent nerves can be the sites of the intrinsic modulation of nociception. Furthermore, drugs with action on these receptors may lead to analgesic effects in the absence of the central adverse effects caused by opioids (Vadivelu *et al.*, 2011). We demonstrate that Eta prevented the spontaneous nociception caused by capsaicin even when administrated plus naloxone, a non-selective opioid antagonist. In contrast, the morphine effect in this test was completely reverted by naloxone, confirming the hypothesis of non-involvement of the opioid system in the action mechanism of Eta.

Conclusion

In this study, we demonstrate that the Eta had a significant antinociceptive effect in screening tests for new analgesics in mice. In addition, this fraction was effective in decreasing several inflammatory mediators. The Eta antinociceptive and anti-inflammatory effects can be occurring by inhibition of inflammatory mediators, since the action via opioid system was excluded. Eta caused these effects without promote alterations in the locomotor activity, corporal temperature or gastric lesions in the stomach of animals. Further, Eta neither alters AST and ALT activities nor

creatinine or urea levels. However, further investigations are needed to elucidate the exact mechanism of Eta action. The results of the present study suggest that this fraction is interesting for use as a mild analgesic drug.

Conflicts of interest

The authors have no conflicts of interest to declare.

Acknowledgments

This study was supported by the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq). We also acknowledge fellowships from CNPq and CAPES.

Table and legends

Table 1. Composition of *S. buxifolia* ethyl acetate fraction.

Compounds	Stem bark		LOD µg/m	LOQ µg/m
	mg/g	%		
Gallic acid	30.84 ± 0.03 a	3.08	0.028	0.091
Catechin	6.53 ± 0.01 b	0.65	0.009	0.029
Chlorogenic acid	25.68 ± 0.01 c	2.56	0.017	0.053
Caffeic acid	19.02 ± 0.02 d	1.90	0.034	0.112
Caffeine	24.57 ± 0.02 c	2.45	0.021	0.070
Ellagic acid	27.01 ± 0.01 e	2.70	0.015	0.048
Epicatechin	6.84 ± 0.03 b	0.68	0.024	0.079
Epigallocatechin	19.27 ± 0.01 d	1.92	0.032	0.108
Rutin	31.09 ± 0.02 a	3.10	0.008	0.027
Isoquercitrin	7.42 ± 0.01 f	0.74	0.025	0.083
Quercitrin	48.75 ± 0.03 g	4.87	0.010	0.032
Quercetin	27.13 ± 0.01 e	2.71	0.045	0.149
Kaempferol	24.50 ± 0.03 c	2.45	0.013	0.043
Luteolin	30.21 ± 0.01 a	3.02	0.036	0.117

Composition of *S. buxifolia* ethyl acetate fraction (%). Limit of Detection (LOD) and Limit of Quantification (LOQ) variations for compounds (ug/ml).

Table 2. Effect of oral administration of Eta on formalin-induced nociception in mice.

Time administration	Study group	Licking time	
		Neurogenic nociception	Inflammatory nociception
15 minutes	Control	74±16	197±27
	Diclofenac	54±10	53±25***
	400 mg/Kg	64±8	85±31
	600 mg/Kg	35±7	87±18*
	800 mg/Kg	34±8	88±16*
	30 minutes	56±9	56±12***
30 minutes	400 mg/Kg	34±12	28±17***
	600 mg/Kg	18±5	18±9***
	800 mg/Kg	62±18	54±23***
60 minutes	400 mg/Kg	55±18	87±36*
	600 mg/Kg	75±27	43±18***
	800 mg/Kg		

One-way ANOVA followed by the Tukey post hoc test. Data represent the mean ± S.E.M. of 6 animals.

***p<0.0001 or *p<0.05 different from vehicle group.

Figure and legends

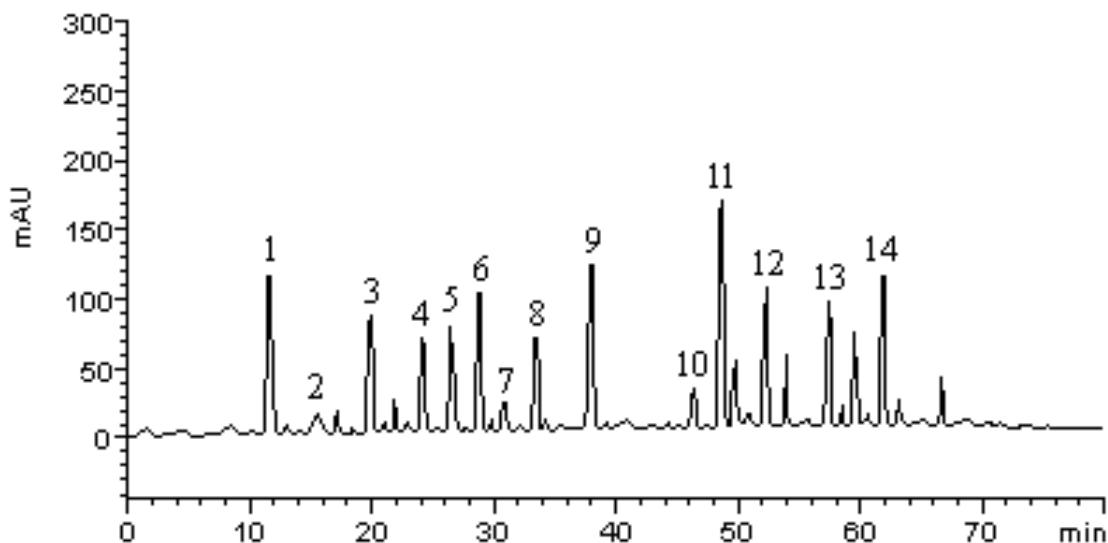


Figure 1 - Representative high performance liquid chromatography profile of Eta. The UV detection was at 327nm. Gallic acid (peak 1), catechin (peak 2), chlorogenic acid (peak 3), caffeic acid (peak 4), caffeine (peak 5), ellagic acid (peak 6), epicatechin (peak 7), epigallocatechin (peak 8), rutin (peak 9), isoquercitrin (peak 10), quercitrin (peak 11), quercetin (peak 12), kaempferol (peak 13) and luteolin (peak 14).

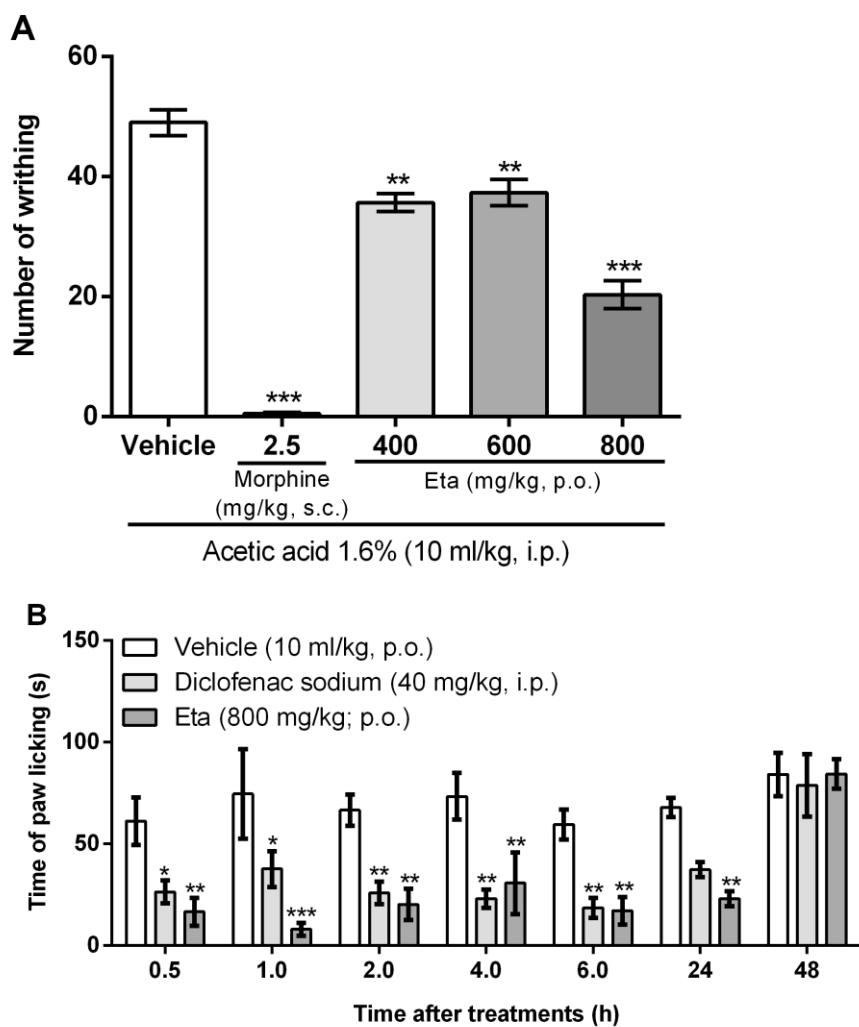


Figure 2 – (A) The effect of Eta on acetic acid-induced abdominal writhing. **(B)** The effect of Eta on capsaicin-induced nociception. Data represent the mean \pm S.E.M. of 6 animals. One-way ANOVA followed by the Tukey post hoc test to acetic acid test and two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test to capsaicin test. ***p<0.0001, **p<0.001 or *p<0.05 different from respective vehicle group.

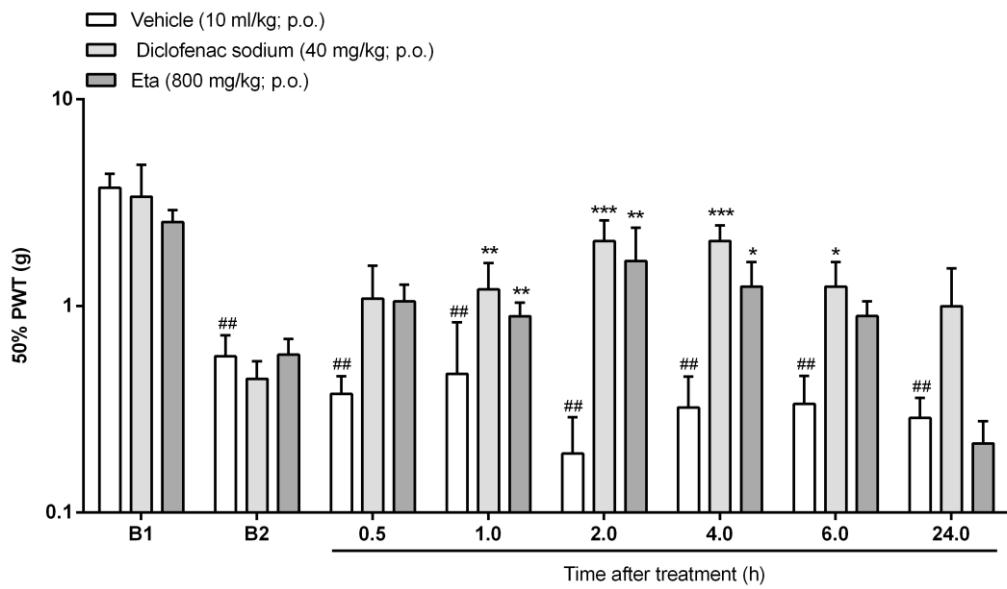


Figure 3 - Time-course curve of paw withdrawal threshold (PWT) in a postoperative pain model. The B1 point on the x-axis represents the response before induction of surgical pain and B2 represents mechanical hyperalgesia measured immediately after induction of surgical pain and before drug treatment. Data represent the mean±S.E.M. of 6 animals. Two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test. ##p<0.001 when compared with the baseline and ***p<0.0001, **p<0.001 or *p<0.05 when compared with the respective vehicle group.

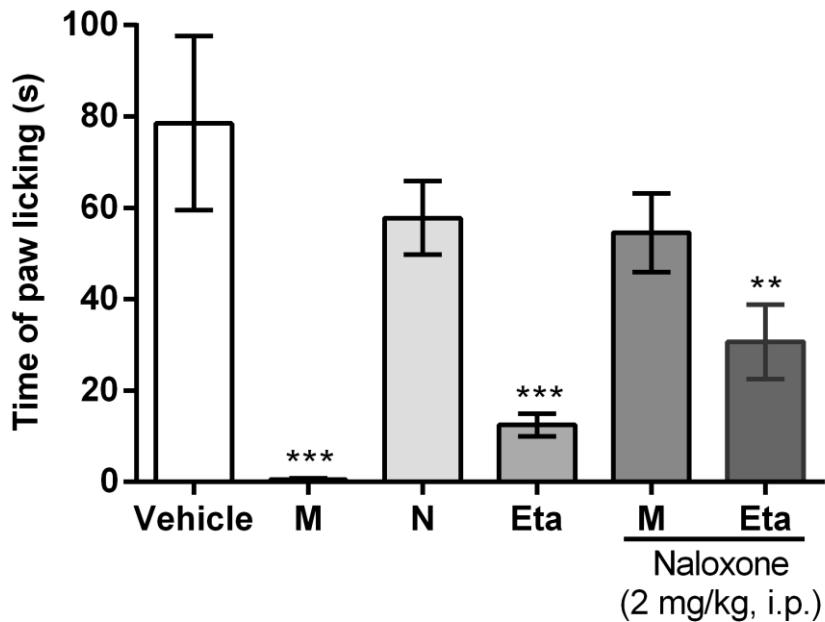


Figure 4 – The effect of naloxone (N) on Eta and morphine (M)-induced antinociception in the intraplantar capsaicin test. Data represent the mean±S.E.M. of 6 animals. One-way ANOVA followed by the Tukey post hoc test. ***p<0.0001 or **p<0.001 different from vehicle group.

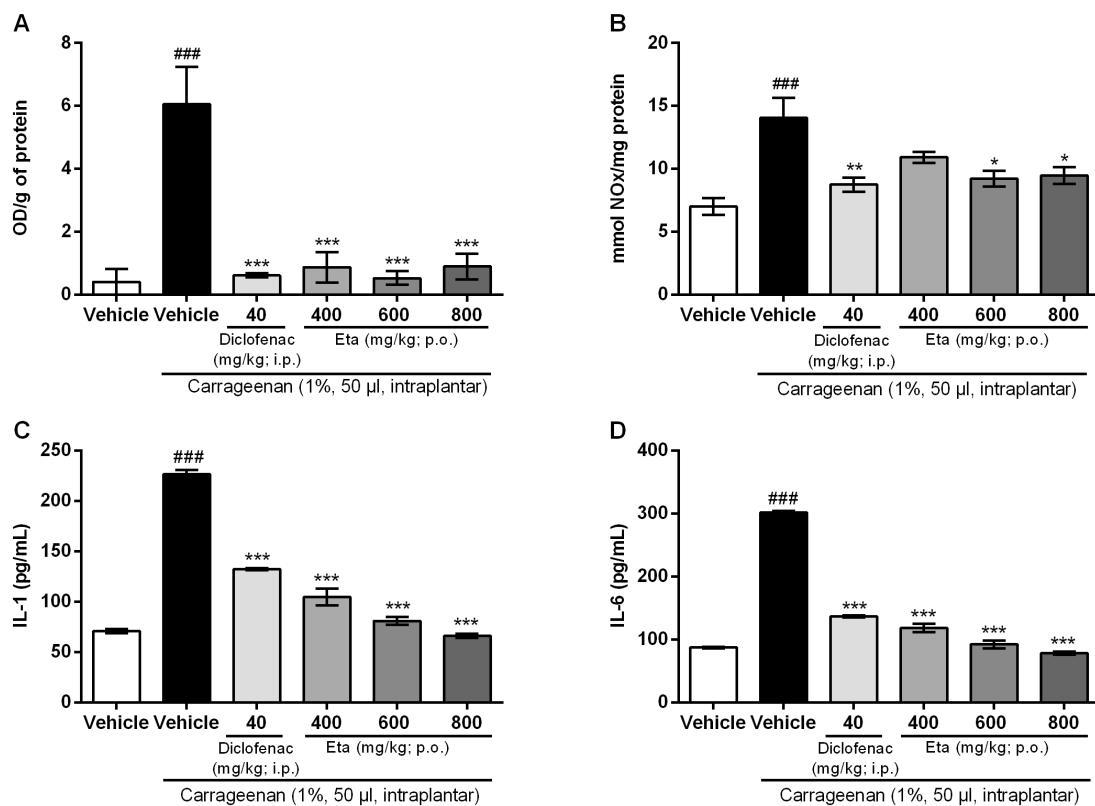


Figure 5 – The effect of Eta on the myeloperoxidase activity (A) and NO_x (B), IL-1 (C) and IL-6 (D) levels after inflammation induced by carrageenan. Data represent the mean±S.E.M. of 6 animals. One-way ANOVA followed by the Tukey post hoc test. ***p<0.0001 different from vehicle group and ***p<0.0001, **p<0.001 or *p<0.05 different from carrageenan group.

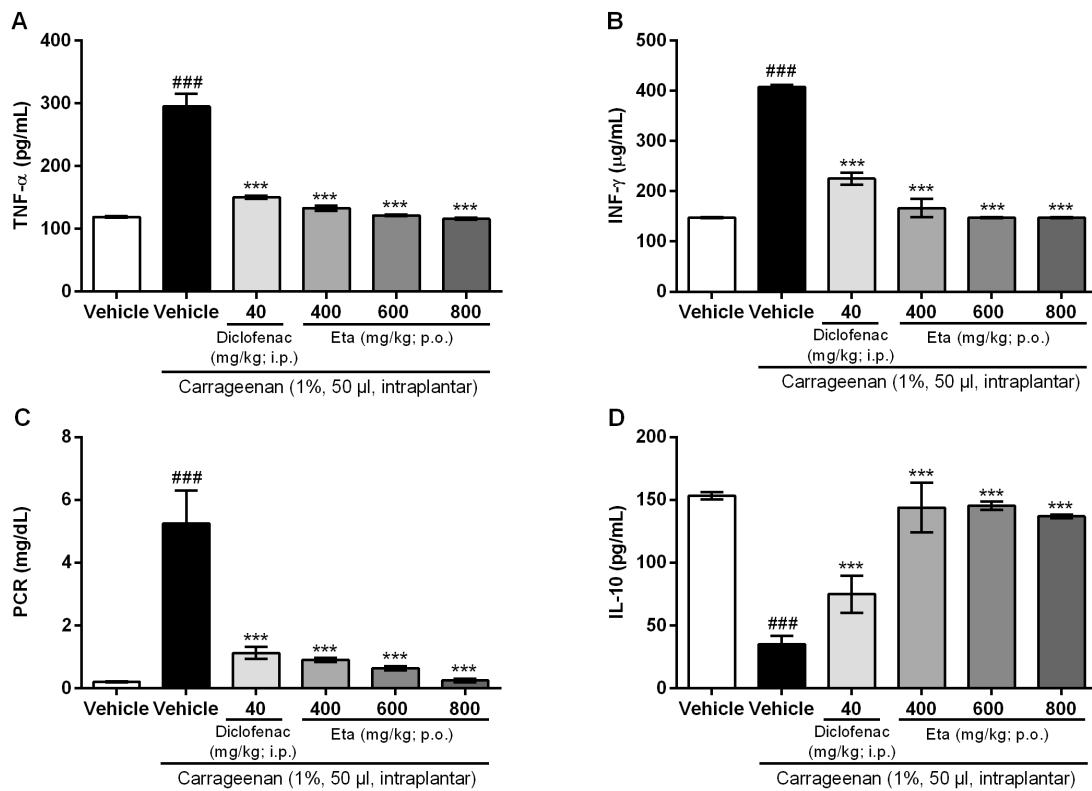


Figure 6 – The effect of Eta on the levels of TNF- α (A), INF- γ (B), CRP (C) and IL-10 (D) after inflammation induced by carrageenan. Data represent the mean \pm S.E.M. of 6 animals. One-way ANOVA followed by the Tukey post hoc test. ***p<0.0001 different from vehicle group and ***p<0.0001 different from carrageenan group.

Supplementary data

Materials and methods

Quantification of compounds by HPLC-DAD

The Eta (20 µg/mL), after its filtration (0.45 µm membrane filter, Millipore) and after be degassed by ultrasonic bath, was injected (50 µL) into a reversed-phase C18 column (4.6 mm x 150 mm) packed with 5 µm diameter particles. The solvents of mobile phase were: solvent A (acetonitrile/water/formic acid, 3:88:9, v/v/v), solvent B (acetonitrile/water/formic acid, 50:41:9, v/v/v), and solvent C (methanol/water/formic acid, 90:1:9, v/v/v). The flow rate was 0.6 ml/min. The linear solvents gradient was: 96% A, 4% B, and 0% C maintained for 7 min; 70% A, 17% B, and 13% C after 31 min; 50% A, 30% B, and 20% C after 14 min; 30% A, 40% B, and 30% C after 0.5 min; 0% A, 50% B, and 50% C after 4.5 min and maintained for 1 min; finally they were returned to initial conditions after 7 min, following the method described by Castillo-Muñoz et al. (2010). Quantification was carried out using the DAD-chromatograms obtained at 270 nm for gallic acid, 280 nm for caffeine, catechin, epicatechin and epigallocatechin, 327 nm for caffeic acid, ellagic and chlorogenic acids, and 366 nm for quercetin, isoquercitrin, quercitrin, rutin, luteolin and kaempferol, by means of external standard calibration curves. Stock solutions of Standards references were prepared in the HPLC mobile phase at a concentration range of 0.020–0.250 mg/ml. The chromatography peaks were confirmed by comparing its retention time with those of reference standards and by DAD spectra (200 to 600 nm).

The calibration curves for gallic acid was: $Y = 13167x + 1258.4$ ($r = 0.9998$); catechin: $Y = 11973x + 1249.5$ ($r = 0.9997$); epicatechin: $Y = 12753x + 1193.5$ ($r = 0.9994$); caffeine: $Y = 12508x + 1321.6$ ($r = 0.9999$); epigallocatechin: $Y = 13582x + 1340.7$ ($r = 0.9999$); caffeic acid: $Y = 11863x + 1265.3$ ($r = 0.9997$); chlorogenic acid: $Y = 11904x + 1196.2$ ($r = 0.9995$); ellagic acid: $Y = 11754x + 1286.1$ ($r = 0.9999$); rutin: $Y = 13086 + 1265.7$ ($r = 0.9998$); quercitrin: $Y = 12409x + 1358.2$ ($r = 0.9994$); quercetin: $Y = 13471x + 1186.3$ ($r = 0.9992$), isoquercitrin: $Y = 11973x + 1325.6$ ($r = 0.9999$); luteolin: $Y = 11785x + 1245.7$ ($r = 0.9995$) and kaempferol: $Y = 12758x +$

1245.7 ($r = 0.9998$). All chromatography operations were carried out at ambient temperature and in triplicate. The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were calculated based on the standard deviation of the responses and the slope using three independent analytical curves. LOD and LOQ were calculated as 3.3 and $10 \sigma/S$, respectively, where σ is the standard deviation of the response and S is the slope of the calibration curve (Boligon *et al.*, 2013).

Nociceptive parameters

Formalin test

The formalin test was carried out as described previously (Milano *et al.*, 2008a). Eta 400-800 mg/kg, orally (p.o.) or vehicle (10 ml/kg, p.o) was administered 15, 30 or 60 minutes before of the formalin injection (2.5%, v/v; 20 µl/paw). Morphine 2.5 mg/kg, subcutaneously (s.c.) or diclofenac sodium 40 mg/kg, intraperitoneally (i.p.), administered 30 min before of test, were used as positive control. It analyzed the time of paw lick. The formalin test can distinguish two distinct phases, neurogenic (0-5 min) and inflammatory (15-30 min) phases after administration.

Capsaicin test

For the capsaicin test, mice received an intraplantar (i.pl.) capsaicin injection (1 nmol/paw) (Trevisan *et al.*, 2012). Groups different of animals were treated with vehicle (10 ml/kg, p.o.), diclofenac sodium (40 mg/kg) or Eta (800 mg/kg) and subjected to the capsaicin test at different times after its administration (1-48h).

Acetic acid-induced abdominal writhing

Abdominal constrictions were induced by acetic acid (1.6%, i.p.) (Oliveira *et al.*, 2009). Mice were treated with vehicle (10 ml/kg, p.o.), Eta (400-800 mg/kg, p.o.) or morphine (2.5 mg/kg, s.c.) 30 min before of acid acetic injection. Immediately after it was observed the number of writhes for 20 min.

Hot-plate test

The hot-plate test was carried out according to Milano *et al.* (2008b). The animals were treated with Eta (800 mg/kg, p.o.), vehicle (10 ml/kg, p.o.) or morphine (2.5 mg/kg, s.c.) and subjected to the hot-plate test 0.5, 1, 2 and 4 h after treatment.

Model of incisional pain

The incisional pain model was carried out as previously described by Oliveira *et al.* (2014). The animals were post-treated 0.5 h after incision with Eta (800 mg/kg, p.o.), sodium diclofenac (40 mg/kg, i.p.), or vehicle (10 ml/kg, p.o.) and the mechanical hyperalgesia was measured from 0.5 up to 24.0 h after its administrations. The measurement of mechanical paw withdrawal threshold was carried out using the Up-and-Down paradigm as described previously by Chaplan *et al.* (1994), with minor modifications (Oliveira *et al.*, 2011). The 50% mechanical paw withdrawal threshold (PWT) response was then calculated from the resulting scores as described previously by Dixon (1980). The PWT was expressed in grams (g) and was evaluated several times before and after treatments or surgical procedures. A significant decrease in PWT compared to the baseline values was considered as mechanical hyperalgesia.

Possible opioid action mechanism

To verify if Eta possess a similar action mechanism to opioids we follow the protocol preconized by Trevisan *et al.* (2013). Naloxone (a non-selective opioid antagonist) was administered (2 mg/kg; i.p.) 15 min before administration of Eta (800 mg/kg; p.o.), morphine (a non-selective opioid agonist) (2.5 mg/kg; s.c.), or vehicle (10 ml/kg, p.o.) in the capsaicin test.

Inflammatory parameters

Carrageenan-induced peripheral inflammation

The carrageenan-induced peripheral inflammation model was used to determine anti-inflammatory activity (Winter *et al.*, 1962). The Eta (400-800 mg/kg,

p.o.), diclofenac sodium (40 mg/kg, i.p.), or vehicle (10 ml/kg, p.o.) were administered 30 min before injection i.pl. of carrageenan (Carr) 1% (50 µL). After 5 h, for the determination of enzyme myeloperoxidase (MPO) activity, the tissue was homogenized (1:4) in potassium phosphate monobasic buffer with EDTA. Blood was also collected from cardiac puncture and serum was separated for the determination of interleukins (IL), tumor necrosis factor (TNF- α), interferon- γ (IFN- γ), c-reactive protein (PCR) and nitrite and nitrate determination (NOx).

Adverse effects

Open field test

Spontaneous exploratory behavior was assessed in the open-field test to rule out any motor disturbance related to the administration of Eta (Oliveira, *et al.*, 2009; 2014). The animals were evaluated 30 min after the administration of vehicle (10 ml/kg, p.o.), Eta (800 mg/kg, p.o.), diclofenac sodium (40 mg/kg, i.p.) or morphine (2,5 mg/kg, s.c.) in the crossings and rearings of the open-field test.

Rotarod test

Locomotor activity forced was evaluated using the rotarod test (Trevisan *et al.*, 2013). Twenty-four hours before testing, all animals were submitted to a training session. On the test day, mice received vehicle (10 ml/kg, p.o.), Eta (800 mg/kg, p.o.), diclofenac sodium (40 mg/kg, i.p.) or morphine (100 mg/kg, s.c.) 1 h before the test. During the test session, the total number of fall during a 4 min period were measured.

Body temperature measurement

The body temperature of mice was measured 30 min after administration of vehicle (10 mg/kg, p.o.), Eta (800 mg/kg, p.o.), morphine (100 mg/kg, s.c.) or diclofenac sodium (40 mg/kg, i.p.) utilizing a digital thermometer (DT 203 LN: 630203) (Oliveira *et al.* 2009; Trevisan *et al.*, 2012).

Gastric lesion assessment

To evaluate the gastric tolerability, the animals were fasted for 18 h and after received oral administration of the Eta (800 mg/kg, p.o.), sodium diclofenac (positive control, 40 mg/kg, p.o.) or saline (10 ml/kg, p.o.) and 1 h after treatments they were euthanized. The stomachs were removed, opened by cutting along the minor curvature and washed with saline at 4°C. The quantification of gastric mucosal lesions was carried out by assigning a score according to the number and size of lesions on a scale from 0 up to 6 points (Oliveira *et al.*, 2009).

Biochemical parameters

To the assessment of creatinine and urea levels, and aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT) activities, the animals received vehicle (10 ml/kg, p.o.), diclofenac sodium (40 mg/kg, p.o.), morphine (2.5 mg/kg, s.c.) or Eta (800 mg/kg, p.o.). Thirty min after the administration the animals were deeply anesthetized with thiopental (100 mg/kg) and blood was collected by cardiac puncture. The obtained serum was utilized for the assessment of biochemical parameters using a commercial kit (Diagnostic Kits Laboratory Bioclin/Quibasa, Minas Gerais, Brazil) and a semi-automatic biochemical analyzer (Genz, Bioplus: Bio-2000).

Chemical, apparatus and general procedures

All chemical utilized were of analytical grade. Acetonitrile, formic acid, gallic acid, chlorogenic acid, ellagic acid, caffeic acid and caffeine purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Quercetin, isoquercitrin, quercitrin, rutin, luteolin, catechin, epicatechin, epigallocatechin and kaempferol were adquired from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA). High performance liquid chromatography (HPLC-DAD) was performed with a Shimadzu Prominence Auto Sampler (SIL-20A) HPLC system (Shimadzu, Kyoto, Japan), equipped with Shimadzu LC-20AT reciprocating pumps connected to a DGU 20A5 degasser with a CBM 20A integrator, SPD-M20A diode array detector and LC solution 1.22 SP1 software. Morphine sulfate, naloxone (Cristália, São Paulo, Brazil), sodium diclofenac and capsaicin (Sigma Chemical Co.,

St. Louis, MO, USA) were also used. The cytokines quantification was assessed by ELISA using commercial kits for human, IL-1, IL-6, IL-10, TNF- α and IFN- γ , (eBIOSCIENCE, San Diego, USA), according to manufacturer's instructions and homocysteine levels assayed by the Immulite analyzer (Diagnostic Products Corporation, Los Angeles, California).

Results

HPLC analysis

HPLC fingerprinting of *S. buxifolia* ethyl acetate fraction revealed the presence of the gallic acid ($t_R = 11.87$ min; peak 1), catechin ($t_R = 15.69$ min; peak 2); chlorogenic acid ($t_R = 20.01$ min; peak 3), caffeic acid ($t_R = 24.15$ min; peak 4), caffeine ($t_R = 27.19$ min; peak 5), ellagic acid ($t_R = 28.71$ min; peak 6), epicatechin ($t_R = 31.04$ min; peak 7), epigallocatechin ($t_R = 33.97$ min; peak 8), rutin ($t_R = 38.12$ min; peak 9), isoquercitrin ($t_R = 46.57$ min; peak 10), quercitrin ($t_R = 48.09$ min; peak 11), quercetin ($t_R = 52.31$ min; peak 12), kaempferol ($t_R = 57.68$ min; peak 13) and luteolin ($t_R = 61.97$ min; peak 14) (Fig. 1 and Table 1). The HPLC analysis revealed that flavonoids (quercetin, quercitrin, isoquercitrin, luteolin, rutin and kaempferol), tannins (caffeine, catechin, epicatechin and epigallocatechin) and phenolics acids (gallic, chlorogenic, ellagic and caffeic acids) are present in the Eta.

Adverse effects

Open-field test

Neither Eta (800 mg/kg, p.o.) nor diclofenac (40 mg/kg, i.p.) altered the number of crossing and rearings in open field test (Table 2S), different from morphine (2.5 mg/kg, s.c.), that caused increase in crossing number (227.2 ± 4.0), when compared to vehicle group (57 ± 4.0) ($p < 0.0001$) and caused a decrease in rearings (00 ± 00) in comparison with the vehicle group (35 ± 5.0) ($p < 0.0001$).

Rotarod test

Neither Eta (800 mg/kg, p.o.) nor diclofenac sodium (40 mg/kg, i.p.) altered the latency to first fall and the number of falls in the rotarod test at 1 h after its oral administrations when compared to vehicle group (Table 2S). In contrast, morphine treatment (2.5 mg/kg, s.c.) reduced the forced locomotor activity of mice, which presented 7.3 ± 3.07 falls, when compared to vehicle group (2.18 ± 0.6 falls) ($p<0.04$).

Body temperature measurement

Neither Eta (800 mg/kg, p.o.) nor diclofenac (40 mg/kg, i.p.) was able to modify body temperature in mice (Table 3S). In the same conditions, morphine-treated (2.5 mg/kg, s.c.) mice showed significant hypothermia ($33\pm0.2^\circ\text{C}$) 1 h after morphine administration, when compared to vehicle group ($36\pm0.1^\circ\text{C}$) ($p<0.0001$).

Gastric lesion assessment

Gastric lesion formation was investigated in mice with a single oral dose of the Eta or diclofenac sodium and was reported as median followed by 25-75% quartiles (Table 3S). The Eta (800 mg/kg, p.o.) presented scores similar to those for the vehicle (10 ml/kg, p.o.), corresponding to 2.00 (0.00-3.00) and 0.00 (0.00-0.00) lesion scores/stomach, respectively. In contrast, oral administration of the non-selective cyclooxygenase inhibitor, sodium diclofenac (40 mg/kg, p.o.), induced a more extensive score values at 9.00 (9.00-12.00) lesion scores/stomach when compared to vehicle group ($p<0.0001$).

Biochemical parameters

Eta (800 mg/kg, p.o.) not caused any alterations in biochemical parameters such as creatinine and urea levels or AST and ALT activities, when compared to vehicle group (Table 4S). The Crea levels were increased ($38\pm0.02\%$ and $39\pm0.01\%$) in mice treated with morphine (2.5 mg/kg, s.c.) and diclofenac sodium (40 mg/kg, p.o.), respectively.

Tables Supplementary

Table 1S. Effect of the administration of Eta (800 mg/kg) on the hot-plate test.

Time (hours)	Vehiche	Morphine	Eta
	(10 ml/kg; p.o.)	(2.5 mg/kg; s.c.)	(800 mg/kg; p.o.)
0.5	10±2	40±0***	13±3
1.0	13±2	40±0***	14±2
2.0	9±2	32±4***	13±3
4.0	11±2	16±3	10±1

Two-way ANOVA followed by Bonferroni's post hoc test (mean ± SEM) (n=5-6/group). The results are expressed in latency time (sec). ***p<0.0001 when compared with the respective vehicle group.

Table 2S. Effect of the administration of Eta (800 mg/kg) on the number of crossings and rearings in open-field test and locomotor activity in rota-rod test.

Groups	Open -field		Rota-rod
	Rearing	Crossing	
Vehicle (10 ml/kg; p.o.)	35±5	57±4	0
Diclofenac sodium (40 mg/Kg; i.p.)	61±3	109±9	0
Morphine (2.5 mg/Kg; s.c.)	0***	227.2±38***	24±2***
Eta (800 mg/kg; p.o.)	37±9	64±8	0

One-way ANOVA followed by the Tukey post hoc test (mean ± SEM) (n=5-6/group). ***p<0.0001 when compared with the respective vehicle group.

Table 3S. Effect of the administration of Eta (800 mg/kg) on the temperature and gastric lesion.

Groups	Gastric lesion	T°C
Vehicle (10 ml/kg; p.o.)	2 (0-3)	36±0.19
Diclofenac sodium (40 mg/kg; p.o. or i.p.)	9 (9-12)***	35±0.40
Morphine (2.5 mg/kg; s.c.)	-	33±0.23***
Eta (800 mg/kg; p.o.)	0	35±0.39

One-way ANOVA followed by the Tukey post hoc test (mean ± SEM) (n=5-6/group). ***p<0.0001 when compared with the respective vehicle group.

Table 4S. Effect of the administration of Eta (800 mg/kg) on urea and creatinine levels and AST and ALT activities.

Groups (mg/Kg)	ALT (U/L)	AST (U/L)	Creatinine (µg/dL)	Urea (mg/dL)
Vehicle	52±4	158±19	30±0.010	40±3
Diclofenac sodium	48±2	133±13	39±0.017*	50±4
Morphine	43±3	152±18	38±0.026*	41±5
Eta	54±9	125±14	37±0.011	39±2

One-way ANOVA followed by the Tukey post hoc test (mean ± SEM) (n=5-6/group). *p<0.05 when compared with the respective vehicle group.

References

- Alessandri, A.L., Sousa, L.P., Lucas, C.D., Rossi, A.G., Pinho, V., Teixeira, M.M., 2013. Resolution of inflammation: Mechanisms and opportunity for drug development. *Pharmacology & Therapeutics*, 139, 189-212.
- Boligon, A.A., Pereira, R.P., Fletrin, A.C., Machado, M.M., Janovik, V., Rocha, J.B.T., Athayde, M.L., 2009. Antioxidant activities of flavonol derivatives from the leaves and stem bark of *Scutia buxifolia* Reiss. *Bioresource Technology*, 100, 6592-6598.
- Boligon, A.A., Kubiça, T.F., Mario, D.N., Brum, T.F., Piana, M., Weiblen, R., Lovato, L., Alves, S.H., Santos, R.C.V., Alves, C.F.S., Athayde, M.L., 2013. Antimicrobial and antiviral activity-guided fractionation from *Scutia buxifolia* Reissek extracts. *Acta Physiologiae Plantarum*, 35, 2229-2239.
- Boligon A.R., Pimentel V.C., Bagatini M.D., Athayde M.L., 2014. Effect of *Scutia buxifolia* Reissek in nucleotidase activities and inhibition of platelet aggregation. *Journal of Natural Medicines*, 69, 46-54.
- Boots, A.W.; Haenen, G.R.; Bast, A., 2008. Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. *European Journal of Pharmacology*, 13, 325-37.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principles of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–54.
- Chaplan S.R., Bach F.W., Pogrel J.W., Chung J.M., Yaksh T.L., 1994. Quantitative assessment of tactile hyperalgesia in the rat paw. *Journal of Neuroscience Methods*, 53, 55–63.
- Derry, S., Karlin, S.M., Moore, R.A. 2015. Single dose oral ibuprofen plus codeine for acute postoperative pain in adults. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 5, 2.
- Dixon W.J., 1980. Efficient analysis of experimental observations. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 20, 441–462.
- Kelly, E., 2013. Ligand bias at the μ -opioid receptor. *Biochemical Society Transactions*, 41, 218-224.
- Loeser, J.D., Treede, R.D., 2008. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Terminology. *Pain*, 137, 473-477.
- Luo, P., Zhang, Z., Yi, T., Zhang, H., Liu, X., Mo, Z., 2008. Anti-inflammatory activity of the extracts and fractions from *Erigeron multiradiatus* through bioassay-guided procedures. *Journal of Ethnopharmacology*, 26, 119(2), 232-7.
- Mansour, R.B., Jilani, I.B., Bouaziz, M., Gargouri, B., Elloumi, N., Attia, H., Ghrabi-Gammar, Z., Lassoued, S. 2014. Phenolic contents and antioxidant activity of ethanolic extract of *Capparis spinosa*. *Cytotechnology*, Nov 7.

McGrath, J.C., Drummond, G.B., McLachlan, E.M., Kilkenny, C., Wainwright, C.L. 2010. Guidelines for reporting experiments involving animals: the ARRIVE guidelines. *British Journal of Pharmacology*, 160(7), 1573-6.

Menezes, J.A., 1995. Scutianina-J, A New Cyclopeptidic Alkaloid Isolated From *Scutia buxifolia* reiss. *Phytochemistry*, 28, 783-786.

Milano, J., Oliveira, S.M., Rossato, M.F., Sauzem, P.D., Machado, P., Beck, P., Zanatta, N., Martins, M.A., Mello, C.F., Rubin, M.A., Ferreira, J., Bonacorso, H.G., 2008a. Antinociceptive effect of novel trihalomethyl-substituted pyrazoline methyl esters in formalina and hot-plate tests in mice. *European Journal of Pharmacology*, 581, 86-96.

Milano, J., Rossato, M.F., Oliveira, S.M., Drewes, C., Machado, P., Beck, P., Zanatta, N., Martins, M.A.P., Mello, C.F., Rubin, M.A., Ferreira, J., Bonacorso, H.G., 2008b. Antinociceptive action of 4-methyl-5-trifluoromethyl-5-hydroxy-4,5-dihydro-1H-pyrazole methyl ester in models of inflammatory pain in mice. *Life Sciences*, 83, 739–746.

Miranda, K.M., Espey, M.G., Wink, D.A., 2001. A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide*, 5, 62–71.

Oliveira S. M., Gewehr C., Dalmolin G.D., Cechinel C.A., Wentz A., Lourega R.V., Sehnem R.C., Zanatta N., Martins M.A., Rubin M.A., Bonacorso H.G., Ferreira J., 2009. Antinociceptive effect of a novel tosylpyrazole compound in mice. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 104(2), 122-9.

Oliveira S.M., Drewes C.C., Silva C.R., Trevisan G., Boschen S.L., Moreira C.G., 2011. Involvement of mast cells in a mouse model of postoperative pain. *European Journal of Pharmacology*, 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. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 124, 396-404.

Piana, M., Silva M.A., Trevisan, G., de Brum, T.F., Silva, C.R., Boligon, A.A., Oliveira, S.M., Zadra, M., Hoffmeister, C., Rossato, M.F., Tonello, R., Laporta, L.V., de Freitas, R.B., Belke, B.V., Jesus, R.S., Ferreira, J., Athayde, M.L., 2013. Antiinflammatory effects of *Viola tricolor* gel in a model of sunburn in rats and the gel stability study. *Journal of Ethnopharmacology*, 150(2), 458-65.

Pinheiro, M.M.G.; Miltojević, A.B.; Radulović, N.S.; Abdul-Wahab, I.R.; Boylan, F.; Fernandes, P.D., 2015. Anti-Inflammatory Activity of *Choisya ternate* Kunth Essential Oil, Ternanthranin, and Its Two Synthetic Analogs (Methyl and Propyl-N-Methylantranilates). *Plos One*, 2510(3), 0121063.

Posadas I, Bucci M, Roviezzo F, Rossi A, Parente L, Sautebin L., 2004. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and

displays differential nitric oxide cyclo-oxygenase-2 expression. *British Journal of Pharmacology*, 142, 331–8.

Trevisan, G., Rossato, M.F., Walker, C.I., 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 transient receptor potential vanilloid 1 antagonist with antinociceptive properties. *Journal of Pharmacology and Experimental*, 343, 258-69.

Trevisan, G., Rossato, M.F., Walker, C.I., Oliveira, S.M., Rosa, F., Tonello, R., Silva, C.R., Machado, P., Boligon, A.A., Martins, M.A., Zanatta, N., Bonacorso, H.G., Athayde, M.L., Rubin, M.A., Calixto, J.B., Ferreira, J., 2013. A novel, potent, oral active and safe antinociceptive pyrazole targeting kappa opioid receptors. *Neuropharmacology* 73, 261-73.

Vadivelu, N., Mitra, S., Hines, R.L., 2011. Peripheral opioid receptor agonists for analgesia: a comprehensive review. *Journal of Opioid Management*, 7, 556–558.

Yang, Y.H., Wang, Z., Zheng, J., Wang, R., 2015. Protective effects of gallic acid against spinal cord injury-induced oxidative stress. *Molecular Medicine Reports*, 12, 3017-24.

Yi, T., Zhao, Z.Z., Yu, Z.L., Chen, H.B., 2010. Comparison of the anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of three medicinal plants known as "Snow Lotus" herb in traditional Uighur and Tibetan medicines. *Journal of Ethnopharmacology*, 24, 128(2), 405-11.

Yi, T., Lo, H., Zhao, Z., Yu, Z., Yang, Z., Chen, H., 2012. Comparison of the chemical composition and pharmacological effects of the aqueous and ethanolic extracts from a Tibetan "Snow Lotus" (*Saussurea laniceps*) herb. *Molecules*, 12, 17(6), 7183-94.

Winter, C.A., Risley, E.A., Nuss, G.W., 1962. Carrageenin-induced oedema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proceedings of The Society for Experimental Biology and Medicine*, 111, 544-547.

Woolf, C.J., 2010. What is this thing called pain? *The Journal of Clinical Investigation*, 120, 3742-3744.

Wu, C.L., Raja, S.N., 2011. Treatment of acute postoperative pain. *Lancet*, 25, 377(9784)-2215-25.

Zhang, L., Hu, J.J., Lin, J.W., Fang, W.S., Du, G.H., 2009. Anti-inflammatory and analgesic effects of ethanol and aqueous extracts of *Pterocephalus hookeri* (C.B. Clarke) Höeck. *Journal of Ethnopharmacology*, 25, 123(3), 510-4.

Zhang Y., Kim H.J., Yamamoto S., Kang X., Ma X., 2010. Regulation of interleukin-10 gene expression in macrophages engulfing apoptotic cells. *Journal of Interferon & Cytokine Research*, 30, 113-122.

5 CONCLUÇÕES

Tendo em vista os resultados obtidos no presente trabalho, pode-se concluir que:

- O perfil fitoquímico da Eta revelou a presença de vários compostos, antioxidantes, sendo que alguns apresentam ações antinociceptiva e antiinflamatória comprovadas.
- Neste estudo, foi demonstrado que a Eta apresentou um efeito antinociceptivo significativo em testes de triagem que estão relacionados com um processo patológico (inflamatório), mas não foi eficaz em testes usados para investigar substâncias que atuam sobre o SNC, sugerindo que o seu efeito antinociceptivo é independente da ação do SNC, mas pode estar vinculada com inibição da produção ou liberação de mediadores inflamatórios.
- A Eta foi eficaz na redução de vários mediadores inflamatórios frente a inflamação induzida por carragenina em camundongos.
- A Eta apresentou ação significativa frente a dor pós-cirúrgica, demonstrando mais uma vez que sua ação pode estar relacionada com a dor inflamatória, já que o dano tecidual desencadeia o processo inflamatório.
- O efeito antinociceptivo da Eta não tem envolvimento com o sistema opioide, uma vez que sua ação não foi revertida quando administrado um antagonista opioide.
- A Eta foi eficaz nos testes realizados sem promover alterações na atividade locomotora, temperatura corporal ou causar lesões gástricas no estômago dos animais. Além disso, a Eta não alterou as atividades das enzimas AST e ALT, nem os níveis de creatinina ou uréia.

6 PERSPECTIVAS

Com base nos resultados obtidos em nosso trabalho novos estudos poderiam ser realizados:

- Mecanismo de ação do Eta frente a nocicepção e inflamação;
- Verificar a possível ação do Eta em outras condições dolorosas de etiologia inflamatória.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALESSANDRI, A. L. et al. Resolution of inflammation: Mechanisms and opportunity for drug development. **Pharmacol Ther**, v.139, p.189-212, 2013.

ARGOFF, C.E. Recent management advances in acute postoperative pain. **Pain Pract**, v. 14, p.477-87, 2014.

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

BOLIGON, A. R. et al. Antioxidant activities of flavonol derivatives from the leaves and stem bark of *Scutia buxifolia* Reiss. **Bioresource Technol**, v.100, p.6592-6598, 2009.

BOLIGON, A. R. et al. Antimicrobial and antiviral activity-guided fractionation from *Scutia buxifolia* Reissek extracts. **Acta Physiol. Plant**, v.35, p.2229-2239, 2013.

BOLIGON, A. R. et al. Effect of *Scutia buxifolia* Reissek in nucleotidase activities and inhibition of platelet aggregation. **J Nat Med**, 2014a.

BOLIGON, A. R. et al. Antiulcerogenic activity of *Scutia buxifolia* on gastric ulcers induced by ethanol in rats. **Acta Pharm Sin B**, v. 4, p.358-67, 2014b.

BOOTS, A. W.; HAENEN, G. R.; BAST, A. Health effects of quercetin: From antioxidant to nutraceutical. **Eur J Pharmacol**, v.13, p.325-37, 2008.

BRAZ, J.; SOLORZANO, C.; WANG, X.; BASBAUM, A. I. Transmitting pain and itch messages: A contemporary view of the spinal cord circuits that generate Gate Control. **Neuron**, v. 7, p. 522-36, 2014.

BRENNAN, T. J.; VANDERMEULEN, E. P.; GEBHART, G. Caracterization of a rat modelo f insicional pain. **Pain**, v.64, p.491-493, 1996.

BRUNE, K.; PATRIGNANI, P. New insights into the use of currently available non-steroidal anti-inflammatory drugs. **J Pain Res**, v. 8, p 105-118, 2015.

BUTTERWORTH, J.; MACKEY, D.; WASNICK, J. Morgan and Mikhail's clinical anesthesiology. **Lange/McGraw-Hill**, New York (NY), 2013.

CHEN, F. F. Analgesic effect of total flavonoids from *Sangvis draxonis* on spared nerve injury rat model of neuropathic pain. **Phytomedicine**, v. 22, p.1125-32, 2015.

CHUNG, K. F. Inflammatory biomarkers in severe asthma. **Curr Opin Pulm Med**, v.18, p.35-41, 2012.

CAZAROLLI, L. H. et al. Flavonoids: prospective drug candidates. **Mini Rev Med Chem**, v.8, p.1429-1440. 2008.

CHANG, G.; CHEN, L.; MAO, J. Opioid Tolerance and Hyperalgesia. **Med Clin N Am**, v. 92, p. 199-211, 2007.

CHANG, H. Y. et al. Analgesic effects and the mechanisms of anti-inflammation of hispolon in mice. **J Evid Based Complementary Altern Med**, V.27, 2011.

CHARAMI, M. T. et al. Antioxidant and antiinflammatory activities of *Sideritis perfoliata* subsp. *perfoliata* (Lamiaceae). **Phytother Res**, v.22 , p.450-4, 2008.

COSTIGAN, M.; SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. Neuropathic pain: a maladaptive response of nervous system to damage. **Annu Rev Neurosci**, v. 32, p.1-32, 2009.

DELPORTE, C. et al. Low-Density Lipoprotein Modified by Myeloperoxidase inInflammatory Pathways and Clinical Studies. **Mediators Inflamm**, p.1-18, 2013.

DA SILVA, A. R. H. et al. Biochemical and hematological effects of acute and sub-acute administration to ethyl acetate fraction from the stem bark *Scutia buxifolia* Reissek in mice. **J Ethnopharmacol**, v.153, p.908-916, 2014.

DA SILVA, R. C. V. A. F. et al. Endothelium-dependent and independent vasorelaxation induced by an n-butanolic fraction of bark of *Scutia buxifolia* Reiss (Rhamanaceae). **J Ethnopharmacol**, v.141, p.997-1004, 2012.

DA SILVA, R. C. V. A. F. et al. Hypotensive and diuretic effect of the butanolic soluble fraction of the hydroethanolic extract of bark of *Scutia buxifolia* Reissek in rats. **J Ethnopharmacol**, v. 172, p. 395–401, 2015.

DELPORTE, C. et al. Low-Density Lipoprotein Modified by Myeloperoxidase in Inflammatory Pathways and Clinical Studies. **Mediators Inflamm**, v. 2013, p. 1-18, 2013.

DERRY, S.; KARLIN, S. M.; MOORE, R. A. Single dose oral ibuprofen plus codeine for acute postoperative pain in adults. **BMJ Publishing Group**, v. 5, p. 2, 2015.

DROEBNER, K. et al. CYSTUS052, a polyphenol-rich plant extract, exerts anti-influenza virus activity in mice. **Antiviral Res**, v.76, p.1-10, 2007.

ELTZSCHIG, H. K.; ECKLE, T. Ischemia and reperfusion-from mechanism to translation. **Nat Med**, v.7, p. 1391-401. 2011.

FILHO, A. W. et al. Quercetin: Further Investigation of its Antinociceptive Properties and Mechanisms of Action. **Arch Pharm Res**, v. 31, p.713-721, 2008.

FONG, A.; SCHUG, S. A. Pathophysiology of pain: a practical primer. **J Plast Reconstr Aesthet Surg**, v. 134, p. 8S-12S, 2014.

FREIRE, M. O.; DYKE, T. E. Natural resolution of inflammation. **Periodontology**, v. 63, p. 149–164, 2013.

- FRIESENECKER, B.; TSAI, A. G.; INTAGLIETTA, M. Cellular basis of inflammation, edema and the activity of Daflon 500 mg. **Int J Microcirc Clin Exp**, v. 15, p. 17-21, 1995
- GAN, T. J. Diclofenac: an update on its mechanism of action and safety profile. **Curr Opin Pulm Med**, v. 26, n. 7, p. 1715-31, 2010.
- GILROY, D.; MAEYER, R. New insights into the resolution of inflammation. **Semin Immunol**, v.27, p. 161–168, 2015.
- GROSU, I.; KOCK, M. New concepts in acute pain management: strategies to prevent chronic postsurgical pain, opioid-induced hyperalgesia, and outcome measures. **Anesthesiol Clin**, v.29, p.311–27, 2011.
- HABIBUDDIN, M. et al. Antidiabetic effect of alcoholic extract of Caralluma sinaica L. on streptozotocin-induced diabetic rabbits. **J Ethnopharmacol**, v.117, p.215-220, 2008.
- HEHN, C. A. V., BARON R., WOOLF, C. J. Deconstructing the Neuropathic Pain Phenotype to Reveal Neural Mechanisms. **Neuron**, v. 73, p. 638-652, 2012.
- HUANG, Y. et al. Inhibition of nitric oxide/cyclic gmp-mediated relaxation by purified flavonoids, baicalin and baicalein, in rat aortic rings. **Biochem Pharmacol**, v.67, p.787-794, 2004.
- IP, W. E. I.; MEDZHITOV, R. Macrophages monitor tissue osmolarity and induce inflammatory response through NLRP3 and NLRC4 inflammasome activation. **Nat Commun**, 6: 6931, 2015.
- JAMISON, R. N.; MAO, J. Opioid Analgesics. **Mayo Clin Proc**, v.90, p.957-968, 2015.
- JAYASURIYA, D. C. The regulation of medicinal plants - a preliminary review of selected aspects of national legislation. **World Health Organization Geneva**, 1999.
- KAM, P. C. A.; SO, A. COX-3: uncertainties and controversies. **Curr Anaesth Crit Care**, v.20, p.50–53, 2009.
- KELLY, E. Ligand bias at the μ -opioid receptor. **Biochem Soc T**, 41, 218-224, 2013.
- KETONIS C.; ILYAS, A. M.; LISS, F. Pain management strategies in hand surgery. **Orthop Clin N Am**, v. 46, p. 399-408, 2015.
- KODALI, B. S.; OBEROI, J. Management of postoperative pain [Systematic reviews and meta-analyses] E.W. Rosenquist, K. Doucette (Eds.) (MA), 2014.
- KUNER, R. Central mechanisms of pathological pain. **Nat Med**, v.16, p.1258-1266, 2010.

- LARSSON, M. Ionotropic glutamate receptors in spinal nociceptive processing. **Mol. Neurobiol.**, v.40, p.260-288, 2009.
- LATREMOLIERE, A.; WOOLF, C. F. Central sensitization: a generator of pain hypersensitivity by central neural plasticity. **J Pain**, v.10, p.895-926, 2009.
- LEE, M. A L. D. et al. Postoperative Opioid-induced Respiratory Depression: A Closed Claims Analysis. **Anesthesiology**, v.122, p.658-665, 2015.
- LOESER, J. D.; TREDE, R. D. The Kyoto protocol of IASP Basic Pain Therminilogy. **Pain**, v. 137, p. 437-477, 2008.
- LOVICH-SAPOLA, J.; SMITH, C. E.; BRANDT, C. P. Postoperative Pain Control. **Surg Clin N Am**, v.95, p. 301-318, 2015.
- LUO, P. et al. Anti-inflammatory activity of the extracts and fractions from Erigeron multiradiatus through bioassay-guided procedures. **J Ethnopharmacol**, v. 26, p. 232-7, 2008.
- MACINTYRE, P. E. et al. The scientific evidence for acute pain treatment. **Curr Opin Anaesthesiol**, v. 23, p.623-628, 2010.
- MANDHANE, S. N.; SHAH, J. H.; THENNATI, R. Allergic rhinitis: an update on disease, present treatments and future prospects. **Int Immunopharmacol**, v.11, p.1646-1662, 2011.
- MANSOUR, R. B. et al. Phenolic contents and antioxidant activity of ethanolic extract of *Capparis spinosa*. **Cytotechnology**, Nov 7, 2014.
- MCFARLAND, H. F.; MARTIN, R. Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. **Nat Immunol**, v.8, p.913–919, 2007.
- MERCADANTE, S. Opioid metabolism and clinical aspects. **Eur J Pharmacol**, v. 769, p. 71-78, 2015.
- MENEZES, J. A. et al. Scutianina-J, A New Cyclopeptidic Alkaloid Isolatd From *Scutia buxifolia* Reiss. **Phytochemistry**, v.28, p.783-786, 1995.
- MILANO, J. et al. Antinociceptive effect of novel trihalomethyl-substituted pyrazoline methyl esters in formalina and hot-plate tests in mice. **Eur J Pharmacol**, v. 581, p.86-96, 2008.
- MILLER, R. J. et al. Cytokine and chemokine regulation of sensory neuron function. **Handb Exp Pharmacol**, v.194, p.417-449, 2009.
- MOORE, R. A.; DERRY, S.; ALDINGTON, D.; WIFFEN, P. J. Single dose oral analgesics for acute postoperative pain in adults - an overview of Cochrane reviews. **Cochrane Libr**, 2015.

- MOREL, F. A. et al Cyclopeptide alkaloids from *Scutia buxifolia* Reiss and their antimicrobial activity. **Phytochemistry**, v.66, p.2571-2576, 2005.
- MULEY, M. M. et al. Preclinical Assessment of Inflammatory Pain. **CNS Neurosci Ther**, p. 1-14, 2015.
- MUTOH, M. et al. Suppression by flavonoids of cyclooxygenase-2 promoter-dependent transcriptional activity in colon cancer cells: structure-activity relationship. **Jpn J Cancer Res**, v. 91, p. 686-91, 2000.
- NATHAN, C.; DING, A. Nonresolving inflammation. **Cell**, v.140, p.871-882, 2010.
- NOSSAMAN, V. E. et al. Advances in perioperative pain management use of medications with dual analgesic, mechanisms, tramadol and tapentadol. **Anesthesiol Clin**, v. 28, p 647-666, 2010.
- OECD: Guidelines for testing of chemical. Acute oral toxicity-up-and-down procedure. **OECD** (Ed): Paris, 2008.
- OLIVEIRA S. M. et al. Antinociceptive effect of a novel tosylpyrazole compound in mice. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v.104, p.122-9, 2009.
- OLIVEIRA S.M. et al. Antinociceptive effect of 3-(4-fluorophenyl)-5-trifluoromethyl-1H-1-tosylpyrazole. A Celecoxib structural analog in models of pathological pain. **Pharmacol Biochem Be**, v. 124, p.396-404, 2014.
- OKSUZ, E. et al. Therapeutic potential of cyclooxygenase-3 inhibitors in the management of glioblastoma. **J Neuro-Oncol**, p. 1-8, 2015.
- OLTEAN, H. et al. Herbal medicine for low-back pain. **Cochrane Libr**, 2014.
- PATHAK, D.; PATHAK, K.; SINGLA, A. K. Flavonoids as medicinal agents – Recent advances. **Fitoterapia**, v.57, p.371-89, 1991.
- PINHEIRO, M.M.G. et al. Anti-Inflammatory Activity of *Choisya ternate* Kunth Essential Oil, Ternanthranin, and Its Two Synthetic Analogs (Methyl and PropylN-Methylantranilates). **Plos One**, 2510(3), 0121063, 2015.
- PETRI, B.; PHILLIPSON, M.; KUBES, P. The physiology of leukocyte recruitment: an in vivo perspective. **J Immunol**, v.15, p.6439-46, 2008.
- POSADAS I. et al. Carrageenan-induced mouse paw oedema is biphasic, age-weight dependent and displays differential nitric oxide cyclo- oxygenase-2 expression. **Br J Pharmacol**, v. 142, p. 331–8, 2004.
- RASO, G. M. et al. Inhibition of inducible nitric oxide synthase and cyclooxygenase-2 expression by flavonoids in macrophage J774A.1. **Life Sci**, v. 68, p. 921–31, 2001.
- RAWAL, N. Current issues in postoperative pain management. **Eur J Anaesthesiol Suppl**, 2015.

- REDDI, D. Preventing chronic postoperative pain. **Anaesthesiology**, v. 71, p.64-71, 2016.
- RIBEIRO, D. et al. Flavonoids Inhibit COX-1 and COX-2 Enzymes and Cytokine/Chemokine Production in Human Whole Blood. **Inflammation**, v. 38, p.858-870, 2015.
- RUSSO, C. M.; BROSE, W. G. Chronic pain. **Annu Rev Med**, v. 49, p. 123-133, 1998.
- SAAD, S. S. T. et al. Nitric oxide is involved in ibuprofen preemptive analgesic effect in the plantar incisional model of postsurgical pain in mice. **Neurosci Lett**, v. 614, p. 33-38, 2016.
- SARAIVA, M.; O'GARRA, A. The regulation of IL-10 production by immune cells. **Nat Rev Immunol**, v.10, p.170–181, 2010.
- SCARPIGNATO, C.; HUNT, R. H. Nonsteroidal antiinflammatory drug-related injury to the gastrointestinal tract: clinical picture, pathogenesis, and prevention. **Gastroenterol Clin North Am**, v.39, p.433–464. 2010.
- SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. Can we conquer pain? **Nat Neurosci**, v.5, p.1062-1067, 2001.
- SERHAN, C. N. et al. Lipid mediators in the resolution of inflammation. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, v. 7, 2014.
- SHAIK, Y. B. et al. Role of quercetin (a natural herbal compound) in allergy and inflammation. **J Biol Regul Homeost Agents**, v.20, p.47-52, 2006.
- SOBRAL, M. et al. Flora Arbórea e Arborescente do Rio Grande do Sul. **Novo Ambiente**: São Carlos, p.350, 2006.
- SCHOLZ, J.; WOOLF, C. J. Can we conquer pain? **Nat Neurosci**, v.5, p.1062-1067, 2002.
- TREVISAN, G. et al. Identification of the plant steroid α -spinasterol as a novel transient receptor potential vanilloid 1 antagonist with antinociceptive properties. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 343, p. 258-69, 2012.
- VADIVELU, N.; MITRA, S.; HINES, R.L. Peripheral opioid receptor agonists for analgesia: a comprehensive review. **J Opioid Manag**, v.7, p.556–558, 2011.
- VAN-ASSCHE, T. et al. Gene therapy targeting inflammation in atherosclerosis. **Curr Pharm Des**, v.17, p.4210-4223, 2011.
- VRONTOU, S. et al. Genetic identification of C fibres that detect massage-like stroking of hairy skin in vivo. **Nature**, v.493, p.669–673, 2013.

- YANG, Y.H.; WANG, Z.; ZHENG, J.; WANG, R. Protective effects of gallic acid against spinal cord injury-induced oxidative stress. **Mol Med Rep**, 12, 3017-24, 2015.
- YAO, X. et al. Targeting interleukin-6 in inflammatory autoimmune diseases and cancers. **J Pharmacol Exp Ther**, v. 141, p. 125-139, 2014.
- YI, T.; ZHAO, Z.Z.; YU, Z.L.; CHEN, H.B. Comparison of the anti-inflammatory and anti-nociceptive effects of three medicinal plants known as "Snow Lotus" herb in traditional Uighur and Tibetan medicines. **J Ethnopharmacol**, v. 24, p. 405-11, 2010.
- WALDERBURGER, J. M.; FIRESTEIN, G. S. Regulation of peripheral inflammation by the Central Nervous System. **Curr Rheumatol Rep**, v.12, p. 370-378, 2010.
- WANG, H. B. Coexpression of delta- and mu-opioid receptors in nociceptive sensory neurons. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 107, p. 13117–13122, 2010.
- WASICKY, R.; WASICKY, M.; JOACHIMOVITS, R. Erstuntersuchungen na coronilha Scutia buxifolia Reissek. **Planta Med**, v.12, p.13-25, 1964.
- WEHLING, M. Non-steroidal anti-inflammatory drug use in chronic pain conditions with special emphasis on the elderly and patients with relevant comorbidities: management and mitigation of risks and adverse effects. **Eur J Clin Pharmacol**, v. 70, p. 1159-1172, 2014.
- WOOLF, C. J. What is this thing called pain? **J Clin Invest**, v. 120, p.3742-3744, 2010.
- WOOLF, C. J. Central sensitization: Implications for the diagnosis and treatment of pain. **Pain**, v. 152, 2011.
- World Health Organization. Programmes and Projects: Cardiovascular disease [site na Internet]. Ginebra: **WHO**, 2009.
- WU, C. L.; RAJA, S. N. Treatment of acute postoperative pain. **TheLancet**, v. 377, p. 2215-2225, 2011.
- ZHANG, L. et al. Anti-inflammatory and analgesic effects of ethanol and aqueous extracts of Pterocephalus hookeri (C.B. Clarke) Höeck. **J Ethnopharmacol**, v. 25, p. 510-4, 2009.
- ZHANG, Y. et al. Regulation of interleukin-10 gene expression in macrophages engulfing apoptotic cells. **J Interferon Cytokine Res**, v. 30, p.113-122, 2010.