



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE
SANTANA
PROGRAMA DE PÓS – GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA**



BRUNO CERQUEIRA DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DE
Gymneia platanifolia (LAMIACEAE) E CUMARINAS
ISOLADAS DE *Polygala boliviensis* (POLYGALACEAE)
EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE DOR**

Feira de Santana, BA
2024

BRUNO CERQUEIRA DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DE
Gymneia platanifolia (LAMIACEAE) E CUMARINAS
ISOLADAS DE *Polygala boliviensis* (POLYGALACEAE)
EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE DOR**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Flávia Oliveira de Lima Gomes
Co-orientadora: Prof^a Dr.^a Angélica Maria Lucchese

Feira de Santana, BA
2024

Ficha catalográfica - Biblioteca Central Julieta Carteadó - UEFS

Silva, Bruno Cerqueira da
S578a Avaliação da atividade antinociceptiva de *Gymneia platanifolia* (Lamiaceae) e Cumarinas isoladas da *Polygala boliviensis* (Polygalaceae) em modelos experimentais de dor / Bruno Cerqueira da Silva. - 2024.
126f.: il.

Orientadora: Flávia Oliveira de Lima Gomes
Coorientadora: Angélica Maria Lucchese

Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Feira de Santana.
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2024.

1. Dor. 2. Antinocicepção. 3. *Gymneia platanifolia*. 4. *Polygala boliviensis*. I. Gomes, Flávia Oliveira de Lima, orient. II. Lucchese, Angélica Maria, coorient. III. Universidade Estadual de Feira de Santana. IV. Título.

CDU: 582.929.4:616.8-009.7

BRUNO CERQUEIRA DA SILVA

“Avaliação da atividade antinociceptiva do extrato metanólico e do óleo essencial da *Gymneia platanifolia* e cumarinas isoladas da *Polygala boliviensis* em modelos experimentais de dor”

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Feira de Santana, área de concentração em Biotecnologia com ênfase em Recursos Naturais da Região Nordeste, como requisito para obtenção do grau de doutor, tendo sido aprovada pelos membros signatários abaixo.

Feira de Santana, Bahia, 19 de julho de 2024.

Documento assinado digitalmente
 **FLAVIA OLIVEIRA DE LIMA GOMES**
Data: 19/07/2024 18:46:41-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Orientadora: Prof^a. Dr^a. **Flávia Oliveira de Lima Gomes**

Universidade Estadual de Feira de Santana

Documento assinado digitalmente
 **EMMANOEL VILACA COSTA**
Data: 19/07/2024 15:21:01-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Membro: Prof. Dr. **Emmanoel Vilaça Costa**

Universidade Federal do Amazonas

Documento assinado digitalmente
 **SAMUEL SILVA DA ROCHA PITA**
Data: 19/07/2024 16:43:35-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Membro: Prof. Dr. **Samuel Silva da Rocha Pita**

Universidade Federal da Bahia

Documento assinado digitalmente
 **CLAYTON QUEIROZ ALVES**
Data: 19/07/2024 17:05:16-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Membro: Prof. Dr. **Clayton Queiroz Alves**

Universidade Estadual de Feira de Santana

Documento assinado digitalmente
 **ANIBAL DE FREITAS SANTOS JÚNIOR**
Data: 19/07/2024 15:50:58-0300
Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

Membro: Prof. Dr. **Aníbal de Freitas Santos Júnior**

Universidade do Estado da Bahia

Dedico à Deus, por sempre guiar meus passos. “Dirige os meus passos nos teus caminhos, para que as minhas pegadas não vacilem” (Salmos 17:5).

AGRADECIMENTOS

Sou grato à **Deus** por todas as coisas que Ele fez, faz e fará na minha vida.

Agradeço em especial à algumas pessoas que contribuíram direto e/ou indiretamente na construção desta trajetória durante a pós-graduação.

À minha querida esposa, **Élida Rocha**, que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos deste trabalho.

Aos meus pais, pelas palavras de incentivo.

Aos colaboradores deste trabalho, Prof.^a Dr.^a **Angélica Lucchese**, Prof. Dr. **Manoelito Coelho** e discente **Larissa Oliveira**, Prof.^a Dr.^a **Danielle Figuerêdo**, obrigado pela colaboração nesta tese.

À Prof.^a Dr.^a **Flávia Lima**, pela orientação deste trabalho.

Aos funcionários do Biotério da UEFS pela colaboração na pesquisa.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

LISTA DE SIGLAS

AURA	Aurapteno
CCK-8	Colecistocinina 8
COX-1	Ciclooxigenase1
COX-2	Ciclooxigenase2
Dexa	Dexametasona
EMGP	Extrato metanólico obtido da <i>Gymneia platanifolia</i>
ERK1/2	MAP quinase ERK2
ET-1	Endotelina-1
GABA	Ácido gama-aminobutírico
IFN- γ	Interferon-gama
IL-1 β	Interleucina-1 beta
IL-6	Interleucina-6
IL-8	Interleucina-8
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
IL-17	Interleucina-17
i.p	Intraperitoneal
JNK1	c-Jun N-Terminal Protein Kinase 1
Kg	Quilograma
MPO	Mieloperoxidase
mg	Miligramas
Mor	Morfina
NF- κ B	NF-kappaB
OEGP	Óleo essencial obtido da <i>Gymneia platanifolia</i>

OMS	Organização Mundial da Saúde
PAF	Fator Ativador de Plaquetas
POLI	Poligaleno
PGs	Prostaglandinas
s.c.	Subcutânea
E.P.M.	Erro padrão da média
TNF- α	Fator de necrose tumoral
TRPV1	Receptor de potencial transitório vaniloide 1
VIP	Peptídeo intestinal vasoativo
v.o	Via oral
Zim	Zimosan

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

Tabela 1: Rendimento do extrato metanólico bruto das folhas, caules e flores de <i>G. platanifolia</i>	52
Tabela 2: Rendimento do óleo essencial extraído das folhas, caules e flores de <i>G. platanifolia</i>	52
Tabela 3: Composição química dos óleos essenciais obtidos da parte aérea de <i>G. platanifolia</i>	54

CAPÍTULO 2

Tabela 1: Valores de energia do acoplamento molecular do poligaleno e do aurapteno com os alvos.....	91
--	----

LISTA DE FIGURAS

REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1: Diferentes tipos de neurônios sensoriais primários, responsáveis pela condução do sinal nociceptivo da periferia ao SNC.....	19
Figura 2: Estrutura química da digitoxina.....	27
Figura 3: Estrutura química da digoxina.....	27
Figura 4: Estrutura química da morfina.....	27
Figura 5: estrutura química do α -farneseno.....	29
Figura 6: estrutura química do γ -bisabolenos.....	29

CAPÍTULO 1

Figura 1 – Efeito do tratamento com OEGP (painel A) e EMGP (painel B) nas contorções abdominais induzidas por ácido acético.....	56
Figura 2 - Efeito do tratamento com OEGP (painéis A e B) e EMGP (painéis C e D) no teste da formalina.....	58
Figura 3 - Efeito do tratamento com OEGP (painel A) e EMGP (painel B) no teste da placa quente.....	60
Figura 4 - Efeito do tratamento com óleo essencial (painel A) e extrato metanólico (painel B) de <i>G. platanifolia</i> na hipernocicepção articular induzida por zimosan.....	62
Figura 5 – Efeito do tratamento com OEGP (painel A) e EMGP (painel B) no teste de campo aberto.....	64
Figura 6 – Efeito do tratamento com OEGP (painel A) e EMGP (painel B) no teste rota-rod.....	66

CAPÍTULO 2

Figura 1. Estrutura química do aurapteno isolado de <i>Polygala boliviensis</i>	78
Figura 2: Estrutura química do poligaleno isolado de <i>Polygala boliviensis</i>	78
Figura 3 – Os painéis A e B representam o efeito da administração de poligaleno (POLI) e aurapteno isolados de <i>P. boliviensis</i> nas contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos.....	80

Figura 4 - Efeito do tratamento com poligaleno (painéis A e B) e aurapteno (painéis C e D) obtidos de <i>P. boliviensis</i> na nocicepção induzida pela formalina.....	82
Figura 5 - Efeito do tratamento com poligaleno (painel A) e aurapteno (painel B) obtidos de <i>P. boliviensis</i> no teste da placa quente em camundongos.....	84
Figura 6 - Efeito da administração oral de poligaleno (POLI) e aurapteno (AURA) isolados de <i>P. boliviensis</i> na hipernocicepção articular induzida por zimosan.....	85
Figura 7 – Efeito da administração oral de poligaleno (painel A) e aurapteno (painel B) isolados de <i>P. boliviensis</i> no teste de campo aberto em camundongos.....	86
Figura 8 – Efeito da administração oral de poligaleno (painel A) e aurapteno (painel B) isolados de <i>P. boliviensis</i> no teste rota-rod em camundongos.....	87
Figura 9. Representação de alvos complexados com seus respectivos ligantes cristalográficos: COX-1, PDB: 2AYL (a); COX-2, PDB: 4PH9 (b); MPO, PDB: 4C1M (c); JNK1, PDB: 3ELJ (d); NF-κB, PDB: 4G3F (e) e ERK1/2, PDB: 5LCJ (f).....	90
Figura 10 - Representação da estrutura de COX-1 (PDB: 2AYL) no complexo com POLI (a) e AURA (b).....	93
Figura 11 - Representação da estrutura de COX-2 (PDB: 4PH9) no complexo com POLI (a) e AURA (b).....	95
Figura 12 - Representação da estrutura de MPO (PDB: 4C1M) no complexo com POLI (a) e AURA (b).....	97
Figura 13 - Representação da estrutura de JNK1 (PDB: 3ELJ) no complexo com POLI (a) e AURA (b).....	99
Figura 14 - Representação da estrutura do NF-κB (PDB: 4G3F) com ênfase no sítio ativo.....	101
Figura 15 - Representação da estrutura de ERK1/2 (PDB: 5LCJ) no complexo com POLI (a) e AURA (b).....	103

RESUMO

O objetivo deste estudo foi caracterizar e avaliar a atividade antinociceptiva do extrato metanólico (EMGP) e do óleo essencial (OEGP) obtidos da *Gymneia platanifolia* (folhas, caule e flores). Este estudo também avaliou a atividade antinociceptiva e predições *in silico* de dois compostos isolados da *Polygala boliviensis*, poligaleno (POLI) e aurapteno (AURA). O OEGP foi obtido por hidrodestilação durante 3h, sendo detectados 22 compostos, constituídos principalmente por espatulenol (31%) e óxido de cariofileno (10%). O EMGP foi obtido por maceração com metanol. Em testes *in vivo*, OEGP, EMGP, POLI e AURA, foram administrados em camundongos, mostrando ação contra a hipernocicepção (contorções abdominais induzidas por ácido acético, formalina e artrite induzida por zimosan). No entanto, os tratamentos não alteraram o limiar de resposta ao estímulo térmico no teste de placa quente, indicando ausência de ação central. Foram realizadas rotinas de acoplamento molecular com as enzimas ciclooxygenase 1 e 2 (COX-1 e COX-2), mieloperoxidase (MPO), c-Jun N-Terminal Protein Kinase 1 (JNK1), NF-kappaB (NF-κB) e MAP quinase ERK2 (ERK2) para avaliar o padrão de interações intermoleculares com POLI e AURA. O acoplamento mostrou que os compostos indicam uma relevância de interações hidrofóbicas, ligações de hidrogênio e pontes salinas, importantes para o reconhecimento molecular no sítio ativo das enzimas. Nossos resultados demonstram importante atividade antinociceptiva do EMGP, OEGP, POLI e AURA em modelos animais de dor, possivelmente envolvendo vias periféricas da cascata inflamatória. A técnica de acoplamento molecular identificou afinidade de POLI e AURA para COX-1, COX-2, MPO, JNK1, NF-κB e ERK2.

Palavras-chave: Dor. Antinocicepção. *Gymneia platanifolia*. *Polygala boliviensis*.

ABSTRACT

The objective of this study was to characterize and evaluate the antinociceptive activity of the methanolic extract (EMGP) and essential oil (OEGP) obtained from *Gymneia platanifolia* (leaves, stem and flowers). This study also evaluated the antinociceptive activity and *in silico* predictions of two compounds isolated from *Polygala boliviensis*, polygalene (POLI) and auraptene (AURA). OEGP was obtained by hydrodistillation for 3h, with 22 compounds detected, mainly consisting of spathulenol (31%) and caryophyllene oxide (10%). EMGP was obtained by maceration with methanol. In *in vivo* tests, OEGP, EMGP, POLI and AURA were administered to mice, showing action against hypernociception (abdominal contortions induced by acetic acid, formalin and arthritis induced by zymosan). However, the treatments did not change the response threshold to thermal stimulation in the hot plate test, indicating the absence of central action. Molecular docking routines were performed with the enzymes cyclooxygenase 1 and 2 (COX-1 and COX-2), myeloperoxidase (MPO), c-Jun N-Terminal Protein Kinase 1 (JNK1), NF-kappaB (NF-κB) and MAP kinase ERK2 (ERK2) to evaluate the pattern of intermolecular interactions with POLI and AURA. The docking showed that the compounds indicate a relevance of hydrophobic interactions, hydrogen bonds and salt bridges, important for molecular recognition in the active site of enzymes. Our results demonstrate important antinociceptive activity of EMGP, OEGP, POLI and AURA in animal models of pain, possibly involving peripheral pathways of the inflammatory cascade. The molecular docking technique identified affinity of POLI and AURA for COX-1, COX-2, MPO, JNK1, NF-κB and ERK2.

Keywords: Pain. Antinociception. *Gymneia platanifolia*. *Polygala boliviensis*.

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	12
REFERÊNCIAS	15
1. REFERENCIAL TEÓRICO	17
1.1 Dor	17
1.2 Dor inflamatória	21
1.3 Artrite Reumatoide	22
1.4 Potencial biotecnológico de plantas	25
1.5 Modelos <i>in silico</i> no planejamento de fármacos	30
REFERÊNCIAS	33
CAPÍTULO 1 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DA <i>Gymneia</i> <i>platanifolia</i>	40
RESUMO	43
1. INTRODUÇÃO	44
2. MATERIAIS E MÉTODOS	45
2.1 Material vegetal	45
2.2 Extração de óleo essencial	45
2.3 Análise da composição química do OEGP	46
2.4 Obtenção do extrato metanólico	46
2.5 Animais experimentais	47
2.6 Drogas e diluentes	47
2.7 Teste de contorção abdominal induzida por ácido acético	48
2.8 Teste de formalina	48
2.9 Teste de placa quente	48
2.10 Indução de modelo experimental de artrite induzida por zimosan	49
2.11 Avaliação nociceptiva articular	49
2.12 Teste do cilindro giratório (rota-rod)	50
2.13 Teste de campo aberto	51
2.14 Análise estatística	51
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
3.1 Rendimento do EMGP e OEGP	52
3.2 Caracterização química do OEGP	53
3.3 Teste de contorção abdominal induzida por ácido acético	55
3.4 Teste de formalina	57
3.5 Teste de placa quente	59
3.6 Avaliação nociceptiva articular	61

3.7	Teste de campo aberto	63
3.8	Teste de cilindro giratório (rota-rod)	65
4.	CONCLUSÃO	67
	REFERÊNCIAS	68
	CAPÍTULO 2 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DE CUMARINAS ISOLADAS DA <i>Polygala boliviensis</i>	72
	RESUMO	75
1.	INTRODUÇÃO	76
2.	RESULTADOS	78
2.1	Obtenção das Cumarinas	78
2.2	Efeito antinociceptivo no teste de contorção abdominal induzida por ácido acético	79
2.3	Efeito antinociceptivo no teste da formalina	81
2.4	Teste de placa quente	83
2.5	Efeito antinociceptivo na hipernocicepção articular induzida por zimosan	85
2.6	Teste de campo aberto	86
2.7	Rota-rod	87
2.8	Seleção e obtenção de estruturas cristalográficas para acoplamento molecular	88
2.9	Acoplamento molecular	91
2.9.1	COX-1	92
2.9.2	COX-2	94
2.9.3	MPO	96
2.9.4	JNK	98
2.9.5	NF- κ B	100
2.9.6	ERK2	102
3.	DISCUSSÃO	104
4.	MATERIAIS E MÉTODOS	111
4.1	Obtenção de cumarinas	111
4.2	Animais	111
4.3	Drogas e diluentes	112
4.4	Teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético	112
4.5	Teste de formalina	113
4.6	Teste de placa quente	113
4.7	Indução de modelo experimental de artrite induzida por zimosan	113
4.8	Avaliação nociceptiva articular	113
4.9	Teste de cilindro giratório (rota-rod)	114

4.10 Teste de campo aberto	115
4.11 Análise estatística	115
4.12 Estudos de acoplamento molecular	116
5. CONCLUSÃO	116
REFERÊNCIAS	118
ANEXO A – Declaração da comissão de ética no uso de animais (CEUA) da UEFS	125

INTRODUÇÃO GERAL

A dor pode ser classificada de diversas formas, incluindo aguda, crônica, visceral, inflamatória e neuropática (SERIZAWA et al., 2021; TAMBA; LEON; PETREUS, 2013). A origem da dor não se limita apenas a danos físicos, mas também é influenciada por uma série de fatores psicológicos (HANNIBAL; BISHOP, 2013), podendo também ter uma base genética significativa (ZORINA-LICHTENWALTER et al., 2016). A presença de dor é comum em muitas condições médicas na prática contemporânea, afetando, por exemplo, aproximadamente 25% dos cidadãos americanos diariamente. Estimativas populacionais de dor crônica entre adultos dos EUA, apontam que variam de 11% a 40% o número de cidadãos que possuem algum tipo de dor crônica, o que acarreta num enorme prejuízo social, econômico e de saúde pública (DAHLHAMER et al., 2018). Já no Brasil, estudos apontam que quase 37% dos brasileiros acima de 50 anos têm dores crônicas. Desses, 30% usam opioides para aliviar o problema (BRASIL, 2023). Com estatísticas tão alarmantes, a dor emergiu como um problema global de saúde pública e uma das principais causas de incapacidade em todo o mundo (BLANCHETTE et al., 2016). À medida que a expectativa de vida aumenta e as doenças crônicas se tornam mais prevalentes, espera-se um aumento anual na incidência de dor associada, especialmente entre os idosos, cujo tratamento também é mais complexo (NAVABI et al., 2021; SCURRAH et al., 2018). Diante deste cenário, é fundamental que a pesquisa se concentre no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos que sejam mais eficazes, tenham menos efeitos colaterais e custos mais acessíveis, visando melhorar a qualidade de vida da população (VIRGEN et al., 2022; COHEN; VASE; HOOTEN, 2021).

Historicamente, o uso de plantas com propriedades analgésicas sempre esteve presente na medicina tradicional desde a antiguidade, e seus estudos têm sido grandes aliados na descoberta de novas opções terapêuticas no combate à dor (MAHNASHI et al., 2021; FAROOQ et al., 2019). Apesar disto, diversas espécies ainda são desconhecidas quanto ao seu potencial farmacológico. Uma destas plantas é a *Gymnea platanifolia*, anteriormente conhecida como *Hyptis platanifolia* (Salzm. ex Benth), conhecida como uma espécie aromática endêmica do semiárido brasileiro (Bahia, Ceará, Maranhão,

Pernambuco, Piauí) perene com caule herbáceo ramificado, folhas pecioladas membranosas e flores em forma de corola tubular e branca. As análises fitoquímicas e fitofarmacológicas desta planta revelaram rendimento médio de 0,5% de óleo nas folhas, com atividade contra *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella choleraesuis* e *Candida albicans*, tendo α -farneseno e γ -bisabolene como principais constituintes (SILVA et al., 2005; LUCCHESE et al., 2006). Algumas atividades biológicas já foram identificadas com o extrato metanólico e óleo essencial desta espécie. Ambos apresentaram atividade antibacteriana contra a bactéria *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* e *Ralstonia solanacearum* e atividade antifúngica frente aos fitopatógenos *Aspergillus niger*, *Cladosporium herbarum*, *Lasioidiplodia theobromae* e *Rhizopus* sp (SANTOS, 2016).

Ainda neste contexto, espécies vegetais pertencentes ao gênero *Polygala* L. (Polygalaceae) também têm sido alvo de considerável interesse devido às suas propriedades farmacológicas, que incluem ação expectorante, sedativa, antipsicótica, antifúngica e analgésica. Além disso, estudos fitoquímicos indicam a presença de uma variedade de classes de metabólitos secundários, que provavelmente exibem atividades biológicas significativas (LAPA, 2006). Pesquisas anteriores documentaram a ocorrência de diversas classes de metabólitos secundários e suas atividades biológicas em espécies de *Polygala* (ZENG et al., 2022; WANG et al., 2022; ÜNLÜ et al., 2022). *Polygala boliviensis* A. W. Benn, comumente chamada de “arrozinho”, é uma planta herbácea de pequeno porte, atingindo entre 18 e 35 centímetros de altura, encontrada na Bolívia e no Brasil (COELHO; AGRA; BARACHO, 2008). No contexto da medicina popular, esta planta é utilizada como diurético, expectorante, no combate à blenorragia e no tratamento de picadas de cobra. Além desses usos medicinais, há registros que indicam suas propriedades antibacterianas e a capacidade de inibir a formação de biofilmes (TRENTIN DDA et al., 2011). Alguns estudos já demonstraram importantes atividades biológicas de *P. boliviensis*. Rocha e colaboradores (2019) identificaram em seus estudos, pela primeira vez, as propriedades antinociceptivas e antiedematogênicas de *P. boliviensis*. Ainda nesse sentido, Silva (2016) isolou o poligaleno a partir do extrato clorofórmico das partes aéreas de *P. boliviensis*. Verificou-se que o

poligaleno possui efeitos imunomoduladores, reduzindo os níveis de IL-6 e TNF após estimulação com LPS em macrófagos peritoneais (SILVA et al., 2016).

Diante desses dados, o presente estudo objetivou avaliar e caracterizar a atividade antinociceptiva do extrato metanólico e do óleo essencial obtidos da *G. platanifolia* (folhas, caule e flores), e, avaliar a atividade antinociceptiva e *in silico* de dois compostos isolados da *P. boliviensis*, poligaleno e aurapteno. A tese está dividida em três seções: a primeira descreve uma revisão bibliográfica dos aspectos gerais da dor e inflamação encontrados na literatura, a segunda descreve a coleta e obtenção do extrato metanólico e óleo essencial, a caracterização do óleo essencial, e por fim, fornece evidências que o tratamento por via oral com o extrato metanólico ou com o óleo essencial obtidos da *G. platanifolia* apresenta redução na hipernocicepção induzida nos testes. A última seção, aborda a avaliação da atividade antinociceptiva das moléculas isolados da *P. boliviensis*, poligaleno e aurapteno, demonstrando que o tratamento com ambos os compostos mostra redução na hipernocicepção induzida, além de apresentarem interações moleculares importantes nas rotinas de acoplamento molecular realizadas com alvos farmacológicos da inflamação e dor.

REFERÊNCIAS

BLANCHETTE, M. A. et al. Effectiveness and Economic Evaluation of Chiropractic Care for the Treatment of Low Back Pain: A Systematic Review of Pragmatic Studies. *PLoS One*, v. 3, 2016.

BRASIL. *Estudo Longitudinal da Saúde dos Idosos*. Ministério da Saúde, FIOCRUZ. Disponível em: <<https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/noticias/2023/dezembro/pesquisa-aponta-que-quase-37-dos-brasileiros-acima-de-50-anos-tem-dores-cronicas#:~:text=Pesquisa%20aponta%20que%20quase%2037,dores%20cr%C3%B4nicas%20%E2%80%94%20Minist%C3%A9rio%20da%20Sa%C3%ADe>>. Acesso em 15 abr. 2024.

CARNEIRO DA ROCHA, J. L. et al. Evaluation of Biological Activity of *Polygala boliviensis* in Experimental Models. *Iran. J. Pharm. Res*, v. 18, 2019.

COELHO, V. P. M.; AGRA, M. F.; BARACHO, G. S. Flora da Paraíba, Brasil: *Polygala* L. (Polygalaceae). *Acta Bot. Bras.*, v. 22, 2008, p. 225-39.

COHEN, S. P.; VASE, L.; HOOTEN, W. M. Chronic pain: an update on burden, best practices, and new advances. *Lancet*, v. 29, 2021.

DAHLHAMER, J. et al. Prevalence of Chronic Pain and High-Impact Chronic Pain Among Adults - United States, 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, v. 67, n. 36, 2018, p. 1001-1006.

FAROOQ, U. et al. Isolation of dihydrobenzofuran derivatives from ethnomedicinal species *Polygonum barbatum* as anticancer compounds. *Biol. Res*, v. 75, 2019.

HANNIBAL, K. E.; BISHOP, M. D. Chronic stress, cortisol dysfunction, and pain: a psychoneuroendocrine rationale for stress management in pain rehabilitation. *Phys Ther*, v. 94, 2014.

LAPA, F. R. *Evaluation of the Antinociceptive, Anti-inflammatory and Gastric Protective Activity of the Crude Hydroalcoholic Extract of Polygala paniculata L.* 2006. 120 f. Dissertation (Master's in Pharmacology) - Department of Pharmacology of the Biological Sciences Sector, Federal University of Paraná, Curitiba.

LUCHESI, A.M. et al. Comparação da atividade antimicrobiana de óleos essenciais extraídos de espécies do semi-árido baiano. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 29., 2006, Águas de Lindóia. Anais... Águas de Lindóia: Sociedade Brasileira de Química, 2006. p. 285.

MAHNASHI, M. H. et al. Cytotoxicity, anti-angiogenic, anti-tumor and molecular docking studies on phytochemicals isolated from *Polygonum hydropiper* L. *BMC Complement Med Ther*, v. 24, 2021.

- NAVIABI, N. et al. Evaluation of Self-medication for Management of Odontogenic Pain in Iranian Patients. *Oral Health Prev. Dent*, v. 7, 2021.
- SCURRAH, A. et al. Regional nerve blockade for early analgesic management of elderly patients with hip fracture - a narrative review. *Anaesthesia*, v. 73, 2018.
- SERIZAWA, K. et al. Interleukin-6: evolving role in the management of neuropathic pain in neuroimmunological disorders. *Inflamm. Regen*, v. 2, 2021.
- SILVA, A.B.L.; DIAS, K.S.; MARQUES, M.S.; LUCHESE, A.M. et al. Óleos essenciais do gênero *Hyptis* da região do semi-árido da Bahia. In: SIMPÓSIO BRASILEIRO DE ÓLEOS ESSENCIAIS, 3., 2005, Campinas. Livro de Resumos do III Simpósio Brasileiro de Óleos Essenciais. Campinas: Instituto Agrônomo de Campinas, 2005. p. 118.
- SILVA, D. F. et al. Poligalen, a new coumarin from *Polygala boliviensis*, reduces the release of TNF and IL-6 independent of NF-κB downregulation. *Fitoterapia*, v. 113, 2016.
- TAMBA, B. I. et al. Common trace elements alleviate pain in an experimental mouse model. *J. Neurosci. Res*, v. 91, 2013.
- TRENTIN, D. S. et al. Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. *J. Ethnopharmacol*, v. 137, 2011.
- ÜNLÜ, A. et al. Isolation, Characterization and *In Silico* Studies of Secondary Metabolites from the Whole Plant of *Polygala inexpectata* Peşmen & Erik. *Molecules*, v. 27, 2022.
- VIRGEN, C. G. et al. Pharmacological management of cancer pain: Novel therapeutics. *Biomed. Pharmacother*, v. 156, 2022.
- WANG, M. et al. The extract of *Polygala fallax* Hemsl. slows the progression of diabetic nephropathy by targeting TLR4 anti-inflammation and MMP-2/9-mediated anti-fibrosis in vitro. *Phytomedicine*, v. 104, 2022.
- ZENG, Z. et al. Structural elucidation and anti-neuroinflammatory activity of *Polygala tenuifolia* polysaccharide. *Int. J. Biol. Macromol*, v. 31, 2022.
- ZORINA-LICHTENWALTER, K. et al. Genetic predictors of human chronic pain conditions. *Neuroscience*, v. 3, 2016.

1. REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 Dor

A dor é definida pela Associação Internacional para Estudo da Dor (IASP) como sendo uma “experiência sensorial e emocional desagradável associada a um dano tecidual real, potencial ou descrita tal como se o dano estivesse presente”. É uma sensação descrita como sendo uma experiência multidimensional na qual estão envolvidos diversos componentes em sua resposta: motivacionais, emocionais, sensitivo discriminativo, afetivos e cognitivos (WHO, 2012; RAJA et al., 2020). Embora incômoda e desagradável, a dor exerce função biológica para conservar a integridade da vida do indivíduo, contribuindo para a preservação da espécie. A dor propriamente dita, apresenta um caráter subjetivo caracterizado por sintomas físicos e psicológicos. Seu processamento envolve a ativação do córtex somatossensorial em áreas responsáveis pela cognição e pela emoção (CALABRÒ et al., 2021), sendo influenciada, por exemplo, pela ansiedade, depressão, expectativa e muitas outras variáveis psicológicas.

Dependendo do tipo de lesão, a dor ainda pode ser classificada como: nociceptiva, onde ocorre uma estimulação dos nociceptores; neuropática, onde há disfunção do nervo; neurogênica, situação em que ocorre uma lesão no nervo; psicogênica, onde os fatores psicológicos predominam sobre os fisiológicos; e dor inflamatória que está relacionada ao processo de sensibilização periférica (BESSON, 1999; SCHAIBLE, 2015).

O termo nocicepção consiste na real injúria tecidual ou em um evento potencialmente danoso transduzido e codificado por nociceptores em níveis espinhais e supra-espinhais (BERTOTTI et al., 2024). Células nociceptoras podem ser ativadas por diversos estímulos, tais como químicos, térmicos e mecânicos, contudo, essa estimulação pode ser reforçada ou sensibilizada por mediadores inflamatórios, como bradicinina, serotonina e prostaglandinas (LIU et al., 2024). Neste sentido, substâncias capazes de atuar bloqueando estas vias de sinalização, tanto em nível central ou até mesmo periférico, tornam-se ferramentas cruciais para o controle da dor (RAJAGOPAL et al., 2022). Portanto, a dor pode ser considerada uma experiência complexa, porque não envolve apenas a transdução do estímulo nociceptivo, mas existe também o

processamento cognitivo e emocional pelo encéfalo, responsável pelas diferentes respostas comportamentais à dor processadas pelo cérebro do indivíduo. (GOUDET; MARCHAND, 2022; FONG; SCHUG, 2014).

Mas de uma maneira geral, alguns pesquisadores caracterizam a dor como uma resposta orgânica protetora como citado anteriormente. Todavia, a dor possui a função de alertar o indivíduo para uma lesão iminente ou real dos tecidos, levando ao surgimento de respostas reflexas e comportamentais coordenadas com o intuito de manter o dano tecidual o mais controlado possível (MARCHON et al., 2024). Esse tipo de dor quando pontual é classificada como dor aguda (ASADAUSKAS et al., 2024). Mas, quando a dor persiste por um período prolongado, deixa de apresentar vantagens biológicas e passa a causar sofrimento ao organismo. Este tipo de dor é classificada como dor crônica, a qual é gerada por impulsos de baixa magnitude produzidos por atividade neural anormal (BABOS et al., 2013; ANWAR, 2016).

Os nociceptores apresentam um limiar de ativação maior do que outros receptores sensoriais e respondem progressivamente, de acordo com a intensidade do estímulo (PENG, 2019). Eles podem ser encontrados em toda a superfície da pele, mucosa, membranas, tecidos conectivos de órgãos viscerais, ligamentos e articulações, músculos, tendões e vasos arteriais (BOURNE, 2014). Nociceptores são terminações nervosas livres de fibras mielínicas delgadas (fibras do tipo A δ ou do tipo III) e fibras nervosas amielínicas (fibras tipo C ou tipo IV). A presença de mielina aumenta a velocidade de condução do impulso nervoso. Portanto, fibras A δ são responsáveis pela condução da assim chamada “primeira dor ou dor rápida” que se caracteriza por ser rápida, aguda e pontual. Enquanto as fibras tipo C transmitem a “segunda dor ou dor lenta”, sendo esta atrasada, difusa e fraca, respondendo a uma ampla variedade de estímulos (mecânicos, químicos, térmicos e isquêmicos) (CHANG, 2024; SOUZA et al., 2020).

Outros tipos de nociceptores têm sido postulados para sinalizar estímulos mecânicos nocivos, incluindo os canais iônicos sensíveis ao ácido (ASICs), TRPV1 (Receptor vanilóide transitório tipo 1) e canais de potássio (WOOLF, 2007). As fibras tipo C são nociceptores polimodais, pois respondem a estímulos térmicos, químicos e mecânicos. Elas são responsáveis por induzir as manifestações da dor crônica, enquanto as fibras tipo A δ são responsáveis por

promover a sensação durante a dor aguda e respondem a estímulos mecânicos fortes, podem responder a estímulos térmicos e químicos desde que tenham sido previamente sensibilizados (JULIUS; BASBAUM, 2001).

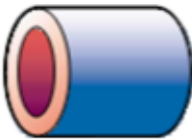
Tipos de fibras	A α e A β	A δ I e II	C
			
Mielinização	Muita	Pouca	Ausente
Diâmetro (μ m)	10	2 – 6	0,4 – 1,2
Velocidade de condução (m/s)	30 – 100	1,2 – 30	0,5 – 2
Temperatura	Não reconhece	Tipo I > 53°C Tipo II > 43°C	> 43°C
Tipo de sinal	Propriocepção Toque leve	Térmico, mecânico e químico	Térmico,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

Figura 1: Diferentes tipos de neurônios sensoriais primários, responsáveis pela condução do sinal nociceptivo da periferia ao SNC.

Fonte: Adaptado de Julius e Basbaum (2001).

Para que seja realizada a interpretação da sensação dolorosa são necessárias três etapas fundamentais no processamento da dor: **transdução** que é a ativação dos nociceptores por transformação de um estímulo nocivo mecânico, térmico ou químico, em potencial de ação; **transmissão**, que é o conjunto de vias que permitem que o impulso nervoso, gerado no nociceptor, seja conduzido para o SNC com modulação no tálamo ou córtex cerebral; **modulação**, que são os mecanismos e vias responsáveis pela supressão ou simplificação da dor e que podem ser ativados pelas próprias vias nociceptivas (BALLOTTA et al., 2018).

Quando ocorre uma lesão tecidual, há uma resposta bioquímica caracterizada pela liberação e interação de mediadores químicos específicos nos locais afetados, os quais se ligam aos seus receptores correspondentes.

Esse processo desencadeia a transmissão do estímulo doloroso ao longo do sistema nervoso até atingir níveis centrais. Após a sensibilização dos nociceptores periféricos e a geração de potenciais de ação, diversos neurotransmissores são liberados no corno dorsal da medula espinhal. Entre esses neurotransmissores estão a substância P, o L-glutamato, o ácido gama-aminobutírico (GABA), o peptídeo intestinal vasoativo (VIP), a colecistocinina 8 (CCK-8), a somatostatina e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) (MATSUKA, 2021). Os neurônios de segunda ordem são, então, ativados pelos neurotransmissores e essa informação nociva na forma de potenciais de ação eleva-se para o tronco encefálico e o tálamo que, a seguir, transmitem a informação para o córtex, onde são processadas informações como intensidade e localização da dor e para o sistema límbico, onde os aspectos emocionais e afetivos são agregados na experiência da percepção da dor (CHENG et al., 2021). Chegando ao tálamo, o estímulo nocivo passa pelo processo de somatização, informando que existe uma sensação nociceptiva, enquanto no sistema límbico existe o componente emocional que discrimina o tipo de sensação (ROY et al., 2009).

1.2 Dor inflamatória

Na maioria das vezes, a dor inflamatória está presente em doenças crônicas ou até mesmo transitórias. A dor de origem inflamatória resulta basicamente da interação entre o tecido danificado e os neurônios sensoriais nociceptivos periféricos por meio da participação de mediadores inflamatórios. Ou seja, o fenômeno da dor inflamatória está relacionado ao processo de sensibilização periférica, em que, após uma lesão tecidual há a liberação de mediadores inflamatórios, responsáveis pela ativação direta ou pela sensibilização dos nociceptores (CUNHA et al., 2005).

Quando ocorre a instalação de um processo inflamatório, já se sabe que há uma liberação de diversos mediadores inflamatórios, como aminas vasoativas, óxido nítrico, citocinas, fatores de necrose tumoral, cininas e substância P, entre outros (ROCHA et al., 2007). Com a ativação da via do ácido araquidônico e assim o início da síntese de prostaglandinas pelas ciclooxigenases, modificações estruturais nas fibras aferentes primárias são observadas mediante a ativação de diversos segundos mensageiros, enzimas ou proteínas, provocando a redução significativa do limiar de ativação da fibra, caracterizando assim a sensibilização das vias nociceptivas resultando em uma maior excitabilidade do neurônio que, por fim, leva a ocorrência de sensações dolorosas (WANG; MULLALLY, 2020; SCHAIBLE; RICHTER, 2004).

Todo este fenômeno de sensibilização de vias nociceptivas, pode ainda ser caracterizado em duas categorias distintas denominadas alodinia e hiperalgesia (JENSEN, FINNERUP, 2014). A hiperalgesia refere-se às condições de sensibilidade dolorosa aumentada, ou seja, provocando a percepção do indivíduo sobre uma dor exagerada ou desproporcional ao estímulo nociceptivo empregado. Já alodinia provoca uma dor originada de uma estimulação que antes não causava dor, portanto, uma resposta dolorosa a um estímulo que antes não era capaz de provocar a ativação dos nociceptores (MIZUMURA, 1997; LOLIGNIER; EIJKELKAMP; WOOD, 2015).

O fato é que a indução de uma dor inflamatória no indivíduo é provocada pela liberação dos mediadores inflamatórios (histamina, bradicininas, serotonina, citocinas, quimiocinas e eicosanoides) que por sinal, atende à uma hierarquia temporal de liberação e de ação. Por exemplo, se forem feitas análises do

exsudato inflamatório em uma fase tardia de um processo inflamatório agudo é possível identificar uma série destes mediadores, tanto finais quanto intermediários. Todavia, caso seja realizada uma análise minuciosa desse mesmo exsudato, durante uma sequência de tempos em tempos definida no processo inflamatório, nota-se uma sequência acentuada desta liberação.

Por este motivo, pode-se bloquear uma cascata de fenômenos no processo inflamatório por meio da inativação ou bloqueio de determinados alvos participativos de todo este conjunto de eventos, reduzindo assim o processo inflamatório e consequentemente a dor (CUNHA et al., 1992, FERREIRA et al., 1993; YANG et al., 2021; SACHS et al., 2002; YOST, BROWNE, LUCKI, 2022).

1.3 Artrite Reumatoide

A Artrite Reumatoide (AR) é uma doença autoimune com caráter inflamatório, de etiologia desconhecida, caracterizada por poliartrite periférica e simétrica. Além disso, ocasiona uma série de complicações clínicas e problemas associados como o cansaço, a perda excessiva de peso e a rigidez matinal, podendo também desenvolver-se em outros órgãos e causar danos maiores ao seu portador, ocasionando a diminuição da expectativa de vida (SMOLEN; ALETAHA; MCINNIS; 2016).

Geralmente, a artrite é caracterizada por dor e rigidez em torno de uma ou mais articulações, originando-se de forma gradual ou de repente. Estima-se que 21,2% (18,7% com idade padronizada) dos adultos norte-americanos com idade ≥ 18 anos (53,2 milhões) tiveram artrite diagnosticada durante o período de 2019-2021 (FALLON et al., 2023). As prevalências de artrite padronizadas por idade foram maiores entre mulheres (20,9%) do que entre homens (16,3%). Adultos com idade ≥ 45 anos representam 88,3% de todos os adultos dos EUA com artrite (FALLON et al., 2023). A prevalência estimada de AR na população mundial é de 0,5 a 1,0%, e a incidência é maior na faixa etária dos 30 aos 50 anos (FINCKH et al., 2022). Além disso, sabe-se que a AR é mais prevalente em mulheres numa proporção estimada de 3:1 em relação aos homens, acomete diversos grupos populacionais e ocorre em todas as etnias. Geralmente os primeiros sintomas aparecem depois dos 40 anos, no entanto, nas mulheres

esses sintomas podem aparecer mais precocemente (VENETSANOPOULOU et al., 2022; ALMUTAIRI et al., 2021)

A articulação é uma estrutura recoberta pela cartilagem articular, ligamentos e pela membrana sinovial que delimita a cavidade preenchida pelo líquido sinovial. Essa membrana é constituída por sinoviócitos do tipo A, macrófagos sinoviais, e do tipo B, fibroblastos sinoviais, vasos sanguíneos e nervos sensoriais, enquanto a cartilagem articular é composta por uma matriz extracelular (colágeno, proteoglicanos e ácido hialurônico) e pelos condrócitos (FAZAL et al., 2018).

Pelo fato de a AR apresentar uma origem multifatorial, os mecanismos envolvidos no desenvolvimento dessa doença ainda são muito estudados. São consideradas as participações de fatores hormonais, ambientais e principalmente imunológicos que atuam em conjunto sobre indivíduos geneticamente suscetíveis, com manifestações ocasionadas a partir de diversos mecanismos inflamatórios (LERMAN et al., 2023).

Acredita-se que a AR tem influências também de fatores genéticos, fato comprovado pela identificação de diversos genes relacionados com o desenvolvimento da AR, dando destaque ao sistema de histocompatibilidade humano (HLA: human leukocyte antigens) no loci DRB1. Estes genes codificam as moléculas de histocompatibilidade presentes na superfície das células apresentadoras de antígenos, além disso, estão associados ao desenvolvimento de formas mais graves da doença (DING; OROZCO, 2019; OKADA et al., 2019).

A fisiopatologia da AR apesar de complexa, parece ser iniciada quando o sistema imunológico adaptativo, tanto celular como humoral, reconhece antígenos que resultam em uma série de mecanismos inflamatórios efetadores distintos, incluindo o recrutamento de leucócitos (COATES, HELLIWELL, 2017; POURHABIBI-ZARANDI et al., 2024). O espaço sinovial normalmente é acelular, no entanto em pacientes com AR, o espaço fica infiltrado de células inflamatórias (macrófagos, linfócitos e neutrófilos) que liberam citocinas, sendo estas as principais responsáveis pela continuidade da resposta imune nessa condição (MANTOVANI; GARLANDA, 2023; DI CONZA; HO, 2020). Uma articulação inflamada apresenta hiperplasia da sinóvia, aumento do fluido sinovial, grandes infiltrados celulares (neutrófilos, macrófagos, fibroblastos, células T, células B e

células dendríticas), levando a uma erosão e remodelamento do osso e da cartilagem da articulação (ALETAHA, SMOLEN, 2018).

Quando há um processo inflamatório, a expressão gênica para a produção de citocinas é aumentada, e consequentemente há um aumento das mais variadas citocinas como por exemplo IL-17, TNF e IFN- γ , IL-1 β , IL-6, IL-8 e IL-12 gerando à iniciação e amplificação da resposta inflamatória. As citocinas são peptídeos regulatórios que são produzidos potencialmente por todas as células, e somente algumas delas são constitutivamente expressas, como fator de necrose tumoral (TNF- α) em mastócitos (ALETAHA, SMOLEN, 2018), e esses mediadores têm uma atuação crucial na ativação das células sinoviais que resultam em inflamação e destruição óssea observada na artrite.

As citocinas provenientes de macrófagos e fibroblastos apresentam-se em grandes quantidades na membrana sinovial, onde se observa um predomínio da atividade das células Th1 e uma baixa atividade de células Th2. Portanto, na artrite ocorre um desequilíbrio na regulação da amplitude e duração da inflamação, as citocinas pró-inflamatórias predominam, onde TNF- α , IL-1 β e IL-6 apresentam maior destaque. No entanto, mesmo com esse predomínio de citocinas pró-inflamatórias também se observa a presença de mediadores anti-inflamatórios como a IL-10, mas em níveis insuficientes para suprimir a inflamação (CHOY, 2012; ACHUTHAN et al., 2018).

Uma outra hipótese que poderia explicar a iniciação da AR seria a presença de um agente infeccioso ou outro tipo de exposição ambiental. Isto resultaria na ativação de mecanismos locais de imunidade inata no microambiente articular, ativando células do revestimento sinovial e resultando uma subsequente resposta celular adaptativa em indivíduos suscetíveis geneticamente, ocasionando a sinovite. Projeções de tecido proliferativo penetram na cavidade articular, invadindo a cartilagem e o tecido ósseo, formando o *pannus*, característico da AR (VOGELPOEL et al., 2015).

Em consequência à exposição inicial (como um agente infeccioso, por exemplo), há um influxo de macrófagos e o aumento na proliferação de sinoviócitos, ocasionando uma hiperplasia da membrana sinovial; o tecido é então infiltrado por células mononucleares, em especial linfócitos T auxiliares e linfócitos B, podendo haver a formação de estruturas semelhantes a nódulos

linfáticos, com a participação de macrófagos e células dendríticas, em aproximadamente um quinto dos pacientes (SWEENEY e FIRESTEIN, 2004).

Ainda assim, ocorre a ativação de mecanismos pró-inflamatórios mediados por citocinas. As células T que se acumulam na membrana sinovial produzem IL-17 e interferon gama (IFN γ) de maneira exacerbada, enquanto os sinoviócitos A e B sintetizam citocinas como IL-1, TNF- α (envolvido na regulação de outras citocinas, recrutamento celular, angiogênese e destruição tecidual) e IL-8. A ativação de todos esses eventos possibilita a progressão e perpetuação da inflamação sinovial, já que haverá estímulo à proliferação de sinoviócitos e produção contínua de outras citocinas e enzimas que levam a efeitos que vão desde o influxo de outros macrófagos até mesmo a destruição articular, conservando um mecanismo de retroalimentação positiva de sinoviócitos e macrófagos recrutados colaborando para a progressão da doença (SWEENEY e FIRESTEIN, 2004).

1.4 Potencial biotecnológico de plantas

O Brasil ocupa quase metade da América do Sul e é o país com a maior diversidade de espécies no mundo, espalhadas nos seis biomas terrestres e nos três grandes ecossistemas marinhos. São mais de 103.870 espécies animais e 43.020 espécies vegetais conhecidas no país. Suas diferentes zonas climáticas favorecem a formação de zonas biogeográficas (biomas), tais como: Amazônia, Cerrado, Pantanal, Mata Atlântica, Caatinga, Campos Sulinos e o bioma Costeiro. Em sua biodiversidade, encontra-se inúmeras plantas com propriedades medicinais, que ao longo do tempo vem sendo utilizadas no uso da melhoria da saúde (DUTRA et al., 2016; SANTOS et al., 2017).

Todavia, plantas sempre foram muito analisadas como potenciais fontes de moléculas com interesse biotecnológico. A possibilidade de aplicação desses compostos na saúde humana, assim como em outras áreas, tem proporcionado a intensos estudos ligados a extração, caracterização e respectiva atividade biológica (SEM; SAMANTA, 2015) Segundo estimativas da Organização Mundial da Saúde (OMS), de 65 a 80% da população mundial usa plantas medicinais nos cuidados básicos ou como recurso terapêutico, uma tendência crescente inclusive nos países desenvolvidos (CALIXTO, 2000; OSMAN, 2019).

A utilização dessas plantas medicinais na fabricação de fármacos, tem recebido incentivos da Organização Mundial de Saúde (OMS). Na década de 1991, a OMS enfatizou a relevante contribuição da medicina tradicional para o fornecimento de cuidados de saúde, especialmente para pessoas com acesso limitado aos sistemas de saúde convencionais. A OMS recomendou aos países membros que aumentassem a colaboração entre os praticantes da medicina tradicional e os profissionais da saúde moderna, com foco particular no uso de remédios tradicionais com eficácia cientificamente comprovada. Isso visava reduzir os custos com medicamentos. (BRASIL, 2019).

Dessa forma, reiterou a importância do cultivo e conservação das plantas medicinais nos cuidados com a saúde, além de reforçar o compromisso em estimular um maior desenvolvimento de políticas públicas com a finalidade de inseri-las no sistema oficial de saúde.

Portanto, plantas medicinais se caracterizam como importantes aliadas para a pesquisa farmacológica e o desenvolvimento de drogas, não somente quando seus constituintes são usados diretamente como agentes terapêuticos, mas também como matérias-primas para a síntese, ou modelos para compostos farmacologicamente ativos (BRASIL, 2019).

Diversas substâncias isoladas de plantas continuam sendo fontes de medicamentos. Por exemplo, os glicosídeos cardiotônicos obtidos da *Digitalis*, usados para insuficiência cardíaca. Plantas que foram a origem da descoberta de medicamentos para o coração. Delas extrai-se glicosídeos cardiotônicos chamados cardenolídeos, sendo os mais utilizados a digitoxina e a digoxina (Figuras 2 e 3, respectivamente) (DOHERTY, 2018). Um outro grande exemplo é a *Papaver somniferum* L. (Papaveraceae), vulgarmente conhecida por papoula, planta usada para a extração do ópio, cujo componente majoritário é a morfina (Figura 4), princípio ativo empregado para combater a dor. Após um século, fora isolado dessa mesma planta, a codeína e mais tarde a papaverina (DEVEREAUX; MERCER; CUNNINGHAM, 2018).

A família botânica Lamiaceae é notável pela sua vasta diversidade, abarcando mais de 6.000 espécies com ampla aplicação nas áreas biológicas e médicas (BEKUT et al., 2018). Um gênero de particular relevância dentro dessa família é o *Hyptis*, cujas plantas exibem um metabolismo peculiar de alta variabilidade. Recentemente, uma revisão taxonômica da subtribo Hyptidinae, fundamentada em marcadores moleculares, resultou na redistribuição de grande parte das espécies desse gênero em onze novos gêneros: *Cantinoa* Harley & J.F.B. Pastore, *Condea* Adanson, *Cyanocephalus* (Pohl ex Benth.) Harley & J.F.B. Pastore, *Gymneia* (Benth.) Harley & J.F.B. Pastore, *Hyptidendron* Harley, *Leptohyptis* Harley e J.F.B. Pastore, *Martianthus* Harley e J.F.B. Pastore, *Medusantha* Harley e J.F.B. Pastore, *Oocephalus* (Benth.) Harley & J.F.B. Pastore, *Physominthe* Harley e J.F.B. Pastore e *Eplingiella* Harley & J.F.B. Pastore.

O gênero *Gymneia* é composto por pelo menos seis espécies: *Gymneia ampelophylla* (Epling) Harley & J.F.B. Pastore (sinônimo de *Hyptis ampelophylla* Epling), *Gymneia chapadensis* Harley, *Gymneia interrupta* (Pohl ex Benth.) Harley & J.F.B. Pastore (sinônimo de *Hyptis interrompe* Pohl ex Bentham), *Gymneia malacophylla* (Benth.) Harley & J.F.B. Pastore (sinônimo de *Hyptis malacophylla* Bentham), *Gymneia moniliformis* Harley, *Gymneia platanifolia* (Mart. ex Benth.) Harley & J.F.B. Pastore (sinônimo de *Hyptis platanifolia* Mart. Ex Bentham) e *Gymneia virgata* (Benth.) Harley & J.F.B. Pastore (sinônimo de *Hyptis virgata* Bentham) (HARLEY; PASTORE, 2012).

A espécie *Gymneia platanifolia*, previamente classificada como *Hyptis platanifolia* (Salzm. ex Benth), é uma planta aromática endêmica das regiões semiáridas do Brasil (Bahia, Ceará, Maranhão, Pernambuco, Piauí). Trata-se de uma planta perene com caule herbáceo ramificado, folhas membranosas pecioladas e flores em formato de corola tubular e branca. Existem poucos relatos na literatura sobre esta planta, mas análises fitoquímicas e fitofarmacológicas demonstraram que as folhas dessa planta possuem um rendimento médio de óleo de 0,5%, apresentando atividade contra *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella choleraesuis* e *Candida albicans*, com α -farneseno (Figura 5) e γ -bisaboleno (Figura 6) como seus principais constituintes (PRADO; PRADO, 2022). Outros estudos identificaram atividades biológicas do extrato metanólico e do óleo essencial desta espécie, incluindo

atividade antibacteriana contra *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* e *Ralstonia solanacearum*, bem como atividade antifúngica contra fitopatógenos como *Aspergillus niger*, *Cladosporium herbarum*, *Lasiodiplodia theobromae* e *Rhizopus* sp (SANTOS, 2016).

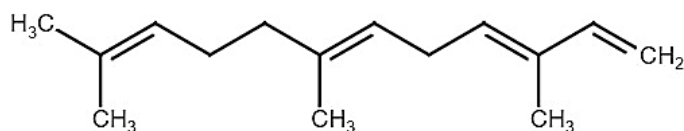


Figura 5: estrutura química do α -farneseno

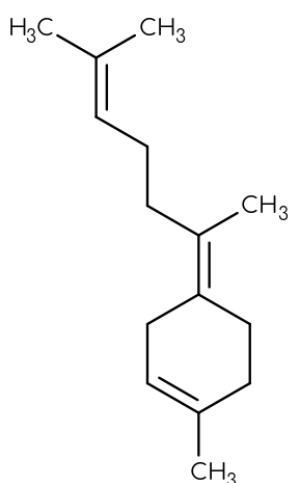


Figura 6: estrutura química do γ -bisaboleno

Já o gênero *Polygala* (Polygalaceae) tem despertado considerável interesse devido às suas propriedades farmacológicas, que englobam ação expectorante, sedativa, antipsicótica, antifúngica e analgésica. Essas características tornam este gênero alvo de investigação para o potencial desenvolvimento de novos produtos fitoterápicos. Além disso, estudos fitoquímicos revelaram a presença de uma diversidade de classes de metabólitos secundários, os quais provavelmente exibem atividades biológicas significativas

(LACAILLE-DUBOIS; DELAUDE; MITAINE-OFFER, 2020). Pesquisas anteriores documentaram a ocorrência de várias classes de metabólitos secundários e suas atividades biológicas em espécies de *Polygala* (ZENG et al., 2022; WANG et al., 2022; ÜNLÜ et al., 2022).

Polygala boliviensis A. W. Benn, comumente conhecida como "arrozinho", é uma planta herbácea de pequeno porte, que pode atingir entre 18 e 35 centímetros de altura, encontrada na Bolívia e no Brasil (COELHO, 2008). Na medicina popular, esta planta é utilizada como diurético, expectorante, no tratamento da blenorragia e em picadas de cobra. Além desses usos medicinais, há relatos que indicam suas propriedades antibacterianas e sua capacidade de inibir a formação de biofilmes (TRENTIN DDA et al., 2011). Estudos prévios identificaram importantes atividades biológicas de *Polygala boliviensis*. Rocha, em seus estudos, identificou pela primeira vez as propriedades antinociceptivas e antiedematogênicas desta espécie (ROCHA et al., 2019).

1.5 Modelos *in silico* no planejamento de fármacos

O planejamento de novas substâncias tem como principal objetivo a obtenção de compostos que possuam propriedades farmacoterapêuticas úteis, capazes de representarem novas entidades químicas, candidatas a protótipos de fármacos eficazes e seguros. Nas últimas décadas, é notável uma grande procura por substâncias farmacologicamente ativas e, mesmo que várias estruturas quimicamente bioativas tenham sido identificadas o crescente desenvolvimento tecnológico contemporâneo possibilita opções que apresentam melhores resultados na obtenção de novos princípios biologicamente ativos, sendo a Química Medicinal a responsável pelo desenvolvimento desses estudos (LUSARDI; SPALLAROSSA; BRULLO, 2024).

A química farmacêutica medicinal possui métodos eficientes para otimizar perfil farmacológico de substâncias, levando ao planejamento e síntese destas, cada vez mais ativas, com biodisponibilidade satisfatória, e metabolismo adequado ao seu emprego terapêutico. Estes métodos podem constituir de aproximação intuitiva, tais como síntese de análogos, isômeros e isósteros ou outros processos de modificação molecular, como a simplificação molecular, a

latenciação, modificação de sistemas anelares, entre outros (KOROLKOVAS, 1998; MONGE et al., 2000).

Diversos medicamentos disponíveis hoje ao alcance de todos, foram desenvolvidos através de estratégias da química medicinal. Nos últimos trinta anos, os avanços ligados às técnicas utilizadas nessa área da ciência têm exposto histórias de sucesso.

Um bom exemplo é a cimetidina, que foi o primeiro antagonista seletivo de receptores da histamina, subtipo 2. Este composto compete com a histamina pelo sítio ativo dos receptores das células gástricas, responsáveis pela produção de ácido clorídrico. A cimetidina foi também o protótipo de vários outros medicamentos utilizados para o tratamento de úlcera gástrica e duodenal, tais como ranitidina, famotidina, nizatidina e roxatidina (TOLOMEU, FRAGA, 2024). Os antirretrovirais do vírus da imunodeficiência humana (HIV), disponíveis no mercado, também foram desenhados através de técnicas racionais. A zidovudina (AZT), foi identificada a partir de algas marinhas (VANANGAMUDI et al. 2023). É largamente utilizado para o tratamento da imunodeficiência adquirida, geralmente combinado com outros medicamentos, e atua no nível da enzima transcriptase reversa do vírus.

Portanto, a modelagem molecular tem fundamental importância para a análise dos aspectos que regem as interações de fármacos com seus alvos. A regulação dos processos biológicos se dá principalmente através da combinação de fatores: estruturais, incluindo estrutura geométrica e estrutura eletrônica, energéticos, dinâmicos e cinéticos. Em se tratando da parte estrutural, os aspectos tridimensionais, que antes não eram considerados, agora trazem indícios do comportamento da substância no ambiente biológico. Trouxeram, principalmente, ampliação da visão sobre a conformação bioativa do ligante no momento da interação com a proteína alvo (OSELUSI, DUBE, ODUGBEMI et al., 2024).

Normalmente são utilizadas duas estratégias para a identificação ligantes a partir de métodos de triagem virtual. A primeira estratégia é baseada na estrutura tridimensional do alvo biológico, ou seja, através de um processo de reconhecimento molecular por complementaridade. A outra estratégia é fundamentada na estrutura dos ligantes, através de um processo de similaridade estrutural dos compostos biologicamente ativos (CETIN et al., 2022).

As técnicas baseadas na estrutura do receptor tornaram-se amplamente utilizadas com a chegada de amplas quantidades de informação de alvos biológicos provenientes de técnicas cristalográficas, que terão um papel principal no processo de desenvolvimento de fármacos (PEI; WANG; LIU, 2006). Portanto, a utilização de métodos de ensaios virtuais robustos, utilizando-se alvos moleculares bem definidos é muito importante para a identificação de novas moléculas bioativas (KONTOYIANNI, 2017).

A técnica de acoplamento molecular consiste em aplicar conhecimentos com a funcionalidade de se obter a melhor orientação e conformação de uma molécula ligante no seu sítio receptor (FORLI, 2015). O objetivo é encontrar o melhor ajuste para o encaixe entre duas moléculas (complexo receptor-ligante). De acordo com Montanari (2011), por este caminho pode-se obter informações espaciais para cada acoplamento realizado, possibilitando eleger a melhor molécula que representa as interações necessárias com o alvo, para um bom resultado desejado. Portanto, a modelagem molecular se resume em identificar possíveis moléculas bioativas, com aperfeiçoamento de perfis farmacocinéticos e farmacodinâmicos, e maximizar as probabilidades de se ligar a seu alvo biológico.

REFERÊNCIAS

- ACHUTHAN, A. et al. Cytokine-Induced Acute Inflammatory Monoarticular Arthritis. *Methods Mol. Biol*, v. 1784, p. 215-223, 2018.
- ALMUTAIRI, K. B. et al. The Prevalence of Rheumatoid Arthritis: A Systematic Review of Population-based Studies. *J. Rheumatol*, v. 48, n. 5, p. 669-676, 2021.
- ANWAR, K. Pathophysiology of pain. *Dis Mon*, v. 62, n. 9, p. 324-329, 2016.
- ASADAUSKAS, A. et al. Modern Approaches to the Treatment of Acute Facial Pain. *Curr. Pain Headache Rep*. 2024.
- BABOS, M. B. et al. Pathophysiology of pain. *Dis. Mon*, v. 59, n. 10, p. 330-358, 2013.
- BALLOTTA, D. et al. Modulation of neural circuits underlying temporal production by facial expressions of pain. *PLoS One*, v. 13, n. 2, e0193100, 2018.
- BEKUT, M. et al. Potential of selected Lamiaceae plants in anti(retro)viral therapy. *Pharmacol. Res*, v. 133, p. 301-314, 2018.
- BERTOTTI, G. et al. Hyperalgesia, Increased Temporal Summation and Impaired Inhibitory Mechanisms in Episodic and Chronic Cluster Headache: An Observational Study. *Biomedicines*, v. 12, n. 2, p. 374, 2024.
- BESSON, J. M. The neurobiology of pain. *Lancet*, v. 353, p. 1610-1615, 1999.
- BOURNE, S.; MACHADO, A. G.; NAGEL, S. J. Basic anatomy and physiology of pain pathways. *Neurosurg. Clin. N. Am*, v. 25, n. 4, p. 629-638, 2014.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. Política e Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. 2016. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/politica_programa_nacional_plantas_medicinais_fitoterapicos.pdf>. Acesso em: 15 jan. 2024.

- CALABRÒ, R. S. et al. Pain Perception in Disorders of Consciousness: A Scoping Review on Current Knowledge, Clinical Applications, and Future Perspective. *Brain. Sci*, v. 11, n. 5, p. 665, 2021.
- CETIN, Y. et al. Review on *In Silico* Methods, High-throughput Screening Techniques, and Cell Culture Based In Vitro Assays for SARS-CoV-2. *Curr. Med. Chem*, v. 29, n. 38, p. 5925-5948, 2022.
- CHANG, X.; ZHANG, H.; CHEN, S. Neural circuits regulating visceral pain. *Commun. Biol*, v. 7, n. 1, p. 457, 2024.
- CHENG, K. et al. Mechanisms and Pathways of Pain Photobiomodulation: A Narrative Review. *J. Pain*, v. 22, n. 7, p. 763-777, 2021.
- CHOY, E. Understanding the dynamics: pathways involved in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology*, v. 51, p. 3-11, 2012.
- COATES, L. C.; HELLIWELL, P. S. Psoriatic arthritis: state of the art review. *Clin. Med (Lond)*, v. 17, n. 1, p. 65-70, 2017.
- COELHO, V. P. M.; AGRA, M. F.; BARACHO, G. S. Flora da Paraíba, Brasil: *Polygala L.* (Polygalaceae). *Acta Bot. Bras*, v. 22, p. 225–239, 2008.
- CUNHA, T. M. et al. An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. *Braz. J. Med. Biol. Res*, v. 37, p. 401–07, 2005.
- CUNHA, F. Q. et al. The pivotal role of tumour necrosis factor alpha in the development of inflammatory hyperalgesia. *Br. J. Pharmacol*, v. 107, n. 3, p. 660-664, 1992.
- DEVEREAUX, A. L.; MERCER, S. L.; CUNNINGHAM, C. W. DARK Classics in Chemical Neuroscience: Morphine. *ACS Chem. Neurosci*, v. 9, n. 10, p. 2395-2407, 2018.
- DI CONZA, G.; HO, P. C. ER Stress Responses: An Emerging Modulator for Innate Immunity. *Cells*, v. 9, n. 3, p. 695, 2020.
- DING, J.; OROZCO, G. Identification of rheumatoid arthritis causal genes using functional genomics. *Scand. J. Immunol*, v. 89, n. 5, e12753, 2019.

DOHERTY, J. E. Landmark publication from the American Journal of the Medical Sciences: the clinical pharmacology of digitalis glycosides: a review. 1968. *Am. J. Med. Sci*, v. 339, n. 5, p. 462-481, 2010.

DUTRA, R. C. et al. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. *Pharmacol. Res*, v. 112, p. 4-29, 2016.

FALLON, E. A.; BORING, M. A.; FOSTER, A. L. et al. Prevalence of Diagnosed Arthritis - United States, 2019-2021. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. V. 72 (41), p. 1101-1107, 2023.

FAZAL, S. A. et al. A Clinical Update and Global Economic Burden of Rheumatoid Arthritis. *Endocr. Metab. Immune. Disord. Drug Targets*, v. 18, p. 98-109, 2018.

FERREIRA, S. H.; LORENZETTI, B. B.; POOLE, S. Bradykinin initiates cytokine-mediated inflammatory hyperalgesia. *Br. J. Pharmacol*, v. 110, n. 3, p.1227-1231, 1993.

FINCKH, A. et al. Global epidemiology of rheumatoid arthritis. *Nat. Rev. Rheumatol*, v. 18, n. 10, p. 591-602, 2022.

FONG, A.; SCHUG, S. A. Pathophysiology of pain: a practical primer. *Plast. Reconstr. Surg*, v. 134, n. 4 Suppl 2, p. 8S-14S, 2014.

GOUDÉT, C.; MARCHAND, F. Editorial: Molecular mechanisms of nociception. *Front. Mol. Neurosci*, v. 15, p. 1025230, 2022 Sep 6.

FORLI, S. Charting a Path to Success in Virtual Screening. *Molecules*, v. 20, n. 10, p. 18732-18758, 2015.

HARLEY, R. M.; PASTORE, J. F. B. A generic revision and new combinations in the Hyptidinae (Lamiaceae), based on molecular and morphological evidence. *Phytotaxa*, v. 58, p. 1-55, 2012.

JENSEN, T. S.; FINNERUP, N. B. Allodynia and hyperalgesia in neuropathic pain: clinical manifestations and mechanisms. *Lancet Neurol*, v. 13, n. 9, p. 924-935, 2014.

JESENAK, M.; URBANCIKOVA, I.; BANOVCIN, P. Respiratory Tract Infections and the Role of Biologically Active Polysaccharides in Their Management and Prevention. *Nutrients*, v. 9, n. 7, p. 779, 2017.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, v. 13, p. 203-210, 2001.

KONTOYIANNI, M. Docking and Virtual Screening in Drug Discovery. *Methods Mol. Biol*, v. 1647, p. 255-266, 2017.

KOROLKOVAS, A. Essentials of Medicinal Chemistry. 2ed. New York: Wiley, 1988.

LACAILLE-DUBOIS, M. A. et al. A review on the phytopharmacological studies of the genus *Polygala*. *J. Ethnopharmacol*, v. 249, p. 112417, 2020.

LERMAN, A. M. et al. HLA-DRB1*15 and Eosinophilia Are Common Among Patients With Systemic Juvenile Idiopathic Arthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)*, v. 75, n. 10, p. 2082-2087, 2023.

LOLIGNIER, S.; EIJKELKAMP, N.; WOOD, J. N. Mechanical allodynia. *Pflugers Arch*, v. 467, n. 1, p. 133-139, 2015.

LIU, Z. et al. NGF Signaling Exacerbates KOA Peripheral Hyperalgesia via the Increased TRPV1-Labeled Synovial Sensory Innervation in KOA Rats. *Pain Res. Manag*, 2024.

LUSARDI, M.; SPALLAROSSA, A.; BRULLO, C. Amino-Pyrazoles in Medicinal Chemistry: A Review. *Int. J. Mol. Sci*, v. 24, n. 9, p. 7834, 2023.

MARCHON, I. S. D. S. et al. Pharmacological potential of 4-dimethylamino chalcone against acute and neuropathic pain in mice. *J. Pharm. Pharmacol*, 2024.

MATSUKA, Y. Orofacial Pain: Molecular Mechanisms, Diagnosis, and Treatment 2021. *Int. J. Mol. Sci*, v. 23, n. 9, p. 4826, 2022.

MANTOVANI, A.; GARLANDA, C. Humoral Innate Immunity and Acute-Phase Proteins. *N. Engl. J. Med*, v. 388, n. 5, p. 439-452, 2023.

- MIZUMURA, K. Peripheral mechanism of hyperalgesia--sensitization of nociceptors. *Nagoya J. Med. Sci*, v. 60, n. 3-4, p. 69-87, 1997.
- MONGE, A. et al. Medicinal chemistry in the development of societies. Biodiversity and natural products. *Eur. J. Med. Chem*, v. 35, n. 12, p. 1121-1125, 2000.
- MONTANARI, C. A. Química Medicinal: métodos e fundamentos em planejamento de fármacos. 1 ed. São Paulo: EDUSP, v. 1, 2011.
- OKADA, Y. et al. Genetics of rheumatoid arthritis: 2018 status. *Ann Rheum. Dis*, v. 78, n. 4, p. 446-453, 2019.
- OSMAN, A. G. et al. Utility of alkaloids as chemical and biomarkers for quality, efficacy, and safety assessment of botanical ingredients. *Phytomedicine*, v. 54, p. 347-356, 2019.
- OSELUSI, S. O. et al. The role and potential of computer-aided drug discovery strategies in the discovery of novel antimicrobials. *Comput. Biol. Med*, v. 169, p. 107927, 2024.
- POURHABIBI-ZARANDI, F. et al. The efficacy of curcumin supplementation on serum total antioxidant capacity, malondialdehyde, and disease activity in women with rheumatoid arthritis: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Phytother. Res*, 2024.
- RAJA, S. N. et al. The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. *Pain*, v. 161, n. 9, p. 1976-1982, 2020.
- RAJAGOPAL, S.; KUMAR, D. P.; ARUL, A. B. Editorial: Regulatory action of calcium channels in pain pathway. *Front Cell Neurosci*, v. 16, p. 928457, 2022.
- ROCHA, A. P. et al. Pain: current aspects on peripheral and central sensitization. *Rev. Bras. Anesthesiol*, v. 57, n. 1, p. 94-105, 2007.
- ROCHA, J. L. C. et al. Evaluation of Biological Activity of *Polygala boliviensis* in Experimental Models. *Iran. J. Pharm. Res*, v. 18, p. 793-802, 2019.

ROY, M. et al. Cerebral and spinal modulation of pain by emotions. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 106, p. 1-6, 2009.

SACHS, D. et al. Tumour necrosis factor-alpha, interleukin-1beta and interleukin-8 induce persistent mechanical nociceptor hypersensitivity. *Pain*, v. 96, n. 1-2, p. 89-97, 2002.

SANTOS, M. O. et al. Medicinal Plants: versatility and concordance of use in the caatinga area, Northeastern Brazil. *An Acad. Bras. Cienc*, v. 90, n. 3, p. 2767-2779, 2018.

SANTOS, U. S. Avaliação do potencial antimicrobiano de *Eplingiella fruticosa*, *Gymneia platanifolia* e *Medusantha martiusii* (Lamiaceae) contra micro-organismo de interesse agrícola. 99f. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2016.

SCHAIBLE, H. G.; RICHTER, F. Pathophysiology of pain. *Langenbecks Arch Surg*, v. 389, n. 4, p. 237-243, 2004.

SCHAIBLE, H. G. Emerging concepts of pain therapy based on neuronal mechanisms. *Handb. Exp. Pharmacol*, v. 227, p. 1-14, 2015.

SEN, T.; SAMANTA, SK. Medicinal plants, human health and biodiversity: a broad review. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol*, v. 147, p. 59-110, 2015.

SILVA, D. F. et al. Poligalen, a new coumarin from *Polygala boliviensis*, reduces the release of TNF and IL-6 independent of NF-kB downregulation. *Fitoterapia*, v. 113, p. 139-143, 2016.

SMOLEN, J. S.; ALETAHA, D.; MCINNES, I. B. Rheumatoid arthritis. *Lancet*, v. 388, p. 2023-2038, 2016.

SOUZA MONTEIRO DE ARAUJO, D. et al. Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. *J. Ethnopharmacol*, v. 137, p. 327-335, 2011.

TOLOMEU, H. V.; FRAGA, C. A. M. Imidazole: Synthesis, Functionalization and Physicochemical Properties of a Privileged Structure in Medicinal Chemistry. *Molecules*, v. 28, n. 2, p. 838, 2023.

- ÜNLÜ, A. et al. Isolation, Characterization and In Silico Studies of Secondary Metabolites from the Whole Plant of *Polygala inexpectata* Peşmen & Erik. *Molecules*, v. 27, p. 684, 2022.
- VANANGAMUDI, M. et al. Strategies in the Design and Development of Non-Nucleoside Reverse Transcriptase Inhibitors (NNRTIs). *Viruses*, v. 15, n. 10, p. 1992, 2023.
- VENETSANOPOULOU, A. I. et al. Epidemiology of rheumatoid arthritis: genetic and environmental influences. *Expert Rev. Clin. Immunol*, v. 18, n. 9, p. 923-931, 2022.
- VOGELPOEL, L. T. C. et al. Control of cytokine production by human Fc gamma receptors: implications for pathogen defense and autoimmunity. *Front Immunol*, v. 6, p. 79, 2015.
- WANG, M. et al. The extract of *Polygala fallax* Hemsl. slows the progression of diabetic nephropathy by targeting TLR4 anti-inflammation and MMP-2/9-mediated anti-fibrosis in vitro. *Phytomedicine*, v. 104, 2022.
- WHO. Guidelines on the pharmacological treatment of persisting pain in children with medical illnesses. *World Health Organization*, p. 1-167, 2012.
- WOOLF, C.J.; MA, Q. Nociceptors--noxious stimulus detectors. *Neuron*, v. 55, n. 3, p. 353-364, 2007.
- YANG, R. et al. Correlation between Hyperalgesia and Upregulation of TNF- α and IL-1 β in Aqueous Humor and Blood in Second Eye Phacoemulsification: Clinical and Experimental Investigation. *J. Immunol. Res*, v. 2021, 2021.
- YOST, J. G. et al. (2R,6R)-hydroxynorketamine (HNK) reverses mechanical hypersensitivity in a model of localized inflammatory pain. *Neuropharmacology*, v. 221, 2022.
- ZENG, Z. et al. Structural elucidation and anti-neuroinflammatory activity of *Polygala tenuifolia* polysaccharide. *Int. J. Biol. Macromol*, v. 31, p. 1284-1296, 2022.

CAPÍTULO 1 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DA *Gymneia
platanifolia*

Antinociceptive activity of *Gymneia platanifolia*

Artigo submetido ao periódico: Journal of Essential Oil Research

Fator de impacto (WoS) 2023: 3.0

Bruno Cerqueira da Silva^{a*}, Flávia Oliveira de Lima^a e Angélica Maria Lucchese^b

^a Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, Brasil;

^b Laboratório de Produtos Naturais e Bioativos, Departamento de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, Brasil.

** Av. Transnordestina - Novo Horizonte, Feira de Santana, Bahia, Brasil. Universidade Estadual de Feira de Santana. Biotério Central.*

Email: farma.bruno@yahoo.com.br

Atividade antinociceptiva de *Gymneia platanifolia*

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi caracterizar e avaliar a atividade antinociceptiva *in vivo* do extrato metanólico (EMGP) e do óleo essencial (OEGP) obtidos de *Gymneia platanifolia* (folhas, caule e flores). O OEGP foi obtido por hidrodestilação durante 3h e foram detectados 22 compostos, constituídos principalmente por espatulenol (31%) e, óxido de cariofileno (10%). O EMGP foi obtido por maceração com metanol. Nos testes *in vivo*, OEGP e EMGP foram administrados em camundongos Swiss machos, mostrando ação contra hipernocicepção (contorções abdominais induzidas por ácido acético, modelo de formalina e testes de artrite induzida por zimosan). Por outro lado, não alteraram o limiar de resposta ao estímulo térmico no teste da placa quente, indicando ausência de ação central. Nossos resultados sugerem, portanto, que OEGP e EMGP promovem ação antinociceptiva, provavelmente através de vias periféricas. Mais estudos são necessários para definir o mecanismo de ação.

Palavras-chave: antinocicepção; *Gymneia platanifolia*; dor.

1. INTRODUÇÃO

A família Lamiaceae é uma das maiores famílias botânicas, compreendendo mais de 6.000 espécies que incorporam uma grande variedade de plantas com aplicações biológicas e médicas (1). Um dos gêneros de grande importância pertencentes a esta família é *Hyptis*, conhecido por possuir plantas com metabolismo especial de alta variabilidade. Este gênero sofreu modificações taxonômicas após recente revisão da subtribo Hyptidinae, baseada em marcadores moleculares, quando grande parte de suas espécies foi redistribuída em onze gêneros: *Cantinoa* Harley & J.F.B. Pastore, *Condea* Adanson, *Cyanocephalus* (Pohl ex Benth.) Harley & J.F.B. Pastore, *Gymneia* (Benth.) Harley & J.F.B. Pastore, *Hyptidendron* Harley, *Leptohyptis* Harley e J.F.B. Pastore, *Martianthus* Harley e J.F.B. Pastore, *Medusantha* Harley e J.F.B. Pastore, *Oocephalus* (Benth.) Harley & J.F.B. Pastore, *Physominthe* Harley e J.F.B. Pastore e *Eplingiella* Harley & J.F.B. Pastore.

O gênero *Gymneia* é composto por pelo menos seis espécies: *Gymneia ampelophylla* (Epling) Harley & J.F.B. Pastore (sinônimo de *Hyptis ampelophylla* Epling), *Gymneia chapadensis* Harley, *Gymneia interrupta* (Pohl ex Benth.) Harley & J.F.B. Pastore (sinônimo de *Hyptis interrompe* Pohl ex Benth.) Harley & J.F.B. Pastore (sinônimo de *Hyptis malacophylla* Benth.) Harley & J.F.B. Pastore (sinônimo de *Hyptis malacophylla* Benth.), *Gymneia moniliformis* Harley, *Gymneia platanifolia* (Mart. ex Benth.) Harley & J.F.B. Pastore (sinônimo de *Hyptis platanifolia* Mart. Ex Benth.) e *Gymneia virgata* (Benth.) Harley & J.F.B. Pastore (sinônimo *Hyptis virgata* Benth.) (2).

A espécie *Gymneia platanifolia*, anteriormente conhecida como *Hyptis platanifolia* (Salzm. ex Benth.), é uma espécie aromática endêmica do semiárido brasileiro (Bahia, Ceará, Maranhão, Pernambuco, Piauí) perene com caule herbáceo ramificado, folhas pecioladas membranosas e flores em forma de corola tubular e branca. As análises fitoquímicas e fitofarmacológicas desta planta revelaram rendimento médio de 0,5% de óleo nas folhas, com atividade contra *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella choleraesuis* e *Candida albicans*, tendo α -farneseno e γ -bisabolene como principais constituintes (3-4). Algumas atividades biológicas já foram identificadas com o extrato metanólico e óleo essencial desta espécie. Ambos apresentaram

atividade antibacteriana contra as bactérias *X. campestris* pv. *viticola* e *R. solanacearum* e atividade antifúngica frente aos fitopatógenos *A. niger*, *C. herbarum*, *L. theobromae* e *Rhizopus* sp (5). O objetivo do presente estudo foi caracterizar quimicamente o óleo essencial das folhas, caule e flores de *G. platanifolia* (OEGP) e o extrato metanólico bruto (EMGP), avaliando suas ações em modelos experimentais de dor.

2. MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Amostras da espécie *G. platanifolia*, foram coletadas em fevereiro de 2022, no período da manhã, no campus da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS), município de Feira de Santana-BA (12°11'52.8 "S 38°58'02,1"W). Após a expedição de coleta, o material foi herbalizado para confecção de exsicata, sendo depositado no Herbário do Departamento de Biologia da UEFS sob o número 260.236. Após realizar a identificação da espécie, o acesso foi cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob nº AF2A66D, nos termos da Lei nº 13.123/2015.

2.2 Extração de óleo essencial

O óleo essencial das folhas, caule e flores de *G. platanifolia* (OEGP) foi obtido por hidrodestilação em aparelho Clevenger em triplicata. O material vegetal, após coleta, passou pelo processo de secagem em temperatura ambiente (25° C) e protegido da luz. Após a secagem, as folhas, caule e flores foram moídas juntas em moinho de facas até obterem partículas de baixa granulometria. O material foi então pesado e dividido em duas partes iguais. Cada parte foi colocada em um frasco contendo 1000mL de água destilada no aparelho Clevenger, por 180 minutos a partir do início da destilação. Após a extração do óleo essencial, foi adicionado sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄) para retirar a água residual e evitar perdas por hidrólise durante o armazenamento. Em seguida, o óleo foi coletado e colocado em recipientes de vidro escuro e

pesado em balança de precisão. O cálculo do teor de óleo foi realizado através da relação entre o volume de óleo coletado e a massa de material vegetal seco utilizado na extração (6).

2.3 Análise da composição química do OEGP

O OEGP foi analisado por cromatografia gasosa com detecção por ionização de chama (GC/DIC) e por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC/MS), para determinação dos constituintes, seu número e concentração. A identificação dos compostos foi realizada por comparação com a base de dados GC/MS (NIST 21 e NIST107), com padrões autênticos e pelo cálculo do Índice de Kovat (calculado pela co-injeção da amostra com uma série homóloga de *n*-alcanos C₈-C₂₄) (7). Nas análises GC/DIC foi utilizado um Cromatógrafo Varian® CP-3380, com detector de ionização de chama (DIC) e coluna capilar DB -5 (30m x 0,5mm x 0,25µm), temperatura do injetor de 220 °C e 240°C. detector, split 1:50, hélio como gás de arraste a uma vazão de 1 mL/min, com programa de temperatura do forno de: 60°C a 240°C (3°C/min), mantendo a 240°C por 20 minutos. As análises de GC/MS foram realizadas em um Cromatógrafo Shimadzu® CG2010 acoplado a um Espectrômetro de Massas Shimadzu® GC/MS-QP 2010, coluna capilar BPX-5 (30m x 0,25mm x 0,25µm), temperatura do injetor 220 °C, gás de arraste hélio com vazão de 1mL/min, split 1:100, temperatura de interface 240°C, temperatura da fonte de ionização 240°C, energia de ionização 70 eV, corrente de ionização: 0,7 kV e programa de temperatura do forno: 60°C a 240°C (3°C/min), mantendo a 240°C por 20 minutos. Antes da injeção, 20mg de cada amostra de óleo essencial foram dissolvidos em 1mL de diclorometano e injetados 0,2µL desta solução. Após análise, um conjunto de óleos essenciais foi compilado para testes posteriores.

2.4 Obtenção do extrato metanólico

Após a coleta, a espécie vegetal foi submetida ao processo de secagem em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Esse procedimento evita a degradação do conteúdo metabólico da planta, pois o alto teor de água no

material vegetal permite o desenvolvimento de microrganismos. Após o processo de secagem, as folhas, caule e flores foram moídas juntas até obterem partículas de baixa granulometria em moinho de facas, a fim de aumentar a superfície de contato entre o material e o solvente. Posteriormente, foram realizadas extrações consecutivas por maceração com metanol (proporção 1:3, material vegetal: metanol), por três vezes consecutivas, observando intervalo de três dias entre as extrações (8-9). Após maceração, os extratos foram concentrados em evaporador rotatório, sob pressão reduzida, em temperaturas entre 40-45°C, e em seguida transferidos para um recipiente de vidro e colocados em capela para evaporação do resíduo remanescente do solvente. Após completa secagem, o material foi pesado e em seguida determinado o rendimento do extrato bruto de *G. platanifolia*.

Testes Farmacológicos

2.5 Animais experimentais

Os experimentos foram realizados com camundongos machos adultos da linhagem *Swiss Webster* (25-30g) provenientes do biotério da Universidade Estadual de Feira de Santana. Todos os testes comportamentais foram realizados entre 07h00 e 18h00 do dia. Os animais foram mantidos em caixas apropriadas no biotério, com temperatura de 22-25°C e ciclos claro-escuro de 12 horas, com livre acesso a comida e água. Todos os experimentos foram realizados de acordo com o protocolo e diretrizes da Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) para utilização de animais de laboratório (10). Os experimentos foram conduzidos após aprovação do comitê de ética de uso em animais da Universidade Estadual de Feira de Santana sob protocolo nº 12/2023.

2.6 Drogas e diluentes

Os medicamentos foram adquiridos da Sigma® (Zimosan, Dimetilsulfóxido), Teuto® (Dexametasona), Cristália® (Isoflurano e Midazolam). Merck® (formaldeído e ácido acético). O óleo essencial foi diluído em dimetilsulfóxido (DMSO) 10% + solução fisiológica. Dexametasona, midazolam

e zimosan foram diluídos em solução salina. O controle negativo foi composto por solução fisiológica + DMSO 10%. O extrato foi diluído em DMSO 5% + solução salina. O controle negativo foi composto por solução salina + DMSO 5%.

2.7 Teste de contorção abdominal induzida por ácido acético

Para avaliar o efeito antinociceptivo, diferentes grupos foram tratados por via intraperitoneal com veículo, ou OEGP (50-200 mg kg⁻¹) 30min antes da injeção intraperitoneal (i.p.) de ácido acético. EMGP (100-400 mg kg⁻¹) ou veículo foi administrado por via oral 60min antes do estímulo nociceptivo. Morfina (5 mg kg⁻¹, s.c.) foi utilizada como fármaco de referência, 40 minutos antes do estímulo nociceptivo. O protocolo comportamental foi aplicado conforme descrito anteriormente por Valasques Júnior et al (11). O número total de contorções abdominais foi registrado dentro de 30min após a administração intraperitoneal de ácido acético (0,8%).

2.8 Teste de formalina

Os animais foram tratados por via intraperitoneal com OEGP (50-200 mg kg⁻¹) ou veículo, 30min antes da administração intraplantar na pata traseira direita com 20ul de formalina 2,5% diluída em solução salina. EMGP ou veículo foram administrados por via oral (100-400 mg kg⁻¹) 60min antes da estimulação. Morfina (5 mg kg⁻¹, s.c.) foi utilizada como fármaco de referência, 40min antes do estímulo nociceptivo. Após a administração, os camundongos foram devolvidos à câmara de observação espelhada. Conforme descrito por Cardona et al (12). O tempo que o animal passa lambendo ou mordendo a pata, após a administração intraplantar de formalina, foi quantificado como comportamento nociceptivo.

2.9 Teste de placa quente

Proposto por Woolfe e Mc Donald (13), consiste em colocar os animais em uma placa quente (55 °C ± 1,0 °C) e cronometrar o tempo gasto pelo animal para manifestar uma resposta nociceptiva como lambendo, morder, pular ou

levantar suas patas. Estabelece-se um limite máximo de 30 segundos para minimizar a probabilidade de danos nos tecidos. Doses de 100, 200 e 400 mg kg⁻¹ de OEGP foram administradas i.p. ou veículo. EMGP (100-400 mg kg⁻¹, v.o.) ou veículo foi administrado 60min antes do início do teste. Morfina 5 mg kg⁻¹ foi administrada por via subcutânea, foi utilizada como fármaco de referência. Desta forma, o tempo que os camundongos levaram para manifestar uma resposta nociceptiva foi medido em intervalos: 0,5h; 1h; 3h e 5h após a aplicação.

2.10 Indução de modelo experimental de artrite induzida por zimosan

Os animais foram tratados por via intraperitoneal (i.p.) com OEGP nas respectivas doses (50, 100 e 200 mg kg⁻¹) ou veículo 30min antes da administração de zimosan. EMGP (100, 200 e 400 mg kg⁻¹) ou veículo foi administrado por via oral 1h antes do estímulo nociceptivo. A dexametasona (2mg/kg) foi utilizada como fármaco de referência, sendo administrada por via subcutânea (s.c.) 40 minutos antes do estímulo nociceptivo. Todos os camundongos foram anestesiados com isoflurano a 2%, em seguida o modelo de artrite foi induzido com a administração de zimosan (30µg/5µL) na articulação tibiotarsal direita dos camundongos. O grupo controle recebeu 5µL de solução salina na articulação tibiotarsal direita dos camundongos.

2.11 Avaliação nociceptiva articular

A avaliação da hipernocicepção da articulação tibiotarsal induzida pelo zimosan foi realizada conforme descrito por Guerrero et al. (14). Os experimentos foram realizados com um anestesímetro eletrônico, que capta a pressão por meio de um transdutor conectado a um contador de força digital expresso em gramas (g). A captura da pressão foi realizada pelo contato do transdutor de pressão com a pata, o que é realizado através de uma ponta descartável de polipropileno com área de 4,15 mm² conectada ao transdutor. Os camundongos foram mantidos individualmente em caixas de acrílico, com piso de tela metálica não maleável. Os animais foram colocados nas caixas 15 minutos antes do início do experimento, para adaptação ao ambiente. A avaliação da nocicepção articular consiste em aplicar, através das malhas da rede, uma pressão linearmente crescente no centro da pata do camundongo, até

que o animal seja estimulado a realizar a flexão dorsal da articulação tibiotarsal. Para este fim, foi utilizada ponta com área de $4,15\text{mm}^2$ que permite avaliar a hipernocicepção articular, pois esta ponta não é per se nociceptiva. A sequência de procedimentos experimentais consistiu em quantificar a hipernocicepção mecânica articular nos tempos 0h, 0,5h, 1h, 3h, 5h, 7h e 24h após a indução da artrite. A intensidade da hipernocicepção mecânica articular foi quantificada por meio de valores de limiar mecânico absoluto (em gramas).

2.12 Teste do cilindro giratório (rota-rod)

O desempenho motor dos animais foi estudado no aparelho cilindro giratório, conforme método descrito por Rocha et al (15). Os animais foram submetidos a uma análise de pré-seleção um dia antes do experimento, a fim de selecionar apenas os animais que permaneceram na barra de equilíbrio por 120 segundos em três tentativas. A velocidade constante escolhida foi de 18 rotações por minuto (rpm). Os animais selecionados foram então tratados com OEGP (200 mg kg^{-1} , i.p.) ou veículo 30 minutos antes de serem colocados no aparelho. EMGP (400 mg kg^{-1} , v.o.) ou veículo foi administrado 60 minutos antes de serem colocados no aparelho. A capacidade de coordenação foi quantificada pelo tempo registrado no aparelho. Os resultados foram expressos como o tempo médio, em segundos, que o animal permaneceu no aparelho. Por se tratar de um benzodiazepínico, utilizou-se midazolam (10 mg kg^{-1} , i.p.) como fármaco de referência com pré-tratamento de 30 minutos.

2.13 Teste de campo aberto

O aparelho consiste em uma caixa de acrílico opaco (50cm x 60cm x 45cm), com piso demarcado em 12 quadrados iguais. No momento do teste, os animais foram colocados em um dos cantos do aparelho e foi registrado o número de vezes que cruzaram os quadrados com as quatro patas durante o período de três minutos. Os animais foram tratados com OEGP (200 mg kg⁻¹, i.p.; ou veículo) 30 minutos antes de serem colocados no aparelho de registro. EMGP (400mg kg⁻¹; ou veículo; v.o.) foi administrado 60 minutos antes do teste. Os resultados foram expressos como o número médio de quadrados cobertos. O fármaco de referência utilizado foi o midazolam (10mg/kg, i.p.) com 30 minutos de pré-tratamento Rocha et al (15).

2.14 Análise estatística

Os dados foram analisados utilizando o programa GraphPadPrism (GraphPad Inc., San Diego, CA) versão 5.0 para Windows e apresentados como média ± erro padrão da média (S.E.M.) das medidas feitas com 6 animais por grupo. A comparação entre os diferentes grupos de tratamento foi feita utilizando ANOVA unidirecional, seguida pelo teste de Bonferroni. Nos estudos de medidas repetidas ao longo do tempo foi utilizada ANOVA de duas vias, seguida do teste de Bonferroni. Em todos os testes, as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para valores de $p \leq 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Rendimento do EMGP e OEGP

Após ser concentrado em evaporador rotatório e seco em capela de exaustão, foram obtidas 58,6g de extrato metanólico bruto, correspondendo a 16,14% de rendimento.

Tabela 1: Rendimento do extrato metanólico bruto das folhas, caules e flores de *G. platanifolia*

Material	Massa do material vegetal seco (g)	Massa do extrato (g)	Rendimento (%)
Folhas, caules e flores <i>G. platanifolia</i>	363	58,6	16,14%

O óleo essencial teve rendimento médio de 0,12%, sendo utilizadas 398,45g de massa do material vegetal seco e extraída a quantidade de 0,5mL de óleo essencial.

Tabela 2: Rendimento do óleo essencial extraído das folhas, caules e flores de *G. platanifolia*

Material	Massa do material vegetal seco (g)	Volume do óleo essencial (mL)	Rendimento (%)
Folhas, caules e flores <i>G. platanifolia</i>	398,45	0,5	0,12%

3.2 Caracterização química do OEGP

Foram identificados 22 compostos (aproximadamente 71,50% da composição total do óleo). Sendo espatulenol (31,1%), óxido de cariofileno (10,37%), α -muurolol (5,97%), α -cadinol (5,6%), 7-epi- α -selineno+ δ -cadineno (3,87%) e α -ilangene (3,1%), os principais compostos. A presença majoritária de espatulenol e óxido de cariofileno foi observada em outras espécies de *Hyptis*, como *Hyptis pectinata* L. (16), *Hyptis brevipes* (Poit.) (17) e *Hyptis fruticosa* (18). Ainda neste contexto, a análise do óleo essencial de *Hyptis suaveolens* (19) revelou o espatulenol como um dos principais compostos desta espécie, apresentando assim uma importante semelhança com os resultados encontrados em nosso trabalho. Adicionalmente, a composição química do OEGP está de acordo com dados da literatura que indicam a presença majoritária destes componentes nestas espécies. Conforme observado, os constituintes OEGP podem ser encontrados nos óleos essenciais de outras espécies de *Hyptis*, variando apenas em proporções. Este fato revela perfis químicos ligeiramente semelhantes entre as espécies, sendo as diferenças na composição destes óleos condicionadas por fatores ambientais.

Tabela 3: Composição química dos óleos essenciais obtidos da parte aérea de *G. platanifolia*

Composto	IK _{lit} ^a	IK _{calc} _b	Média ± DP
<i>p</i> -metilacetofenona	1182	1184	0,63 ± 0,11
α-cubeno	1348	1354	0,93 ± 0,06
α-ilangene	1375	1375	3,1 ± 0,20
α-copaeno	1376	1379	t
dauceno	1381	1388	t
β-bourboneno	1388	1390	0,67 ± 0,11
β-cubeno + β-elemeneno	1388/1390	1393	1,1 ± 0,10
cipereno	1398	1406	0,73 ± 0,06
α-santaleno	1417	1417	t
(<i>E</i>)-cariofileno	1419	1424	0,37 ± 0,11
α-humuleno	1454	1455	0,7 ± 0,00
germacreno D	1485	1486	0,93 ± 0,06
α-bergamoteno	1434	1438	0,07 ± 0,00
γ-amorfenos	1495	1499	1,0 ± 0,00
α-muuroleno	1500	1505	1,27 ± 0,06
β-bisaboleno	1505	1511	2,1 ± 0,001
7- <i>epi</i> -α-selineno+δ-cadineno	1522/1523	1524	3,87 ± 0,29
(<i>Z</i>)-calameneno	1529	1529	1,17 ± 0,11
espatulenol	1583	1586	31,1 ± 0,95
óxido de cariofileno	1583	1589	10,37 ± 0,06
α-muurolol	1646	1648	5,97 ± 0,11
α-cadinol	1654	1655	5,6 ± 0,53
Total de compostos identificados			71,50 ± 0,98

t – traços, a - Índice de Kovats determinado em coluna DB5 utilizando séries homólogas de *n*-alcanos (C₈-C₂₁), b - Índice de Kovats da literatura (Adams, 2007).

3.3 Teste de contorção abdominal induzida por ácido acético

Este trabalho estudou os efeitos da *G. platanifolia* em modelos experimentais de dor. Com base nisso, o teste inicial para avaliar a atividade antinociceptiva foi o teste de contorção abdominal induzida por ácido acético. O comportamento de contorção em camundongos após a administração de ácido acético, induzindo a nocicepção química, permite avaliar a nocicepção inflamatória visceral e a atividade antinociceptiva de substâncias que atuam tanto em nível central quanto periférico (20). A resposta depende da interação de diversos neurotransmissores e neuromoduladores caracterizando a nocicepção, tornando-a um excelente modelo de triagem na busca de novas substâncias analgésicas. Em nosso estudo, após administração intraperitoneal do agente nociceptivo (ácido acético 0,8%) nos camundongos, os animais tratados pela administração intraperitoneal de OEGP na dose de 200 mg kg⁻¹ apresentaram redução significativa no número de contorções (Figura 1-A). O tratamento oral com EMGP (400 mg kg⁻¹) também apresentou redução significativa no número de contorções (Figura 1-B). A morfina (5mg/kg), utilizada como medicamento de referência, inibiu significativamente o número de contorções abdominais ($p < 0,05$).

O óxido de cariofileno foi identificado como um dos componentes majoritários do nosso óleo essencial (10,37%). Chavan et al (21) demonstraram que o óxido de cariofileno reduziu o número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético, exibindo atividade antinociceptiva através de diversos mecanismos que podem envolver ações centrais e periféricas. Portanto, o efeito do tratamento com OEGP no teste de contorção abdominal induzido por ácido acético pode ser, pelo menos em parte, devido à presença de óxido de cariofileno.

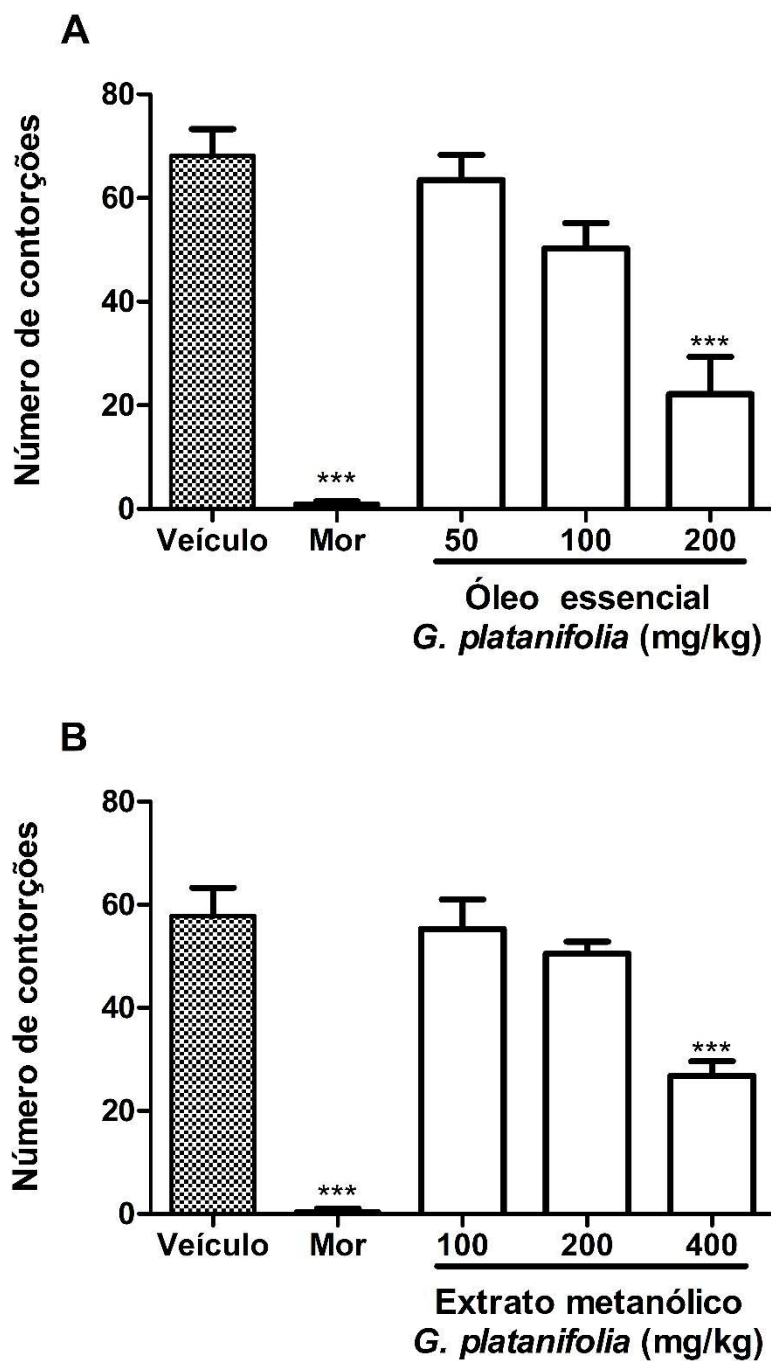


Figura 1 – Efeito do tratamento com OEGP (painel A) e EMGP (painel B) nas contorções abdominais induzidas por ácido acético. Os camundongos foram tratados com OEGP (50, 100 e 200 mg kg⁻¹) ou veículo por via intraperitoneal 30 minutos antes da solução de ácido acético, ou EMGP (100, 200 e 400 mg kg⁻¹) ou veículo por via oral 1h antes de ácido acético 0,8%. A morfina (Mor; 5 mg kg⁻¹, s.c.) foi utilizada como fármaco de referência, sendo administrada por via subcutânea 40 minutos antes do ácido acético. Os dados são expressos como média ± E.P.M; n = 6 camundongos por grupo. *** Significância estatística em relação ao grupo controle negativo (p<0,05), conforme determinado pela ANOVA seguida do teste de Bonferroni.

3.4 Teste de formalina

A administração intraplantar de formalina promove duas fases de sensibilidade dolorosa, que podem servir tanto para avaliar a substância antinociceptiva como também para elucidar os mecanismos de antinocicepção (22). Esse comportamento nociceptivo ocorre em um padrão bifásico. A primeira fase corresponde aos primeiros 5 minutos e está associada à resposta imediata à formalina, a segunda fase (15 a 30 minutos) resulta da liberação de mediadores hiperalgésicos no local da aplicação. A fase inicial (dor neurogênica), que não foi afetada pelo tratamento com óleo essencial ou extrato metanólico, tem início imediato e é caracterizada por excitação direta das fibras sensoriais C e liberação de substância P. Por outro lado, a fase tardia (dor inflamatória) deste teste é causada por inflamação local e está associado a alterações teciduais e funcionais no corno dorsal da medula espinhal com liberação de mediadores químicos como histamina, serotonina, bradicinina, prostaglandinas e aminoácidos excitatórios (23). Neste estudo, o tratamento com 200 mg kg⁻¹ de OEGP (Figura 2B) e 400 mg kg⁻¹ de EMGP (Figura 2D), induziu atividade antinociceptiva apenas na fase tardia da formalina. A morfina teve efeito significativo em ambas as fases.

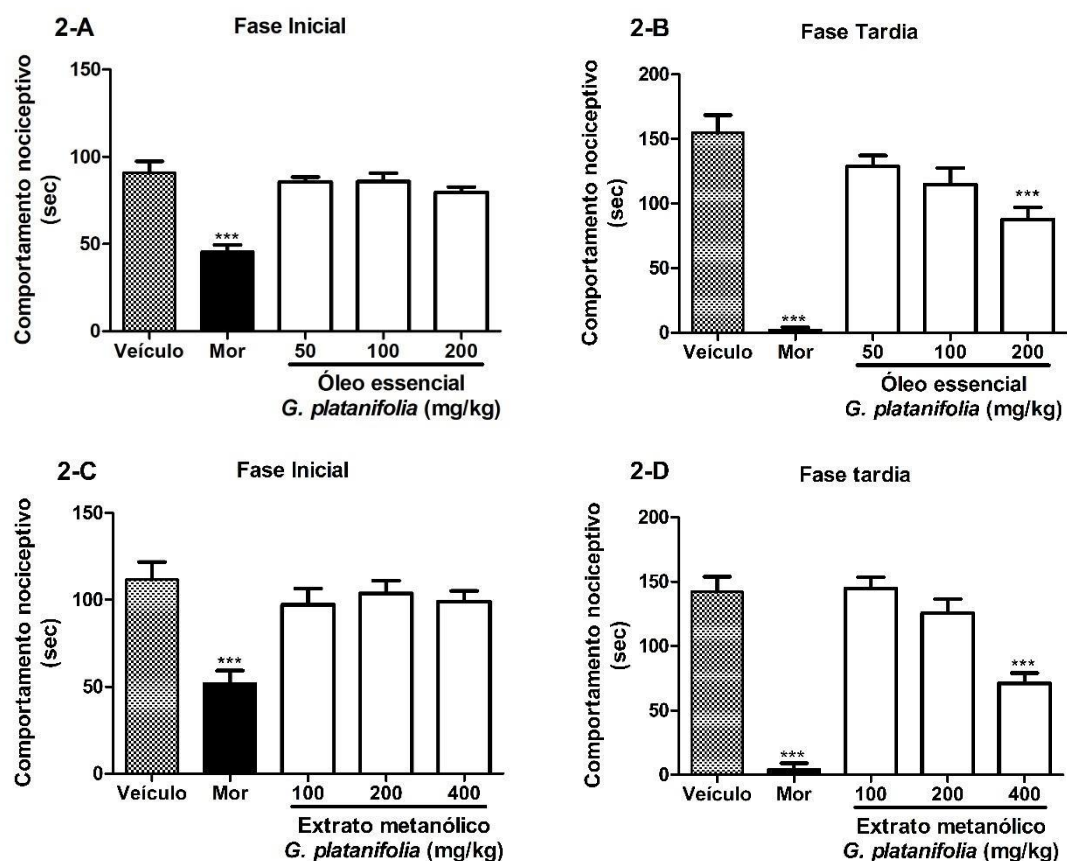


Figura 2 - Efeito do tratamento com OEGP (painéis A e B) e EMGP (painéis C e D) no teste da formalina. Os camundongos foram tratados com OEGP (50, 100 e 200 mg kg⁻¹) ou veículo, por via intraperitoneal 30 minutos antes da formalina, ou EMGP (100, 200 e 400 mg kg⁻¹) ou veículo, por via oral 1h antes da formalina. Morfina (Mor; 5mg kg⁻¹, s.c.) foi utilizada como fármaco de referência, sendo administrada por via subcutânea 40 minutos antes da injeção de formalina. Os dados são expressos como média ± E.P.M; n = 6 animais por grupo. *** Significância estatística em relação ao grupo controle negativo (p<0,05), conforme determinado pela ANOVA seguida do teste de Bonferroni.

3.5 *Teste de placa quente*

Como o extrato e o óleo essencial não apresentaram efeito antinociceptivo na primeira fase do teste da formalina, sugerindo que provavelmente não houve efeito central no processo antinociceptivo, foi realizado o teste da placa quente para confirmar a ausência desse mecanismo. Este modelo permite avaliar a participação de mecanismos centrais na atividade antinociceptiva, que é determinada pela resposta do animal a um estímulo térmico, temperaturas acima de 43°C. O estímulo térmico ativa nociceptores (fibras C amielínicas) que são responsáveis por transmitir informações ao corno dorsal da medula espinhal e, posteriormente, aos centros corticais, produzindo uma resposta nociceptiva organizada (24-25). Por esse motivo, o modelo de placa quente é amplamente utilizado no estudo de medicamentos analgésicos, principalmente aqueles que atuam no sistema nervoso central, como os opioides (25). O tratamento com OEGP (100, 200 e 400 mg kg⁻¹) não alterou o tempo de latência no teste da placa quente (Figura 3A). Da mesma forma, o tratamento com EMGP (100, 200 e 400 mg kg⁻¹) não alterou o tempo de latência no teste da placa quente (Figura 3B). A morfina (5 mg kg⁻¹), analgésico opioide utilizada como droga de referência, aumentou significativamente o tempo de latência de resposta ao estímulo térmico. Portanto, estes dados mostram que a atividade antinociceptiva tanto do OEGP quanto do EMGP não envolve a participação de mecanismos supraespinhais.

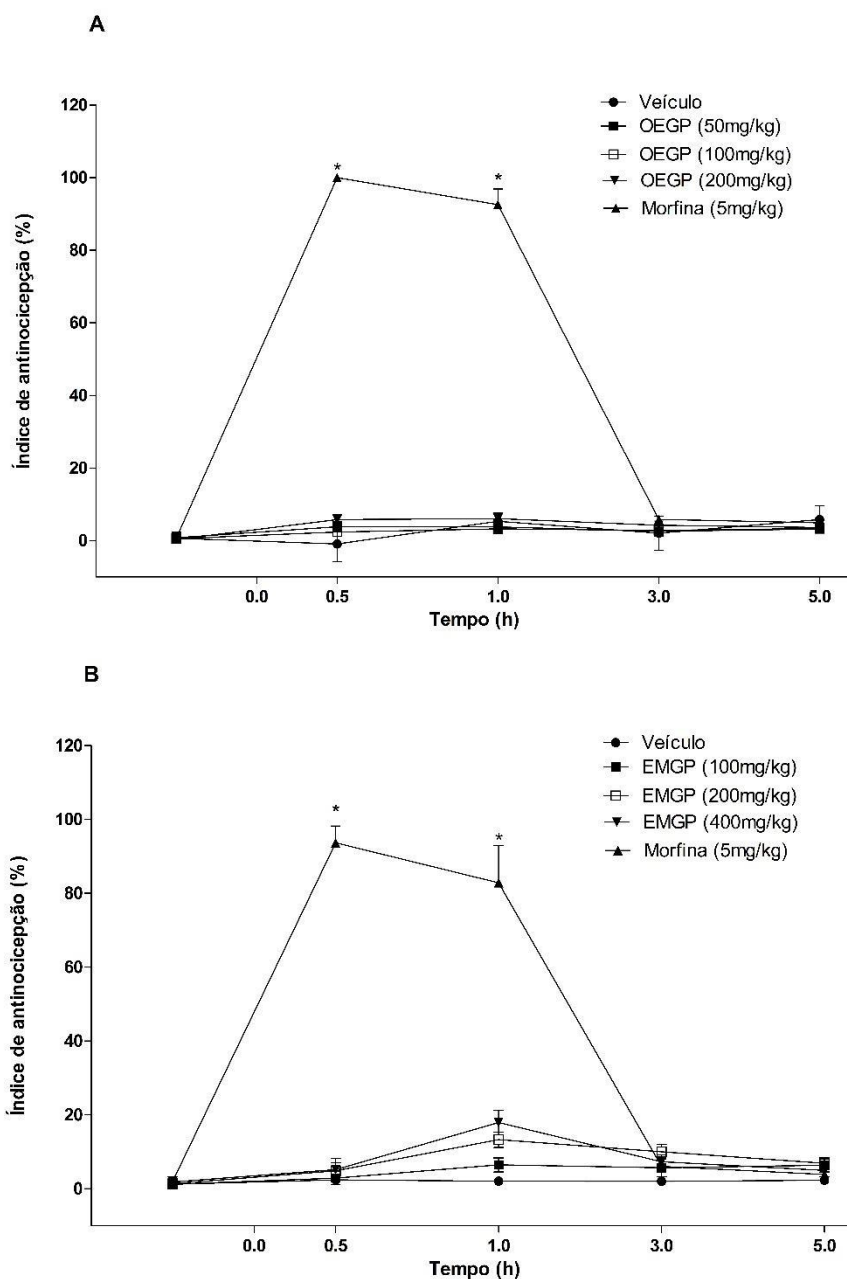


Figura 3 - Efeito do tratamento com OEGP (painel A) e EMGP (painel B) no teste da placa quente. Para avaliar a evolução temporal do efeito antinociceptivo, o limiar térmico nociceptivo foi avaliado até 5 horas após a administração intraperitoneal de OEGP (50, 100 e 200 mg kg⁻¹, i.p.) ou veículo, ou após administração oral de EMGP (100, 200 e 400 mg kg⁻¹, i.p.) ou veículo. Morfina (5 mg/kg s.c.) foi o fármaco de referência. Os dados são expressos como média ± E.P.M; n = 6 animais por grupo. *Significativamente diferente do grupo controle (p<0,001) ANOVA duas vias, seguida de teste de Bonferroni.

3.6 Avaliação nociceptiva articular

O modelo de artrite induzida por zimosan é amplamente utilizado em pesquisas porque mimetiza as principais características clínicas observadas na artrite reumatoide em humanos. A dor articular resulta principalmente dos efeitos diretos e indiretos de mediadores inflamatórios, como histamina, eicosanoides, Fator Ativador de Plaquetas (PAF), neuropeptídeos, óxido nítrico e principalmente citocinas e prostaglandinas que sensibilizam as fibras nociceptivas primárias que inervam a articulação inflamada (26-28). Além disso, alguns componentes, incluindo produtos lipídicos do ácido araquidônico, sistema complemento e endotelina-1 (ET-1), também estão envolvidos na inflamação causada pelo zimosan. Neste estudo, o pré-tratamento com OEGP (200 mg kg^{-1}) reduziu a hipernocicepção articular até a primeira hora do teste (Figura 4A). EMGP (400 mg kg^{-1}) também causou redução hipernociceptiva articular até a primeira hora do teste (Figura 4B).

O óleo avaliado em nossos estudos teve o espatulenol como componente majoritário (31,1%). Em outro estudo, este composto preveniu a sensibilidade nociceptiva ao frio induzida pela formalina, a hiperalgesia mecânica induzida pela carragenina, o edema da pata e a atividade da mieloperoxidase (29). Além disso, o óxido de cariofileno, outro composto importante do OEGP (10,37%), tem ação analgésica e anti-inflamatória (21). Portanto, o efeito antinociceptivo do OEGP deve provavelmente ser parcialmente devido à presença de espatulenol e óxido de cariofileno.

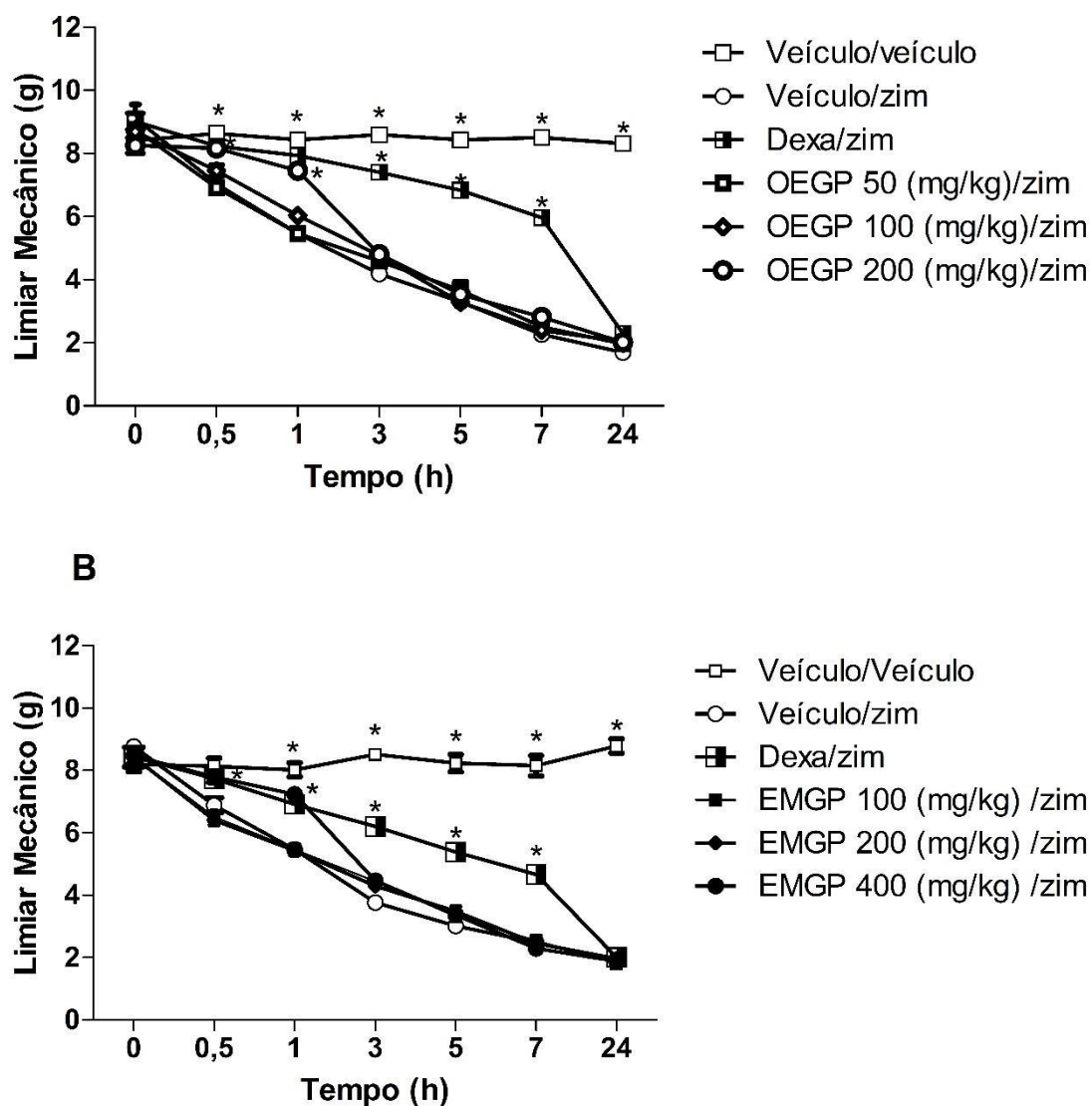


Figura 4 - Efeito do tratamento com óleo essencial (painel A) e extrato metanólico (painel B) de *G. platanifolia* na hipernocicepção articular induzida por zimosan. Os camundongos foram pré-tratados por via intraperitoneal com OEGP (50, 100 e 200 mg kg⁻¹), ou veículo, 30 minutos antes da injeção tibiortarsal com zimosan (30µg/5µL), ou EMGP (100, 200 e 400 mg kg⁻¹) ou veículo, por via oral 1h antes da injeção tibiortarsal com zimosan (30µg/5µL). O comportamento nociceptivo articular foi avaliado antes e até 24 horas após a injeção intra-articular. Os resultados são expressos como média ± E.P.M; de 6 animais por grupo. *Significativamente diferente quando comparado ao grupo veículo/zimosan (p<0,05); determinado por ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Bonferroni.

3.7 Teste de campo aberto

Os depressores do sistema nervoso central (neurolépticos, benzodiazepínicos, barbitúricos e etanol), assim como os relaxantes musculares, podem reduzir a coordenação motora em animais (30, 31). Neste estudo foram utilizados métodos (contorções abdominais, teste da formalina, artrite induzida por zimosan e placa quente) para avaliar a atividade antinociceptiva, que automaticamente requer respostas motoras dos animais. Portanto, conclusões precipitadas poderiam ser tiradas do efeito antinociceptivo observado caso houvesse perda de coordenação motora nos animais devido à sedação e/ou relaxamento muscular. Para descartar essa possibilidade foram realizados o teste do cilindro giratório (rota-rod) e o teste de campo aberto.

O teste de campo aberto é amplamente utilizado para avaliar o estado espontâneo de atividade motora de animais (32) e foi aqui utilizado para determinar se OEGP ou EMGP podem induzir comprometimento motor e, assim, interferir na avaliação do comportamento de nocicepção. Neste modelo, OEGP e EMGP não causaram efeito significativo (Figura 5) em comparação ao grupo controle. Entretanto, o midazolam apresentou redução significativa ($p < 0,05$). O espatulenol, principal composto do OEGP, também não reduz a atividade locomotora em testes de campo aberto (29). Estes dados permitem-nos concluir que OEGP e EMGP não interferem no comportamento locomotor durante experimentos de nocicepção.

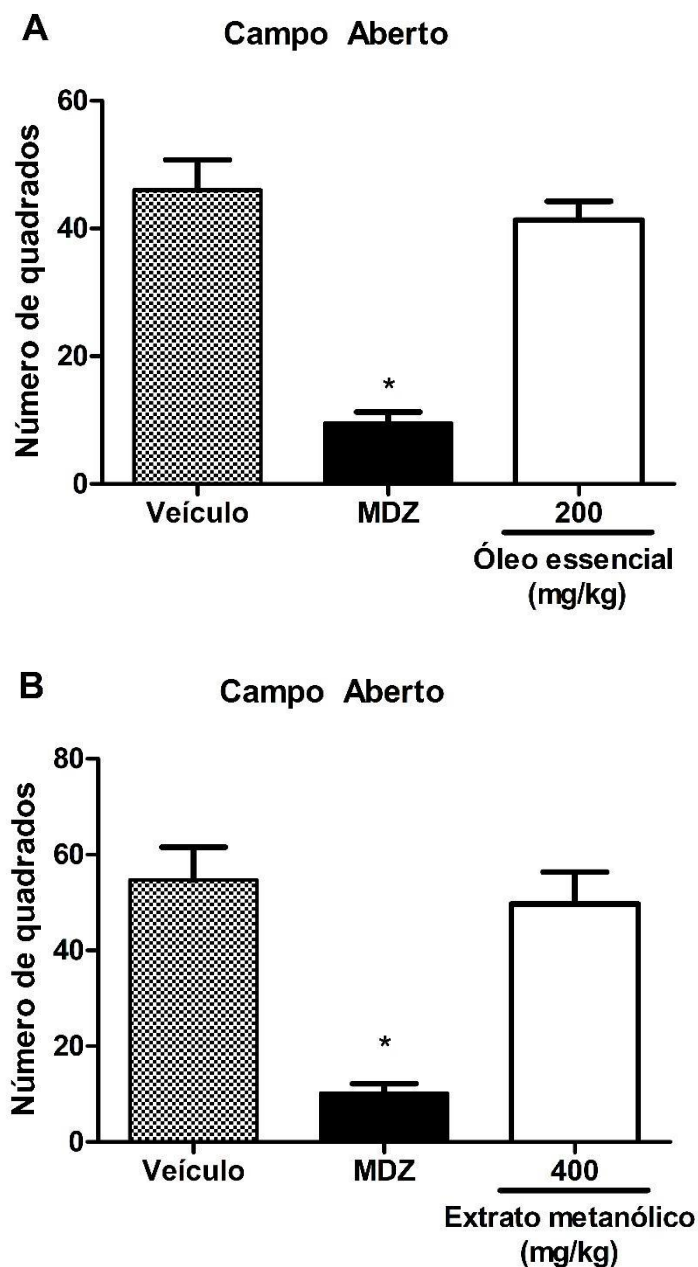


Figura 5 – Efeito do tratamento com OEGP (painel A) e EMGP (painel B) no teste de campo aberto. Os animais foram tratados com OEGP (200 mg kg⁻¹) ou veículo por via intraperitoneal, 30 minutos antes do início do teste, ou EMGP (400 mg kg⁻¹) ou veículo, por via oral 1h antes do início do teste. Midazolam (10 mg kg⁻¹, s.c.) foi o fármaco de referência. Os dados são expressos como média ± E.P.M; n = 6 animais por grupo. *Significativamente diferente do grupo controle (p<0,05), conforme determinado pela ANOVA seguida do teste de Bonferroni.

3.8 Teste de cilindro giratório (rota-rod)

O teste rota-rod foi proposto por Rocha et al (15) e consiste em uma metodologia utilizada para triagem de fármacos com possível atividade neurotóxica/miorrelaxante. Esse método permite avaliar a especificidade da ação antinociceptiva de drogas, verificando se essas substâncias promovem incoordenação motora nos animais, seja por meio de sedação e/ou relaxamento muscular, através do tempo que os animais permanecem na barra giratória (32, 33). Os tratamentos com OEGP (200 mg kg⁻¹) e EMGP (400 mg kg⁻¹) não afetaram o desempenho motor dos animais no teste do cilindro giratório. Midazolam (10 mg kg⁻¹), droga de referência, reduziu significativamente o tempo de permanência dos animais no cilindro giratório. Portanto, este resultado confirma que o tratamento com óleo essencial não promoveu alterações na função motora dos animais.

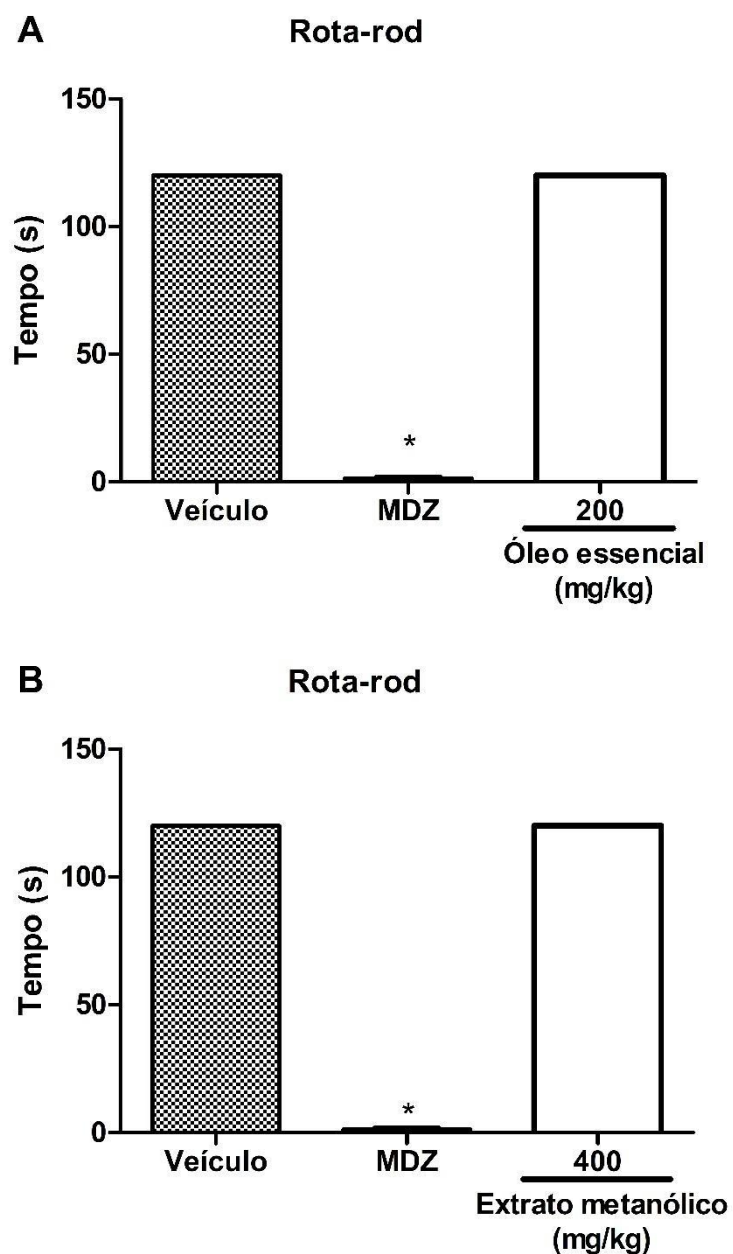


Figura 6 – Efeito do tratamento com OEGP (painel A) e EMGP (painel B) no teste rota-rod. Os animais foram tratados com OEGP (200 mg kg⁻¹) ou veículo por via intraperitoneal, 30 minutos antes do início do teste, ou EMGP (400 mg kg⁻¹) ou veículo, por via oral 1h antes do início do teste. Midazolam (10 mg kg⁻¹, s.c.) foi o fármaco de referência. Os dados são expressos como média ± E.P.M; n = 6 animais por grupo. *Significativamente diferente do grupo controle (p<0,05), conforme determinado pela ANOVA seguida do teste de Bonferroni.

4. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho mostram importante ação antinociceptiva tanto do óleo essencial quanto do extrato metanólico, obtido de *Gymneia platanifolia*, em modelos experimentais de dor. O espatulenol (31,1%) e o óxido de cariofileno (10,37%) foram identificados como os principais compostos do óleo essencial. Mais estudos são necessários para identificar possíveis mecanismos de ação.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Gostaríamos também de agradecer à Universidade Estadual de Feira de Santana, e em especial ao Biotério Central, pela estrutura disponibilizada.

REFERÊNCIAS

1. M. Bekut, S. Brkić, N. Kladar, G. Dragović, N. Gavarić, B. Božin. *Potential of selected Lamiaceae plants in anti(retro)viral therapy*. Pharmacological Research, **133**, 301-314, (2018). doi: 10.1016/j.phrs.2017.12.016. Epub 2017 Dec 16.
2. R.M. Harley; J.F.B. Pastore. *A generic revision and new combinations in the Hyptidinae (Lamiaceae), based on molecular and morphological evidence*. Phytotaxa, **58**, 1-55, (2012). doi: <https://doi.org/10.11646/phytotaxa.58.1.1>
3. A.B.L. Silva; K.S. Dias; M.S. Marques; A.M. Lucchese, et al. *Óleos essenciais do gênero Hyptis da região do semi-árido da Bahia*. In: III Simpósio Brasileiro de Óleos Essenciais, Campinas. Livro de Resumos do III Simpósio Brasileiro de Óleos Essenciais. Campinas: Instituto Agrômico de Campinas, **118**, (2005).
4. A.M. Lucchese. et al. *Comparação da atividade antimicrobiana de óleos essenciais extraídos de espécies do semi-árido baiano*. In: Reunião anual da sociedade brasileira de química, Águas de Lindóia. Anais... Águas de Lindóia: Sociedade Brasileira de Química, **285**, (2006).
5. U. S. SANTOS. *Avaliação do potencial antimicrobiano de Eplingiella fruticosa, Gymneia platanifolia e Medusanthus martiusii (Lamiaceae) contra micro-organismo de interesse agrícola*. 99f. Dissertação (Mestrado Acadêmico em Recursos Genéticos Vegetais) - Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2016.
6. S. Teles, J.A. Pereira, L.M. de Oliveira, R. Malheiro, A.M. Lucchese, F. Silva, *Lippia origanoides H.B.K. essential oil production, composition, and antioxidant activity under organic and mineral fertilization: Effect of harvest moment*, Industrial Crops and Products, **60**, 217-225, (2014). doi: 10.1016/j.indcrop.2014.06.008
7. R.B. Adams. *Identification of essential oil components by gas chromatograph/mass spectrometry*. Carol Stream: Allured. **804**, (2007)
8. A. Martin, P. Bustamante, *Physical pharmacy*. Philadelphia: Lea e Febiger, **4**, (1993).
9. J.P.V. Leite, *Fitoterapia: Bases científicas e tecnológicas*. São Paulo: Atheneu, **328**, (2009).
10. M. Zimmermann. *Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals*. Pain, **16**, 109-110, (1983). doi: 10.1016/0304-3959(83)90201-4

11. G.L.V. Junior, F.O. de Lima, E.F. Boffo, J.D. Santos, B.C. da Silva, S.A. de Assis. *Extraction optimization and antinociceptive activity of (1→3)-β-d-glucan from Rhodotorula mucilaginosa*. Carbohydrate Polymers, **25**, 293-9, (2014). doi: 10.1016/j.carbpol.2014.01.064

12. H.R. Arias Cardona; Cerqueira da Silva, B.; de Lima, F.O.; Andrade Leite, F.H.; de Souza, B.C.; Brandão, H.N.; David, J.M.; Alves, C.Q.; Kijjoa, A. *Hydroxytakakiamide and Other Constituents from a Marine Sponge-Associated Fungus Aspergillus fischeri MMERU23, and Antinociceptive Activity of Ergosterol Acetate, Acetylazonalenin and Helvolic Acid*. Marine Drugs, **22**, 97, (2024). doi: 10.3390/md22030097

13. G. WOOLFE, A. D. MACDONALD, *The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (demerol)*. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, **80**, 300-307, (1944).

14. A.T. Guerrero, W.A.J. Verri, T.M. Cunha, T.A. Silva, F.A. Rocha, S.H. Ferreira, F.Q. Cunha, C.A. Parada. *Hypernociception elicited by tibio-tarsal joint flexion in mice: a novel experimental arthritis model for pharmacological screening*. Pharmacology Biochemistry and Behavior. **84**, 244-51, (2006). doi: 10.1016/j.pbb.2006.05.008

15. J.L.C. da Rocha, R.F.A.T. Calumby, D.F. da Silva, H.N. Brandão, C.F. Villarreal, F.O. de Lima. *Evaluation of Biological Activity of Polygala boliviensis in Experimental Models*. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, **18**, 793-802, (2019). doi: 10.22037/ijpr.2019.1100655

16. K. Koba , C. Raynaud , J. Millet , J.-P. Chaumont & K. Sanda. *Chemical Composition of Hyptis pectinata L., H. lanceolata Poit , H. suaveolens (L) Poit and H. spicigera Lam. Essential Oils from Togo*, Journal of Essential Oil Bearing Plants, **10**, 357-364, (2007). doi: 10.1080/0972060X.2007.10643567

17. M.N.I. Bhuiyan, J. Begum, N.C. Nandi. *Chemical component studies on the leaf and inflorescence essential oil of Hyptis brevipes (Poit.)*. Journal of Medicinal Plants Research. **4**, 2128-2131, (2010).

18. C.R.P. Franco, P.B. Alves, D.M. Andrade, H.C.R. de Jesus, E.J.S. Silva, E.A.B. Santos, A.R. Antonioli, L.J. Quintans-Júnior. *Essential oil composition and variability in Hyptis fruticose*. Brazilian Journal of Pharmacognosy. **21**, 24-32, (2011). doi: 10.1590/S0102-695X2011005000034

19. J.W.A. Bezerra, A.R. Costa, M.A.P. da Silva, M.I. Rocha, A.A. Boligon, J.B.T. da Rocha, L.M. Barros, J.P. Kamdem. *Chemical composition and toxicological evaluation of Hyptis suaveolens (L.) Poiteau (LAMIACEAE) in Drosophila melanogaster and Artemia salina*. South African Journal of Botany, **113**, 437–442, (2017). doi: 10.1016/j.sajb.2017.10.003

20. M. Barrot, *Tests and models of nociception and pain in rodents*. Neuroscience, **211**, 39–50 (2012). doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.12.041
21. M.J. Chavan, P.S. Wakte, D.B. Shinde. *Analgesic and anti-inflammatory activity of Caryophyllene oxide from Annona squamosa L. bark*. Phytomedicine. **17**, 149-51, (2010). doi: 10.1016/j.phymed.2009.05.016.
22. F.V. Hassani, R. Rezaee, H. Sazegara, M. Hashemzaei, K. Shirani and G. Karimi, *Effects of silymarin on neuropathic pain and formalin-induced nociception in mice*. Iranian Journal of Basic Medical Sciences, **18**, 715-720 (2015).
23. S. Hunskaar, K. Hole, *The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain*. Pain, **30**, 103-114, (1987). doi: 10.1016/0304-3959(87)90088-1
24. H.G. Schaible, A. Ebersberger, G.S. Von Banchet. *Mechanisms of pain in arthritis*. Annals of the New York Academy of Sciences, **966**, 343-354, (2002). doi: 10.1111/j.1749-6632.2002.tb04234.x
25. H.G. Schaible, B.D. Grubb. *Afferent and spinal mechanisms of joint pain*. Pain. **55**, 5-54, (1993). doi: 10.1016/0304-3959(93)90183-P
26. J.S.A. Júnior, É.B.S. Silva, T.M.P. Moraes, A.A.M. Kasper, A. Sartoratto, L.C. Baratto, E.C.P. de Oliveira, E. Oliveira, L.E.S. Barata, A.H.H. Minervino, W.P. Moraes. *Anti-Inflammatory Potential of the Oleoresin from the Amazonian Tree Copaifera reticulata with an Unusual Chemical Composition in Rats*. Veterinary Sciences. **10**, 320, (2021). doi: 10.3390/vetsci8120320.
27. J. C. Silva, S.R.G.L. Saraiva, R.G.O. Júnior, J.R.G.S. Almeida, *Experimental models for evaluation of antinociceptive activity of natural products: a review*. Brazilian of Journal of Pharmacy, **94**, 18-23, (2013)
28. J.J. McDougall, S.E. Larson, *Nociceptin/orphanin FQ evokes knee joint pain in rats via a mast cell independent mechanism*. Neuroscience Letters. **398**, 135-138, (2006). doi: 10.1016/j.neulet.2005.12.066.
29. E. D. Santos, J.A.S. Radai, K.F. do Nascimento, A.S.N. Formagio, N. B. de Matos, E.B. Ziff, E.K. Castelon, C.A.L. Kassuya. *Contribution of spathulenol to the anti-nociceptive effects of Psidium guineense*. Nutritional neuroscience, **25**(4):812-822, (2022). doi: 10.1080/1028415X.2020.1815330
30. H.G. Schaible, A. Ebersberger, G.S. Von Banchet. *Mechanisms of pain in arthritis*. Annals of the New York Academy of Sciences, **966**, 343-354, (2002). doi: 10.1111/j.1749-6632.2002.tb04234.x

31. H.G. Schaible, B.D. Grubb. *Afferent and spinal mechanisms of joint pain*. Pain. **55**, 5-54, (1993). doi: 10.1016/0304-3959(93)90183-P
32. H. Kuribara, Y. Higuchi, S. Tadokoro. *Effects of central depressants on rota-rod and traction performances in mice*. Japanese Journal of Pharmacology. **27**, 117-26, (1977). doi: 10.1254/jjp.27.117.
33. T.C.S. Maiolini, K.J. Nicácio, W. Rosa, D.O. Miranda, M.F.C. Santos, P.C.P. Bueno, J.H.H. Lago, P. Sartorelli, D.F. Dias, D.A. Chagas de Paula, M.G. Soares. *Potential anti-inflammatory biomarkers from Myrtaceae essential oils revealed by untargeted metabolomics*. Natural Product Research. **24**,1-8, (2023). doi: 10.1080/14786419.2023.2283758.

CAPÍTULO 2 – AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DE
CUMARINAS ISOLADAS DA *Polygala boliviensis*

Antinociceptive effects and *in silico* analysis of poligalen and auraptene isolated from *Polygala boliviensis* A. W. Been (Polygalaceae)

Artigo submetido ao periódico: Pharmaceuticals

Fator de impacto (JCR) 2024: 4.6

Antinociceptive effects and *in silico* analysis of poligalen and auraptene isolated from *Polygala boliviensis* A. W. Been (Polygalaceae)

Bruno C. da Silva ¹, Larissa Oliveira Dourado ², Manoelito C. dos Santos Junior ², Danielle F. da Silva ^{3*}, Clayton Q. Alves ⁴, Hugo N. Brandão ³, Flávia O. de Lima ^{1*}

¹ Laboratório de Dor e Inflamação, Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, UEFS, Feira de Santana 44.036.900, BA, Brasil; farma.bruno@yahoo.com.br (B. C. d. S.) flavia_lima2000@yahoo.com.br (F.O.d.L.)

² Laboratório de Modelagem Molecular, LMM, Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, UEFS, Feira de Santana 44.036.900, BA, Brasil; manoelito@uefs.br (M.C.d.S.J.)

³ Laboratório de Extração, Departamento de Saúde, Universidade Estadual de Feira de Santana, UEFS, Feira de Santana 44.036.900, BA, Brasil; dfsilva@uefs.br (D.F.d.S.)

⁴ Laboratório de Pesquisa em Química - LABQUIM, Departamento de Ciências Exatas, Universidade Estadual de Feira de Santana, UEFS, Feira de Santana 44.036.900, BA, Brasil; cqalves@uefs.br (C.Q.A)

* Correspondência: dfsilva@uefs.br (D.F.d.S.); flavia_lima2000@yahoo.com.br (F.O.d.L.); Tel.: +55-75-991261191 (D.F.d.S.); +55-71-996150580 (F.O.d.L.)

RESUMO

Este estudo avaliou a atividade antinociceptiva e *in silico* de dois compostos isolados de *Polygala boliviensis* A. W. Been, poligaleno (POLI) e aurapteno (AURA). Ambos foram submetidos a testes farmacológicos em camundongos Swiss machos. A administração oral de POLI ou AURA reduziu significativamente as contorções abdominais induzidas por ácido acético, a segunda fase da nocicepção induzida por formalina e a hipernocicepção mecânica no modelo de artrite induzida por zimosan ($p < 0,05$). Entretanto, a administração oral de POLI ou AURA não alterou o limiar de resposta ao estímulo térmico no teste da placa quente, indicando ausência de ação central. Também não houve alteração no comportamento exploratório ou comprometimento motor dos animais, avaliados nos testes de campo aberto e rota-rod, respectivamente. Com base nesses resultados, rotinas de acoplamento molecular foram realizadas com as enzimas ciclooxigenase 1 e 2 (COX-1 e COX-2), mieloperoxidase (MPO), c-Jun N-Terminal Protein Kinase 1 (JNK1), NF-kappaB (NF-κB) e MAP kinase ERK2 (ERK2) para avaliar o padrão de interações intermoleculares. O acoplamento mostrou que os compostos indicam a relevância das interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio, que são importantes para o reconhecimento molecular no sítio ativo das enzimas. Nossos resultados demonstram a importante atividade antinociceptiva de POLI e AURA nos modelos animais de dor, possivelmente envolvendo as vias periféricas da cascata inflamatória. Além disso, a técnica de acoplamento molecular identificou a afinidade desses compostos por COX-1, COX-2, MPO, JNK1, NF-κB e ERK2.

Palavras-chave: dor; antinocicepção; *Polygala boliviensis*; poligaleno; aurapteno; *in vivo*; *in silico*

1. INTRODUÇÃO

A dor é comum em muitas condições médicas na prática contemporânea, afetando, por exemplo, aproximadamente 20,5% dos cidadãos americanos diariamente. Com estatísticas tão alarmantes, a dor surgiu como um problema global de saúde pública e uma das principais causas de incapacidade em todo o mundo [1]. À medida que a expectativa de vida aumenta e as doenças crônicas se tornam mais prevalentes, espera-se um aumento anual na incidência de dor associada, especialmente entre os idosos, cujo tratamento também é mais complexo [2, 3]. Diante desse cenário, é essencial que as pesquisas se concentrem no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos que sejam mais eficazes, tenham menos efeitos colaterais e custos mais acessíveis, visando melhorar a qualidade de vida da população [4, 5]. Historicamente, o uso de plantas com propriedades analgésicas sempre esteve presente na medicina tradicional desde a antiguidade, e seus estudos têm sido grandes aliados na descoberta de novas opções terapêuticas para combater a dor [6, 7]. Dentro deste contexto, espécies vegetais pertencentes ao gênero *Polygala* L. (Polygalaceae) têm sido alvo de considerável interesse devido às suas propriedades farmacológicas, que incluem ação expectorante, sedativa, antipsicótica, antifúngica e analgésica. Além disso, estudos fitoquímicos indicam a presença de uma variedade de classes de metabólitos secundários, que provavelmente apresentam atividades biológicas significativas [8]. Estudos anteriores conduzidos por alguns pesquisadores documentaram a ocorrência de variadas classes de metabólitos secundários e suas atividades biológicas em espécies de *Polygala* [9-11]. *Polygala boliviensis* A. W. Been, comumente chamada de "arrozinho", é uma planta herbácea de pequeno porte, atingindo entre 18 e 35 centímetros de altura, com caule ramificado logo acima da base e coberto por tricomas falciformes. As folhas são alternas na porção superior e verticiladas na porção basal, sendo sésseis ou curto-pecioladas, membranáceas, lineares a linear-lanceoladas, glabras e puntiformes, com pico agudo e base cuneiforme. As inflorescências são racemosas, espiciformes, laxifloras, medindo de 2 a 14 cm de comprimento, com ráquis e pedúnculo também cobertos por tricomas falciformes, e a corola varia do rosado esbranquiçado ao violeta. Esta espécie é encontrada na Bolívia e no Brasil [12].

No contexto da medicina popular, a infusão ou decocção das folhas de *P. boliviensis* em água é utilizada como diurético, emético e expectorante e no combate à blenorragia. Adicionalmente, as raízes são comidas e colocadas acima da área afetada para tratar picadas de cobra. Além desses usos medicinais, há registros que indicam suas propriedades antibacterianas e a capacidade de inibir a formação de biofilmes [13]. Rocha et al. identificaram [14] em seus estudos, pela primeira vez, as propriedades antinociceptivas e antiedematogênicas de *P. boliviensis*. Ainda neste sentido, Silva et al. [15] isolaram o poligaleno do extrato clorofórmico de *P. boliviensis*. Foi constatado que o poligaleno possui efeitos imunomoduladores, reduzindo os níveis de IL-6 e TNF e potencializando a ativação do NF-κB após estimulação com LPS em macrófagos peritoneais. Portanto, o presente estudo foi realizado para investigar a atividade antinociceptiva de duas cumarinas isoladas do extrato clorofórmico de *P. boliviensis*, poligaleno e aurapteno.

2. RESULTADOS

2.1 Obtenção das Cumarinas

As cumarinas isoladas foram identificadas como aurapteno [16] e poligaleno [15]. Aurapteno foi encontrado como um pó branco com um peso molecular (PM) de 298 Da e fórmula molecular $C_{19}H_{22}O_3$ (Figura 1), enquanto poligaleno foi isolado como um cristal branco com um PM de 260 Da e fórmula molecular $C_{14}H_{12}O_5$ (Figura 2). Listadas abaixo estão as estruturas moleculares bidimensionais para análise posterior de encaixe molecular.

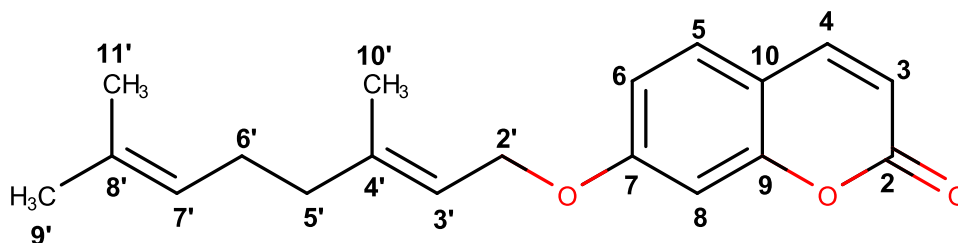


Figura 1. Estrutura química do aurapteno isolado de *Polygala boliviensis*.

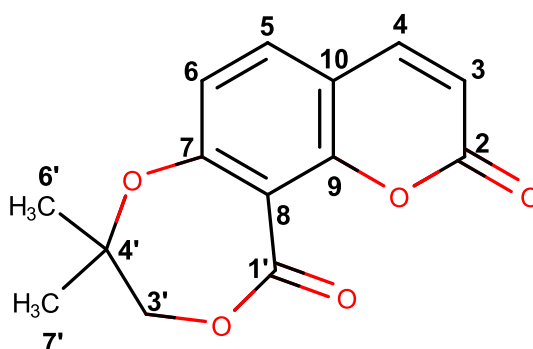


Figura 2. Estrutura química do poligaleno isolado de *Polygala boliviensis*.

2.2 Efeito antinociceptivo no teste de contorção abdominal induzida por ácido acético

A atividade antinociceptiva de POLI e AURA foi inicialmente avaliada no teste de contorção abdominal induzida por ácido acético. Após a administração intraperitoneal do agente nociceptivo (ácido acético) em camundongos, os animais tratados pela administração intraperitoneal de POLI e AURA em doses de 90 mg/kg produziram uma redução significativa no número de contorções abdominais induzidas por este agente algésico ($p < 0,05$). A morfina (5 mg/kg) usada como droga de referência também inibiu significativamente o número de contorções abdominais ($p < 0,05$) (Figura 3).

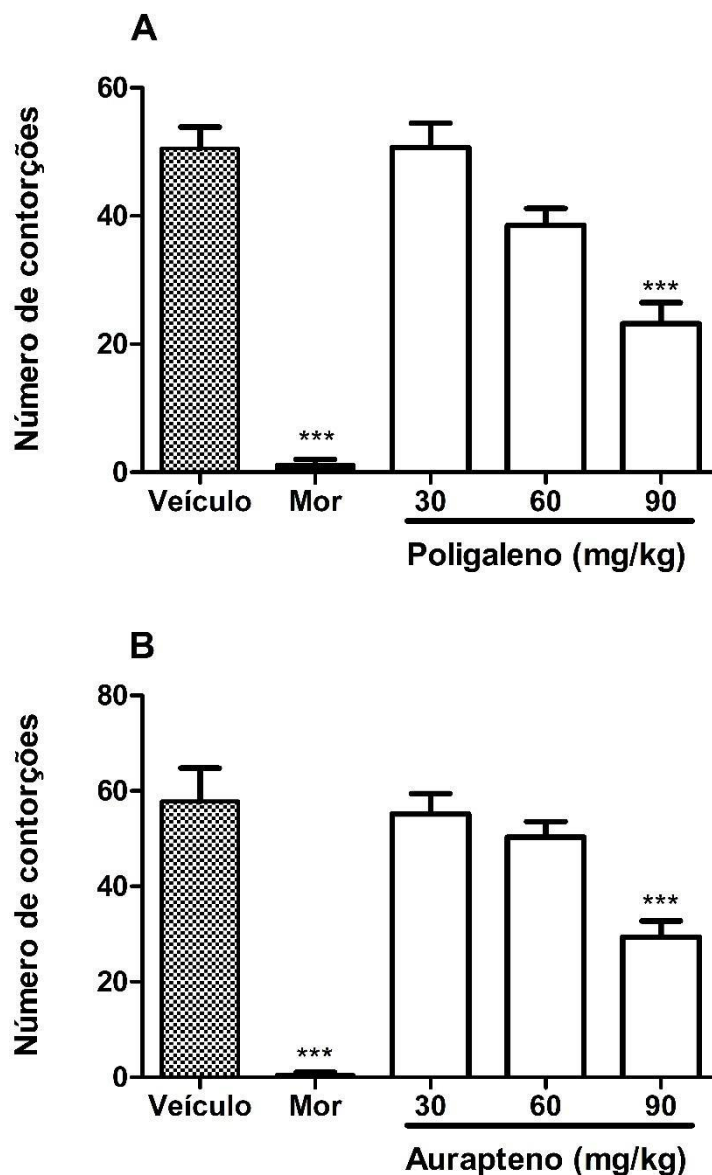


Figura 3 – Os painéis A e B representam o efeito da administração de poligaleno (POLI) e aurapteno isolados de *P. boliviensis* nas contrações abdominais induzidas por ácido acético em camundongos. Os camundongos foram tratados com POLI (30, 60 e 90 mg/kg) ou AURA (30, 60 e 90 mg/kg) ou veículo por via oral 60 minutos antes de ácido acético a 0,8%. A morfina (Mor; 5 mg/kg, s.c.) foi utilizada como fármaco de referência, sendo administrada por via subcutânea 40 minutos antes do ácido acético. Os dados são expressos como média $\pm$ E.P.M; $n = 6$ camundongos por grupo. *** Significância estatística em relação ao grupo controle negativo ($p < 0,05$), conforme determinado por ANOVA seguida do teste de Bonferroni.

2.3 Efeito antinociceptivo no teste da formalina

A injeção intraplantar de formalina promoveu uma resposta bifásica, caracterizada pela presença de duas fases distintas de nocicepção: a primeira, denominada fase neurogênica, e a posterior, denominada fase inflamatória (Figura 4). Na fase de dor neurogênica ou fase inicial (0-5 min), pode-se notar que os pré-tratamentos com POLI ou AURA (30, 60 e 90 mg/kg) não inibiram o comportamento nociceptivo dos animais (Figura 4A e C). Entretanto, na segunda fase (15-30 min), o pré-tratamento com POLI ou AURA (90 mg/kg) foi capaz de inibir significativamente o comportamento nociceptivo ($p < 0,05$) (Figura 4B e D). A morfina (5 mg/kg, i.p.), droga de referência, apresentou ação antinociceptiva em ambas as fases do teste da formalina.

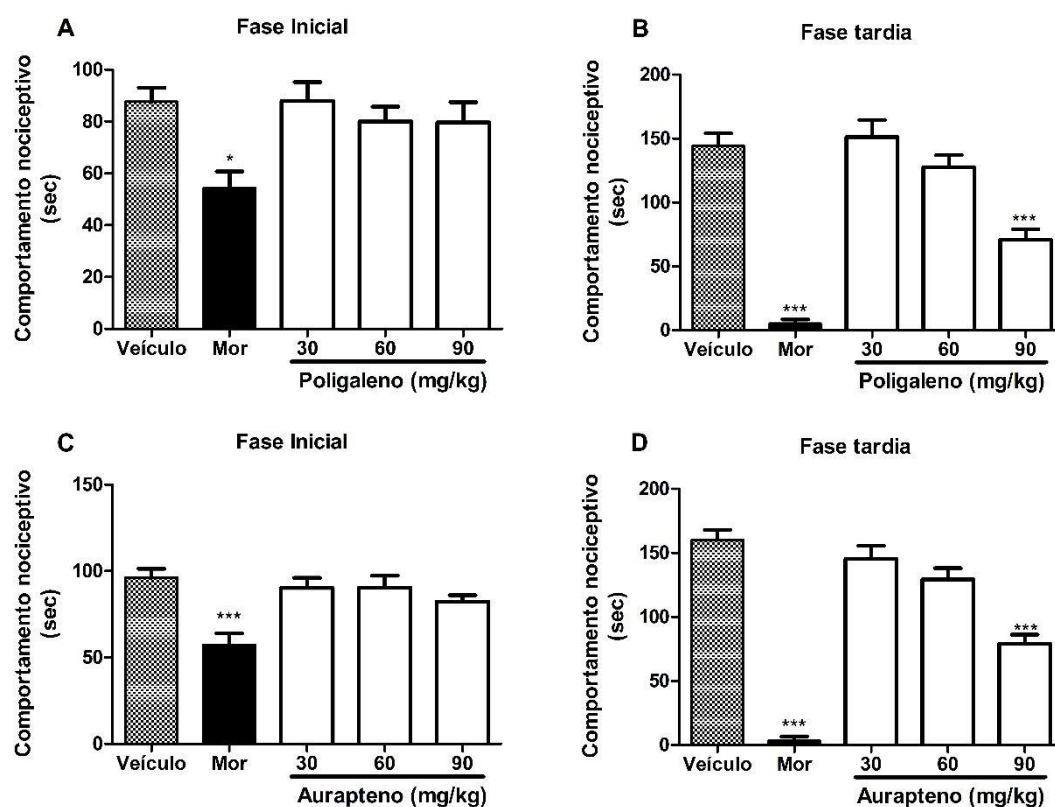


Figura 4 - Efeito do tratamento com poligaleno (painéis A e B) e aurapteno (painéis C e D) obtidos de *P. boliviensis* na nocicepção induzida pela formalina. Os camundongos foram tratados com POLI (30, 60 e 90 mg/kg) ou AURA (30, 60 e 90 mg/kg) ou veículo, por via oral 60 minutos antes da formalina. Morfina (Mor; 5mg/kg, s.c.) foi utilizada como fármaco de referência, sendo administrada por via subcutânea 40 minutos antes da injeção de formalina. Os dados são expressos como média $\pm$ E.P.M; n = 6 animais por grupo. *** Significância estatística em relação ao grupo controle negativo ($p < 0,05$), conforme determinado pela ANOVA seguida do teste de Bonferroni.

2.4 Teste de placa quente

Os resultados representados na Figura 5 demonstram que o pré-tratamento com POLI ou AURA em diferentes doses (30, 60 e 90 mg/kg, i.p.) não alterou o tempo de latência de resposta ao estímulo térmico no teste da placa quente nos tempos de 0,5, 1,0, 3,0 e 5,0h após os tratamentos. Entretanto, o tratamento com morfina (agonista não seletivo do receptor opioide, 5 mg/kg, s.c.) aumentou o período de latência dos animais 0,5 e 1h após a administração ($p < 0,001$).

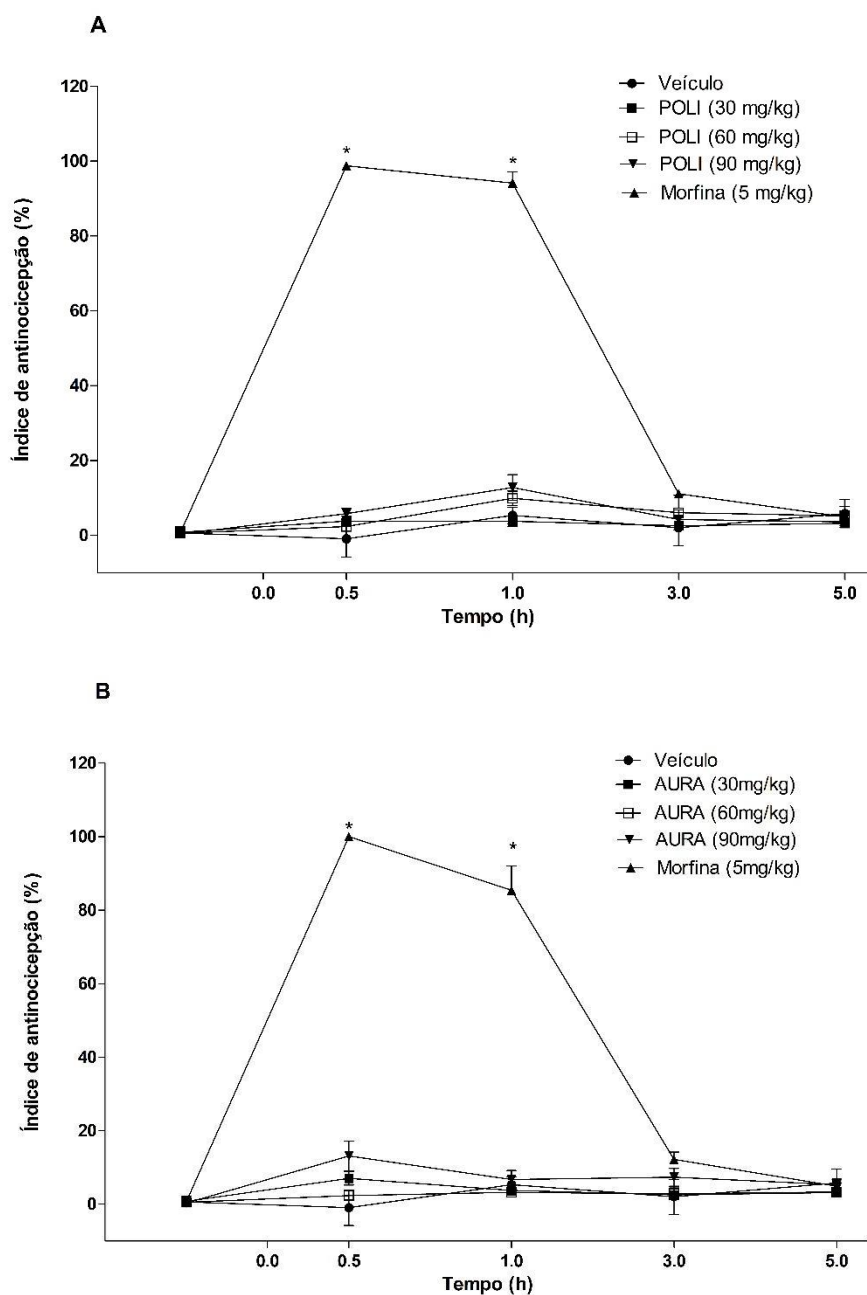


Figura 5 - Efeito do tratamento com poligaleno (painel A) e aurapteno (painel B) obtidos de *P. boliviensis* no teste da placa quente em camundongos. A figura mostra dados de latência (reflexo nociceptivo) representados como índice de antinociceção. Para avaliar a evolução temporal do efeito antinociceptivo, foram analisados os limiares térmicos nociceptivos até 5 horas após a administração oral de POLI (30, 60 e 90 mg/kg, i.p.) ou veículo, ou de AURA (30, 60 e 90 mg/kg, i.p.) ou veículo. Morfina (5 mg/kg s.c.) foi o fármaco de referência. Os dados são expressos como média $\pm$ E.P.M; $n = 6$ camundongos por grupo. * Significativamente diferente do grupo controle ($p < 0,001$) ANOVA duas vias seguida do teste de Bonferroni.

2.5 Efeito antinociceptivo na hipernocicepção articular induzida por zimosan

A atividade antinociceptiva de POLI e AURA foi avaliada no modelo de artrite induzida por zimosan. A injeção intra-articular com zimosan promoveu redução significativa ($p < 0,05$) no limiar mecânico em comparação ao grupo solução salina (Figura 6). Os tratamentos orais com POLI (90 mg/kg) ou AURA (90 mg/kg) e POLI + AURA (30+30 mg/kg) reduziram a hipernocicepção articular induzida por zimosan na primeira hora ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo veículo (veículo/zimosan). Dexametasona (2 mg/kg, s.c.), o fármaco de referência, também produziu aumento no limiar mecânico, com o efeito permanecendo até a sétima hora quando comparado ao grupo controle negativo ($p < 0,05$).

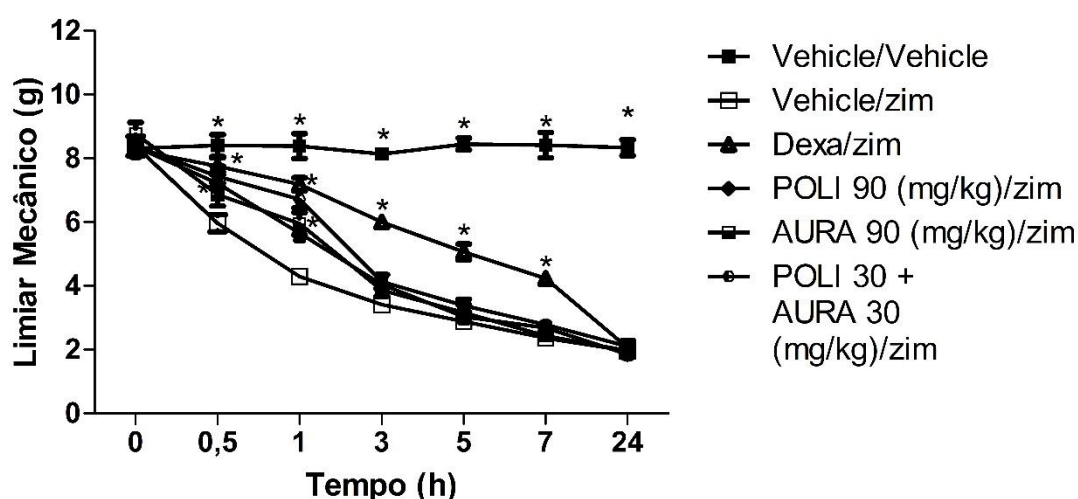


Figura 6 – Efeito da administração oral de poligaleno (POLI) e aurapteno (AURA) isolados de *P. boliviensis* na hipernocicepção articular induzida por zimosan. Os camundongos foram pré-tratados por via oral com POLI (90mg/kg), ou AURA (90mg/kg), ou POLI + AURA (30+30 mg/kg), ou veículo, 60 minutos antes da injeção tibiotarsal com zimosan (30µg/5µL). O comportamento nociceptivo articular foi avaliado antes e até 24 horas após a injeção intra-articular. Foi utilizada como fármaco de referência a dexametasona, administrada por via intraperitoneal 30 minutos antes. Os resultados são expressos como média $\pm$ E.P.M.; $n = 6$ camundongos por grupo. * Significativamente diferente quando comparado ao grupo veículo/zimosan ($p < 0,05$); determinado por ANOVA de duas vias seguida pelo teste de Bonferroni.

2.6 Teste de campo aberto

A administração oral de POLI ou AURA (90 mg/kg) não alterou significativamente o número de quadrados percorridos pelos camundongos em relação ao grupo controle, tratado com veículo. O diazepam (10 mg/kg, s.c.) apresentou redução significativa no número de quadrados percorridos no campo aberto ($p < 0,05$) (Figura 7).

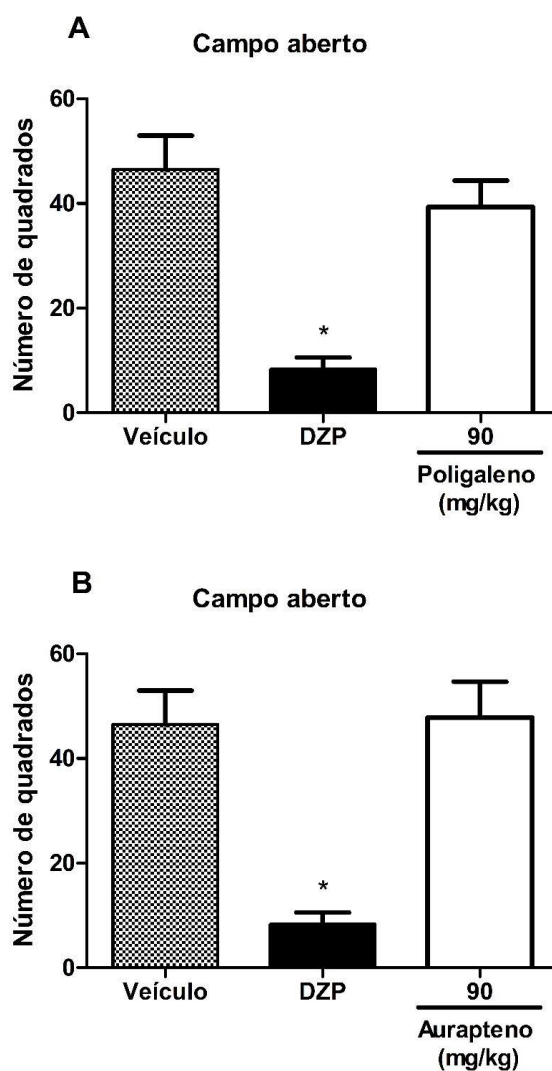


Figura 7 – Efeito da administração oral de poligaleno (painel A) e aurapteno (painel B) isolados de *P. boliviensis* no teste de campo aberto em camundongos. Os animais foram tratados com poligaleno (90mg/kg), ou aurapteno (90mg/kg) ou veículo por via oral, 60 minutos antes do início do teste. Diazepam (10mg/kg, s.c.) foi o fármaco de referência. Os dados são expressos como média $\pm$ E.P.M; $n = 6$ animais por grupo. *Significativamente diferente do grupo controle ($p < 0,05$), conforme determinado pela ANOVA seguida do teste de Bonferroni.

2.7 Rota-rod

A função motora dos animais foi avaliada no teste rota-rod, realizado 60 min após a administração oral da maior dose utilizada nos testes para avaliar a ação do POLI ou AURA (90 mg/kg). Observou-se que os grupos tratados não alteraram significativamente o tempo gasto pelos animais no rota-rod, em comparação aos animais que receberam pré-tratamento com diazepam (10 mg/kg), o controle positivo ($p < 0,05$) (Figura 8).

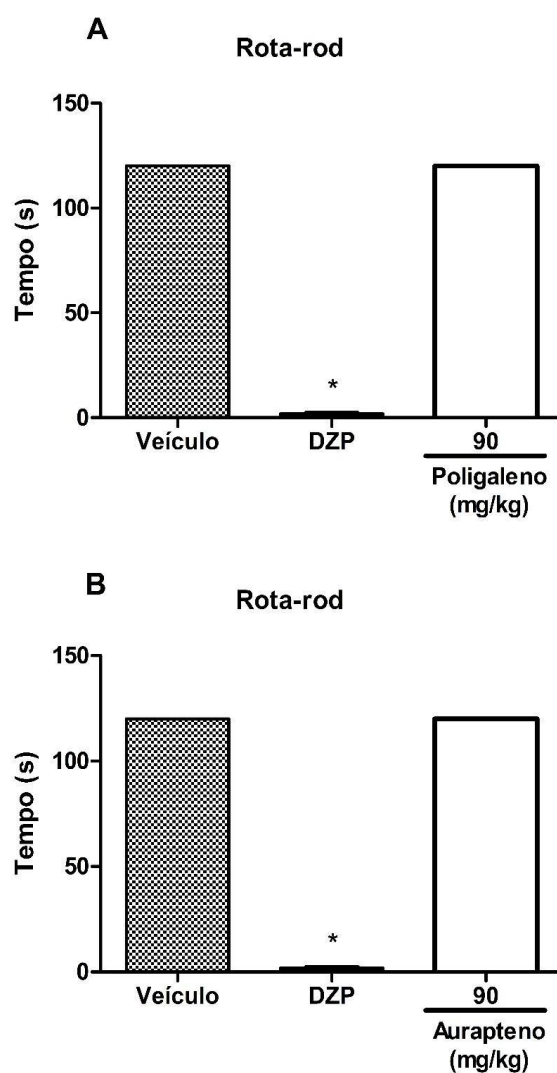


Figura 8 – Efeito da administração oral de poligaleno (painel A) e aurapteno (painel B) isolados de *P. boliviensis* no teste rota-rod em camundongos. Os animais foram tratados com poligaleno (90mg/kg), ou aurapteno (90mg/kg) ou veículo por via oral, 60 minutos antes do início do teste. Diazepam (10mg/kg, s.c.) foi o fármaco de referência. Os dados são expressos como média $\pm$ E.P.M.; $n = 6$ animais por grupo. * Significativamente diferente do grupo controle ($p < 0,05$), conforme determinado pela ANOVA seguida do teste de Bonferroni.

2.8 Seleção e obtenção de estruturas cristalográficas para acoplamento molecular

Como estudos anteriores *in vivo* envolvem a participação de diversas vias de sinalização da dor, foram selecionados seis alvos farmacológicos que atuam direta ou indiretamente na formação do estímulo doloroso. A análise do acoplamento molecular nesses alvos permite, ao menos em parte, a visualização de como POLI e AURA interagem em nível molecular, fornecendo informações valiosas sobre os possíveis mecanismos que governam a resposta biológica encontrados em testes *in vivo*. Os melhores alvos selecionados para o estudo foram os códigos PDB: 2AYL (COX-1), 4PH9 (COX-2), 4C1M (MPO), 3ELJ (JNK1), 4G3F (NF- κ B) e 5LCJ (ERK1/2), pois apresentaram os melhores valores de resolução. A estrutura cristalográfica 2AYL é proveniente do organismo *Ovis aires*, com resolução de 2Å e, além disso, possui identidade de sequência 93% semelhante ao organismo humano [17] e apresenta interações intermoleculares com seu ligante cristalográfico de natureza hidrofóbica com resíduos VAL349, LEU352, TYR355, LEU359, TYR385, TRP387, ILE523 e ALA527, ligação de hidrogênio com TYR355 e interação eletrostática com ARG120 (Figura 9a). A estrutura 4PH9 vem do organismo *Mus musculus* e tem um valor de resolução de 1,81 Å, contém uma identidade de sequência de 88% em comparação com o organismo humano, [18] e interage com seu ligante cristalográfico por meio de uma interação hidrofóbica com os resíduos VAL350, TYR356, LEU360, TRP388 e ALA528, ligação de hidrogênio com TYR356 e interação eletrostática com ARG121 (Figura 9b). A estrutura 4C1M vem do organismo *Homo sapiens*, com resolução de 2Å [19], e apresenta interações intermoleculares com sua natureza hidrofóbica de ligante cristalográfico com os resíduos ARG239 e PHE366 e ligações de hidrogênio com GLN91 e ARG239 (Figura 9c). A estrutura 3ELJ vem do organismo *Homo sapiens*, com resolução de 1,80Å [20] e interage com seu ligante cristalográfico através de uma interação hidrofóbica com os resíduos ILE32, VAL40, ALA53 e LEU168 e ligações de hidrogênio com MET111, ASN156, ALA36 e LYS55 (Figura 9d). A estrutura 4G3F vem do organismo *Mus musculus*, com resolução de 1,64Å [21], e apresenta interações intermoleculares com seu ligante cristalográfico hidrofóbico com os resíduos VAL408, VAL416, LYS431, ILE469, MET471 e LEU524 e ligações de hidrogênio com LYS431,

GLU442, LEU474, ASP536, GLU442 e ASP536 (Figura 9e). A estrutura 5LCJ vem do organismo *Homo sapiens*, com resolução de 1,78Å [22], e interage com seu ligante cristalográfico por meio de interações hidrofóbicas com os resíduos ILE31, VAL39 e LEU156, ligações de hidrogênio com MET108, LYS114, ALA35 e SER153 e ligações halógenas com GLN105 (Figura 9f).

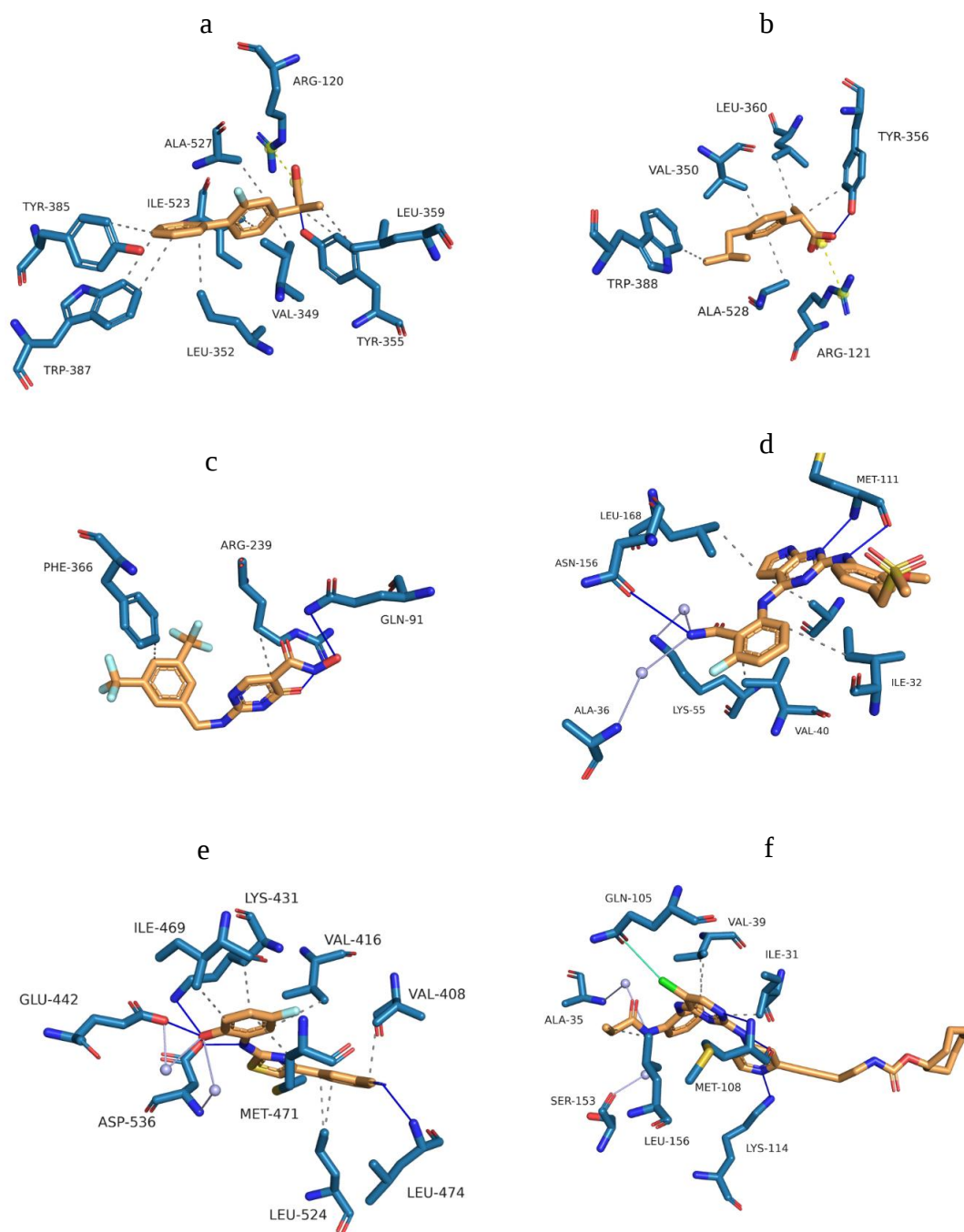


Figura 9 - Representação de alvos complexados com seus respectivos ligantes cristalográficos: COX-1, PDB: 2AYL (a); COX-2, PDB: 4PH9 (b); MPO, PDB: 4C1M (c); JNK1, PDB: 3ELJ (d); NF- κ B, PDB: 4G3F (e) e ERK1/2, PDB: 5LCJ (f). Linhas tracejadas cinza: interações hidrofóbicas; linha azul sólida: ligação de hidrogênio; linha tracejada amarela: interação eletrostática; linha verde sólida: ligação de halogênio; linha branca sólida: ligação de hidrogênio com molécula de água.

2.9 Acoplamento molecular

Os resultados para acoplamento molecular são apresentados na Tabela 1. Os valores da função de pontuação Chemgauss4 usada no programa FRED demonstram que AURA e POLI têm afinidade para os alvos moleculares testados. Para COX-1 e 2, POLI tem melhor afinidade, enquanto AURA tem melhor afinidade para MPO, JNK, NF- κ B e ERK2. As interações intermoleculares de cada molécula com os alvos moleculares estudados foram rastreadas para o perfil de reconhecimento molecular.

ALVO MOLECULAR	AURA	POLI
COX-1	-11.58	-11.86
COX-2	-9.78	-11.29
MPO	-10.57	-9.18
JNK	-10.21	-10.01
NF- κ B	-9.55	-7.59
ERK2	-9.05	-8.58

Tabela 1- Valores de energia do acoplamento molecular do poligaleno e do aurapteno com os alvos.

2.9.1 COX-1

Poligaleno (Figura 10a) interage com os resíduos ALA527, VAL359, LEU352, TRP387, ILE523 e LEU521, além de uma ligação de hidrogênio com o resíduo SER530. Da mesma forma, aurapteno mostrou interações hidrofóbicas com vários resíduos, notavelmente ALA527, ILE345, VAL349, LEU352, TYR355, LEU359, LEU384, TRP387, PHE518, ILE523 e LEU531 (Figura 10b). Interações hidrofóbicas podem ser observadas com o ligante cristalográfico (Figura 9a), indicando que interações hidrofóbicas são importantes para o reconhecimento molecular. Além disso, ligações de hidrogênio são observadas entre o ligante cristalográfico e ARG120 e TYR355, demonstrando a importância das interações com resíduos ARG e TYR para o reconhecimento molecular.

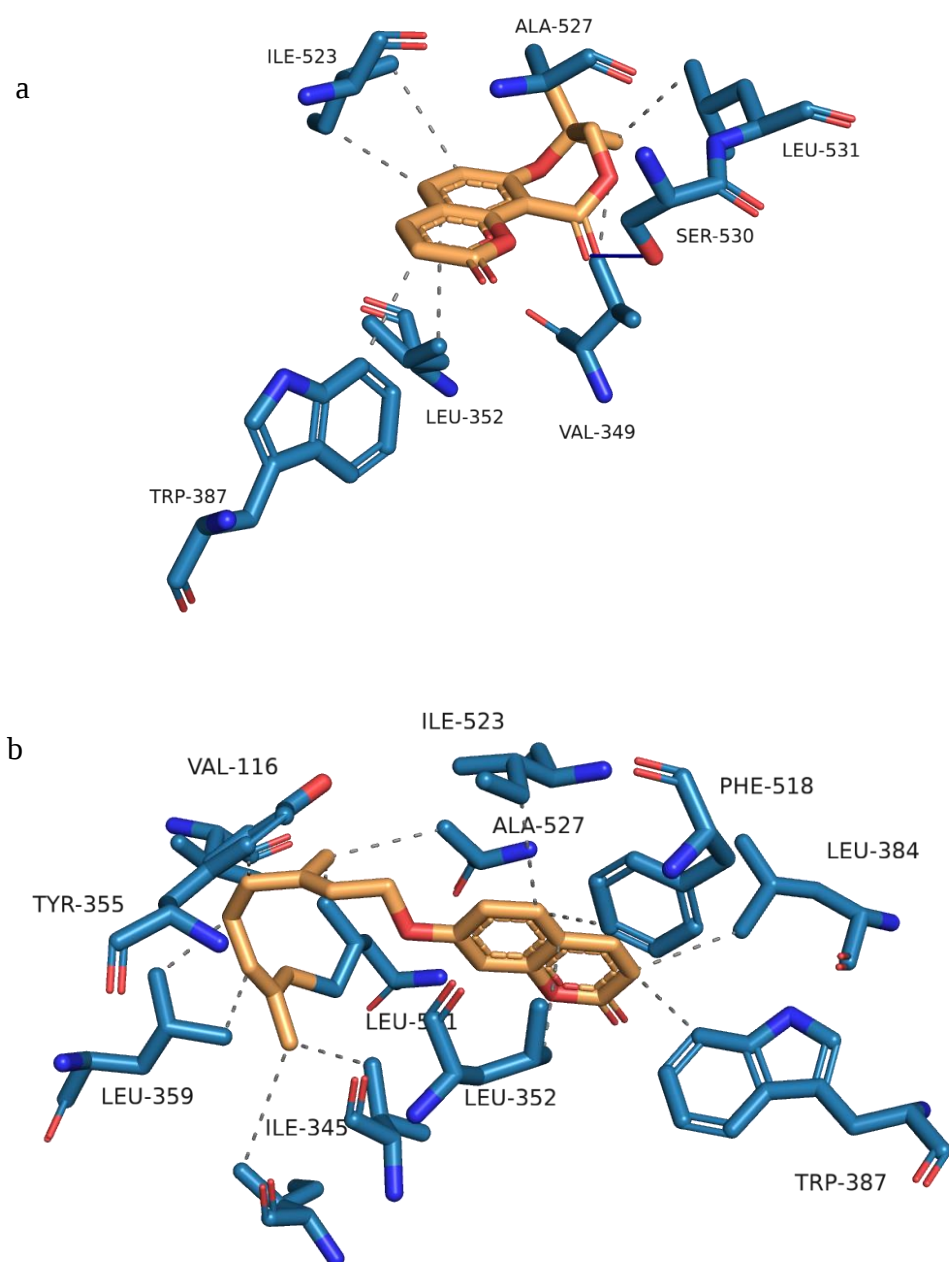


Figura 10 - Representação da estrutura de COX-1 (PDB: 2AYL) no complexo com POLI (a) e AURA (b). Linhas tracejadas cinza: interações hidrofóbicas; linha azul sólida: ligação de hidrogênio.

2.9.2 COX-2

POLI realiza interações hidrofóbicas com LEU360, TRP388, PHE519, VAL424, ALA528 e LEU532, além de uma ligação de hidrogênio com o resíduo SER531 (Figura 11a). Uma ligação de hidrogênio em ambos os encaixes é observada com o resíduo SER531. AURA complexado com COX-2 mostrou interações hidrofóbicas com vários resíduos, notavelmente VAL117, ILE356, VAL350, TYR356, LEU360, TRP388, PHE519, VAL524, ALA528 e LEU532, além de uma ligação de hidrogênio com o resíduo SER531 (Figura 11b). O ligante cristalográfico forma interações hidrofóbicas, indicando que essas interações são importantes para o reconhecimento molecular no sítio ortostérico. Um fato importante, o ligante cristalográfico (Figura 9b) apresenta uma ligação de hidrogênio com a cadeia lateral do resíduo TYR356, indicando que a interação com este aminoácido também é importante para o reconhecimento molecular.

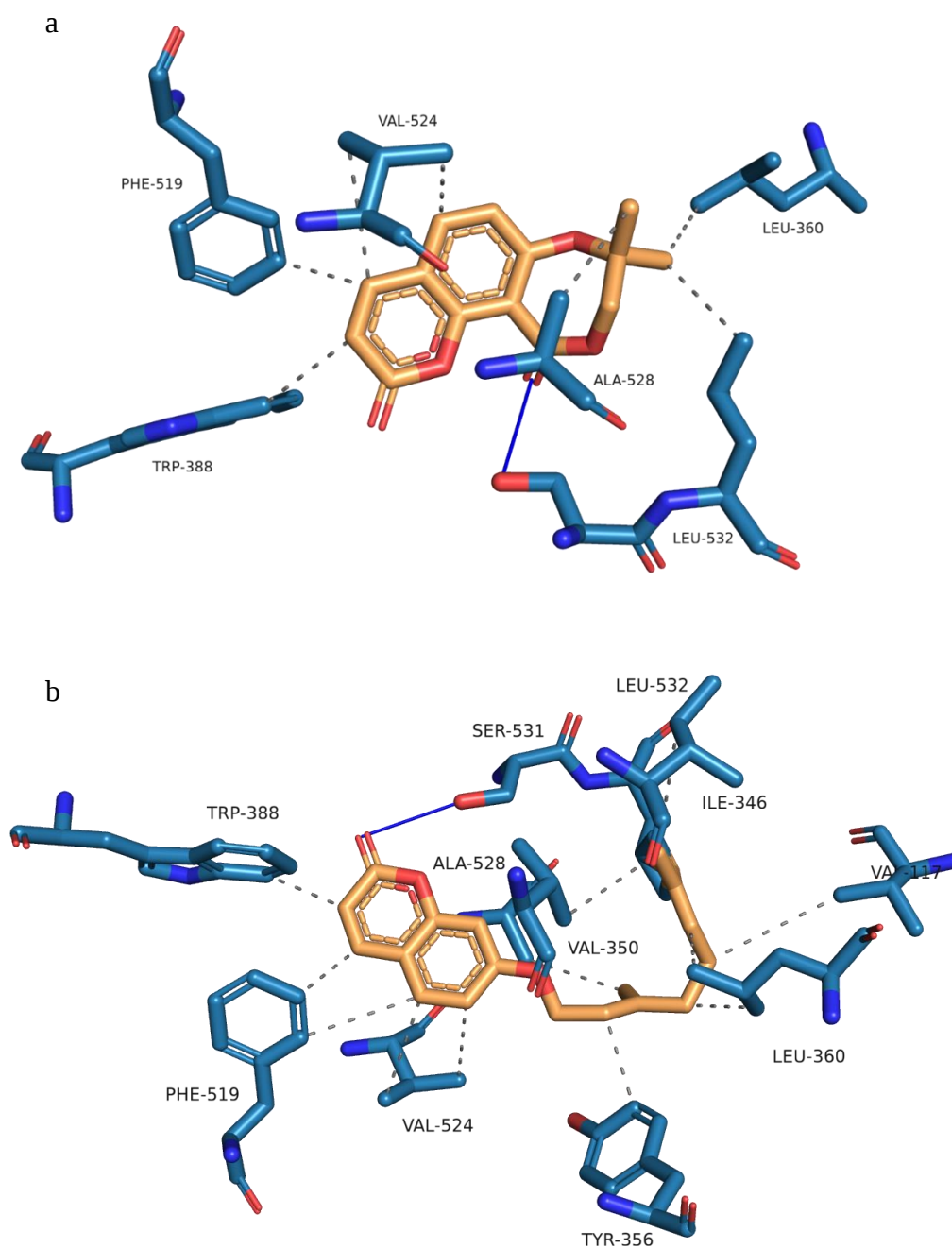


Figura 11 - Representação da estrutura de COX-2 (PDB: 4PH9) no complexo com POLI (a) e AURA (b). Linhas tracejadas cinza: interações hidrofóbicas; linha azul sólida: ligação de hidrogênio.

2.9.3 MPO

POLI mostrou interações hidrofóbicas com ARG239, GLU242, PHE366 e PHE407; da mesma forma, interações eletrostáticas com HIS95 e ARG239 são notadas (Figura 12a). AURA mostrou interações hidrofóbicas com resíduos de PHE99, GLU102, ARG239, GLU242 e PHE407 (Figura 12b). Também é possível notar interações eletrostáticas com os resíduos HIS95 e ARG239. Analisando o ligante cristalográfico, observa-se que AURA e POLI apresentam interações hidrofóbicas da mesma natureza que o ligante cristalográfico (Figura 9c) em resíduos semelhantes, indicando que interações hidrofóbicas são importantes para o reconhecimento molecular no sítio ativo. Em destaque, AURA tem interações eletrostáticas com a cadeia lateral do resíduo HIS95 e ARG239. Também é possível notar interações eletrostáticas envolvendo HIS95 e ARG239, indicando que a interação com esses aminoácidos é importante para o reconhecimento molecular de POLI.

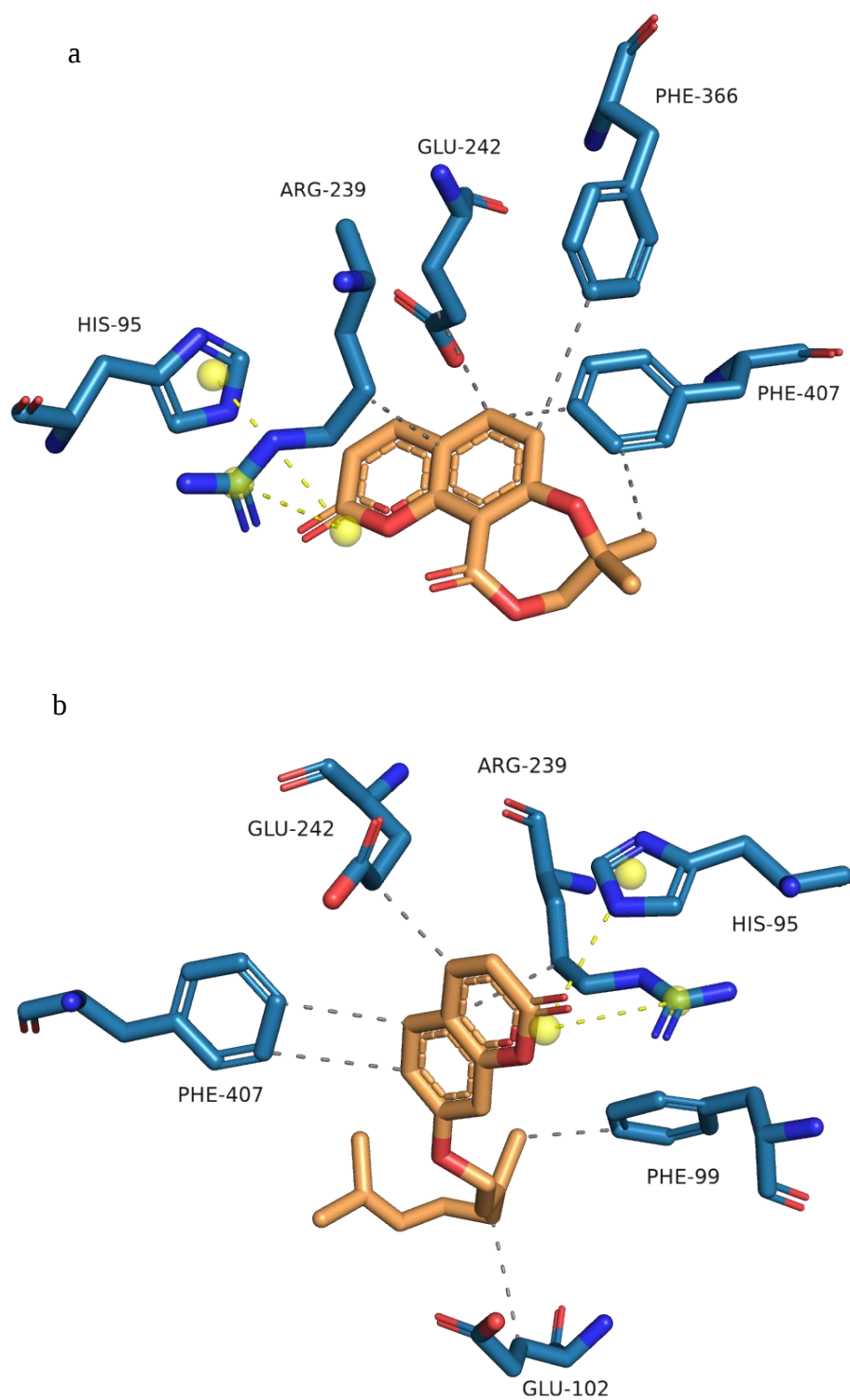


Figura 12 - Representação da estrutura de MPO (PDB: 4C1M) no complexo com POLI (a) e AURA (b). Linha tracejada cinza: interações hidrofóbicas; linha tracejada amarela: interação eletrostática.

2.9.4 JNK

POLI mostrou interações hidrofóbicas com resíduos de VAL40, ALA53, MET111, VAL158 e LEU168. Também é possível notar uma ligação de hidrogênio com o resíduo ASN114 (Figura 13a). AURA mostrou interações hidrofóbicas com resíduos ILE32, VAL40, ALA53, LYS55, MET111, VAL158 e LEU168 (Figura 13b). Ao examinar o ligante cristalográfico (Figura 9d), torna-se evidente que AURA e POLI se envolvem em interações hidrofóbicas semelhantes às do ligante cristalográfico com resíduos idênticos. Esta observação ressalta a importância das interações hidrofóbicas no reconhecimento molecular dentro do sítio ativo JNK. Além disso, o ligante apresenta uma ligação de hidrogênio com a cadeia lateral dos resíduos ASN114, indicando que a interação com esses aminoácidos também é importante para o reconhecimento molecular.

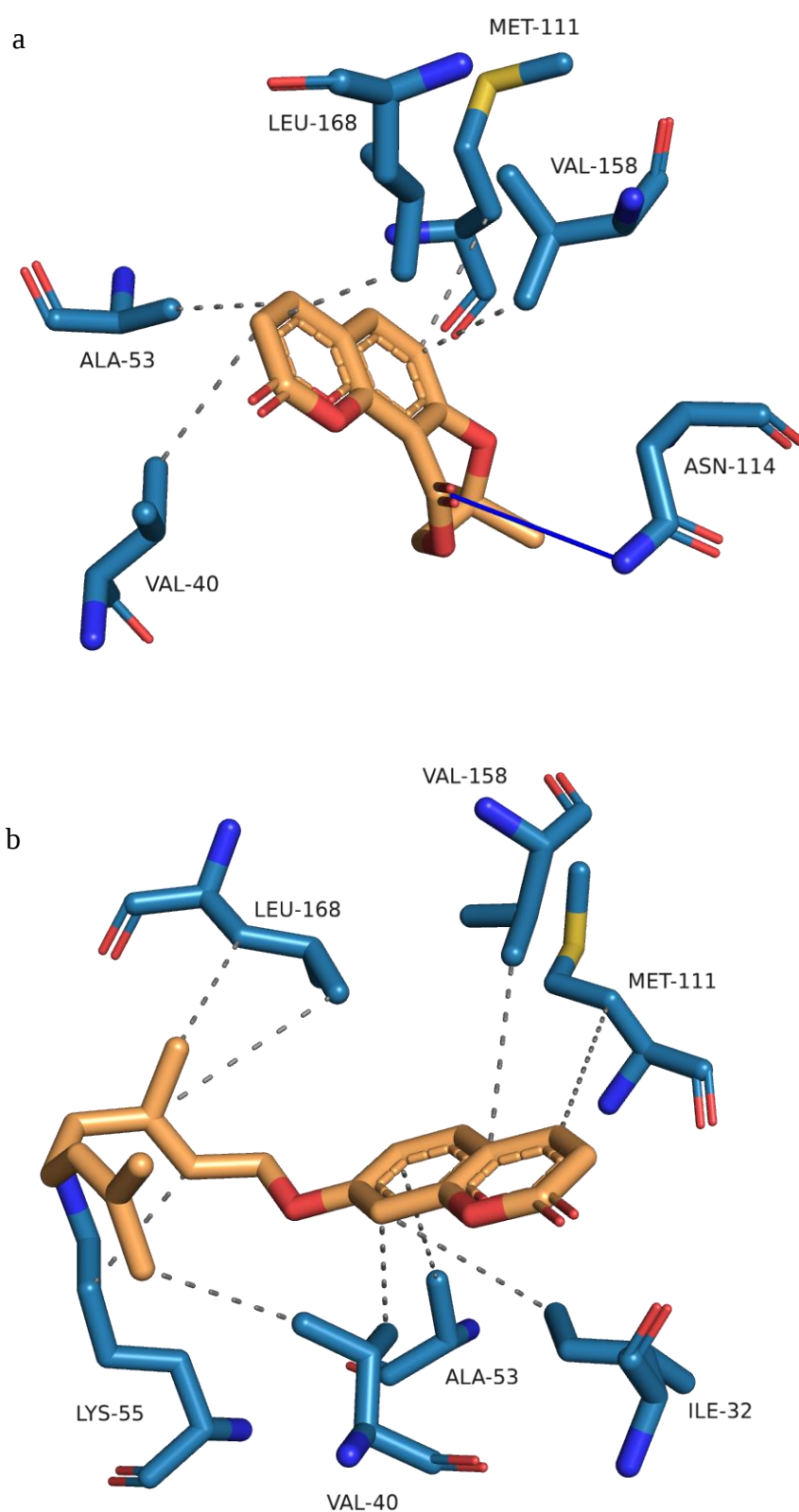


Figura 13 - Representação da estrutura de JNK1 (PDB: 3ELJ) no complexo com POLI (a) e AURA (b). Linha tracejada cinza: interações hidrofóbicas; linha azul sólida: ligação de hidrogênio.

2.9.5 *NF-κB*

POLI também mostrou interações hidrofóbicas com resíduos VAL408, VAL416 e LEU524 (Figura 14a). AURA complexado com NF-κB revelou interações hidrofóbicas com VAL408, VAL416 e LYS431, além de uma ligação de hidrogênio com o resíduo GLN481A (Figura 14b). Interações de natureza semelhante são notadas no ligante cristalográfico (Figura 9e), sugerindo a significância das interações hidrofóbicas para o reconhecimento molecular dentro do sítio ativo. Além disso, ligações de hidrogênio são observadas entre AURA e o sítio, especificamente com o resíduo GLN481, destacando a importância das interações com esses aminoácidos para o reconhecimento molecular também.

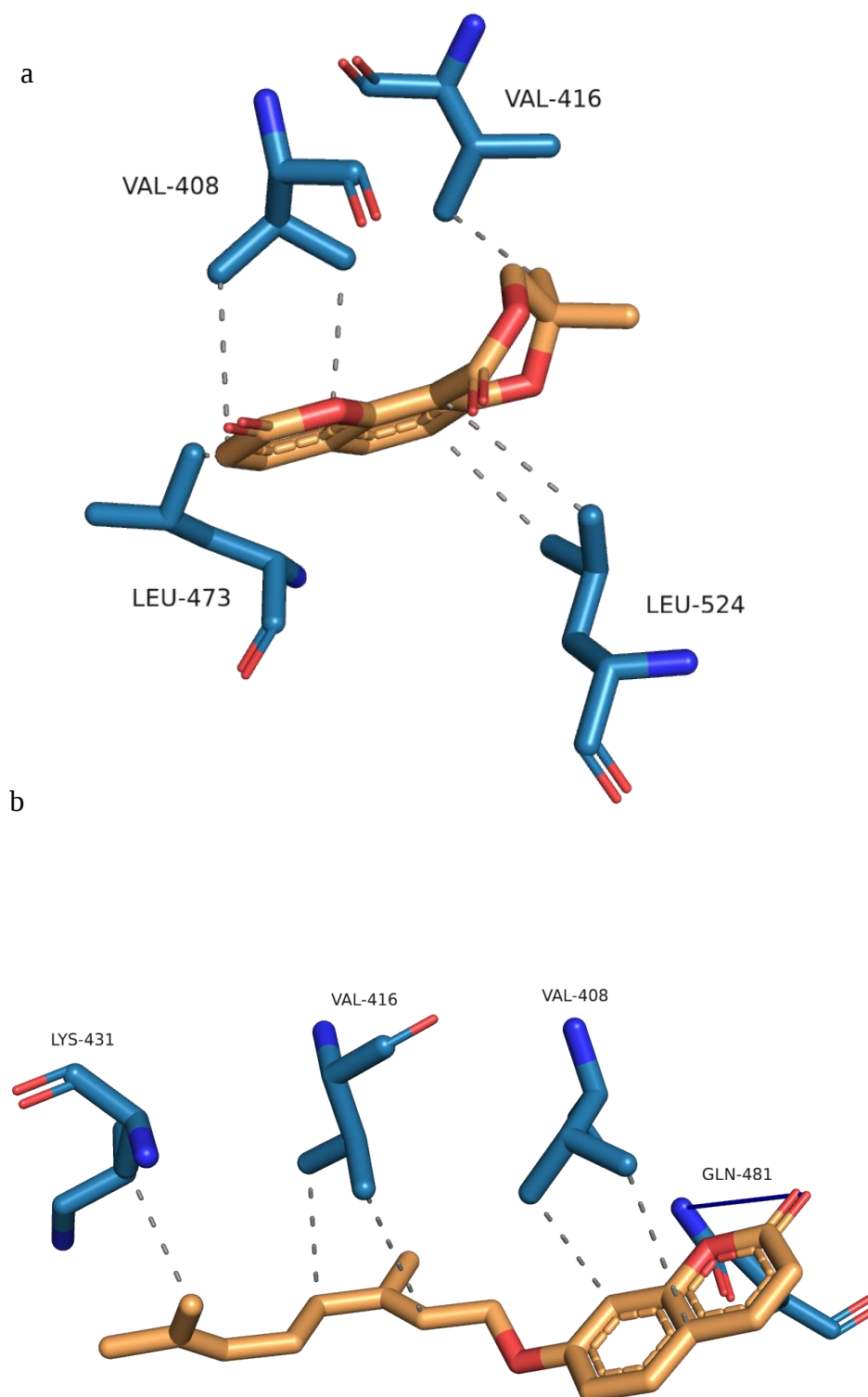


Figura 14 - Representação da estrutura do NF- κ B (PDB: 4G3F) com ênfase no sítio ativo. Linha tracejada cinza: interações hidrofóbicas; linha sólida azul: ligação de hidrogênio.

2.9.6 *ERK2*

POLI também mostrou interações hidrofóbicas com VAL39, LYS54, MET108 e LEU156. Interações eletrostáticas são observadas no resíduo LYS114 entre POLI e ERK2 (Figura 15a). AURA acoplado a ERK2 mostrou interações hidrofóbicas com ILE31, VAL39, ALA52, LYS54, ASP111 e LEU156. Ligações de hidrogênio também podem ser observadas entre AURA e o resíduo ALA35 (Figura 15b). Comparando com o ligante cristalográfico (Figura 9f), interações hidrofóbicas podem ser observadas com esses mesmos resíduos descritos em AURA e POLI. Interações de ligação de hidrogênio também são observadas no ligante com resíduo LYS114 e ALA35, indicando que são importantes para o reconhecimento molecular.

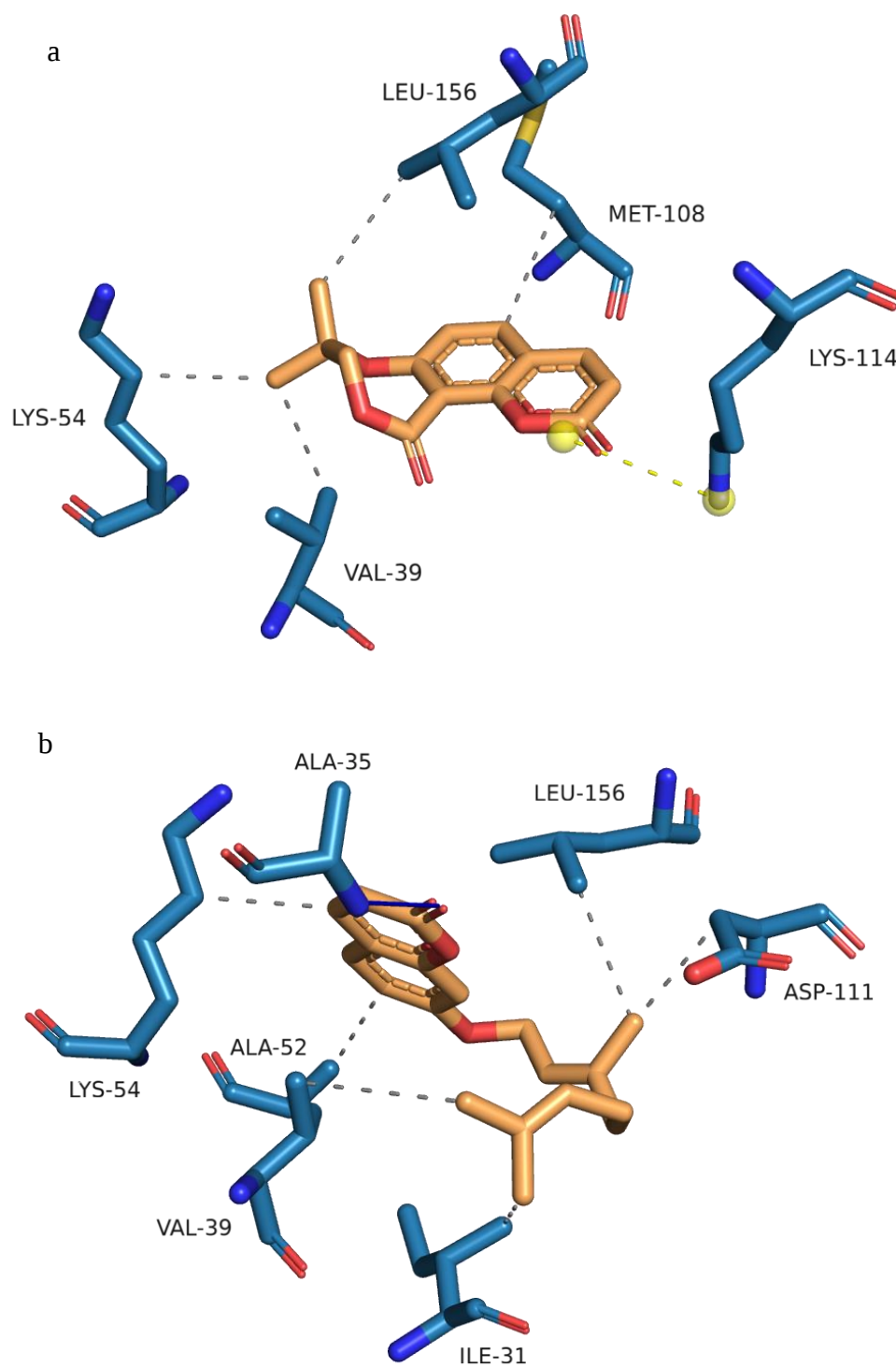


Figura 15 - Representação da estrutura de ERK1/2 (PDB: 5LCJ) no complexo com POLI (a) e AURA (b). Linha tracejada cinza: interações hidrofóbicas; linha tracejada amarela: interação eletrostática; linha sólida azul: ligação de hidrogênio.

3. DISCUSSÃO

Modelos animais têm sido amplamente utilizados por várias décadas para estudar a dor e têm contribuído excelentemente para desvendar mecanismos de patogênese e validar novos alvos para tratamento [23]. Um estudo anterior demonstrou que o tratamento oral com extrato de *Polygala boliviensis* produz efeitos antinociceptivos e antiedematogênicos [14]. Assim, este trabalho investigou as duas cumarinas isoladas de *Polygala boliviensis*, a POLI e a AURA, produzem atividade antinociceptiva. O primeiro teste utilizado foi um teste de contorção abdominal induzida por ácido acético, um modelo amplamente utilizado para avaliar a eficácia de novas substâncias que atuam em níveis central e periférico do sistema nervoso no alívio da sensação de dor [24,25]. Em nossos estudos, tanto o POLI (90 mg/kg) quanto o AURA (90 mg/kg) apresentaram inibição significativa no teste de contorção abdominal quando comparados ao veículo. Para confirmar a atividade antinociceptiva do POLI e do AURA, foi utilizado o teste da formalina. A fase inicial resulta do efeito direto dos nociceptores [26] e não foi afetada pelo tratamento oral com POLI ou AURA. Por outro lado, na fase tardia, associada à dor inflamatória [27], tanto POLI (90 mg/kg) quanto AURA (90 mg/kg) demonstraram atividade antinociceptiva no teste, sugerindo assim um possível efeito antinociceptivo envolvendo vias anti-inflamatórias.

Os relatos da literatura também mencionam efeitos antinociceptivos encontrados em outras espécies do gênero *Polygala*. Pradi et al. [28] demonstram em seus estudos que o extrato hidroalcólico de *Polygala altomontana* (30, 100 e 300 mg/kg) apresentou ação antinociceptiva dose-dependente durante a fase inflamatória do teste da formalina. Além disso, a preparação (30 e 300 mg/kg) apresentou ação anti-hiperalgésica quando testada em modelo de nocicepção mecânica. Em sua identificação, os pesquisadores encontraram ésteres de sacarose, fenilpropanoides, derivados de quercetina glicosilados, estirilpironas e cumarinas. Kim et al [29], em seus estudos, identificaram uma atividade anti-hiperalgésica do extrato metanólico de *Polygala cyparissias*, sugerindo que a atividade anti-hiperalgésica do extrato está, pelo menos em parte, relacionada à sua capacidade de inibir a hipersensibilização induzida por mediadores hiperalgésicos ou agentes inflamatórios, como

lipopolissacarídeo (LPS), carragenina ou adjuvante completo de Freund (CFA). Meotti et al. [30] identificaram que a cumarina escopoletina isolada de *Polygala sabulosa* e dois ésteres da cumarina foram obtidos de maneira semissintética; enquanto isso, a acetilescopoletina e a benzoilescopoletina (0,001-10 mg/kg) exibiram efeitos antinociceptivos significativos e relacionados à dose contra a dor visceral induzida por ácido acético.

Em outros estudos, pesquisadores também identificam moléculas pertencentes à classe das cumarinas com potencial atividade anti-inflamatória. Leal et al. [31] avaliaram um estudo comparativo dos efeitos antioxidantes e anti-inflamatórios das cumarinas naturais 1,2-benzopirona, umbeliferona e esculetina, envolvendo análises *in silico*, *in vitro* e *in vivo*. Em seus testes, a enzima COX-2 apresentou boas afinidades pelas três cumarinas, conforme revelado por análises de acoplamento molecular. Entretanto, considerando os efeitos anti-inflamatórios *in vivo*, a 1,2-benzopirona foi a mais eficiente no combate à inflamação pleural nas doses de 50, 100 e 200 mg/kg. Na dose de 20 mg/kg, a 1,2-benzopirona foi ineficaz, assim como as cumarinas umbeliferona e esculetina nas doses de 20 e 200 mg/kg. Liang et al. [32] avaliaram o efeito neuroprotetor da umbeliferona contra déficits neurológicos induzidos por isquemia/reperfusão em ratos. O tratamento dose-dependente de umbeliferona diminuiu a pontuação neurológica, infarto cerebral, mediador inflamatório (TNF- α , IL-1 β , IL-6, COX-2, NF- κ B e PGE2) no soro e tecido cerebral em comparação com os ratos do grupo controle induzidos por I/R. A umbeliferona também diminuiu o nível do fator nuclear kappa B (NF- κ B) em comparação com os ratos do grupo controle. Castro-Martinez et al. [33] demonstraram que os extratos de *Tagetes lucida* têm efeitos imunomoduladores e neuroprotetores. Em seus resultados, eles concluíram que os extratos e cumarinas 7-Isopreniloxicumarina, herniarina, 7-O-Prenilescopoletina, dimetilfraxetina e escoporona de *Tagetes lucida* (25 mg/kg) exercem efeito neuroprotetor, controlando danos motores e neuroinflamação, aumentando a expressão de IL-4 e IL-10 e diminuindo IL-1 β e TNF- α , notavelmente.

O teste da placa quente é um modelo amplamente utilizado para avaliar analgésicos de ação central. O estímulo térmico ativa nociceptores (fibras C amielínicas), que são responsáveis por transmitir informações ao corno dorsal

da medula espinhal e, conseqüentemente, aos centros corticais, desencadeando uma resposta nociceptiva organizada [34-35]. O tratamento com POLI ou AURA não alterou o tempo de latência no teste da placa quente. A morfina (5 mg/kg), um analgésico opioide usado como controle positivo, aumentou significativamente o tempo de latência da resposta ao estímulo térmico. Portanto, esses dados mostram que a atividade antinociceptiva encontrada não envolve a participação de mecanismos supraespinhais, como também demonstrado no teste da formalina.

A artrite reumatoide é uma doença crônica do tecido conjuntivo de etiologia imunológica, caracterizada pela inflamação e degeneração dos ossos e cartilagens das articulações. Durante o processo inflamatório, ocorre a síntese em larga escala de mediadores químicos presentes na inflamação, notadamente as interleucinas IL-1, IL-6 e o fator de necrose tumoral TNF-alfa. O zimosan tem sido usado como um agente pró-inflamatório há algum tempo, amplamente utilizado para induzir artrite aguda [36]. Assim, a artrite aguda causada pelo zimosan na articulação do joelho é caracterizada pelo aumento da permeabilidade vascular, migração celular e dor. A dor articular é atribuída principalmente aos efeitos, diretos e indiretos, de mediadores inflamatórios, como histamina, eicosanoides, fator de ativação plaquetária (PAF), neuropeptídeos, óxido nítrico e, notavelmente, citocinas e prostaglandinas, que sensibilizam as fibras nociceptivas primárias que inervam a articulação inflamada [37]. Neste trabalho, os pré-tratamentos com POLI (90 mg/kg) e AURA (90 mg/kg) reduziram a hipernocicepção articular até a primeira hora do teste, sugerindo um possível efeito antinociceptivo envolvendo vias anti-inflamatórias. Para verificar possível sinergismo entre substâncias bioativas isoladas do mesmo extrato de *Polygala boliviensis*, que já demonstrou ter efeito antinociceptivo [14], foi realizado tratamento oral com POLI (30 mg/kg) e AURA (30 mg/kg) antes da indução da artrite com zimosan. Um fato interessante, esse efeito sinérgico entre doses ineficazes de POLI (30 mg/kg) e AURA (30 mg/kg) mostrou antinocicepção até a primeira hora após a injeção de zimosan. Os relatos da literatura citam diversas atividades biológicas de AURA e POLI, com destaque para a atividade anti-inflamatória. Okuyama et al. [38] demonstraram que o aurapteno suprimiu a ativação microglial, a expressão da ciclooxigenase

(COX-2) em astrócitos e a expressão do mRNA da COX-2 no hipocampo. Vu Dang La e pesquisadores [39] mostraram que o aurapteno diminuiu, de forma dose-dependente, a secreção da metaloproteinase 2 da matriz, bem como os principais mediadores inflamatórios, incluindo IL-6 e IL-8. Da mesma forma, relatos na literatura indicam que o POLI tem efeitos imunomoduladores, reduzindo os níveis de IL-6 e TNF após estimulação com LPS em macrófagos peritoneais, independente da regulação negativa do NF- κ B [15]. Esses relatos reforçam os resultados encontrados em nossos testes, indicando que a atividade antinociceptiva nessas moléculas é possivelmente por meio da inibição de mediadores inflamatórios.

O teste de campo aberto é um procedimento conveniente para medir de forma geral a sedação ou atividade exploratória do animal [40]. Normalmente, quando há um novo ambiente, o animal tende a explorar o local, mesmo que esta situação cause estresse ou conflito. O teste de rota-rod foi proposto por Dunham e Miya [41] e consiste em uma metodologia utilizada para triagem de fármacos com efeitos colaterais na coordenação motora. Este método permite avaliar a especificidade da ação antinociceptiva de fármacos, verificando se estas substâncias promovem incoordenação motora em animais, seja por meio de sedação e/ou relaxamento muscular, ao longo do tempo em que os animais permanecem em uma barra giratória [42]. A administração oral de POLI (90 mg/kg) ou AURA (90 mg/kg) não afetou a atividade locomotora dos animais e, portanto, não reduziu a capacidade exploratória no teste de campo aberto. Da mesma forma, no teste rota-rod, não afetou o desempenho motor dos animais. Portanto, esses resultados validam a atividade antinociceptiva de POLI e AURA em modelos experimentais de dor.

Para verificar a afinidade dessas moléculas por COX-1, COX-2, mieloperoxidase (MPO), JNK1, NF- κ B e ERK1/2, foi realizado um teste *in silico* utilizando a técnica de acoplamento molecular. Cada um desses alvos desempenha um papel fundamental nas respostas à dor e foi, portanto, selecionado para teste. As prostaglandinas (PGs) produzidas pela atividade da enzima COX-1 desempenham um papel preponderante na regulação das funções homeostáticas em vários sistemas do corpo, enquanto aquelas formadas pela COX-2 estão principalmente associadas à modulação da dor e à

resposta inflamatória [43]. Evidências confirmam o papel crucial dessa enzima no teste da formalina, mostrando a ligação da COX-2 com a transmissão nociceptiva em camundongos [44]. Da mesma forma, as ciclooxigenases desempenham um papel fundamental na artrite reumatoide. A COX-2 está presente em maiores quantidades nos tecidos sinoviais de pacientes com artrite reumatoide, mas a COX-1 também está presente em quantidades menores. A expressão de COX-2 na sinóvia reumatoide é estimulada por citocinas pró-inflamatórias; além disso, já está comprovado que as prostaglandinas (especialmente a prostaglandina E2) atuam como mediadoras em interações complexas que contribuem para o desenvolvimento de erosões na cartilagem articular e no osso adjacente às articulações [45]. Em nossos testes, tanto AURA quanto POLI, quando acoplados à COX-1, apresentam interações relevantes, destacando interações hidrofóbicas com os aminoácidos ARG-120A e TYR-385A. Esses aminoácidos parecem ser essenciais para a atividade do ligante, pois parecem interagir via ligações de hidrogênio. Ainda nesse sentido, quando acoplados à COX-2, apresentam interações hidrofóbicas com diversos aminoácidos, destacando novamente as interações com ARG-121A e TYR-386A. O ligante cristalográfico também interage com esses resíduos, indicando assim que a interação com esses aminoácidos é importante para o reconhecimento molecular.

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima peroxidase contendo heme, encontrada principalmente em neutrófilos, com menor presença em monócitos. Embora desempenhe um papel fundamental no sistema imunológico, a MPO está implicada na origem ou progressão de várias doenças devido à sua capacidade de intensificar a inflamação e causar danos aos tecidos. Pesquisas mostram que a MPO é um marcador da atividade dos neutrófilos em danos aos tecidos e na resposta inflamatória em várias condições inflamatórias, que podem causar dor. Níveis elevados de MPO foram observados em várias doenças inflamatórias, como artrite reumatoide. Estudos sobre sua presença na cartilagem inflamada sugerem que ela pode causar a doença por meio do estresse oxidativo, mas atualmente acredita-se que a MPO esteja mais associada à progressão da doença ao longo do tempo [46, 47]. Em nossos estudos, foram demonstradas interações extremamente relevantes para o

encaixe molecular. Tanto na AURA quanto na POLI, houve interação com resíduos ARG239B, GLN91B e HEM605B. Interações com esses resíduos também são observadas no ligante cristalográfico, indicando que são relevantes para o encaixe no sítio ativo.

A via c-Jun NH2-terminal kinase (JNK) é uma subdivisão das proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs) e desempenha um papel crucial em vários estados de doenças inflamatórias [48]. É vista como um alvo promissor para o tratamento dessas doenças, pois desempenha um papel decisivo na maturação e atividade das células T, além de regular a produção de citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-2 (IL-2), IL-6 e TNF- α . A relevância da via JNK em doenças inflamatórias crônicas como osteoartrite e artrite inflamatória foi observada por Ge et al. e Han et al. respectivamente [49, 50]. AURA, quando acoplada ao sítio ativo, mostrou interações hidrofóbicas relevantes com os resíduos ALA113, ASN156, MET111 e SER155. Interações com os mesmos resíduos são observadas no ligante cristalográfico, destacando o papel fundamental desses aminoácidos no acoplamento molecular. POLI demonstrou interações hidrofóbicas com ALA113, ALA53, MET111 e VAL40, entre outros. Da mesma forma, esses resíduos são observados em interações com o ligante cristalográfico.

As cinases relacionadas ao sinal extracelular (ERK1/2s), que fazem parte da família da proteína cinase ativada por mitógeno (MAPK), são componentes terminais da cascata de fosforilação e foram associadas ao desenvolvimento de dor neuropática e inflamatória. Pesquisas recentes indicam que as cinases ERK1/2 desempenham um papel essencial na regulação da expressão gênica inflamatória, sendo ativadas após receptores imunes em resposta a estímulos como infecções, danos celulares ou teciduais [51]. Um estudo colaborativo demonstrou que a ativação de ERK1/2 na medula espinhal contribui para a alodinia mecânica em um modelo de dor pós-operatória em camundongos [52]. Outros pesquisadores confirmaram que a via de sinalização ERK1/2 está profundamente envolvida na modulação do componente sensorial da dor em vários níveis do sistema de processamento da dor [53]. As evidências também confirmam que a estimulação excessiva desta via está intimamente ligada à

destruição da cartilagem articular e à hiperplasia inflamatória dos tecidos sinoviais, demonstrando seu envolvimento na artrite reumatoide [54].

Em nossos estudos com AURA acoplado a esse alvo, interações hidrofóbicas foram observadas com ALA35, ALA52, ASP111, GLN105, GLU33, GLY34, ILE31, LEU156, LYS114 e VAL39. Esses resíduos também são notados com o ligante cristalográfico e, além disso, apresentam ligações de hidrogênio com ALA35 e LYS114, mostrando a relevância dessas interações. POLI mostra interações hidrofóbicas com ALA52, GLN105, GLU109, ILE31, LEU156, MET108 e VAL39. Uma ligação de hidrogênio também ocorre com o resíduo LYS114.

A via de sinalização do fator nuclear NF- κ B é amplamente reconhecida como um exemplo clássico de uma via pró-inflamatória, devido ao seu papel na regulação da expressão de genes pró-inflamatórios, como citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão [55]. Estudos recentes destacam o papel crucial do NF- κ B na resposta a estímulos dolorosos. Wang [56], em sua pesquisa, mostra que a ativação do NF- κ B e a subsequente produção de citocinas pró-inflamatórias contribuem para a perpetuação da dor crônica. Além disso, Ahmed [57] demonstra que o NF- κ B pode estar envolvido na geração ou manutenção de mecanismos periféricos de dor, regulando a expressão de neuropeptídeos relacionados à dor. Em nossos estudos, tanto AURA quanto POLI mostraram interações relevantes com o sítio ativo. Interações hidrofóbicas com resíduos ARG410, ASP521, CYS535, LEU473, LEU474, LEU524, MET471, VAL408 e VAL416 foram observadas em acoplamentos com AURA e com POLI. Interações com os mesmos resíduos foram notadas com o ligante cristalográfico, demonstrando importância no reconhecimento molecular.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 *Obtenção de cumarinas*

As cumarinas foram isoladas e identificadas previamente [15, 54]. O material vegetal foi coletado em julho de 2013, em Feira de Santana, Bahia, Brasil (12°12'00.6"S e 38°58'25.6"W; altitude de 240 m acima do nível do mar). A autorização para acesso ao patrimônio genético vegetal foi obtida do Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (A1080C4). O material foi identificado pelo Dr. José Floriano Barea Pastore por meio da comparação do material coletado com um espécime voucher depositado no Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana (HUEFS), HUEFS 168956. O material vegetal (partes aéreas, incluindo caule, folhas e inflorescências e raízes) foi seco em estufa a $45 \pm 3^{\circ}\text{C}$ por 15 dias. Em seguida, o material foi pulverizado em liquidificador industrial e submetido à maceração com metanol em temperatura ambiente. O extrato metanólico obtido foi então filtrado e concentrado em evaporador rotativo sob pressão reduzida e em banho-maria a $60 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Após a secagem, o extrato metanólico foi particionado com solventes em ordem crescente de polaridade: hexano, clorofórmio e acetato de etila. A fração clorofórmica foi submetida à cromatografia em coluna com sílica gel 60 como fase estacionária, e o sistema foi eluído sucessivamente usando um gradiente de misturas de hexano e EtOAc com polaridade crescente, resultando em frações contendo as cumarinas, AURA (1,14 g) e POLI (2,69 g), que foram identificadas por diferentes experimentos espectroscópicos e espectrométricos, conforme descrito por Silva et al. [15,16].

4.2 *Animais*

Os experimentos foram realizados com camundongos machos adultos da linhagem Swiss Webster (25–30 g) do biotério da Universidade Estadual de Feira de Santana. Todos os testes comportamentais foram realizados entre 07:00 e 18:00 do dia. Os animais foram mantidos em caixas apropriadas no biotério, à temperatura de 22-25 °C e ciclo claro-escuro de 12 horas, com livre acesso a

comida e água. Todos os experimentos foram realizados de acordo com o protocolo e as diretrizes da International Association for the Study of Pain (IASP) para uso de animais de laboratório [58]. Os experimentos foram conduzidos após aprovação do comitê de ética em animais de experimentação da Universidade Estadual de Feira de Santana sob o protocolo nº 12/2023.

4.3 Drogas e diluentes

O ácido acético glacial foi adquirido da Dinâmica® (São Paulo, Brasil). O formaldeído e o Tween 80 foram adquiridos da Labsynth® (São Paulo, Brasil). O isoflurano e o sulfato de morfina foram adquiridos da Cristália® (São Paulo, Brasil). O diazepam foi adquirido da União Química® (São Paulo, Brasil). O zimosan e o dimetilsulfóxido foram adquiridos da Sigma® (São Paulo, Brasil). A dexametasona foi adquirida da Teuto® (Goiás, Brasil). A solução salina (solução fisiológica de cloreto de sódio a 0,9%) da Farmace® (Ceará, Brasil). O POLI e o AURA foram diluídos em solução salina Tween 80 + 2%. O ácido acético, a formalina, a dexametasona, o diazepam, a morfina e o zimosan foram diluídos em solução salina. Uma solução de formalina 2,5% foi preparada com formaldeído em solução salina. O controle negativo foi composto de solução salina + 2% Tween 80. Os instrumentos rota-rod, von frey digital analgesímetro + acessórios e placa quente foram adquiridos da Insight® (São Paulo, Brasil).

4.4 Teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético

Para avaliar o efeito antinociceptivo, diferentes grupos foram tratados por via oral com AURA ou POLI (30, 60 e 90 mg/kg) ou veículo, 60 min antes de uma injeção intraperitoneal (i.p.) de ácido acético. Morfina (5 mg/kg, s.c.) foi usada como droga de referência, 40 min antes do estímulo nociceptivo. O protocolo comportamental foi aplicado conforme descrito anteriormente por Júnior et al. [59]. O número total de contorções abdominais foi registrado dentro de 30 min após a administração intraperitoneal de ácido (0,8%).

4.5 Teste de formalina

Os animais foram submetidos ao tratamento oral com doses de POLI ou AURA (30, 60 e 90 mg/kg) ou veículo, 60 min antes da administração intraplantar na pata traseira direita com 20µL de formalina 2,5% diluída em solução salina. A morfina (5 mg/kg, s.c.) foi utilizada como droga de referência, administrada 40 min antes do estímulo nociceptivo. Após a administração das substâncias, os camundongos foram devolvidos à câmara de observação espelhada, seguindo o protocolo previamente descrito por Cardona et al. [60]. O tempo durante o qual os animais passaram lambendo ou mordendo a pata após a administração intraplantar de formalina foi quantificado como comportamento nociceptivo.

4.6 Teste de placa quente

O teste proposto por Woolfe e McDonald [61] envolve colocar os animais em uma placa aquecida a $55^{\circ}\text{C} \pm 1,0^{\circ}\text{C}$ e o tempo que eles levam para manifestar uma resposta nociceptiva, como lamber, morder, pular ou levantar as mãos. Um limite máximo de 10 s é estabelecido para mitigar o risco de dano tecidual. Doses de 30, 60 ou 90 mg/kg de POLI ou AURA, assim como o veículo, foram administradas por via oral. A morfina foi administrada na dose de 5 mg/kg por via subcutânea. O tempo necessário para os camundongos manifestarem uma resposta nociceptiva foi então medido em intervalos de tempo específicos: 0,5h, 1h, 3h e 5h após a administração das substâncias.

4.7 Indução de modelo experimental de artrite induzida por zimosan

Os animais foram tratados por via oral com POLI ou AURA em doses respectivas (90 ou 30 + 30 mg/kg) ou veículo 1h antes da administração de zimosan. Dexametasona (2 mg/kg) foi usada como droga de referência, sendo administrada por via subcutânea (s.c.) 40min antes do estímulo nociceptivo. Todos os camundongos foram anestesiados com 2% de isoflurano, então o modelo de artrite foi induzido com a administração de zimosan (30µg/5µL) na

articulação tibiotarsal direita dos camundongos. O grupo controle recebeu 5µL de solução salina na articulação tibiotarsal direita dos camundongos.

4.8 Avaliação nociceptiva articular

A avaliação da hipernocicepção da porção tibiotarsal induzida por zimosan foi realizada conforme descrito por Guerrero et al. [62]. Os experimentos foram conduzidos com um anesthesiômetro eletrônico, que capta a pressão por meio de um transdutor conectado a um contador de força digital expresso em gramas (g). A pressão foi captada pelo contato do transdutor de pressão com a pata, o que é realizado por meio de uma ponta descartável de polipropileno com área de 4,15 mm² conectada ao transdutor.

Os camundongos foram mantidos individualmente em caixas de acrílico, com piso feito de tela de arame não maleável. Os animais foram colocados nas caixas 15 min antes do início do experimento, para adaptação ao ambiente. A avaliação da nocicepção articular consiste em aplicar, por meio das malhas da rede, uma pressão linearmente crescente no centro da sola da pata do camundongo, até que o animal seja estimulado a realizar a flexão dorsal da articulação tibiotarsal. Para tanto, foi utilizada uma ponta com área de 4,15 mm², que permite avaliar a hipernocicepção articular, uma vez que esta ponta não é per se nociceptiva. A sequência de procedimentos experimentais consistiu em quantificar a hipernocicepção mecânica articular nos tempos de 0h, 0,5h, 1h, 3h, 5h, 7h e 24h após a indução da artrite. A intensidade da hipernocicepção mecânica articular foi medida usando valores de limiar mecânico absoluto (em gramas).

4.9 Teste de cilindro giratório (rota-rod)

O desempenho motor dos animais foi estudado no aparelho de cilindro giratório, segundo o método descrito por Rocha et al. [14]. Os animais foram submetidos a uma análise de pré-seleção um dia antes do experimento para selecionar apenas os animais que permaneceram na barra de equilíbrio por 120s

em três tentativas. A velocidade constante escolhida foi de 18 rotações por minuto (rpm). Os animais selecionados foram então tratados com POLI ou AURA (90 mg/kg, v.o.) ou veículo 1h antes de serem colocados no aparelho. A capacidade de coordenação foi quantificada pelo tempo registrado no aparelho. Os resultados foram expressos como o tempo médio, em segundos, que o animal permaneceu no aparelho. Por ser um benzodiazepínico, o diazepam (10 mg/kg, i.p.) foi utilizado como pré-tratamento de 30min.

4.10 Teste de campo aberto

O aparelho consiste em uma caixa de acrílico opaca (50 cm x 60 cm x 45 cm), com piso demarcado em 12 quadrados iguais. No momento do teste, os animais foram colocados em um dos cantos do aparelho e o número de vezes que os animais cruzaram os quadrados com suas quatro patas durante o período de três minutos foi registrado. Os animais foram tratados com POLI ou AURA (90 mg/kg, v.o.; ou veículo) 30 min antes de serem colocados no aparelho de registro. Os resultados foram expressos como a média do número de quadrados cobertos. O fármaco de referência utilizado foi o midazolam (10 mg/kg, i.p.) com 30 min de pré-tratamento, Rocha et al. [14].

4.11 Análise estatística

Os dados foram analisados usando o programa GraphPadPrism (GraphPad Inc., San Diego, CA) versão 5.0 para Windows e apresentados como a média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M.) das medidas feitas com 6 animais por grupo. A comparação entre os diferentes grupos de tratamento foi feita usando ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni. Em estudos de medidas repetidas ao longo do tempo, foi usada ANOVA de duas vias, seguida pelo teste de Bonferroni. Em todos os testes, as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para valores de $p \leq 0,05$.

4.12 Estudos de acoplamento molecular

O encaixe molecular foi realizado no programa FRED 4.1.1.0; o alvo molecular foi preparado no utilitário gráfico Make Receptor da OpenEye Scientific [63]; artefatos de cristalografia e moléculas de água foram removidos, seguidos por hidrogênios e carga parcial de átomos (Gasteiger). A caixa de encaixe molecular foi baseada no posicionamento espacial do ligante cristalográfico de cada alvo molecular; neste sentido, as seguintes dimensões foram utilizadas: COX-1: 13,67Å x 15,00Å x 18,00Å, 3689 Å³ de volume de caixa e forma 904 Å³ (forma externa); COX-2: 16,33Å x 15,67Å x 13,00Å, 3326 Å³ de volume de caixa e forma 897 Å³ (forma externa); MPO: 14,00Å x 18,33Å x 17,67Å, 4534 Å³ de volume de caixa e formato 1458 Å³ (formato externo); JNK: 21,00Å x 19,00Å x 16,67Å, 6649 Å³ de volume de caixa e formato 1740 Å³ (formato externo); NF-κB: 19,67Å x 13,33Å x 17,33Å, 4545 Å³ de volume de caixa e formato 1085 Å³ (formato externo); e ERK1/2: 31,00Å x 23,00Å x 15,67Å, 11170 Å³ de volume de caixa e formato 1085 Å³ (formato externo). Os parâmetros restantes foram executados em suas configurações padrão. O programa Omega 4.2.1.2 da OpenEye Scientific [64] gerou as conformações tridimensionais das moléculas submetidas ao encaixe no FRED. Para classificar as moléculas, foi usada a função de pontuação padrão Chemgauss4. As interações intermoleculares foram geradas no servidor online PLIP [65].

5. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste trabalho mostram uma importante ação antinociceptiva do poligaleno e do aurapteno, obtidos de *Polygala boliviensis*, em modelos experimentais de dor. Os ensaios *in silico* sugerem uma afinidade dessas moléculas com os alvos COX-1, COX-2, MPO, JNK1, NF-κB e ERK1/2.

Financiamento: O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Declaração do Conselho de Ética em Pesquisa: O protocolo de estudo com animais foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (Nº12/2023; 30 de junho de 2023) da Universidade Estadual de Feira de Santana.

Agradecimentos: Agradecemos ao Biotério Central da Universidade Estadual de Feira de Santana e a equipe administrativa.

Conflitos de interesse: Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

REFERÊNCIAS

1. Yong, R.J.; Mullins, P.M.; Bhattacharyya, N. Prevalence of chronic pain among adults in the United States. *Pain* **2022**, *163*, 328-332. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000002291>.
2. Maresova, P.; Javanmardi, E.; Barakovic, S.; Barakovic, H.J.; Tomsone, S.; Krejcar, O.; Kuca, K. Consequences of chronic diseases and other limitations associated with old age—A scoping review. *BMC Public Health* **2019**, *19*, 1431. <https://doi.org/10.1186/s12889-019-7762-5>.
3. Scurrah, A.; Shiner, C.T.; Stevens, J.A.; Faux, S.G. Regional nerve blockade for early analgesic management of elderly patients with hip fracture—A narrative review. *Anaesthesia* **2018**, *73*, 769-783. <https://doi.org/10.1111/anae.14178>.
4. Virgen, C.G.; Kelkar, N.; Tran, A.; Rosa, C.M.; Cruz-Topete, D.; Amatya, S.; Cornett, E.M.; Urits, I.; Viswanath, O.; Kaye, A.D. Pharmacological management of cancer pain: Novel therapeutics. *Biomed. Pharmacother.* **2022**, *156*, 113871. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.113871>.
5. Cohen, S.P.; Vase, L.; Hooten, W.M. Chronic pain: An update on burden, best practices, and new advances. *Lancet* **2021**, *29*, 2082–2097. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(21\)00393-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(21)00393-7).
6. Mahnashi, M.H.; Alqahtani, Y.S.; Alyami, B.A.; Alqarni, A.O.; Ullah, F.; Wadood, A.; Sadiq, A.; Shareef, A.; Ayaz, M. Cytotoxicity, anti-angiogenic, anti-tumor and molecular docking studies on phytochemicals isolated from *Polygonum hydropiper* L. *BMC Complement. Med. Ther.* **2021**, *24*, 239. <https://doi.org/10.1186/s12906-021-03411-1>.
7. Farooq, U.; Naz, S.; Shams, A.; Raza, Y.; Ahmed, A.; Rashid, U.; Sadiq, A. Isolation of dihydrobenzofuran derivatives from ethnomedicinal species *Polygonum barbatum* as anticancer compounds. *Biol. Res.* **2019**, *75*, 1. <https://doi.org/10.1186/s40659-018-0209-0>.
8. Lacaille-Dubois, M.A.; Delaude, C.; Mitaine-Offer, A.C. A review on the phytopharmacological studies of the genus *Polygala*. *J Ethnopharmacol.* **2020**, *249*, 112417. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2019.112417>.
9. Zeng, Z.; Chang, X.; Zhang, D.; Chen, H.; Zhong, X.; Xie, Y.; Yu, Q.; Yan, C. Structural elucidation and anti-neuroinflammatory activity of *Polygala tenuifolia* polysaccharide. *Int. J. Biol. Macromol.* **2022**, *31*, 1284-1296. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.08.161>.
10. Wang, M.; Liu, X.; Wang, Z.; Xu, Q. The extract of *Polygala fallax* Hemsl. slows the progression of diabetic nephropathy by targeting TLR4 anti-inflammation and MMP-2/9-mediated anti-fibrosis in vitro. *Phytomedicine* **2022**, *104*, 154251. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2022.154251>.

11. Ünlü, A.; Teralı, K.; Uğurlu Aydın, Z.; Dönmez, A.A.; Yusufoglu, H.S.; Çalış, İ. Isolation, Characterization and *In Silico* Studies of Secondary Metabolites from the Whole Plant of *Polygala inexpectata* Peşmen & Erik. *Molecules* **2022**, *27*, 684.
<https://doi.org/10.3390/molecules27030684>.
12. Coelho, V.P.M.; Agra, M.F.; Baracho, G.S. Flora da Paraíba, Brasil: *Polygala* L. (Polygalaceae). *Acta Bot. Bras*, **2008**, *22*, 225-239.
13. da Silva Trentin, S.; Giordani, R.B.; Zimmer, K.R.; da Silva, A.G.; da Silva, M.V.; dos Santos Correia, M.T.; Baumvol, I.J.R.; Macedo, A.J. Potential of medicinal plants from the Brazilian semi-arid region (Caatinga) against *Staphylococcus epidermidis* planktonic and biofilm lifestyles. *J. Ethnopharmacol.* **2011**, *137*, 327–335.
<https://doi.org/10.1016/j.jep.2011.05.030>.
14. Carneiro da Rocha, J.L.; Araujo, R.F.C.T.; Silva, D.F.; Neves, B.H.; Villarreal, C.F.; Lima, F.O. Evaluation of Biological Activity of *Polygala boliviensis* in Experimental Models. *Iran. J. Pharm. Res.* **2019**, *18*, 793–802. <https://doi.org/10.22037/ijpr.2019.1100655>.
15. Silva, D.F.; Alves, C.Q.; Brandão, H.N.; David, J.M.; David, J.P.; Silva, R.L.; Franchin, M.; Cunha, T.M.; Martins, F.T.; Oliveira, C.M. Poligalen, a new coumarin from *Polygala boliviensis*, reduces the release of TNF and IL-6 independent of NF-κB downregulation. *Fitoterapia* **2016**, *113*, 139-143. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2016.07.021>.
16. da Silva, D.F.; de Souza, J.L.; da Costa, D.M.; Costa, D.B.; Moreira, P.O.L.; da Fonseca, A.L.; Varotti, F.d.P.; Cruz, J.N.; dos Santos, C.B.R.; Alves, C.Q.; et al. Antiplasmodial activity of coumarins isolated from *Polygala boliviensis*: In vitro and *in silico* studies. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2023**, *41*, 22. <https://doi.org/10.1080/07391102.2023.2173295>.
17. Gupta, K.; Barry, S.; Selinsky And Patrick, J. Loll. 2.0 Å structure of prostaglandin H2 synthase-1 reconstituted with a manganese porphyrin cofactor. *Acta Cryst.* **2006**, *62*, 151–156.
<https://doi.org/10.1107/S0907444905036309>.
18. Orlando, B.J.; Lucido, M.J.; Malkowski, M.G. The structure of ibuprofen bound to cyclooxygenase-2. *J. Struct. Biol.* **2015**, *189*, 62-66.
<https://doi.org/10.1016/j.jsb.2014.11.005>.
19. Forbes, L.V.; Sjögren, T.; Auchère, F.; Jenkins, D.W.; Thong, B.; Laughton, D.; Hemsley, P.; Pairaudeau, G.; Turner, R.; Eriksson, H.; et al. Potent reversible inhibition of myeloperoxidase by aromatic hydroxamates. *J. Biol. Chem.* **2013**, *288*, 36636-36647.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M113.507756>.

20. Chamberlain, S.D.; Redman, A.M.; Wilson, J.W.; Deanda, F.; Shotwell, J.B.; Gerding, R.; Lei, H.; Yang, B.; Stevens, K.L.; Hassell, A.M.; et al. Optimization of 4,6-bis-anilino-1H-pyrrolo[2,3-d]pyrimidine IGF-1R tyrosine kinase inhibitors towards JNK selectivity. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2009**, *15*, 360-364. <https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2008.11.077>.
21. de Leon-Boenig, G.; Bowman, K.K.; Feng, J.A.; Crawford, T.; Everett, C.; Franke, Y.; Oh, A.; Stanley, M.; Staben, S.T.; Starovasnik, M.A.; et al. The crystal structure of the catalytic domain of the NF- κ B inducing kinase reveals a narrow but flexible active site. *Structure* **2012**, *10*, 1704-1714. <https://doi.org/10.1016/j.str.2012.07.013>.
22. Lebraud, H.; Wright, D.J.; East, C.E.; Holding, F.P.; O'Reilly, M.; Heightman, T.D. In-gel activity-based protein profiling of a clickable covalent ERK1/2 inhibitor. *Mol. Biosyst.* **2016**, *16*, 2867-2874. <https://doi.org/10.1039/c6mb00367b>.
23. Abboud, C.; Duveau, A.; Bouali-Benazzouz, R.; Massé, K.; Mattar, J.; Brochoire, L.; Fossat, P.; Boué-Grabot, E.; Hleihel, W.; Landry, M. Animal models of pain: Diversity and benefits. *J. Neurosci. Methods* **2021**, *15*, 108997. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2020.108997>.
24. Barrot, M. Tests and models of nociception and pain in rodents. *Neuroscience* **2012**, *211*, 39-50. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2011.12.041>.
25. Le Bars, D.; Gozariu, M.; Cadden, S.W. Animal models of nociception. *Pharmacol. Rev.* **2001**, *53*, 597-652.
26. Park, S.H.; Sim, Y.B.; Kang, Y.J.; Kim, S.S.; Kim, C.H.; Kim, S.J.; Suh, H.W. Mechanisms involved in the antinociceptive effects of orally administered oleanolic acid in the mouse. *Arch. Pharmacol. Res.* **2013**, *36*, 905-911. <https://doi.org/10.1007/s12272-013-0093-7>.
27. Hunskaar, S.; Hole, K. The formalin test in mice: Dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain* **1987**, *30*, 103-114. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(87\)90088-1](https://doi.org/10.1016/0304-3959(87)90088-1).
28. Pradi, L.; Andrade, T.E.S.; Lacerda, J.W.F.; Karvat, J.; Beppler, L.M.; Tizziani, T.; Santos, A.R.S.; Sandjo, L.P. The Antinociceptive Effect of a Hydroalcoholic Extract of *Polygala altomontana* and Its Chemical Profile Using UPLC-ESI-QTOF-HR-MS. *Chem. Biodivers.* **2023**, *20*, 202200715. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202200715>.
29. Kim, K.S.; Lee, D.S.; Bae, G.S.; Park, S.J.; Kang, D.G.; Lee, H.S.; Oh, H.; Kim, Y.C. The inhibition of JNK MAPK and NF- κ B signaling by tenuifoliside A isolated from *Polygala tenuifolia* in lipopolysaccharide-induced macrophages is associated with its anti-inflammatory effect. *Eur. J. Pharmacol.* **2013**, *721*, 267-276. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2013.09.026>.

30. Meotti, F.C.; Ardenghi, J.V.; Pretto, J.B.; Souza, M.M.; d'Avila Moura, J.; Junior, A.C.; Soldi, C.; Pizzolatti, M.G.; Santos, A.R. Antinociceptive properties of coumarins, steroid and dihydrostyryl-2-pyrones from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae) in mice. *J Pharm. Pharmacol.* **2006**, *58*, 107-112. <https://doi.org/10.1211/jpp.58.1.0013>.
31. Leal, L.E.; Moreira, E.S.; Correia, B.L.; Bueno, P.S.A.; Comar, J.F.C.; Sá-Nakanishi, A.B.; Cuman, R.K.N.; Bracht, A.; Bersani-Amado, C.A.; Bracht, L. Comparative study of the antioxidant and anti-inflammatory effects of the natural coumarins 1,2-benzopyrone, umbelliferone and esculetin: *In silico*, *in vitro* and *in vivo* analyses. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* **2024**, *397*, 173-187. <https://doi.org/10.1007/s00210-023-02606-2>.
32. Liang, S.; Chen, Z.; Li, H.; Cang, Z.; Yin, K.; Wu, M.; Luo, S. Efeito neuroprotetor da Umbeliferona contra déficits neurológicos induzidos por isquemia cerebral/reperfusão: *In vivo* e estudos *in silico*. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **2021**, *39*, 4715-4725. <https://doi.org/10.1080/07391102.2020.1780153>.
33. Castro-Martínez, G.; Herrera-Ruiz, M.; González-Cortázar, M.; Porras-Dávila, S.L.; Almanza, P.J.C.; Jimenez-Ferrer, E. Effects of Five Coumarins and Standardized Extracts from *Tagetes lucida* Cav. on Motor Impairment and Neuroinflammation Induced with Cuprizone. *Pharmaceuticals* **2023**, *16*, 1391. <https://doi.org/10.3390/ph16101391>.
34. Beirith, A.; Santos, A.R.; Rodrigues, A.L.; Creczynski-Pasa, T.B.; Calixto, J.B. Spinal and supraspinal antinociceptive action of dipyrone in formalin, capsaicin and glutamate tests. Study of the mechanism of action. *Eur. J. Pharmacol.* **1998**, *345*, 233-245. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(98\)00026-0](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(98)00026-0).
35. Mekonnen, T.; Urga, K.; Engidawork, E. Evaluation of the diuretic and analgesic activities of the rhizomes of *Rumex abyssinicus* Jacq in mice. *J. Ethnopharmacol.* **2010**, *127*, 433-439. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.10.020>.
36. Ahmed, L.; Biddle, K.; Blundell, A.; Koushesh, S.; Kiely, P.; Mein, G.; Sedgwick, P.; Sofat, N. Assessing the effects of distinct biologic therapies on rheumatoid arthritis pain by nociceptive, neuropathic and nociplastic pain components: A randomised feasibility study. *Pilot Feasibility Stud.* **2024**, *1*, 77. <https://doi.org/10.1186/s40814-024-01505-4>.
37. Rocha, F.A.; Aragão, A.G., Jr.; Oliveira, R.C.; Pompeu, M.M.; Vale, M.R.; Ribeiro, R.A. Periarthritis promotes gait disturbance in zymosan-induced arthritis in rats. *Inflamm. Res.* **1999**, *48*, 485-490. <https://doi.org/10.1007/s000110050491>.

38. Okuyama, S.; Morita, M.; Kaji, M.; Amakura, Y.; Yoshimura, M.; Shimamoto, K.; Ookido, Y.; Nakajima, M.; Furukawa, Y. Auraptene Acts as an Anti-Inflammatory Agent in the Mouse Brain. *Molecules* **2015**, *10*, 20230-20239. <https://doi.org/10.3390/molecules201119691>.
39. La, V.D.; Zhao, L.; Epifano, F.; Genovese, S.; Grenier, D. Anti-inflammatory and wound healing potential of citrus auraptene. *J Med. Food.* **2013**, *10*, 961-964. <https://doi.org/10.1089/jmf.2013.0029>.
40. Prut, L.; Belzung, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behavior: A review. *Eur J Pharmacol.* **2003**, *463*, 18-27. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(03\)01272-x](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(03)01272-x).
41. Dunha, N.W.; Miya, T.S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *J. Am. Pharm. Assoc.* **1957**, *46*, 208-209. <https://doi.org/10.1002/jps.3030460322>.
42. Kuribara, H.; Higuchi, Y.; Tadokoro, S. Effects of central depressants on rota-rod and traction performances in mice. *Jpn. J. Pharmacol.* **1977**, *27*, 117-126. <https://doi.org/10.1254/jjp.27.117>.
43. Adelizzi, R.A. COX-1 and COX-2 in health and disease. *J. Am. Osteopath Assoc.* **1999**, *99*, 7-12.
44. Yamamoto, T.; Nozaki-Taguchi, N. The role of cyclooxygenase-1 and -2 in the rat formalin test. *Anesth. Analg.* **2002**, *94*, 4. <https://doi.org/10.1097/00000539-200204000-00035>.
45. Stańczyk, J.; Kowalski, M.L. The role of cyclooxygenase and prostaglandins in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Pol. Merkur. Lekarski.* **2001**, *11*, 438-443.
46. Aratani, Y. Myeloperoxidase: Its role for host defense, inflammation, and neutrophil function. *Arch. Biochem. Biophys.* **2018**, *15*, 47-52. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2018.01.004>.
47. Siraki, A.G. The many roles of myeloperoxidase: From inflammation and immunity to biomarkers, drug metabolism and drug discovery. *Redox Biol.* **2021**, *46*, 102109. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2021.102109>.
48. Roy, P.K.; Rashid, F.; Bragg, J.; Ibdah, J.A. Role of the JNK signal transduction pathway in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol.* **2008**, *14*, 200-202. <https://doi.org/10.3748/wjg.14.200>.
49. Ge, H.X.; Zou, F.M.; Li, Y.; Liu, A.M.; Tu, M. JNK pathway in osteoarthritis: Pathological and therapeutic aspects. *J. Recept. Signal Transduct. Res.* **2017**, *5*, 431-436. <https://doi.org/10.1080/10799893.2017.1360353>.

50. Han, Z.; Boyle, D.L.; Chang, L.; Bennett, B.; Karin, M.; Yang, L.; Manning, A.M.; Firestein, G.S. c-Jun N-terminal kinase is required for metalloproteinase expression and joint destruction in inflammatory arthritis. *J. Clin. Investig.* **2001**, *108*, 73-81. <https://doi.org/10.1172/JCI12466>.
51. Lucas, R.M.; Luo, L.; Stow, J.L. ERK1/2 in immune signalling. *Biochem. Soc. Trans.* **2022**, *31*, 1341–1352. <https://doi.org/10.1042/BST20220271>.
52. Shi, X.-D.; Fu, D.; Xu, J.-M.; Zhang, Y.-L.; Dai, R.-P. Activation of spinal ERK1/2 contributes to mechanical allodynia in a rat model of postoperative pain. *Mol. Med. Rep.* **2013**, *7*, 1661-1665. <https://doi.org/10.3892/mmr.2013.1347>.
53. Borges, G.; Berrocoso, E.; Mico, J.A.; Neto, F. ERK1/2: Function, signaling and implication in pain and pain-related anxio-depressive disorders. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry* **2015**, *60*, 77-92. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2015.02.010>.
54. Ding, Q.; Hu, W.; Wang, R.; Yang, Q.; Zhu, M.; Li, M.; Cai, J.; Rose, P.; Mao, J.; Zhu, Y.Z. Signaling pathways in rheumatoid arthritis: Implications for targeted therapy. *Signal Transduct. Target Ther.* **2023**, *8*, 68. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01331-9>.
55. Lawrence, T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **2009**, *1*, 001651. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a001651>.
56. Wang, J.; Yin, C.; Pan, Y.; Yang, Y.; Li, W.; Ni, H.; Liu, B.; Nie, H.; Xu, R.; Wei, H.; et al. CXCL13 contributes to chronic pain of a mouse model of CRPS-I via CXCR5-mediated NF-κB activation and pro-inflammatory cytokine production in spinal cord dorsal horn. *J. Neuroinflammation* **2023**, *20*, 109. <https://doi.org/10.1186/s12974-023-02778-x>.
57. Ahmed, A.S.; Berg, S.; Alkass, K.; Druid, H.; Hart, D.A.; Svensson, C.I.; Kosek, E. NF-κB-Associated Pain-Related Neuropeptide Expression in Patients with Degenerative Disc Disease. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 658. <https://doi.org/10.3390/ijms20030658>.
58. Zimmermann, M. Ethical guidelines for investigations of experimental pain in conscious animals. *Pain* **1983**, *16*, 109-110. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(83\)90201-4](https://doi.org/10.1016/0304-3959(83)90201-4).
59. Junior, G.L.V.; Lima, F.O.; Boffo, E.F.; Santos, J.D.; Silva, B.C.; Assis, S.A. Extraction optimization and antinociceptive activity of (1→3)-β-D-glucan from *Rhodotorula mucilaginosa*. *Carbohydr. Polym.* **2014**, *25*, 293-299. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.01.064>.
60. Arias Cardona, H.R.; Cerqueira da Silva, B.; de Lima, F.O.; Andrade Leite, F.H.; de Souza, B.C.; Brandão, H.N.; David, J.M.; Alves, C.Q.;

- Kijjoa, A. Hydroxytakakiamide and Other Constituents from a Marine Sponge-Associated Fungus *Aspergillus fischeri* MMERU23, and Antinociceptive Activity of Ergosterol Acetate, Acetylaszonalenin and Helvolic Acid. *Mar. Drugs*. **2024**, *22*, 97. <https://doi.org/10.3390/md22030097>.
61. Woolfe, G.; MacDonald, A.D. The evaluation of the analgesic action of pethidine hydrochloride (demerol). *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **1944**, *80*, 300-307.
 62. Guerrero, A.T.; Verri, W.A.; Cunha, T.M.; Silva, T.A.; Rocha, F.A.; Ferreira, S.H.; Cunha, F.Q.; Parada, C.A. Hypernociception elicited by tibio-tarsal joint flexion in mice: A novel experimental arthritis model for pharmacological screening. *Pharmacol. Biochem. Behav.* **2006**, *84*, 244-251. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2006.05.008>.
 63. Adasme, M.F.; Linnemann, K.L.; Bolz, S.N.; Kaiser, F.; Salentin, S.; Haupt, V.J.; Schroeder, M. PLIP 2021: Expanding the scope of the protein-ligand interaction profiler to DNA and RNA. *Nucleic Acids Res.* **2021**, *49*, 530-534. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab294>.
 64. McGann, M. FRED and HYBRID docking performance on standardized datasets. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **2012**, *26*, 897-906. <https://doi.org/10.1007/s10822-012-9584-8>.
 65. Hawkins, P.C.; Skillman, A.G.; Warren, G.L.; Ellingson, B.A.; Stahl, M.T. Conformer generation with OMEGA: Algorithm and validation using high quality structures from the Protein Databank and Cambridge Structural Database. *J. Chem. Inf. Model.* **2010**, *50*, 572-584. <https://doi.org/10.1021/ci100031x>.

ANEXO A – Declaração da comissão de ética no uso de animais (CEUA) da
UEFS

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE SANTANA
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA-UEFS
Portaria nº 631 / 2003



Feira de Santana, 30 de junho de 2023.

Ofício 12/2023

DE: Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UEFS

PARA: Sr. Bruno Cerqueira da Silva

Prezado Sr. Bruno Cerqueira

Em resposta à solicitação de avaliação do Projeto de Pesquisa intitulado **COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ESTUDO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DA *Gymneia platanifolia* (MART. EX BENTH.) EM MODELOS EXPERIMENTAIS DE DOR**, o projeto foi **APROVADO *ad referendum*** do Colegiado da CEUA UEFS. Solicitamos entrar em contato a coordenação do Biotério Central da UEFS para solicitação dos animais.

Solicitamos de vossa senhoria um relatório final após o término do projeto como consta no Item 5.2.9. Relatório de projetos ou protocolos, da **DIRETRIZ BRASILEIRA PARA O CUIDADO E A UTILIZAÇÃO DE ANIMAIS EM ATIVIDADES DE ENSINO OU DE PESQUISA CIENTÍFICA – DBCA**.

Agradecemos a atenção.
Atenciosamente,

CEUA-UEFS
PORTARIA-UEFS 534/2022

