



Universidade Federal do Maranhão

Pró-Reitora de Pesquisa e Pós-Graduação

**Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto e da
Criança**

Mestrado Acadêmico



**MECANISMO DE AÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E
ANTI-INFLAMATÓRIA DA *Persea americana***

NATHALIA DE FÁTIMA MELO LIMA

São Luís

2018

Universidade Federal do Maranhão
Pró-Reitora de Pesquisa e Pós-Graduação
Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto e da
Criança
Mestrado Acadêmico

NATHALIA DE FÁTIMA MELO LIMA

MECANISMO DE AÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E
ANTI-INFLAMATÓRIA DA *Persea americana*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto e da Criança da Universidade Federal do Maranhão para obtenção do Título de Mestre em Saúde do Adulto e da Criança.

Área de Concentração: Ciências Aplicadas à Saúde do Adulto

Orientadora: Prof. Dr^a. Maria do Socorro de Sousa Cartágenes.

Coorientador: Prof^a Dr^o João Batista Santos Garcia

São Luís

2018

NATHALIA DE FÁTIMA MELO LIMA

**MECANISMO DE AÇÃO DA ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA E
ANTI-INFLAMATÓRIA DA *Persea americana***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde do Adulto e da Criança da Universidade Federal do Maranhão para obtenção do título de Mestre em Saúde do Adulto e da Criança.

A Banca Examinadora da Defesa de Mestrado, apresentada em sessão pública, considerou o candidato aprovado em: ____/____/____.

Prof^a Dr^a Maria do Socorro de Sousa Cartágenes (Orientadora)
Universidade Federal do Maranhão

Prof^a Dr^o João Batista Santos Garcia (Coorientador)
Universidade Federal do Maranhão

Prof^a Dr^o Fernando Cesar Vilhena Moreira Lima
Faculdade Santa Terezinha

Prof^a Dr^a Sally Cristina Moutinho Monteiro
Universidade Federal do Maranhão

Prof^o Dr^o Orlando José dos Santos
Universidade Federal do Maranhão

A Deus, por me permitir trilhar meus caminhos neste plano com saúde, força e sabedoria.

À minha avó Naná (*in memoriam*) e minha mãe, Felizia, por todo o amor incondicional dedicado a mim.

AGRADECIMENTOS

A Deus, o Mentor de todas as coisas, que me concede a graça de estar viva e de poder desfrutar deste momento.

A minha amada vó, Maria Silva - Vó Naná (*in memoriam*), que me cobriu com amor incondicional e que não poupou esforços para me ver concretizando sonhos.

A minha querida e adorável mãe, Felizia Lima, a qual me oferece o sentimento mais nobre que existe: o amor de mãe. Obrigada por não me deixar fraquejar e por lutar comigo lado a lado nessa conquista.

À Prof^a Maria do Socorro de Sousa Cartágenes, pelos ensinamentos e pelo acolhimento, incentivo e carinho e principalmente pela compreensão, paciência e amizade ao longo de toda minha trajetória acadêmica.

As minhas tias Ana Lucia Melo, Ana Cristina Melo, Dalva Melo, pelo carinho e afago de todo sempre.

As minhas melhores amigas, Mariana Serra e Thaciane Sodré, irmãs que a vida me permitiu escolher.

A Fernanda Rosa, pela força, incentivo e paciência em ouvir os meus lamentos ao longo da realização deste trabalho.

A Rosa Helena, parceira de luta e infinitos experimentos em dias que eram para ser de lazer. Obrigada por sempre estar comigo, por não me deixar desistir.

A Will Mesquita, Alberto Lopes e Cleydilene Vasconcelos, pelo incentivo e parceria com os testes e experimentos *in vitro*.

Aos amigos e professores do Laboratório Experimental de Estudo da Dor – LEED, pelos conhecimentos trocados, pela boa companhia nos experimentos prolongados.

Aos professores da Pós-Graduação em Saúde do Adulto da UFMA pelos conhecimentos transmitidos, pelo aprendizado concedido.

Aos amigos que fiz durante a Pós-Graduação em Saúde do Adulto e da Criança, os quais proporcionam momentos de descontração e estiveram juntos galgando esse caminho.

A Universidade Federal do Maranhão, pelo ambiente de ensino e trabalho.

A CAPES e a FAPEMA, pelos financiamentos dos projetos aos quais pude fazer parte.

MUITO OBRIGADA!

“Instruir-te-ei, e ensinar-te-ei o caminho
que deves seguir; guiar-te-ei com os
meus olhos.”

Salmos 32:8

RESUMO

Persea americana Mill é uma espécie vegetal tradicionalmente utilizada na medicina tradicional brasileira no tratamento de processos álgicos e inflamatórios. **Objetivos:** Avaliar o efeito anti-inflamatório e antinociceptivo do extrato hidroalcoólico das folhas de *Persea americana* Mill (EHPa) em modelos de dor e inflamação, bem como investigar os possíveis mecanismos envolvidos na ação desta espécie. **Materiais e Métodos:** Para identificação dos compostos existentes no EHPa utilizou-se a CLAE. A atividade do EHPa foi avaliada utilizando camundongos *Mus musculus* (machos, ±45 dias) no teste de edema de pata induzido por carragenina e dextrana, para ação anti-inflamatória e; contorções abdominais induzidas por ácido acético, formalina e glutamato para ação antinociceptiva. Para avaliação do envolvimento de receptores opioides e participação da via L-arginina-NO na ação antinociceptiva, tratou-se previamente com naloxona e L-NAME, respectivamente. Para análise *in vitro*, utilizou-se o teste de inibição de COX-1 e COX-2 e a docagem molecular para avaliar o composto que melhor interagiu com a COX-2. **Resultados:** A CLAE identificou compostos como a β-amirina, ácido cafeico, ácido cumárico, isoquercitrina, naringerina e canferol. O tratamento com EHPa 250 e 500mg/kg reduziu o edema de pata induzido por carragenina em 40% e 70%, respectivamente; resultado semelhante foi obtido com o EHPa na dose de 500mg/kg na indução de edema por dextrana (redução de 50%), evidenciando o poder anti-inflamatório da espécie. O EHPa (50, 250 e 500mg/kg) reduziu a nocicepção causada pelo ácido acético, assim como também na segunda fase (inflamatória) do teste de formalina. Na fase neurogênica do teste de formalina, o EHPa nas doses de 250 e 500mg/kg conseguiu reduzir o tempo de reação dos animais em 51% e 71,1%, respectivamente. No teste de glutamato, o EHPa (50, 250 e 500mg/kg) reverteu a nocicepção causada pela injeção intraplantar de glutamato em 61,2%, 71,7% e 86% respectivamente. A naloxona não foi capaz de reverter a ação desempenhada pelo EHPa (500mg/kg) na fase neurogênica do teste de formalina. Em contrapartida, a naloxona foi capaz de bloquear o efeito antinociceptivo do EHPa na fase inflamatória. O L-NAME não foi capaz de reverter ação antinociceptiva central do EHPa; Na fase inflamatória, o L-NAME foi capaz de aumentar ainda mais a ação antinociceptiva periférica do EHPa em 49,3%. No teste *in vitro*, o EHPa inibiu as Cicloxigenases, apresentando maior seletividade para COX-2, quando comparada a COX-1. A β-amirina foi o composto que melhor interagiu com a COX-2. **Conclusão:** O EHPa tem efeitos anti-inflamatórios e antinociceptivos significativos. A ação anti-inflamatória do EHPa envolve a participação de histamina e/ou 5HT, além da inibição das cicloxigenases, tendo maior seletividade por COX-2, causada pelo menos em parte, pela β-amirina. Os receptores opioides não estão envolvidos na atividade antinociceptiva central do EHPa, porém evidenciou-se a possível participação de receptores do tipo NMDA. A ação antinociceptiva periférica do EHPa parece envolver receptores opioides e a modulação de NO.

Palavras-chaves: *Persea americana*, COX-2, receptor opioide, NO, β-amirina.

ABSTRACT

Introduction: *Persea americana* Mill is a plant species traditionally used in traditional Brazilian medicine for the treatment of inflammatory and algic processes. **Objectives:** To evaluate the anti-inflammatory and antinociceptive effect of the hydroalcoholic extract of the leaves of *Persea americana* Mill (EHPa) on pain and inflammation models, as well as to investigate the possible mechanisms involved in the action of this species. **Materials and Methods:** To identify the existing compounds in EHPa, the HPLC was terminated. The activity of EHPa was evaluated using *mus musculus* mice (males, \pm 45 days) in the paw edema test induced by carrageenan and dextran, for anti-inflammatory action; abdominal contortions induced by acetic acid, formalin and glutamate for antinociceptive action. For evaluation of the involvement of opioid receptors and participation of the L-arginine-NO pathway in antinociceptive action, previously treated with naloxone and L-NAME, respectively. For in vitro analysis, the COX-1 and COX-2 inhibition test was used. **Results:** The HPLC identified compounds such as β -amirin, caffeic acid, coumaric acid, isoquercitrin, naringerin and canferol. Treatment with EHPa (250 and 500mg / kg) reduced carrageenan-induced paw edema by 40% and 70%, respectively; A similar result was obtained with the 500mg / kg EHPa in the induction of dextran edema (50% reduction), evidencing the anti-inflammatory power of the species. In the in vitro test, the EHPa inhibited the Cyclooxygenases, presenting greater selectivity for COX-2, when compared to COX-1. EHPa (50, 250 and 500mg / kg) reduced nociception caused by acetic acid, as well as the second (inflammatory) phase of the formalin test, in the neurogenic phase of the formalin test, EHPa at doses of 250 and 500 mg / kg was able to reduce the reaction time of the animals in 51% and 71.1% respectively. In the glutamate test, EHPa (50, 250 and 500mg / kg) reversed the nociception caused by intraplantar glutamate injection in 61.2%, 71.7% and 86% respectively. Naloxone was not able to reverse the action of EHPa (500mg / kg) in the neurogenic phase of the formalin test. In contrast, naloxone was able to block the antinociceptive effect of EHPa in the inflammatory phase. L-NAME was not able to reverse central antinociceptive action of EHPa; In the inflammatory phase, L-NAME was able to further increase the peripheral antinociceptive action of EHPa in 49.3%. **Conclusion:** EHPa has significant anti-inflammatory and antinociceptive effects. The anti-inflammatory action of EHPa involves the participation of histamine and / or 5HT, in addition to the inhibition of cyclooxygenases, having greater COX-2 selectivity. Opioid receptors are not involved in the central antinociceptive activity of EHPa, but the possible participation of NMDA receptors was evidenced. The peripheral antinociceptive action of EHPa seems to involve opioid receptors and NO modulation.

Keywords: *Persea americana*, COX-2, opioid receptor, NO, β -amyirin.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Sensibilização periférica e central via prostaglandina (PGE ₂).....	24
Figura 2	Vias nociceptivas do sistema nervoso periférico ao sistema nervoso central.....	26
Figura 3	Sensibilização periférica.....	27
Figura 4	Regulação inibitória da neurotransmissão.....	31
Figura 5	Síntese de óxido nítrico a partir da L-arginina.....	32
Figura 6	Degraus do tratamento farmacológico da dor.....	33
Figura 7	Efeito do EHPa (50, 250 e 500 mg/Kg,vo), Indometacina (10mg/Kg,vo) e Salina (NaCl 0,9%,vo) no teste de edema de pata induzido por carragenina em camundongos (n=6/grupo).....	43
Figura 8	Efeito do EHPa (500 mg/Kg,vo), Ciproheptadina (10mg/Kg,vo) e Salina (NaCl 0,9%,vo) no teste de edema de pata induzido por dextrana em camundongos (n=6/grupo).....	44
Figura 9	Efeito antinociceptivo do EHPa (50, 250 e 500 mg/Kg,vo), Indometacina (10mg/Kg,vo) e Salina (NaCl 0,9%,vo) no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos (n=6/grupo).....	45
Figura 10	Efeito antinociceptivo do EHPa (50, 250 e 500 mg/Kg,vo), Indometacina (10mg/Kg,vo) e Salina (NaCl 0,9%,vo) no teste de formalina em camundongos (n=6/grupo).....	46
Figura 11	Efeito antinociceptivo do EHPa (50, 250 e 500 mg/Kg, vo), MK-801 (0,03mg/Kg,ip) e Salina (NaCl 0,9%,vo) no teste de glutamato em camundongos (n=6/grupo).....	47
Figura 12	Efeito do pré-tratamento com naloxona (5 mg/kg, i.p.) sobre o efeito antinociceptivo do extrato bruto de <i>Persea americana</i> no modelo de nocicepção induzida por formalina em camundongos (n=6/grupo).....	48
Figura 13	Efeito do pré-tratamento com L-NAME (50 mg/kg, i.p.) sobre o efeito antinociceptivo do extrato bruto de <i>Persea americana</i> no modelo de nocicepção induzida por formalina em camundongos (n=6/grupo).....	49
Figura 14	Percentual de inibição da Ciclooxygenase 1 (COX-1) e da Ciclooxygenase 2 (COX-2) in-vitro, induzido pelo extrato hidroalcoólico de <i>Persea americana</i> , testado em três concentrações: 2µg/mL, 10µg/mL e 50 µg/mL.....	50

Figura 15 Conformação espacial obtida por docagem molecular da B-
amirina (verde) com a enzima COX-2 (PDB:
1DDX)..... 51

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

5-HT	Serotonina
AINE	Anti-inflamatórios não esteroidais
AMPA	Receptor AMPA
ATP	Trifosfato de Adenosina
Ca²⁺	Cálcio
cAMP	Adenosina 3',5'-monofosfato cíclico
CCK	Colecistocinina
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene calcitonina
COX	Cicloxygenase
COX 1	Cicloxygenase 1
COX 2	Cicloxygenase 2
DRG	Gânglio da raiz dorsal
EHPa	Extrato Hidroalcoólico de Persea americana
ERO	Espécie Reativa de Oxigênio
Glu	Glutamato
GM-CSF	Fator estimulador de colônias granulocíticas e macrófagos
IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor
IL-1	Interleucina 1
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
iNOS	Óxido nítrico sintase induzível
ip	Intraperitoneal
ipl	Intraplantar
K⁺	Potássio
KA	Ácido cainato
L-NAME	Nitro-L-arginine methyl ester
MAPKS	Proteína quinase ativada por mitógeno
mGLUR	Receptores metabotrópicos
MPO	Mieloperoxidase
Na⁺	Sódio
NAV	Canais de sódio regulado por voltagem

NGF	Fator de crescimento nervoso
NMDA	N-metil D-Aspartato
NO	Óxido Nítrico
NOS	Óxido Nítrico Sintase
NPY	Neuropeptídeo Y
P2X3	Receptores purinérgicos
PAG	Substância cinzenta periaquedutal
PB	Núcleo parabraquial
PGE₂	Prostaglandina
PGI₂	Prostaciclina
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
RMV	Bulbo ventral medial rostral
sc	Subcutâneo
SNC	Sistema Nervoso Central
SP	Substância P
TFN α	Fator de necrose tumoral α
TRP	Receptores de potencial transitório
vo	Via oral
WDR	Neurônios de amplo espectro
ATP	Trifosfato de Adenosina
CCK	Colecistocinina
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene calcitonina
EHPa	Extrato Hidroalcoólico de Persea americana
IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor
NO	Óxido Nítrico
NPY	Neuropeptídeo Y
SNC	Sistema Nervoso Central
SP	Substância P

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	18
2.1	Gerais	18
2.2	Específicos	18
3	REFERENCIAL TEÓRICO	18
3.1	A espécie vegetal <i>Persea americana</i>	18
3.2	Inflamação	22
3.3	Mecanismos periféricos da dor	26
3.4	Mecanismos centrais da dor	29
3.5	Regulação inibitória da dor	31
3.6	Via L-arginina-óxido nítrico	33
3.7	Terapia farmacológica da dor	33
4	MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1	Produtos Químicos	37
4.2	Espécie Vegetal e Preparo do Extrato	37
4.3	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta-visível (CLAE-UV-Vis)	37
4.4	Animais	38
4.5	Atividade Anti-inflamatória	38
4.5.1	Teste de edema de pata induzido por carragenina.....	38
4.5.2	Teste de edema de pata induzido por dextrana.....	38
4.6	Atividade Antinociceptiva	39
4.6.1	Teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético.....	39
4.6.2	Nocicepção induzida por Formalina.....	39
4.6.3	Nocicepção induzida por glutamato.....	39
4.6.4	Envolvimento do sistema opióide.....	40
4.6.5	Envolvimento do sistema L-arginina- oxido nítrico.....	40
4.7	Ensaio de inibição da enzima ciclooxigenase	40
4.8	Estudo in silico	41

4.8.1	Estruturas dos compostos e enzima COX-2.....	41
4.8.2	Docagem molecular.....	41
4.9	Análises Estatísticas.....	42
5	RESULTADOS.....	43
5.1	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta-visível (CLAE-UV-Vis).....	43
5.2	Atividade Anti-inflamatória.....	43
5.2.1	Teste de edema de pata induzido por carragenina.....	43
5.2.2	Teste de edema de pata induzido por dextrana.....	43
5.3	Atividade Antinociceptiva.....	45
5.3.1	Teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético.....	45
5.3.2	Nocicepção induzida por formalina.....	46
5.3.3	Nocicepção induzida por glutamato.....	46
5.3.4	Envolvimento do sistema opióide.....	47
5.3.5	Envolvimento do sistema L-arginina- oxido nítrico.....	48
5.4	Ensaio de inibição da enzima ciclooxigenase.....	50
5.5	Docagem molecular.....	51
6	DISCUSSÃO.....	53
7	Considerações Finais.....	60
	REFERÊNCIAS.....	61
	ANEXO A: Certificado de Aprovação do CEUA.....	72

1. INTRODUÇÃO

O dor nociceptiva representa um sistema importante para alertar o organismo sobre um dano tecidual, a partir da sinalização mediada por receptores periféricos de alto limiar, os denominados nociceptores (NICKEL et al., 2012).

A dor é iniciada na periferia por estímulos mecânicos, térmicos e químicos e conduzida pelas fibras A β , A δ e C até o corno dorsal da medula espinal. Os potenciais de ação gerados na periferia provem a abertura dos canais de cálcio, liberação de neurotransmissores excitatórios como glutamato e aspartato no corno dorsal da medula espinal. Posteriormente, a informação é transmitida e modulada até o córtex (GRIFFIN; WOOLF, 2009).

Mediadores inflamatórios como as interleucinas, prostaglandinas, histamina, prótons, fator de necrose tumoral, aminas, prostaciclina e bradicinina também promovem alterações no fluxo dos canais iônicos, sensibilização de receptores, redução dos limiares de ação produzindo com isso, a hiperalgesia que é definida como o aumento da sensibilidade a estímulos nocivos e a alodínia que é definida como dor a estímulos normalmente inócuos (CHEN; YANG; GROSSER, 2013; GILRON; JENSEN; DICKENSON, 2013).

A dor é um problema de saúde com implicações socioeconômicas. Nos Estados Unidos, estima-se que a prevalência de dor crônica seja de 30%, gerando um custo de 650 bilhões de dólares por ano (GILRON, JENSEN, DICKENSON, 2013). Segundo Vieira et al. (2012), estima-se que na cidade de São Luís- MA, 42% da população apresente dor crônica e 10% da população apresente dor com características neuropáticas.

Buscando favorecer o equilíbrio entre a transmissão excitatória e a transmissão inibitória descendente da dor, são utilizados anti-inflamatórios não esteroidais (AINES), antidepressivos, anticonvulsivantes, antagonistas dos receptores NMDA, opióides e agentes tópicos na farmacoterapia da dor (BASHIR; COLVIN, 2013).

Modelos experimentais em animais são utilizados para avaliar a atividade analgésica e anti-inflamatória de novos compostos representando o ponto de

partida para caracterização farmacológica (LAPA et al., 2002). Com o advento da tecnológica, abordagens computacionais como a docagem molecular vem sendo utilizada para elucidar a ação de compostos biologicamente ativos. A docagem molecular é uma técnica computacional utilizada para prever a orientação mais favorável de um ligante flexível ligado a um receptor rígido (CHEN, 2014)

O uso de plantas medicinais em países em desenvolvimento é bastante expressivo. Deste modo, uma parte da população brasileira utiliza as plantas medicinais com base no conhecimento e uso popular como único recurso terapêutico. Com isso, tornaram-se uma importante fonte de produtos naturais biologicamente ativos, que podem resultar na descoberta de novos fármacos (ARGENTA et al., 2011; GUIDO et al., 2010).

A espécie *Persea americana* Mill é conhecida popularmente como abacate. Estudos fitoquímicos demonstraram a presença de flavanoídes, alcaloides, taninos, saponinas e triterpenos (WIENTARSIH et al., 2012). Biologicamente é capaz de prevenir doenças renais (WIENTARSIH et al., 2012), , apresenta atividade antifúngica (BIASI-GARBIN et al., 2016), antioxidante (DAIUTO et al., 2014), hipolipidêmica e anti-obesidade (MONIKA; GEETHA, 2015), analgésica e anti-inflamatória (ADEYEMI; OGUNTI et al., 2002; ABUBAKAR; ADAMU, 2013; HERNANDEZ et al, 2014).

Considerando a modulação da dor por vias descendentes de transmissão, o envolvimento de mediadores químicos no processo de nocicepção e diante das evidências científicas sobre a existência da atividade anti-inflamatória e analgésica, busca-se investigar os possíveis mecanismos envolvidos na ação antinociceptiva e anti-inflamatória da *Persea americana*.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Investigar os possíveis mecanismos envolvidos na ação antinociceptiva e anti-inflamatória do extrato hidroalcoólico das folhas de *Persea americana* Mill (EHPa).

2.2 Específicos

- Identificar os compostos constituintes da *Persea americana*
- Identificar o efeito do EHPa sobre modelos de edema de pata induzidos por carragenina e dextrana.
- Dosar Cicloxigenases (COX-1 e COX-2).
- Realizar cálculos de docagem molecular dos compostos presentes no EHPa.
- Avaliar o efeito do EHPa sobre modelos de nocicepção;
- Avaliar, no efeito antinociceptivo do EHPa:
 - 1) a participação da via opióide
 - 2) a participação da via L-arginina - óxido nítrico
 - 3) a participação da via glutamaérgica

3. REFERENCIAL TEÓRICO

3.1. A espécie vegetal *Persea americana*.

Divisão: Magnoliophyta

Classe: Magnoliopsida

Ordem: Laurales

Família: Lauraceae

Gênero: *Persea*

Espécie: *Persea americana*

A família Lauraceae, rara nas regiões temperadas, encontra-se amplamente distribuídas através das regiões tropicais e subtropicais do planeta, sendo constituída de 50 gêneros, dos quais 22 são encontrados no Brasil, e 2.500 - 3.000 espécies. Em geral, as plantas dessa família são conhecidas como “canelas” e possuem valor econômico e ecológico (BARROSO et al., 2002).

Estudos relatam o isolamento de neolignanas, flavonóides, estirilpironas, ésteres e amidas de Lauraceas nativas do Brasil (FERNANDES et al., 1976; BARBOSA-FILHO, et al., 1987; ROSSI et al., 1997). Diferentes espécies desta família possuem atividade biológica comprovada, como por exemplo, atividade antimicrobiana de *Laurus nobilis* (BARATTA et al., 1998), atividade acaricida de *Laurus novocanariensis* e de *L. nobilis* (MACCHIONI et al., 2006), atividade larvicida de *Aniba duckei* (SOUZA et al., 2007) e atividade antifúngica de *Aniba rosaeodora* (SIMIC et al., 2004).

Persea, membro da família Lauraceae, compreende cerca de 190 espécies (MADRINAN, 1996; ALVAREZ et al., 2016), distribuídas principalmente na Mesoamérica, América do Sul e Sudeste Asiático (SCORA E BERGH, 1990). Plantas pertencentes a este gênero foram usadas na medicina tradicional para tratar a hipertensão (WRIGHT et al., 2007), diarreia (MOHAGHEGHZADEH et al., 2006), doenças infecciosas (SCHLEMPER et al., 2001), anti-inflamatório (CECHINEL-FILHO et al., 2007) e analgésico gástrico (NOVAIS et al., 2004).

A espécie *Persea americana* tem como sinonímia científica *Laurus persea* L, *Persea drymifolia* Schlecht. e cham, *Persea gratissima* Gaertn.f., e

Persea nubigena, recebendo nome comum de abacateiro (MOHAMMAD; DAS; KHARYA, 2010). O Brasil é o nono maior produtor de abacate, com 160.400 toneladas colhidas em 10.750 hectares, em 2011, sendo a 17ª fruta mais produzida no país, e tendo o estado de São Paulo como produtor (47,5%), seguido por Minas Gerais (19,0%) e Paraná (11,2%) (ALMEIDA; SAMPAIO, 2013).

A espécie *Persea americana* Mill, pertencente à família Lauraceae é integrante das florestas de natureza tropical, onde se caracteriza por ser uma árvore de folhas perenes, com nome vernacular abacateiro, e tem seu fruto conhecido como abacate (TESKE; TRENTINI, 1996). A espécie mede de 10 a 15 metros, possui córtex aromático e caule lenhoso. Suas folhas são lisas, ceriáceas, de cor verde escura, formato oval-oblongas, de margens inteiras, mais ou menos onduladas (ANVISA, 2010).

Esta espécie tem sido utilizada em países de origem americana como regulador hormonal, agente anticonstipação e redutor dos níveis de colesterol (CHIU; CHANG, 1988), além de estarem descritos como matéria-prima na preparação de emulsões para os tratamentos de pele seca, agentes protetores contra a radiação ultravioleta, compostos antioxidantes e antienvhecimento (VINHA et al, 2012).

No Brasil, as preparações advindas desta espécie são utilizadas para o combate a problemas renais, ação diurética e antihipertensiva, vermífugo, tendo o caroço, folha e flor como as partes utilizadas pela população local (REGO, 1995; RODRIGUES, 2013). Estudos químicos com *Persea americana* revelaram a presença de glicósidos terpenoides (MURAKOSHI et al., 1976; RODRIGUEZ-SAONA et al., 1999), derivados do anel de furano (RODRIGUEZ-SAONA et al., 2000), alcanóis (DEL REFUGIO RAMOS et al., 2004), flavonoides, ácidos orgânicos, fitohormônios e vitaminas (HURTADO-FERNÁNDEZ et al., 2014). Em um estudo conduzido por Oberlies et al. (1998), foi isolado 1,2,4-tri-hidroxi-heptadec-16-eno, 1,2,4-tri-hidroxi-heptadec-16-yne e 1,2,4-tri-hidroxinonadecano de frutos de *P. americana*, destacando a atividade moderadamente citotóxica destas substâncias quando testadas em um pequeno painel de células cancerígenas. Guzman-Rodriguez et. al. (2016) evidenciaram

a ação anticâncer da *P.americana* em células de câncer de mama, MCF-7. Abubakar e seus colaboradores (2017) isolaram um triterpenoide das sementes de *P. americana* capaz de inibir significativamente a proliferação de células das linhagens MCF-7 e HepG2, reafirmando a ação citotóxica da espécie. Alguns dos flavonoides encontrados na espécie são biologicamente ativos, como a quercetina, que mostrou atividade inibitória da formação do antígeno p24 do vírus da imunodeficiência humana (HIV) (WIGG et al., 1996). O extrato de folhas da planta inibiu o vírus causador do herpes simples tipo 1 (HSV-1), o vírus causador da doença de Aujeszky (ADV) e adenovírus tipo 3 (AD3) (ALMEIDA et al., 1998).

Estudos demonstraram que as folhas e sementes de *P. americana* exibem propriedades anticonvulsivante (OJEWOLE; AMABEOKU, 2006), hipoglicemiante (EZEJIOFOR et al, 2013), antifúngicas (BIASI-GARBIN, 2016), antidiarreica (ODO et al, 2013) quando estão presentes em extratos hidroalcoólicos, aquosos ou são preparadas por infusão (chás) (LORENZI; MATOS, 2008). O óleo de abacate também é rico em β -sitosterol (SALGADO et al., 2008), sendo este um dos principais fitoesterol presente nas plantas (VILLASEÑOR e al., 2002). Leite e colaboradores (2009) isolaram β -sitosterol das sementes de *P. americana* e evidenciaram ação larvicida e antifúngica da espécie. Estudos mostraram que o β -sitosterol apresenta ação quimiopreventiva antimutagênica, analgésica, anti-helmintica (VILLASEÑOR et al., 2002), hipocolesterolemiante (LOTTENBERG et al., 2002; VILLASEÑOR et al., 2002) e antifúngica contra *Aspergillus flavus* (LALL et al., 2006).

Vários estudos relatam a ação antioxidante da *Persea americana*, seja em extratos obtidos do fruto (WANG et al, 2010; VILLA-RODRIGUEZ et al, 2011; RODRIGUEZ-SANCHEZ et al, 2013; MORENO; ORTIZ; RESTREPO, 2014; ABAIDE et al, 2017) ou das sementes (RAMOS et al, 2004; DAIOUTO, 2014) da espécie.

Adeyemi e colaboradores (2002) demonstraram a atividade analgésica e anti-inflamatória do extrato aquoso das folhas de *P. americana*, em que obteve seus melhores resultados na dose de 800mg/kg de peso do animal. Abubakar & Adamu (2013) evidenciaram ação do extrato das folhas de *P. americana* em

modelo de dor experimental (contorções abdominais induzidas por ácido acético) e reforçaram a necessidade de mais estudos acerca dos constituintes envolvidos neste efeito analgésico. Hernandez et al (2014) em testes pré-clínicos de nocicepção evidenciou a ação analgésica periférica e central de *P. americana* nas doses 1, 5 e 10g/kg de peso do animal.

3.2 Inflamação

A inflamação, ou processo inflamatório é um evento biológico de detecção, regulação, contenção e reparação do dano tecidual, possuindo como objetivo, a manutenção da integridade do organismo (VODOVOTZ et al., 2008). Constitui uma complexa rede de resposta a um dano ou agente invasor, apresentando como sinais clínicos característicos, rubor (vermelhidão), calor, tumor (tumefação), dor e perda de função (AMSTRONG; KLICKSTEIN, 2009).

O processo inflamatório é multicelular e multimolecular, em que segundos mensageiros e proteínas plasmáticas participam de forma coordenada e eficaz. A resposta inflamatória ocorre em duas fases, a aguda e a crônica (MULLA et al, 2010).

A resposta inflamatória aguda é inicialmente detectada por macrófagos teciduais ou mastócitos, que ativam citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, aminas vasoativas e eicosanóides que além de amplificarem a resposta imune, promovem o aumento da permeabilidade vascular, migração celular e morte celular (HEADLAND; NORLING, 2015).

A inflamação aguda é caracterizada pela exsudação de proteínas e pela migração de neutrófilos para o tecido inflamado. A infiltração de neutrófilos ocorre através de proteínas transmembranas, as selectinas e intreginas, que permitem o rolamento e a adesão dos neutrófilos ao longo da parede do capilar e do endotélio inflamado, além de coordenarem a transmigração através da membrana basal. Posteriormente, os monócitos migram para o local inflamado, sofrem diferenciação para macrófagos e promovem a remoção de detritos e neutrófilos apoptóticos (FREIRE; VAN DYKE, 2013).

Os neutrófilos possuem um papel importante na ativação e recrutamento de macrófagos, além de gerar vários fatores quimiotáticos para monócitos/macrófagos e células dendríticas. Citocinas pró-inflamatórias como a

interleucina 1 (IL-1), interleucina 6 (IL-6), interleucina 8 (IL-8), fator de necrose tumoral α (TNF- α) e outros como o fator estimulador de colônias granulocíticas e macrófagos (GM-CSF) e a mieloperoxidase (MPO), são liberados pelos neutrófilos para promoverem a fagocitose e prolongarem seu o tempo de vida (OLIVEIRA et al, 2011).

A migração de leucócitos e macrófagos para o local afetado também promovem degranulação e o aumento na produção de espécies reativas de oxigênio (EROS), exercendo um importante mecanismo para morte do agente. Além disso, mediadores solúveis, tais como citocinas, quimiocinas, e metabólitos de ácido araquidônico, intensificam a migração de macrófagos e ativam fatores de transcrição, responsáveis pela produção e liberação de cicloxigenase 2 (COX-2), óxido nítrico sintase induzível (iNOS), quimiocinas e citocinas (KAULMANN; BOHN, 2014).

Em geral, a resposta inflamatória aguda é benéfica e persiste por um curto período de tempo, a partir de mecanismos que levam a reparação do dano e homeostase. Entretanto, estados de agressão persistente, aumentam os riscos de danos celulares, resultando em respostas fisiológicas anormais e ao desenvolvimento de estados inflamatórios crônico (KAULMANN; BOHN, 2014).

A resposta inflamatória crônica ocorre pela não resolução do processo na fase aguda, a partir de mecanismos endógenos de resistência ou através de mecanismos de proteção contra a defesa do hospedeiro (FERGUSON, 2010).

É caracterizada morfológicamente pela infiltração de células mononucleares, que incluem monócitos, macrófagos e plasmócitos, destruição tecidual coordenada por células inflamatórias e reparo tecidual desenvolvido a partir da substituição do tecido danificado pelo tecido conjuntivo, acompanhada pela proliferação de pequenos vasos e fibrose (CHOPADE; MULLA, 2010; NATHAN; DING, 2010).

Tanto na resposta de fase aguda quanto na crônica, mediadores inflamatórios como a bradicinina, leucotrienos, interleucinas, substância P e prostaglandinas, agem ativando outras células envolvidas com o processo inflamatório ampliando assim, a resposta inicial ao agente lesivo. Assim como, os mediadores inflamatórios liberados pelos macrófagos, mastócitos, células

endoteliais ou nervos traumatizados, ativam nociceptores facilitando dessa forma, a transmissão dolorosa (KRAYCHETE; CALASANS; VALENTE, 2006; GERALDO; ALFENAS, 2008).

O ácido araquidônico é um mediador inflamatório resultante da ação da fosfolipase A2 nos lipídeos de membrana que posteriormente é metabolizado pela cicloxigenase (COX-1, COX-2), lipoxigenase e epoxigenase formando as prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos, leucotrienos, lipoxinas e ácido epoxieicosatetraenoicos (HOHJOH et al., 2014).

A isoforma constitutiva COX-1 induz a produção de prostaglandinas envolvidas na regulação de funções fisiológicas como a citoproteção da mucosa gástrica, homeostasia renal e função plaquetária. A COX-2, é frequentemente referido como a isoforma induzível responsável pela produção de prostaglandinas durante a inflamação. Além do envolvimento em processos inflamatórios, a COX-2 também está relacionada com o crescimento e formação tumoral (SILVA et al, 2017).

Especificamente, a prostaglandina E2 (PGE2) é o principal prostanóide pró-inflamatório envolvido na hipersensibilidade dolorosa periférica e central. A PGE2 ativa na periferia os canais de sódio e cálcio, reduz o fluxo de potássio, ativa receptores purinérgicos, sensibiliza e potencializa os receptores TRPV1 e aumenta a sensibilidade de receptores a bradicinina via PKA e PKC produzindo assim, hiperalgesia e alodínia. A sensibilização central da PGE2 pré-sináptica ocorre pela liberação de cálcio e posteriormente de glutamato, substância P e do peptídeo relacionado ao gene de calcitonina (CGRP) e a PGE2 pós-sináptica potencializa os receptores NMDA e AMPA e bloqueia a liberação de neurotransmissores inibitórios como a glicina (CHEN; YANG; GROSSER, 2013) (Figura 1).

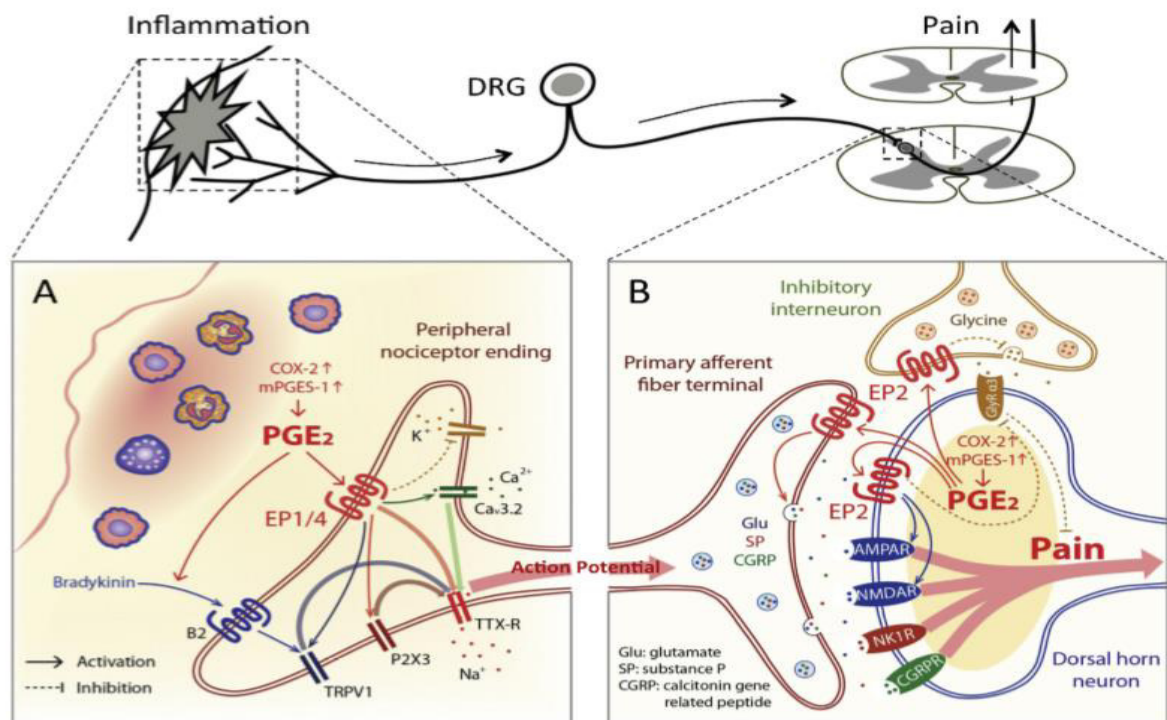


Figura 1. Sensibilização periférica e central via prostaglandina (PGE2). A migração leucocitária libera PGE2 que perifericamente potencializa e sensibiliza os receptores TRPV1, ativa os canais de sódio (Na⁺) e cálcio (Ca²⁺), ativa os receptores purinérgicos (P2X3) e inibe o fluxo de potássio (K⁺). A nível central, a PGE2 pré-sináptica libera cálcio, glutamato (Glu), substância P (SP) e peptídeo relacionado ao gene de calcitonina (CGRP) e pós-sináptica potencializa os receptores NMDAR, AMPAR e inibe glicina. Fonte: Chen; Yang; Grosser (2013).

Além disso, mediadores inflamatórios como a bradicinina, fator de crescimento nervoso (NGF), prostaglandinas, íon hidrogênio (H⁺), fator de necrose tumoral α (TNF- α), interleucina 1 β (IL-1 β), interleucina 6 (IL-6) e quimiocinas promovem sensibilização periférica a partir da ativação de receptores TRPV1 e TRPA1, e canais de sódio tipo Nav 1.7, Nav 1.8 e Nav 1.9 resultando em aumento da sensibilidade e excitabilidade dos nociceptores via proteína quinase A (PKA), proteína quinase C (PKC) e proteína quinase ativada por mitógeno (MAPKS) (Ji et al., 2011).

Por fim, a resposta inflamação é controlada e cessada por mediadores químicos com propriedades anti-inflamatórias, anti-proliferativas e pró-resolução como as lipoxinas e por vias que controlam a migração de leucócitos, edema, permeabilidade vascular, produção de citocinas pró-inflamatórias, tempo de vida dos leucócitos, apoptose, recrutamento de células inflamatórias e clearance de

células apoptóticas (ALESSANDRI et al., 2013; CHANDRASEKHARAN; SHARMA-WALIA, 2015).

3.3. Mecanismos periféricos da dor

Segundo a International Association for the Study of Pain-IASP (2012) a dor é uma experiência sensitiva e emocional desagradável associada ou relacionada a lesão real ou potencial dos tecidos. Pode ser classificada segundo o tempo de duração em aguda (inferior a 30 dias) e crônica (superior a 30 dias) ou segundo seu mecanismo fisiopatológico em dor nociceptiva através da ativação fisiológica dos nociceptores, dor neuropática que ocorre como consequência direta de uma lesão ou de doenças que afetam o sistema somatossensitivo (HAANPAA et al., 2011) e dor mista que envolve a fisiopatologia da dor nociceptiva e neuropática (BRASIL, 2012).

A nocicepção refere-se aos mecanismos pelos quais a dor é codificada, consistindo dessa forma os processos de transdução, transmissão e modulação. De forma simplificada, pode ser considerada como uma cadeia de três-neurônios, com o neurônio de primeira ordem originado na periferia e projetando-se para a medula espinal; o neurônio de segunda ordem ascende pela medula espinal e o neurônio de terceira ordem projetando-se para o córtex cerebral (KLAUMANN; WOUK; SILLAS, 2008) (Figura 2).

A transdução ocorre pela ativação dos nociceptores, que são considerados terminações livres de neurônios nociceptivos periféricos. Essa ativação envolve estímulos mecânicos, térmicos e químicos de alto limiar, gerando alterações celulares que são transmitidas pelas fibras nervosas periféricas até o sistema nervoso central (SNC) (ROCHA et al., 2007).

A estimulação térmica é processada pelos receptores de potencial transitório (TRP), os quais são canais catiônicos (Na^+ , Ca^{2+} , K^+) não seletivos. As respostas ao calor nocivo envolvem a subfamília de receptores TRPV1, que são sensíveis a temperaturas acima de 42°C , pH extracelular baixo e estados inflamatórios. Os receptores TRPM8 e TRPA1 estão envolvidos na resposta ao frio e mentol, sendo o TRPM8 ativado em temperaturas abaixo de 15°C e o

TRPA1 ativado em temperaturas abaixo de 17°C (ANDRADE; MEOTTI; CALIXTO, 2012).

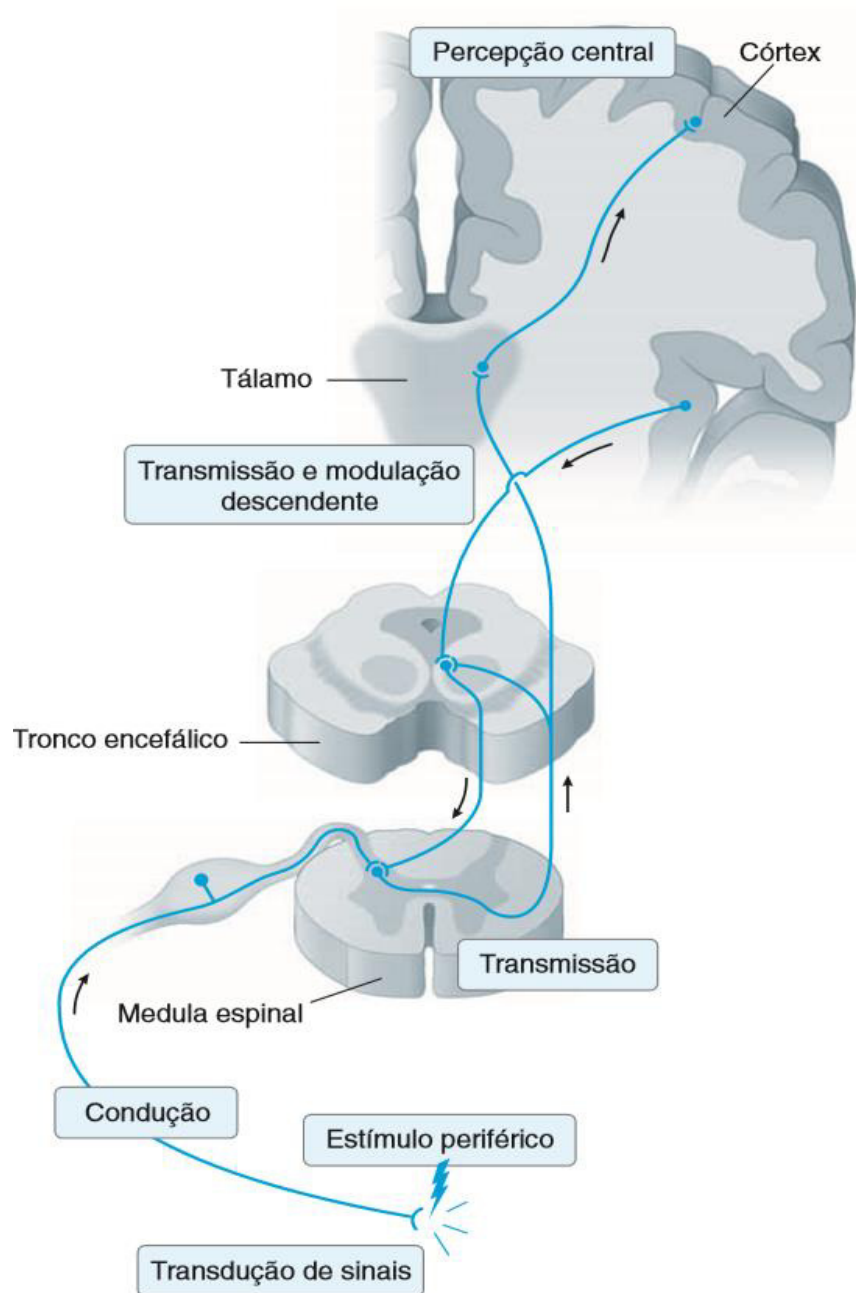


Figura 2. Vias nociceptivas do sistema nervoso periférico ao sistema nervoso central. Fibras aferentes primárias A β , A δ e C cujos corpos celulares encontram-se no gânglio da raiz dorsal (DRG) que transmitem impulsos da periferia ao corno dorsal da medula. Os neurônio de segunda ordem transmitem o impulso ao sistema nervoso central. Fonte: Griffin e Woolf (2009)..

Os estímulos químicos como a bradicinina, prótons, histamina, prostaglandina (PGE₂), prostaciclina (PGI₂), fator de crescimento do nervo

(NGF), interleucinas, fator de necrose tumoral (TNF- α), aminas e quimiocinas produzem sensibilização periférica (CHEN, YANG, GROSSER, 2013). Esses mediadores ativam segundos mensageiros que por sua vez fosforilam canais de sódio regulado por voltagem (Nav1,8) e receptores TRPV1 resultando em redução do limiar de ativação e aumento de resposta a estímulos de calor (GRIFFIN e WOOLF, 2009).

A condução da informação para medula espinhal ocorre pelas fibras nervosas periféricas. As fibras A α e A β são mielinizadas, possuem velocidade de condução rápida, respondem a estímulos inócuos como toque leve, vibração e tornam-se responsivas em estados de inflamação e cicatrização tecidual, causando aumento da resposta dolorosa. As fibras A δ , são mielinizadas, com velocidade de condução rápida, modulando a dor aguda. As fibras C são amielínicas, com velocidade de condução lenta, modulando a dor crônica e tardia (BABOS et al., 2013). Algumas fibras C aferentes denominadas fibras silenciosas não podem ser ativadas normalmente, porém tornam-se responsivas apenas durante a inflamação (MERTENS; DAVID; RIGOARD, 2015).

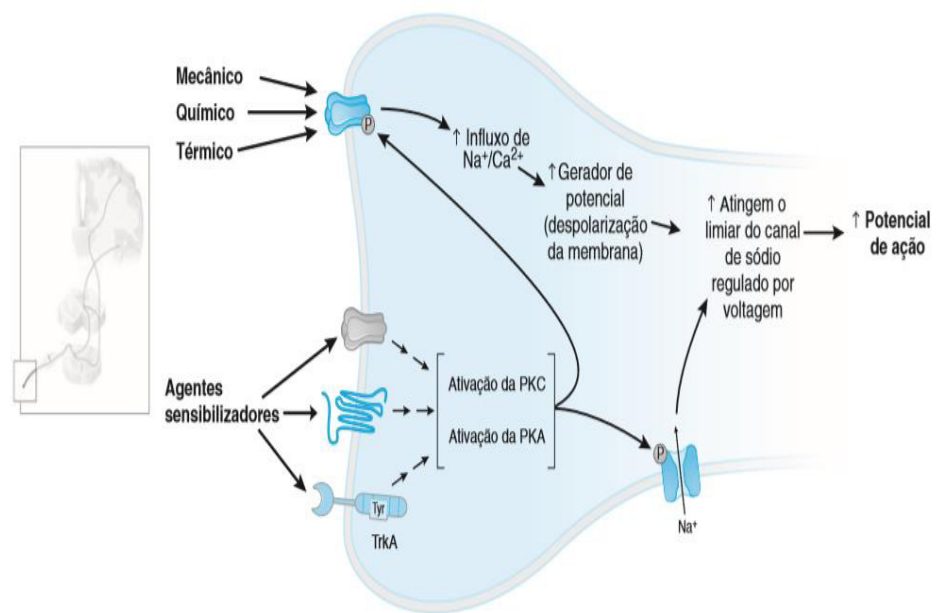


Figura 3. Sensibilização periférica. Um agente sensibilizador ativa o seu receptor acoplado à proteína G. Esse receptor desencadeia duas cascatas de sinalização paralelas. Um ramo ativa a via da fosfolipase C resultando em aumento da liberação de cálcio das reservas intracelulares e em ativação da proteinocinase C (PKC). Ambos os efeitos aumentam o influxo de íons em resposta ao estímulo nociceptivo. O segundo ramo da cascata de sinalização ativa a adenil

ciclase resultando em formação aumentada de cAMP, ativação da proteino quinase A (PKA) e fosforilação dos canais iônicos. Fonte: Griffin e Woolf (2009).

Além da condução da informação pelas fibras nervosas periféricas, é necessária a participação dos canais de sódio voltagem dependentes (Na_v) para converter a despolarização das terminações nervosas em potenciais de ação. São descritos 9 tipos de canais $Na_v1.1$ - $Na_v1.9$ e Na_x , dos quais, os $Na_v1.7$ - 1.9 são expressos principalmente em neurônios periféricos e nos gânglios da raiz dorsal da medula espinal, participando dessa forma, da sinalização dolorosa (BAGAL et al., 2014).

Diversos estímulos podem gerar alterações como, aumento da responsividade e redução do limiar de neurônios na periferia, caracterizando a sensibilização periférica (IASP, 2012) e resultando em alodínia (dor a estímulos normalmente inócuos) e hiperalgesia primária (aumento da sensibilidade a estímulos nocivos no local de lesão) (GILRON; JENSEN; DICKENSON, 2013).

3.4. Mecanismos centrais da dor

Os potenciais de ação gerados na periferia induzem a liberação de neurotransmissores excitatórios (glutamato e aspartato) no corno dorsal da medula espinal. O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório e age na transmissão rápida entre os neurônios sensoriais primários e secundários, mediada pelos receptores metabotrópicos (mGluR) e receptores ionotrópicos N-metil-D-aspartato (NMDA), α -amino-3-hidroxi-5-metilsoxazol-4-propiónico (AMPA) e ácido cainato (KA) (ROCHA et al., 2007).

Os receptores mGluR são subdivididos em 3 grupos: Grupo I (mGlu1 e mGlu5 são acoplados a proteína $G_{\alpha q}$ e ativam a PKC), Grupo II (mGlu2, mGlu3) e Grupo III (mGlu4, mGlu6, mGlu7, mGlu8 são acoplados a proteína $G_{\alpha i}$ e inibem a adenilato ciclase). O grupo I é responsável pela sensibilização neuronal através da inibição da fosforilação dos canais de potássio e ativação dos receptores TRPV1. O grupo II apresenta atividade analgésica pela redução da ativação dos canais TRPV1, canais de sódio e redução do número de sinapses. O grupo III modula a transmissão sináptica em estados inflamatórios e de dor neuropática (CHIECHIO & NICOLETTI, 2012).

O receptor NMDA é um heterotetrâmero composto cada um por duas subunidades GluN1 e GluN2. A ativação do receptor requer a ligação da glicina na subunidade GluN1 e do glutamato a subunidade GluN2 (TAJIMA et al., 2016). O NMDA é bloqueado por íons de magnésio (Mg^{2+}), sendo removido após sua ativação pelo glutamato acarretando em influxo de cálcio e sódio dependente de voltagem e propagação da excitabilidade neuronal (MUIR, 2010).

O receptor AMPA (AMPA) é uma proteína transmembrana composta por 4 subunidades GluR1-GluR4, que ao ligar-se ao glutamato abre o canal para passagem aos íons Na^+ e Ca^{2+} despolarizando as membranas pós-sinápticas, que por sua vez ativa os receptores NMDA, amplificando dessa forma transmissão sináptica (WANG; GOFFER, 2010). A lesão tecidual promove aumento pré-sináptico da subunidade GluR1, internalização da subunidade GluR2 promovendo influxo de cálcio, aumento da excitabilidade neuronal, alterações na transmissão sináptica e sensibilização central (KOPACHA & VOITENKOA, 2013).

A sensibilização central é definida pela IASP (2012) como o aumento da capacidade de resposta dos neurônios nociceptivos no SNC. Essa sensibilização pode ocorrer através do *wind up*, que é descrito como um sistema de ampliação nociceptiva na medula, a partir da ativação de nociceptores periféricos presentes nas fibras C e da ativação de receptores N-metil-D-aspartato (NMDA) e neuroquinina 1 (NK1) (ARANOFF, 2016).

Além disso, fibras nervosas que normalmente transmitem informações não nócicas (fibras $A\beta$) podem transmitir informações dolorosas, gerando hipersensibilidade. Adicionalmente, são descritos reduções no limiar nociceptivo, mudanças nas propriedades dos neurônios do SNC, atividade espontânea neuronal, inibição reduzida e potencialização, facilitação e ampliação nociceptiva (LATREMOLIERE; WOOLF, 2009).

Mediadores inflamatórios como a bradicinina, as prostaglandinas, fator de crescimento nervoso (NGF), óxido nítrico, a interleucina 6 (IL-6), a interleucina 8 (IL-8) e quimiocinas facilitam a despolarização da membrana neuronal através dos canais de sódio e cálcio, exacerbando com isso, a hiperalgesia e alodínia (KRAYCHETE; CALASANS; VALENTE, 2006).

As citocinas também desempenham papel importante na modulação da transmissão nociceptiva. A primeira citocina formada após lesão tecidual ou infecção é a interleucina 1 β (IL-1 β) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) os quais atuam diretamente sobre receptores específicos dos neurônios sensitivos e levam à síntese em cascata de outros efetores, o que também contribui para hiperalgesia e alodínia (OLIVEIRA et al., 2011).

Posteriormente, a informação é transmitida pelos neurônios de projeção secundários da medula espinal ao tronco encefálico e ao tálamo que, a seguir, transmitem sinais ao córtex, hipotálamo e sistema límbico (GRIFFIN & WOOLF, 2009).

3.5 Regulação inibitória da dor

A regulação inibitória da dor é realizada pelas vias descendentes que partem do cérebro para as lâminas I, II, e IV do corno dorsal da medula espinal (MERTENS; DAVID; RIGOUARD, 2015) (Figura 4).

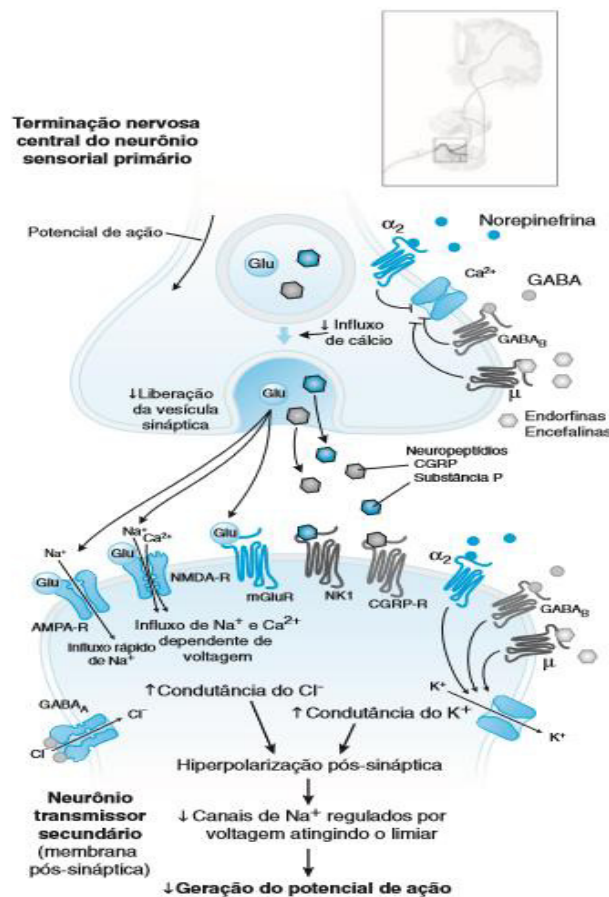


Figura 4. Regulação inibitória da neurotransmissão. A norepinefrina, o GABA e os opióides liberados por neurônios inibitórios descendentes e/ou de circuito local atuam em nível tanto pré-sináptico quanto pós-sináptico, inibindo a neurotransmissão. A inibição pré-sináptica é mediada através da atividade reduzida dos canais de cálcio sensíveis à voltagem, enquanto a inibição pós-sináptica é mediada primariamente pelo aumento do influxo de cloreto e efluxo de potássio. Fonte: Griffin & Woolf (2009).

Os opióides representam o principal sistema de controle periférico e central da dor. Apresentam uma elevada distribuição de receptores no corno dorsal da medula espinal- lâminas I e II (MERRER et al., 2009) e por isso é um importante alvo para caracterização farmacológica de substâncias.

Os peptídeos opióides (β -endorfina, encefalinas e dinorfinas) agem sobre os receptores μ , δ e κ , acoplados a proteína G, que quando ativados inibem a adenilato ciclase, subsequentemente reduz o influxo de cálcio, aumenta o fluxo de potássio, gerando redução na liberação de neurotransmissores excitatórios pré-sinápticos e hiperpolarização pós-sináptica (STEIN, 2013). Além disso, parte da resposta inibitória do sistema é atribuída pela desativação do sistema noradrenérgico no cérebro e ativação de receptores α_2 -adrenérgicos na medula espinal (VO et al., 2016).

A noradrenalina exerce seus efeitos pela ativação dos receptores α_1 e α_2 -adrenérgicos, pela redução pré-sináptica do fluxo de cálcio, ativação pós-sináptica dos canais de potássio, além de ativar interneurônios inibitórios e inibir interneurônios excitatórios (PERTOVAARA, 2013).

O papel da serotonina 5HT ainda não é bem elucidado, porém estudos demonstram que a ativação dos receptores 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₄ expressos no corno dorsal da medula espinal inibem as respostas nociceptivas transmitidas pela fibras-C (LIU et al., 2010).

O GABA e de glicina são os principais neurotransmissores inibidores no corno dorsal da medula espinal. O GABA exerce seus efeitos neurofisiológicos através de sua ligação a receptores de GABA_a presente nas fibras C e na medula espinal, reduzindo a excitabilidade neural e favorecendo a hiperpolarização. A glicina juntamente com o GABA permitem que os íons de magnésio permaneçam bloqueando o canal do receptor NMDA (RUSCHEWEYH et al., 2011).

Por fim, pesquisadores como Ascensão et al (2016) demonstram a participação dos canabinóides no processo analgésico a partir do aumento na expressão dos receptores de CB1 e CB2.

3.6 Via L-arginina-óxido nítrico

O NO, a espécie reativa de nitrogênio mais importante do ponto de vista funcional, está envolvido na via nociceptiva periférica e central sendo formado a partir da L-arginina pela ação da NO sintase (NOS) (PENHA, 2014) (Figura 5).

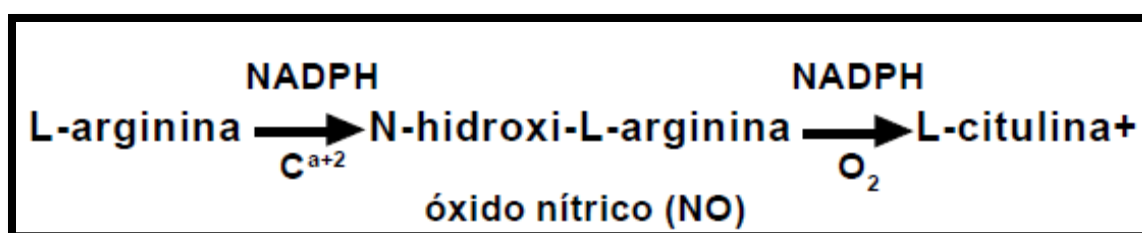


Figura 5. Síntese de óxido nítrico a partir da L-arginina. Fonte: Flora Filho; Zilberstein,

São descritas três isoformas da NOS: 1) Endotelial (eNOS) expressa no endotélio vascular, 2) Neuronal (nNOS) expressa em neurônios, células musculares cardíacas e esqueléticas e 3) Induzível (iNOS) expressa em macrófagos (VITECEK 2012).

Embora esteja envolvido em uma gama de atividades biológicas, o NO em grandes concentrações pode causar danos às proteínas do organismo. Estudos sugerem a participação do óxido nítrico no mecanismo de nocicepção (CURY et al, 2011; CAVALCANTE-SILVA et al, 2014) o que caracteriza essa via um forte alvo farmacológico de novas drogas.

3.7 Terapia farmacológica da dor

Dada à natureza complexa da dor com a participação de aspectos físicos, cognitivos, psicológicos e comportamentais, o tratamento da dor é multimodal, envolvendo reabilitação física e psicológica, tratamento farmacológico, mudanças no estilo de vida e intervenções cirúrgicas (DALE & STACEY, 2015).

Segundo o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Dor Crônica (2012), o tratamento medicamentoso da dor nociceptiva e mista devem seguir os degraus de escala da dor. O tratamento é iniciado pelo primeiro degrau, com a utilização de analgésicos, anti-inflamatórios e fármacos adjuvantes até dose máxima preconizada. Caso não ocorra atenuação dos sintomas após uma semana, haverá passagem para o degrau seguinte (Figura 6).

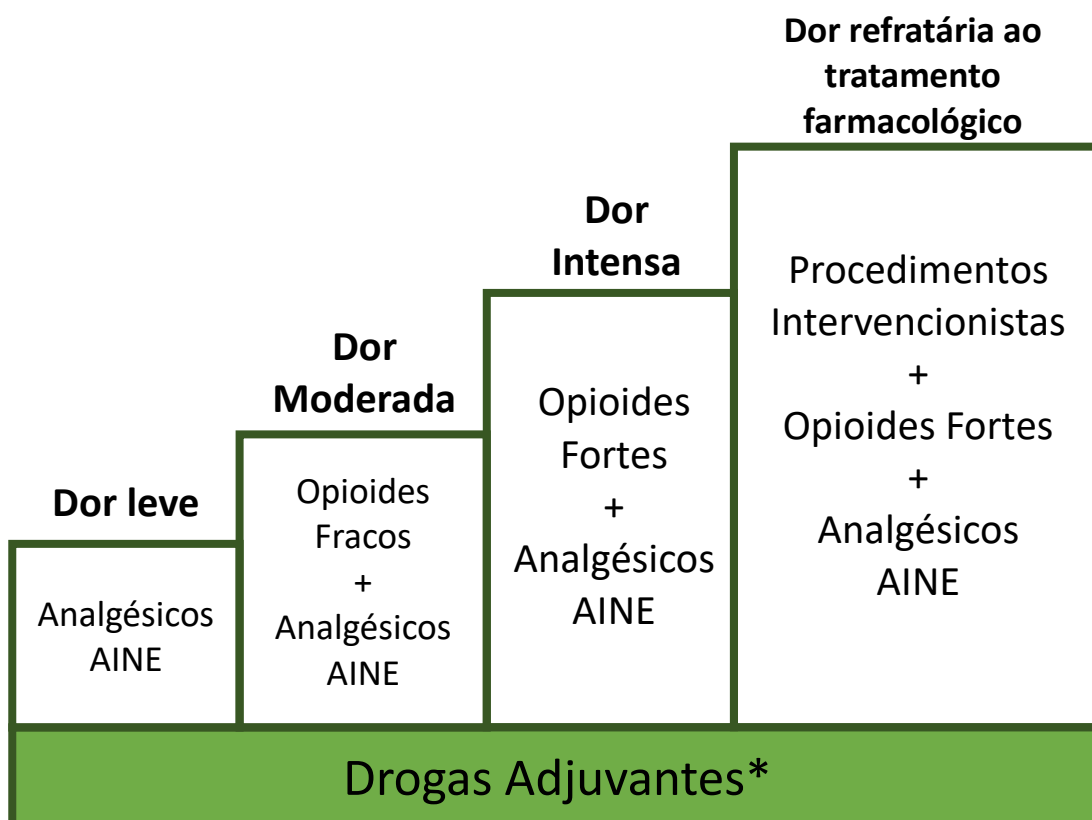


Figura 6. Degráus do tratamento farmacológico da dor

* Antidepressivos ou relaxantes musculares. Fonte: Cardoso, 2014.

Diversas classes de fármacos são amplamente utilizadas para alívio da dor. Os agonistas dos receptores opióides exercem seus efeitos analgésicos diferentes níveis do sistema nervoso central (SNC) e periférico (SNP), através da ativação dos receptores opióides μ a nível pré e pós-sináptico, impedindo a liberação de neurotransmissores excitatórios. Efeitos adversos durante o uso de

opióides incluem depressão respiratória, bradicardia e redução na motilidade intestinal (ROCHA; LEMONICA; BARROS, 2002). O uso prolongado de opióides provoca inúmeras alterações celulares responsáveis pelo desenvolvimento de tolerância, síndrome de abstinência e dependência (NASCIMENTO; SAKATA, 2011).

A terapia com os AINEs consiste em inibir a geração a COX- 1 e COX-2, fator de necrose tumoral (TNF- α) e óxido nítrico sintase induzível (iNOS), reduzindo com isso, a vasodilatação e dor gerados pelas prostaglandinas (PGE₂) e prostaciclina (PGI₂). Além disso, o tratamento com os AINEs causa efeitos adversos gastrointestinais, renais e cardiovasculares (DWIVEDI et al., 2015). A indometacina é um dos AINEs derivados do ácido acético que inibe a COX de forma competitiva, reversível e não seletiva, reduzindo com isso a síntese de prostaglandinas (PGE₂) (JOHNSTON et al., 2012).

Os efeitos analgésicos dos antidepressivos tricíclicos são sugeridos pela inibição da recaptação das monoaminas no sistema nervoso central. Fármacos como a amitriptilina, também são capazes de bloquear os receptores NMDA e canais de sódio (MIKA et al., 2013).

Os anticonvulsivantes reduzem a hiperexcitabilidade neuronal por múltiplos mecanismos, incluindo o reforço da neurotransmissão inibitória GABAérgica, redução do influxo de íons de sódio, bloqueio dos canais de cálcio e inibição da neurotransmissão excitatória glutamatérgica (PHANG & TAN, 2013). Entre os anticonvulsivantes que possuem maior valor clínico temos a gabapentina, pregabalina, lamotrigina e carbamazepina. A gabapentina e a pregabalina possuem efeitos semelhantes, sendo que a gabapentina liga-se à subunidade $\alpha 2\delta$ dos canais de cálcio dependentes de voltagem. A lamotrigina e a carbamazepina atuam pelos bloqueios dos canais de sódio (GRIFFIN; LOWENSTEIN, 2009).

O receptor de NMDA é uma componente chave na evolução e desenvolvimento dos estados de dor. A memantina exerce seu efeito antagonista dos receptores NMDA, principalmente dos receptores pré-sinápticos, reduz os potenciais de longo prazo, inibe receptores de acetilcolina e de serotonina 5-HT₃, e possui efeitos anti-inflamatórios por reduzir a liberação de citocinas no sistema

nervoso central e com isso, a sensibilização central (JOHSON; GLASGOW; POVYSHEVA, 2015). Também é utilizada para o tratamento da doença de Alzheimer por manter a função cognitiva e por possuir efeitos colaterais mínimos das doses estabelecidas dentro do intervalo terapêutico (MOREL et al., 2013)

Os agonistas α_2 -adrenérgicos como a clonidina é utilizada para o tratamento da dor a partir da ativação dos seus receptores α_2 -adrenérgicos e liberação de noradrenalina (SAKATA, 2010).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Produtos Químicos

Os reagentes e fármacos utilizados neste experimento foram: Carragenina (Sigma, EUA), Formaldeído (Labsynth, Brasil), Ácido acético glacial, Indometacina (Indocid®, Merck, EUA), Sulfato de morfina (Dimorf®, Cristalia, Brasil), Cloridrato de Naloxona (Narcan®, Cristalia), Dextrana (Sigma, EUA), Ciproheptadina (Periatin®, Brasil), Glutamato (Sigma, EUA), MK-801 (Sigma, EUA), L-arginina (Sigma, EUA), L-NAME (Sigma, EUA).

4.2. Espécie Vegetal e Preparo do Extrato

Folhas de *Persea americana* foram coletadas na área rural da Ilha de São Luís (2°28'23" S 44°10'13" O), identificadas e registradas sob o número 1087 no Herbário Ático Seabra da Universidade Federal do Maranhão. A amostra vegetal foi submetida à secagem em estufa com circulação de ar, em temperatura limite máxima de 38°C, seguida de trituração em moinho de facas, obtendo-se pó moderadamente grosso (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010). O material seco e moído foi extraído por maceração em etanol (70%) por período médio de 15 (quinze) dias. Parte das soluções extrativas foi reservada para análises químicas e o restante submetido à concentração sob pressão reduzida a 40°C em rotaevaporador originando o Extrato Hidroalcoólico de *Persea americana* (EHPa).

4.3. Cromatografia líquida de alta eficiência com detector ultravioleta-visível (CLAE-UV-Vis)

O EHPa foi analisado em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (Thermo-Finnigan Surveyor) acoplado a detector de ultravioleta-visível (CLAE-UV-Vis). Foi utilizada uma coluna analítica ACE 5 C18 de fase reversa (250 x 4,6 mm, 5 µm). Os compostos do EHPa foram separados em temperatura ambiente usando gradiente de eluição com um fluxo de 1 mL/min. As fases móveis consistiram de água purificada contendo 0,1% de ácido acético (A) e acetonitrila (B). O gradiente usado foi: 0-5min, 20% de B; 5-10min, 25% de B; 10-15min, 25-23% de B, 15-20

min, 23-21% de B; 20-25 min, 21-18% de B; 25-30 min, 18-15% de B, 30-35 min, 15-0% de B. O volume de injeção no sistema de CLAE foi de 5 µL e a detecção no UV-Vis foi realizada em 254 nm.

4.4.. Animais

Para os experimentos foram utilizados camundongos machos (*Mus musculus*) da linhagem *Swiss* de aproximadamente 25-30g provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Maranhão (UFMA). Os animais foram alocados em gaiolas de polietileno (n= 6/ gaiola) e mantidos sob condições controladas de temperatura ($22^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$) e iluminação (ciclo claro/escuro de 12 h), com água e ração *ad libitum*. Todos os protocolos experimentais foram desenvolvidos de acordo com os princípios éticos e de bem-estar animal designados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFMA (número 23115.001913/2016-27).

4.5. Atividade Anti-inflamatória

4.5.1. Teste de edema de pata induzido por carragenina

O teste foi utilizado para avaliação da atividade farmacológica a partir da administração subplantar de carragenina. Os camundongos foram distribuídos foram distribuídos randomicamente em grupos (n= 6) tratados com veículo, EHPa (50, 250 e 500mg/Kg, via oral) ou indometacina (10 mg/Kg, v.o.). Após 60 minutos de tratamento, o edema de pata foi induzido pela administração subplantar de 50 µL de carragenina 1% na pata direita do animal. O volume da pata do animal foi mensurado pelo pletismômetro digital (Modelo Ugo Basile, Verese-Itália) com 0, 1, 2, 3 e 4 horas após a indução. O valor do edema foi obtido pela diferença entre o volume da pata direita e esquerda, sendo expressos como a variação do volume da pata (mL) ao decorrer do tempo (PASSOS et al, 2005).

4.5.2. Teste de edema de pata induzido por dextrana

O teste foi utilizado para avaliação da atividade farmacológica a partir da administração subplantar de dextrana. Os camundongos foram distribuídos foram distribuídos randomicamente em grupos (n= 6) tratados com veículo,

EHPa (500mg/Kg, v.o.) ou indometacina (10 mg/Kg, v.o.). Após 60 minutos de tratamento, o edema de pata foi induzido pela administração subplantar de 50 µL de dextrana 1% na pata direita do animal. O volume da pata do animal foi mensurado pelo pletismômetro digital (Modelo Ugo Basile, Verese-Itália) com 0, 1, 2, 3 e 4 horas após a indução. O valor do edema foi obtido pela diferença entre o volume da pata direita e esquerda, sendo expressos como a variação do volume da pata (mL) ao decorrer do tempo (HENRIQUE et al, 1987).

4.6. Atividade Antinociceptiva

4.6.1. Teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético

O teste de contorções abdominais foi realizado como descrito por Koster e al (1959). Os animais foram tratados por via oral com EHPa (50, 250 e 500mg/Kg), indometacina (10mg/kg) ou veículo (10ml/Kg) uma hora antes da administração de solução de ácido acético (0,6%, 0,1ml/10g, intraperitoneal [i.p.]). O número de contorções foi contabilizado para cada animal durante um período de 20 minutos após a injeção de ácido acético. Os resultados foram expressos como média do número acumulado de contorções.

4.6.2. Nocicepção induzida por Formalina

No modelo de dor induzida por formalina (2,5 %), 20 µL do agente flogístico foram administrados por via intraplantar na pata traseira direita dos camundongos pré-tratados (60 minutos) com veículo, EHPa (50, 250 e 500mg/Kg;v.o), indometacina (10mg/kg; v.o) ou (30 minutos) morfina (5mg/Kg; subcutâneo [s.c.]). O comportamento nociceptivo foi avaliado durante 30 minutos em duas fases distintas: 0 – 5 minutos (fase de dor neurogênica) e 15 – 30 minutos (fase de dor inflamatória), sendo determinado o tempo em segundos de lambertura na pata injuriada nestes dois intervalos (HUNSKAAR; HOLE, 1987, TJOLSEN et al., 1992).

4.6.3. Nocicepção induzida por glutamato

O teste de nocicepção induzida por glutamato foi realizado seguindo estudo prévio realizado por Beirith et al (2002). Os animais foram tratados com EHPa (50, 250 e 500mg/Kg, v.o.), com o antagonista de N-metil-D-aspartato (NMDA), MK-801 (0.03mg/Kg, i.p.) ou com veículo (10ml/Kg; v.o) uma hora antes da administração intraplantar de solução de glutamato (20 µmol/pata, i.pl.) na pata

traseira direita. O tempo em que o animal permaneceu lambendo a pata injetada foi contabilizado por um período de 15 minutos.

4.6.4. *Envolvimento do sistema opióide*

A possível participação do sistema opioide no efeito antinociceptivo do EHPa foi avaliada com o uso do teste formalina, como descrito previamente por Costa et al (2013). Os animais foram pré-tratados com naloxona (5 mg/kg, i.p.) 20 min antes da administração do EHPa (500mg/Kg, v.o.), morfina (5 mg/kg, s.c.) ou veículo (10ml/Kg; v.o). Sessenta minutos após os tratamentos os animais foram submetidos ao teste de formalina.

4.6.5. *Envolvimento do sistema L-arginina- oxido nítrico*

Os animais foram pré-tratados com L-NAME (50 mg/kg, i.p). Após 20 min os animais receberam EHPa (500mg/Kg, v.o.), L-arginina (600 mg/kg, i.p.) ou veículo (10ml/Kg; v.o). Sessenta minutos após dos tratamentos os animais foram submetidos ao teste de formalina.

4.7. **Ensaio de inibição da enzima ciclooxigenase**

O ensaio foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante (Cox Colorimetric Inhibitor Screening - Cayman Chemical®). As microplacas de 96 poços foram inicialmente identificadas, sendo os testes de inibição realizados em triplicata, para cada concentração testada (2, 10 e 50 ug/mL) de extrato de *Persea americana* e para os controles da reação: **BW** – controle sem enzima; **A** – com enzima somente, sem inibidor. Os 3 poços “**BW**” receberam 160 µL do tampão Tris-HCl, 10 µL do HEME e 10 µL do solvente – etanol 70%, utilizados para diluir as amostras. Os 3 poços “**A**” receberam 150 µL do tampão Tris-HCl, 10 µL do Heme , 10 µL da enzima (COX-1 ou COX-2) e 10 µL do solvente – etanol 70%. Os poços com extrato *P. americana* receberam 150 µL do tampão Tris-HCl, 10 µL do HEME , 10 µL da enzima (COX-1 ou COX-2) e 10 µL da amostra de extrato de *Persea americana* diluído com solvente – etanol 70%, nas concentrações 2, 10 e 50 ug/mL. Após a mistura de todos estes reagentes em cada poço, agitou-se cuidadosamente a placa por alguns segundos, seguidos por 5 minutos de período de incubação. Em seguida, foram adicionados 20 µL da solução com substrato colorimétrico, em cada poço da placa e logo em seguida, adicionados 20 µL de ácido araquidônico, substrato da reação

enzimática catalisada pela COX, em cada poço. As placas foram novamente agitadas e incubadas a 25°C por mais dois minutos e então lida a 590 nm.

4.8. Estudo *in silico*

4.8.1. Estruturas dos compostos e enzima COX-2.

Os compostos identificados no extrato hidroetanólico de *P. americana* foram obtidos no banco de dados do Projeto PubChem e estruturalmente esquematizados em três dimensões (3D) com o GaussView 5.0.8 (64).

As propriedades geométricas e vibracionais foram calculadas (otimizadas) no vácuo em nível do método da Teoria do Funcional da Densidade (TFD) utilizando-se o funcional híbrido B3LYP combinado com a base 6-31 ++ G (d,p) com o programa Gaussian 09 (65).

A estrutura 3D da COX-2 (cadeia A) de camundongos *Mus musculus* foi obtida do *Protein Data Bank* (PDB) código 1DDX. Os ligantes originais da estrutura foram removidos, mantendo-se apenas a estrutura da enzima.

4.8.2. Docagem molecular

A estrutura da COX-2 e dos ligantes foram preparados para os cálculos de docagem com o módulo AutoDock Tools (ADT), versão 1.5.6. A enzima Cox-2 foi considerada rígida enquanto que cada ligante foi considerado flexível. As cobranças parciais de Gasteiger foram calculadas após a adição de todos os hidrogênios. Hidrogênios apolares de proteína e ligante foram subsequentemente fundidos. Uma caixa cúbica de 100 × 100 × 100 pontos com um espaçamento de 0,35 Å entre os pontos da grade foi gerada para o alvo inteiro da proteína. A caixa da grade foi centrada no resíduo Arg120. Os métodos de pesquisa global algoritmo genético Lamarckian (LGA) e busca local (LS) pseudo-Solis e Wets foram aplicados na pesquisa de docking. Cada ligante foi submetido a 100 execuções independentes de simulações de acoplamento. O restante dos parâmetros de encaixe foram definidos como os valores padrão. As coordenadas iniciais foram escolhidas utilizando o critério de menor conformação de encaixe do cluster com menor energia combinada com a inspeção visual, segundo Ramos et al (2012) e Silva et al., (2017). O docking molecular foi realizado usando o AutoDock 4.2.

4.9. Análises Estatísticas

As análises estatísticas entre os grupos experimentais foram realizadas por meio de análise de variância (ANOVA) seguida pelo teste de Tukey. Os resultados que apresentaram probabilidade de ocorrência da hipótese de nulidade menor que 5% ($P < 0.05$) foram considerados estatisticamente significantes. A análise estatística foi realizada utilizando o software Graphpad Prima 6[®].

5. RESULTADOS

5.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV-Vis)

No EHPa foram identificados β - amirina, ácido caféico, ácido cumarínico, naringerina, quercitrina e isoquercetina (Tabela 1).

Tabela 1. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV-Vis) dos constituintes identificados no extrato hidroalcoólico de *P. americana*.

Composto	Tempo de Retenção (min)	Área (%)
β -Amirina	14,16	5,48
Ácido caféico	16,457	4,58
Ácido cumarico	20,032	1,46
Naringerina	33,908	1,2
Isoquercitrina	22,278	0,9
Quercitrina	26,398	11,92
Canferol	38,19	0,19

5.2. Atividade Anti-inflamatória

5.2.1 Teste de edema de pata induzido por carragenina

O tratamento realizado com o EHPa na dose 500mg/kg reduziu significativamente o edema de pata em 70% quando comparados ao grupo controle, a partir da segunda hora de teste ($p=0,0242$). A dose de 250mg/kg de EHPa foi capaz de reduzir o volume do edema de pata dos animais em 40% a partir da terceira hora de teste, quando comparados ao grupo controle ($p=0,0182$). A Indometacina (10mg/kg), usada como controle positivo, também foi capaz de reduzir o volume do edema de pata nos animais em 80% a partir da segunda hora de teste, gerando resultados estatisticamente significantes quando comparado ao grupo controle ($p=0,0318$), conforme demonstrado na Figura 7.

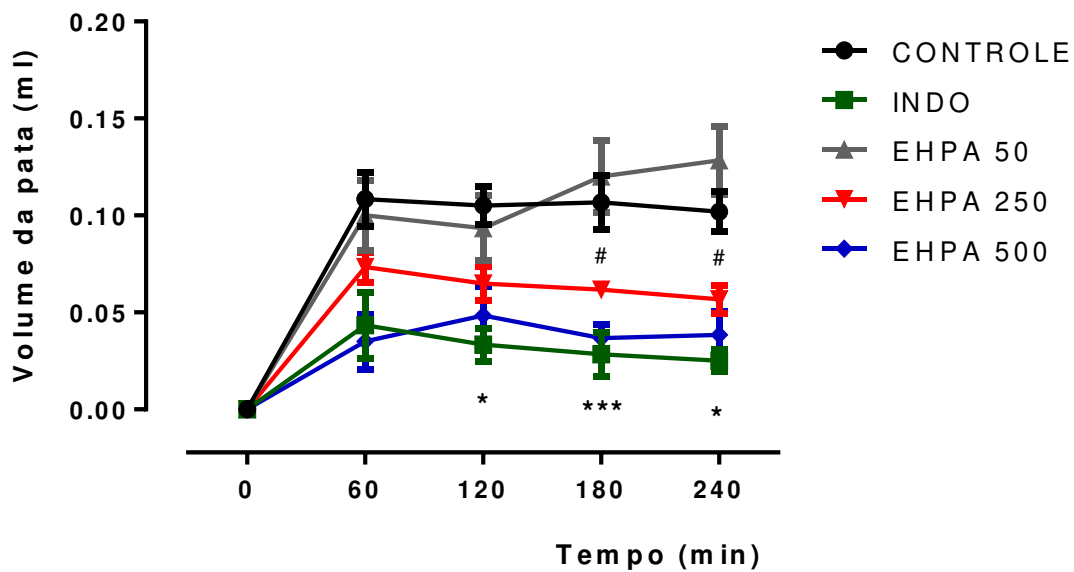


Figura 7: Efeito do EHPa (50, 250 e 500 mg/Kg,vo), Indometacina (10mg/Kg,vo) e Salina (NaCl 0,9%,vo) no teste de edema de pata induzido por carragenina em camundongos (n=6/grupo). Análise estatística realizada no Graphpad Prima 6, usando teste one-way ANOVA seguido pelo Teste de Tukey. * $p < 0,05$ e *** $p < 0,001$ comparando EHPa 500 *versus* grupo controle. # $p < 0,05$ comparando EHPa 250 *versus* grupo controle.

5.2.2. Teste de edema de pata induzido por dextrana

No edema de pata induzido por dextrana, o tratamento realizado com o EHPa na dose 500mg/kg reduziu significativamente o edema de pata em 50% a partir da terceira hora de teste, quando comparados ao grupo controle ($p = 0,0165$). A Ciproheptadina (10mg/kg), usada como controle positivo, também foi capaz de reduzir o volume do edema de pata em 77,8% a partir da primeira hora após a indução do edema, gerando resultados estatisticamente significantes quando comparado ao grupo controle ($p < 0,0001$). A partir da segunda hora de teste os grupos EHPa e Ciproheptadina não apresentaram diferenças estatisticamente significantes (Figura 8).

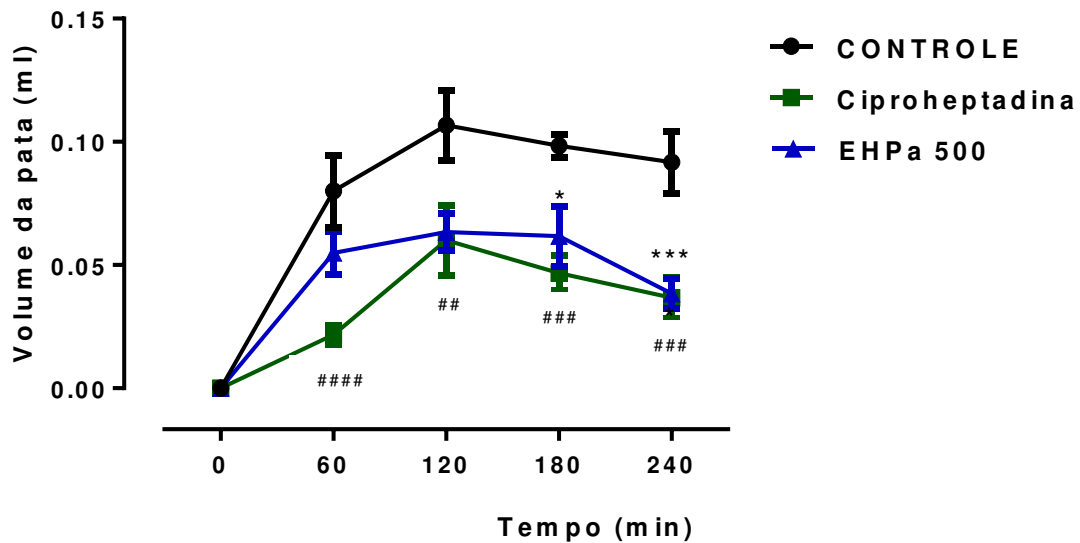


Figura 8: Efeito do EHPa (500 mg/Kg,vo), Ciproheptadina (10mg/Kg,vo) e Salina (NaCl 0,9%,vo) no teste de edema de pata induzido por dextrana em camundongos (n=6/grupo). Análise estatística realizada no Graphpad Prima 6, usando teste one-way ANOVA seguido pelo Teste de Tukey. * $p < 0,05$, *** $p < 0,01$ comparando EHPa 500 *versus* grupo controle. ##### $p < 0,0001$, ### $p < 0,01$ comparando Ciproheptadina *versus* grupo controle.

5.3. Atividade Antinociceptiva

5.3.1 Teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético.

O EHPa nas doses de 50, 250 e 500mg/kg, administrado por via oral, foi capaz de diminuir o número de contorções realizadas pelos animais em 63,4% ($p < 0,0001$), 67% ($p < 0,0001$) e 81,3% ($p < 0,0001$) respectivamente, quando comparado ao grupo controle. A indometacina (10mg/kg), droga padrão utilizada no teste, diminui o número de contorções abdominais em 73% quando comparado ao grupo controle ($p < 0,0001$) (Figura 9).

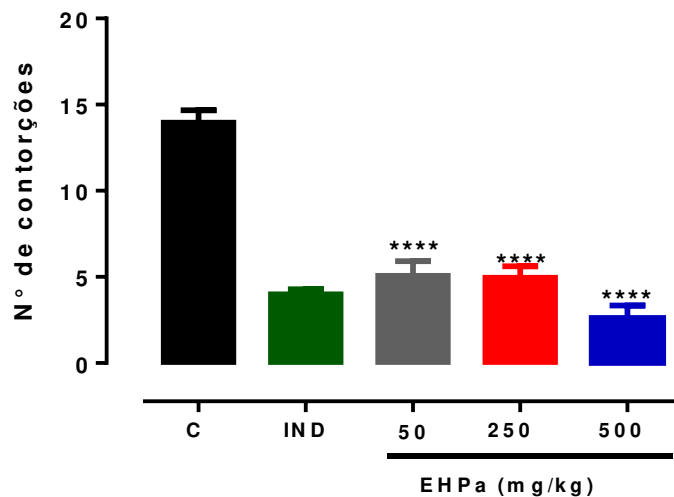


Figura 9: Efeito antinociceptivo do EHPa (50, 250 e 500 mg/Kg,vo), Indometacina (10mg/Kg,vo) e Salina (NaCl 0,9%,vo) no teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos (n=6/grupo). Análise estatística realizada usando one-way ANOVA seguido pelo Teste de Tukey. ****p<0,0001 comparado ao grupo controle.

5.3.2. Nociceção induzida por formalina

Na fase neurogênica (0 - 5min) do teste de dor induzida pela formalina, os tratamentos com EHPa nas doses 250 e 500mg/kg, por via oral, foram capazes de reduzir em 51% ($p=0,0027$) e 71,1% ($p=0,0002$) respectivamente, o tempo em que os animais permaneceram sacudindo/lambendo a pata induzida, gerando resultados estatisticamente significantes quando comparados ao grupo controle. A morfina (5mg/kg, sc) e a indometacina (10mg/kg; vo), drogas utilizadas como controle positivo, também geraram resultados estatisticamente significantes (57,8%, $p<0,0001$ e 33,7%, $p=0,0154$ respectivamente) quando comparadas ao grupo controle. O tratamento com EHPa na dose de 50mg/kg não gerou resultados estatisticamente significantes quando comparado ao grupo controle (Figura 10A). Na fase inflamatória (15 – 30min), o EHPa gerou resultados estatisticamente significantes nas doses 50, 250 e 500mg/kg, as quais foram capazes de reduzir o tempo em que os animais permaneceram sacudindo/lambendo a pata induzida em 29,6% ($p =0,0014$), 51,9% ($p=0,0002$) e 63,5% ($p<0,0001$) respectivamente, quando comparados ao grupo controle. Os fármacos utilizados como droga padrão, morfina e indometacina, também foram

capazes de reduzir o tempo (89,1%, $p < 0,0001$ e 88,4%, $p < 0,0001$, respectivamente) em que os animais permaneceram produzindo resposta (Figura 10B).

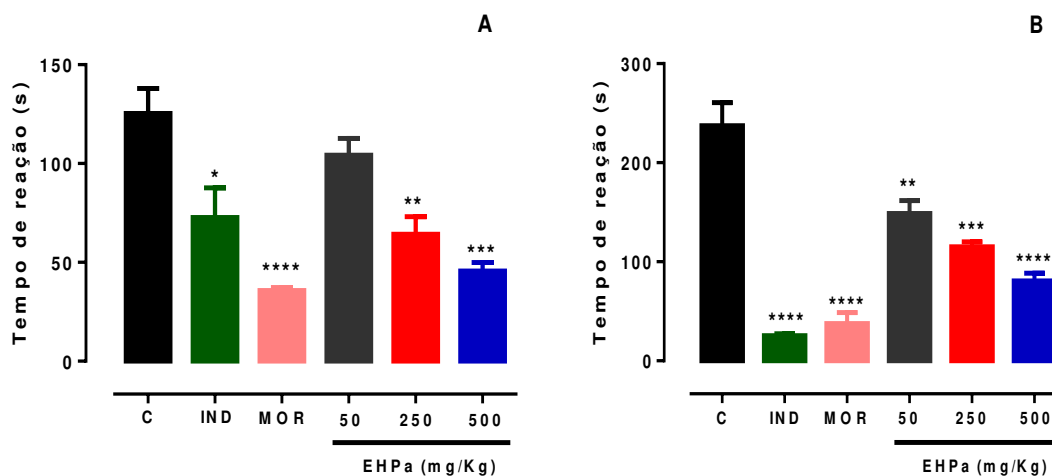


Figura 10: Efeito antinociceptivo do EHPa (50, 250 e 500 mg/Kg,vo), Indometacina (10mg/Kg,vo) e Salina (NaCl 0,9%,vo) no teste de formalina em camundongos (n=6/grupo). A – 1ª fase e B- 2ª fase. Análise estatística realizada no Graphpad Prima 6, usando teste one-way ANOVA seguido pelo Teste de Tukey. **** $p < 0,0001$ *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ e * $p < 0,05$ comparados ao grupo controle.

5.3.3. Nocicepção induzida por glutamato

No teste de nocicepção induzida pelo glutamato, O EHPa nas doses de 50, 250 e 500mg/kg foi capaz de diminuir o tempo em que os animais permaneceram sacudindo/lambendo a pata induzida em 61,2% ($p < 0,0001$), 71,7% ($p < 0,0001$) e 86% ($p < 0,0001$) respectivamente, gerando resultados estatisticamente significantes quando comparados ao grupo controle. O MK-801 (0,03mg/kg, ip), droga padrão utilizada, também reduziu o tempo em que os animais permaneceram reagindo ao glutamato em 77,9% ($p < 0,0001$), produzindo resultados estatisticamente significantes quando comparados ao grupo controle (Figura 11).

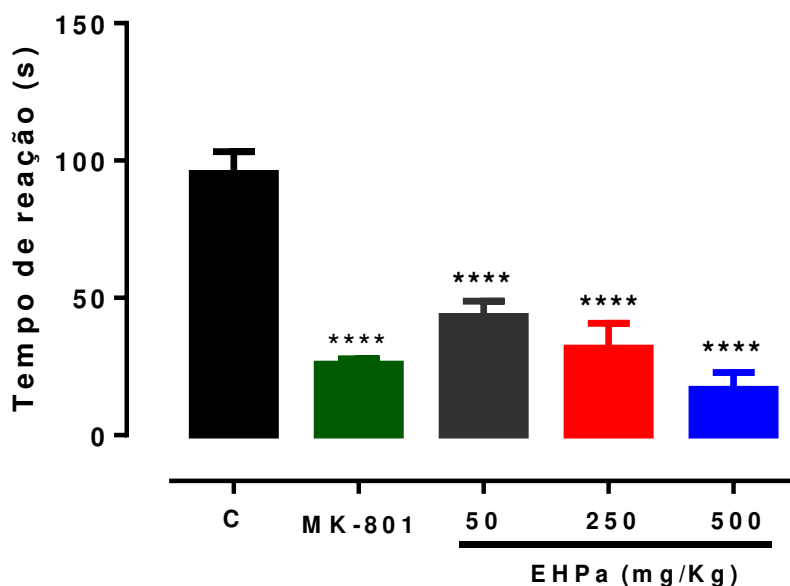


Figura 11: Efeito antinociceptivo do EHPa (50, 250 e 500 mg/Kg, vo), MK-801 (0,03mg/Kg,ip) e Salina (NaCl 0,9%,vo) no teste de glutamato em camundongos (n=6/grupo). Análise estatística realizada usando one-way ANOVA seguido pelo Teste de Tukey. ****p<0,0001 *versus* grupo controle.

5.3.4. Envolvimento do receptor opióide

Na fase neurogênica do teste de formalina, o pré-tratamento com naloxona (5mg/kg, ip) não alterou a resposta desempenhada pelo EHPa na dose de 500mg/kg, por via oral, quando comparado ao grupo tratado apenas com EHPa. Ambos os grupos tratados com EHPa na dose de 500mg/kg apresentaram diminuição no tempo de permanência de lambertura/mordida durante o teste, produzindo resultados estatisticamente significantes quando comparados ao grupo controle, independentemente de estar em associação com a naloxona (50,4%, p=0,0005) ou não (53,9%, p<0,0001). A naloxona, antagonista de receptores opióide, foi capaz de reduzir o efeito analgésico da morfina em 50,8% (p=0,0006) quando comparado ao grupo tratado apenas com morfina. (Figura 12A).

Na fase inflamatória do teste de formalina, o pré-tratamento com naloxona (5mg/kg, ip) foi capaz de alterar a resposta desempenhada pelo EHPa na dose de 500mg/kg, por via oral, aumentando o tempo de reação dos animais em 57,8% (p= 0,0369), gerando resultados estatisticamente significantes quando

comparado ao grupo tratado com EHPa na dose de 500mg/kg sem a administração prévia do antagonista. O grupo tratado com morfina e previamente com naloxona não apresentou resultados estatisticamente significantes quando comparado ao grupo controle. A naloxona, antagonista de receptores opióides, foi capaz de reduzir o efeito analgésico da morfina em 77,3% ($p=0,0029$) quando comparado ao grupo tratado apenas com morfina (Figura 12B).

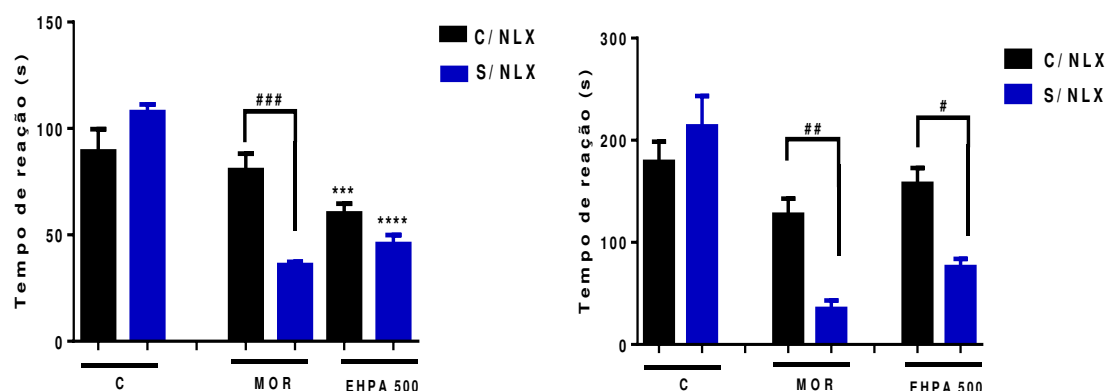


Figura 12: Efeito do pré-tratamento com naloxona (5 mg/kg, i.p.) sobre o efeito antinociceptivo do extrato bruto de *Persea americana* no modelo de nociceção induzida por formalina em camundongos (n=6/grupo). A – 1ª fase e B- 2ª fase. Análise estatística realizada no Graphpad Prima 6, usando teste one-way ANOVA seguido pelo Teste de Tukey. **** $p<0,0001$, *** $p<0,001$ versus grupo controle (C). ### $p<0,001$, ## $p<0,01$ Morfina versus Morfina + Naloxona. # $p<0,05$ EHPa 500 versus EHPa 500 + Naloxona.

5.3.5. Envolvimento da via L-arginina-NO

Na fase neurogênica do teste de formalina, o pré-tratamento L-NAME (50mg/kg, ip), não foi capaz de alterar a resposta desempenhada pelo EHPa na dose de 500mg/kg, por via oral, gerando resultados estatisticamente significantes quando comparado ao grupo tratado com L-arginina + L-NAME ($p=0,0002$). A L-Arginina e EHPa 500 foram capazes de reduzir a resposta desempenhada pelos animais em 42,6% ($p<0,0001$) e 59,7% ($p<0,0001$) respectivamente, gerando resultados estatisticamente significantes quando comparados ao grupo controle (Figura 13A).

Na fase inflamatória do teste de formalina, os grupos tratados com EHPa na dose de 500mg/kg e L-arginina apresentaram diminuição no tempo de permanência de lambadura/mordida em 48,0% ($p<0,0001$) e 78,7% ($p<0,0001$) respectivamente,

gerando resultados estatisticamente significantes quando comparado ao grupo controle. O pré-tratamento com L-NAME (50mg/kg, ip) foi capaz de alterar a resposta desempenhada pelo EHPa na dose de 500mg/kg, diminuindo ainda mais (49,3%, $p=0,0392$) o tempo de resposta dos animais quando comparados ao grupo tratado apenas com EHPa 500mg. O grupo tratado previamente com L-NAME e que receberam L-arginina, apresentou um aumento de 58,0% ($p=0,0132$) no tempo de reação desses animais quando comparado ao grupo tratado com L-NAME + EHPa 500 (Figura 13B).

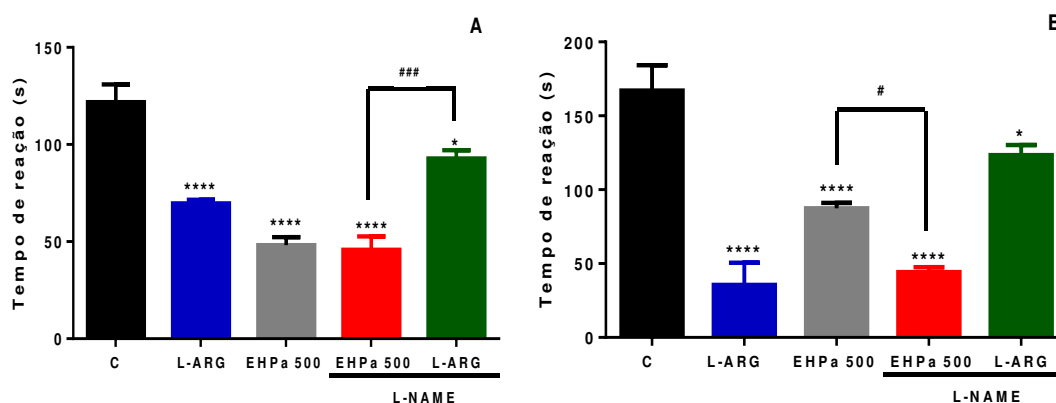


Figura 13: Efeito do pré-tratamento com L-NAME (50 mg/kg, i.p.) sobre o efeito antinociceptivo do extrato bruto de *Persea americana* no modelo de nociceção induzida por formalina em camundongos (n=6/grupo). A – 1ª fase e B- 2ª fase. Análise estatística realizada no Graphpad Prima 6, usando teste one-way ANOVA seguido pelo Teste de Tukey. * $p < 0,001$ e **** $p < 0,0001$ versus controle e ### $p < 0,001$ L-NAME + EHPa 500 versus L-ARG+NAME, # $p < 0,05$ EHPa 500 versus L-NAME + EHPa 500.**

5.4. Ensaio de inibição da enzima ciclooxigenase

O EHPa inibiu 62,6% a COX-1 na maior concentração testada (50 μ g/mL) e em 76,7% a COX-2, na mesma concentração. O EHPa na concentração de 10 μ g/mL foi capaz de inibir em 21,9% a COX-2 e em 3,3% a COX-1. A concentração de 2 μ g/mL do EHPa não produziu nenhum efeito inibitório sobre as enzimas (Figura 14).

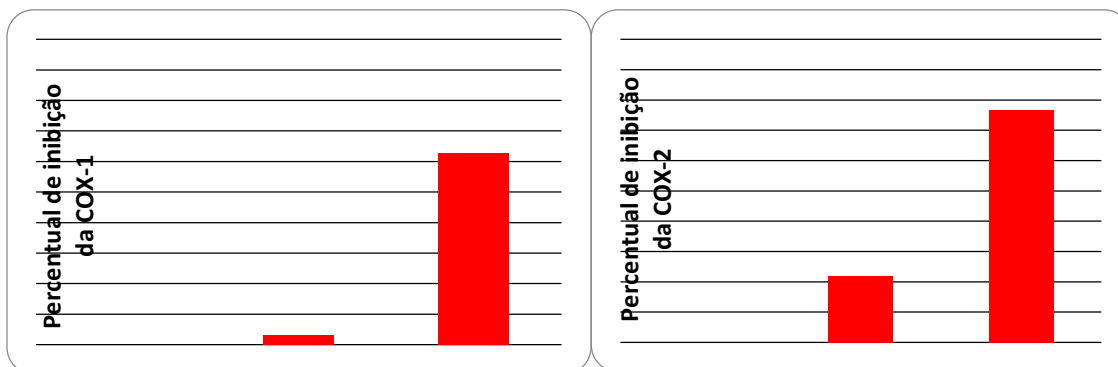


Figura 14 - Percentual de inibição da Ciclooxigenase 1 (**COX-1**) e da Ciclooxigenase 2 (**COX-2**) *in-vitro*, induzido pelo extrato hidroalcoólico de *Persea americana*, testado em três concentrações: 2µg/mL, 10µg/mL e 50 µg/mL.

5.5. Docagem molecular

Para a docagem molecular foram selecionados todos os compostos identificados por CLAE-UV-Vis no extrato bruto de *P. americana*. Dentre os compostos identificados, a β -Amyrin foi o composto que apresentou os melhores parâmetros de afinidade nos cálculos de docagem molecular com a enzima COX-2. Os resultados dos valores de energia de ligação de todos os ligantes estão dispostos na Tabela 2.

Tabela 2. Energias livre de ligação e constante de inibição obtidos por docagem molecular dos compostos identificados no EHB de *P. americana* com COX-2.

COX-2		
Ligand	ΔG_{bind} (kcal/mol)*	Ki (μM)**
β -Amirina	-9.29	0.15
Naringenina	-8.35	0.76
Quercitrina	-8.27	0.87
Isoquercitrina	-7.92	1.55
Canferol	-7.43	3.56
Ácido Cumárico	-6.86	9.36
Ácido caféico	-6.63	13.86
Indometacina ¹	-8.30	0.82

* ΔG_{bind} , binding energy. **Ki, inhibition constant.

¹ - Silva et al., 2017.

Avaliando-se o complexo β -Amyrin e COX-2 (Figura 15), observamos que o ligante realizou uma ligação de hidrogênio com o resíduo Phe470 e contatos hidrofóbicos com outros 11 resíduos, incluindo Arg120 e Glu524, que são resíduos do sítio ativo da enzima (Tabela 3).

Tabela 3. Resíduos de aminoácidos da COX-2 que possuem interação com a β -Amyrin.

COX-2		
Ligand	Hydrogens Bonds	Hydrofobic Interactions
β -Amyrin	Phe470	Leu82, Lys83, Pro84, Tyr115, Ser119, Arg120, Tyr122, Leu123, Ser471, Leu472 e Glu524

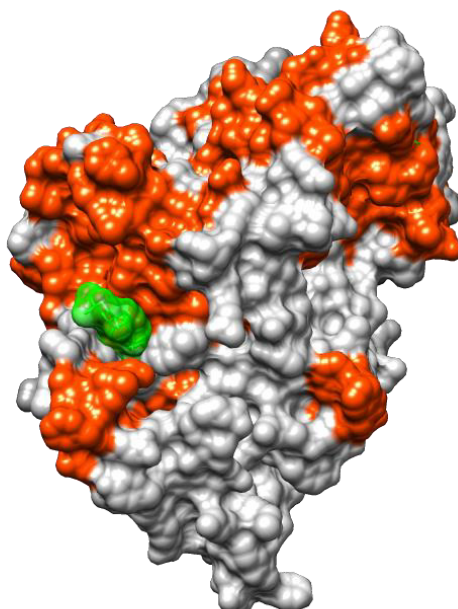


Figura 15 - Conformação espacial obtida por docagem molecular da B-amirina (verde) com a enzima COX-2 (PDB: 1DDX).

6. DISCUSSÃO

O EHPa (250 e 500mg/kg) apresentou efeito anti-edematogênico equivalente ao da indometacina a partir da 2h. O edema de pata induzido por carragenina se caracteriza por apresentar duas fases: a primeira é iniciada a partir da administração da carragenina e dura até 2 horas, sendo este período de tempo correlacionado a fase exsudativa da inflamação a partir da liberação de mediadores inflamatórios como a histamina, serotonina e bradicinina; a segunda fase ocorre a partir da 3 horas de administração, sendo regulada pela infiltração de neutrófilos e mantida pela produção de prostaglandinas (HONMORE et al., 2016; WILCHES et al., 2015). O teste de edema de pata induzido por carragenina recruta uma infinidade de mediadores inflamatórios, e portanto, necessária a realização de testes que elucidem quais mediadores estão participando da sua atividade anti-inflamatória, com base nestes resultados, buscou-se avaliar especificamente os mediadores envolvidos nesta resposta.

A dextrana é um agente pró-inflamatório que promove a liberação de aminas vasoativas, como a histamina e serotonina, causando edema osmótico, caracterizado por aumento de permeabilidade vascular com baixos níveis de proteína e neutrófilos (METCALFE et al, 2008). O EHPa (500mg/kg) diminuiu o edema de pata causado pela dextrana a partir da terceira hora de avaliação do teste. Dessa forma é possível sugerir, que a atividade anti-edematogênica do EHPa está associada a modulação na síntese/liberação ou bloqueio das ações da histamina e/ou 5-HT.

Em estudos com *Persea cordata*, Schlemper e seus colaboradores (2013) evidenciaram ação anti-edematogênica da espécie em testes utilizando os agentes flogísticos carragenina e dextrana. Silva et al (2018) em testes com *Ximenia americana*, espécie rica em compostos semelhantes ao da *P. americana* (quercitrina, ácido cafeico, canferol), evidenciaram ação anti-edematogênica da espécie.

O ácido araquidônico é um mediador inflamatório resultante da ação da fosfolipase A2 nos lipídeos de membrana que posteriormente é metabolizado por enzimas, dentre elas as cicloxigenases, dando origem às prostaglandinas (Hohjoh et al., 2014). A isoforma constitutiva COX-1 induz a produção de prostaglandinas envolvidas na regulação de funções fisiológicas como a citoproteção da mucosa gástrica, homeostasia renal e função plaquetária. A COX-2, é frequentemente referido como a isoforma induzível responsável pela produção de prostaglandinas durante a inflamação (SILVA et al, 2017). Especificamente, a prostaglandina E2 (PGE2) é o principal prostanóide pró-inflamatório envolvido na hipersensibilidade dolorosa. A PGE2 ativa na periferia os canais de sódio e cálcio, reduz o fluxo de potássio, ativa receptores purinérgicos, sensibiliza e potencializa os receptores TRPV1 e aumenta a sensibilidade de receptores a bradicinina via PKA e PKC produzindo assim, hiperalgesia e alodínia (Chen et al, 2013).

O EHPa , em ensaio de inibição *in vitro*, foi capaz de produzir efeito inibitório sobre ambas as isoformas de COX, evidenciando dose-dependência. Esse teste evidenciou ainda que o EHPa possui uma maior seletividade pela COX-2, visto que o percentual de inibição desta isoforma foi maior quando comparado a COX-1. Os resultados encontrados neste trabalho podem ser atribuídos à inibição da enzima COX-2 e conseqüente redução da síntese de PGE₂, uma vez que houve equivalência dos tratamentos com a indometacina, associada à modulação da histamina e/ou serotonina evidenciada no teste anterior.

A reação inflamatória causada pela carragenina também induz o aparecimento de espécies reativas de oxigênio (EROs), gerando um estresse oxidativo, que leva a um aumento dos danos causados aos tecidos, favorecendo o processo doloroso (Vane et al, 1998). Os compostos químicos com propriedades antioxidantes geralmente agem aliviando a dor através da prevenção da peroxidação, como a síntese e a libertação de diferentes mediadores inflamatórios (Kumar e Pandey, 2013).

Os flavonoides pertencem a uma ampla classe de substâncias químicas de origem natural, cuja síntese não ocorre em seres humanos (Peterson et al., 2003, Lopes e Maruo, 2015). Inúmeras atividades biológicas estão associadas aos flavonoides como funções antioxidante (Ksouri et al, 2013) e anti-inflamatória (Coutinho et al., 2009; Ksouri et al, 2013).

Diversos estudos realizados com a casca, semente e fruto de *P. americana* evidenciam ações antioxidantes (Rodriguez-Sanchez et al, 2013, Daioto et al, 2014; Moreno et al., 2014; Abaide et al, 2017). A análise fitoquímica evidenciou a presença de fenóis no EHPa. Os fenóis possuem a capacidade de capturar e neutralizar EROs, apresentando assim a capacidade anti-inflamatória por modular importantes vias de sinalização celular (Kobuchi et al, 1999). O ácido cumárico e o ácido cafeico são ácidos fenólicos com atividade antioxidante comprovada em literatura (Soares, 2002).

Para investigar o efeito antinociceptivo do EHPa, realizou-se o teste de contorções abdominais induzidas por ácido acético. Este é um modelo não seletivo de dor inflamatória visceral, mas com alto poder de sensibilidade sendo uma ferramenta de triagem de compostos com atividade analgésica periférica que envolve a ativação de receptores somáticos e viscerais, além de induzir inflamação local mediada pela prostaglandina, bradicinina, TNF- α , IL-1 β e IL-8 (Olonode et al., 2015; Rodrigues et al., 2012). Estudos demonstraram que em modelos de dor inflamatória, há aumento da ativação de receptores periféricos e aumento na concentração de glutamato na medula espinal (Shamsi et al, 2013; Santos et al, 2005).

O EHPa (50, 250 e 500mg/kg) reduziu o número de contorções desempenhadas pelos animais, evidenciando dose-dependência. O aumento no tempo de latência desses animais caracteriza o EHPa em todas as doses analisadas, como sendo uma espécie com potencial atividade antinociceptiva corroborando com os estudos de Adeyemi e colaboradores (2002) e Hernández e colaboradores (2014). Entretanto, por se tratar de um teste inespecífico, fez-se necessária a utilização de outros métodos para complementar este achados.

O modelo de nocicepção induzido por formalina desencadeia uma resposta nociceptiva bifásica (Hunnskaar e Hole, 1987). A primeira fase (0-5 minutos) corresponde à fase neurogênica onde ocorre predominantemente a ativação de fibras C, enquanto a segunda fase (15-30 minutos) corresponde à fase inflamatória, sendo desenvolvida por uma combinação de mediadores inflamatórios, sensibilização periférica e central (Hunnskaar e Hole, 1987; Tjolsen et al., 1992; Berrino et al, 2003).

O EHPa (250 e 500mg/kg) reduziu o *licking time* dos animais na primeira fase do teste de formalina. Em sua maior dose (500mg/kg), o EHPa demonstrou resultados próximos à morfina. Drogas que atuam no sistema nervoso central são capazes de oferecer resultados satisfatórios em ambas as fases do teste de formalina (Rosland et al, 1990; Couto et al, 2011). Na segunda fase do teste, o EHPa foi capaz de reduzir o *licking time* dos animais tratados com todas as doses (50, 250 e 500mg/kg), aumentando o limiar de dor desses animais. Esses achados evidenciam a participação de componentes anti-inflamatórios na atividade antinociceptiva do EHPa, diminuindo mediadores inflamatórios, atuando por via periférica, ação semelhante desempenhada por anti-inflamatórios não esteroidais como a indometacina, droga padrão utilizada no teste. A indometacina atua fortemente na segunda fase do teste de formalina, por se tratar do envolvimento de mediadores inflamatórios (Couto et al, 2011).

Durante o processo inflamatório ou dano tecidual há liberação de substâncias que promovem vasodilatação, extravasamento de plasma e recrutamento celular. Adicionalmente, há aumento da liberação de glutamato pelos aferentes primários (fibras A δ e C) e aumento da ativação de receptores glutamatérgicos como o NMDA, que promovem a propagação dos potenciais de ação e liberação de neurotransmissores excitatórios no corno dorsal da medula espinal (Miller et al., 2011).

O glutamato é o principal aminoácido excitatório liberado pelo sistema nervoso central e periférico em respostas nociceptivas (Bardoni, 2013). Após a agressão tecidual há liberação de diversos neurotransmissores, dentre eles o glutamato. A ativação dos receptores NMDA pelo glutamato promove uma

aumento do cálcio intracelular resultando na ativação de NOS com a conseqüente produção de NO (Freire et al., 2009) e envolvimento deste no caminho da modulação central e periférica da nocicepção (Andreasen et al., 2013; Kawamata e Omote, 1999).

O EHPa na dose de 500mg/kg conseguiu diminuir o tempo de reação dos animais durante o teste de glutamato, produzindo resultados semelhantes ao MK-801, um antagonista de receptores NMDA, que também foi capaz de reverter a reação causada pelo glutamato. Portanto, pode-se sugerir que a ação antinociceptiva desempenhada pelo EHPa envolve o antagonismo de receptores do tipo NMDA.

Diversos estudos tem demonstrado a complexidade da fisiopatologia da dor por englobar variados sistemas de transmissão de informações, dentre eles o oxidonitrérgico, glutamatérgico, opioide, GABAérgico, colinérgico, serotoninérgico, adrenérgico, dopaminérgico, receptores canabinoides, dentre outros (Enna e McCarson, 2006; Xie et al, 2009; Cury et al, 2011; Bardoni, 2013;).

Os opióides representam o principal sistema de controle periférico e central da dor (MERRER et al., 2009). Buscando-se averiguar a participação da via opioide no mecanismo antinociceptivo do EHPa, utilizou-se a morfina, agonista utilizado como droga padrão, e a naloxona, antagonista não seletivo dos receptores opioides. Embora os resultados expostos sejam sugestivos da ação central do EHPa, é provável que o sistema opioide não esteja envolvido na ação antinociceptiva desse extrato, uma vez que a naloxona não foi capaz de inibir a antinocicepção causada pelo EHPa na fase neurogênica do teste de formalina. Na segunda fase do teste, a naloxona reduziu o efeito antinociceptivo do EHPa, sugerindo envolvimento de receptores opioides periféricos na ação antinociceptiva dessa espécie.

Para investigar a atividade do EHPa sobre a modulação do do óxido nítrico (NO) no mecanismo de ação antinociceptivo, utilizou-se L-arginina, um substrato para a síntese de NO, e L-NAME, um inibidor da biossíntese de NO. A injeção de formalina na pata traseira aumenta os níveis de NO via ativação regional da NOS, contribuindo para a indução de respostas de nocicepção na

primeira e segunda fase do referido teste. A via do NO/cGMP/canal KATP desempenha um papel importante na atividade antinociceptiva periférica de vários fármacos no teste da formalina (Duarte e Ferreira, 1992). Saragusti et al. (2012) descreveram evidências experimentais da participação de óxido nítrico, entre outros mediadores inflamatórios, na segunda fase do teste de dor induzida por formalina. O NO em baixas concentrações exerce efeito nociceptivo; em altas concentrações age como agente antinociceptivo (Kawamata, 1999; Monte, 2014). Estudos indicam que o óxido nítrico atua juntamente as prostaglandinas, aumentando ainda mais a produção de PGE2 quando na presença de NO e, que a inibição da produção de NO por inibidores da enzima óxido nítrico sintetase parece diminuir a produção de PGE2 (Rocha et al, 2007).

O resultado obtido neste estudo sugere que não existe a participação da via L-arginina-óxido nítrico no efeito antinociceptivo central do EHPa, visto que o pré-tratamento com L-NAME, um inibidor da biossíntese de NO, não foi capaz de alterar a resposta antinociceptiva desempenhada pelo EHPa na primeira fase do teste de formalina. Entretanto, o tratamento prévio com L-NAME foi capaz de potencializar o efeito antinociceptivo do EHPa na segunda fase (inflamatória) do teste de formalina, sugerindo a participação da via L-arginina-óxido nítrico no efeito antinociceptivo periférico do EHPa. Resultados semelhantes foram encontrados por Mansouri et al (2017) em seus estudos com pioglitazona, onde evidenciou o efeito antinociceptivo aumentado na segunda fase do teste de formalina em animais previamente tratados com L-NAME; assim como os resultados encontrados por Mehanna e seus colaboradores (2018) ao avaliar a ação antinociceptiva do tadalafila, onde evidenciaram que o L-NAME foi capaz de potencializar o efeito analgésico do fármaco na segunda fase do teste de formalina.

Com base nos resultados expostos, os compostos β - amirina, ácido caféico, ácido cumarínico, naringerina, quercitrina e isoquercetina identificados no EHPa, foram submetidos a docagem molecular para COX-2. Segundo Guimarães et al (2014), energias de ligação negativas representam interações favoráveis do complexo ligante-receptor. De acordo com os resultados, a β -amirina foi o ligante que apresentou menor energia de ligação, sendo assim, o

ligante mais favorável para a formação de complexo com a enzima COX-2. Estruturalmente, o local ativo da COX-2 consiste em um canal lipofílico cuja entrada é formada pela Arg120, Tyr355 e Glu524 (Rowlinson et al, 2003) e sua ativação causa a metabolização do ácido araquidônico (AA) a partir da interação com Arg120, Tyr355, Tyr385 e Ser530 da COX, levando a produção de prostaglandinas (Xu et al, 2014).

A importância da interação com estes aminoácidos, indicando que eles são potenciais alvos de pesquisa de novos inibidores dessa enzima, estão descritas em diversos trabalhos. Avaliações *in vitro* e posterior cristalografia de raios-x do potencial inibidor da COX-2, por Meloxicam e Isoxicam, identificaram interações de ambos os compostos com Met113, Leu117, Arg120, Ile345, Val349, Leu352, Leu359, Phe518, Ala527, Ser530 e Leu531 (Xu et al, 2014). A interação da COX-2 com o ibuprofeno, outro AINE com atividade anti-inflamatória e analgésica, também evidenciou a participação dos aminoácidos Arg120, Val349, Tyr355, Trp387, Met522, Val523, Gly526, Ala527 e Ser530 da COX-2. Os resultados desse estudo destacam ainda que os aminoácidos Arg120 e Tyr355 localizados na entrada do canal da ciclooxigenase são fundamentais para interação entre COX-2 e o ibuprofeno (Orlando et al, 2015).

O presente estudo demonstrou que a β -amirina manteve constantes interações com aminoácidos importantes como Arg120, Glu524 e com outros aminoácidos próximos aos que foram descritos nos trabalhos anteriores, como exemplo Try115 (próximo a Met113 e Leu117, observados nas interações do Isoxicam e Meloxicam), Leu123 (próximo a Arg120 nas interações do Meloxicam, Isoxicam e Ibuprofeno), Glu524 (próximo a Val523 para interação do Ibuprofeno e Meloxicam e Gly526 na interação com Ibuprofeno).

Diante do exposto é possível inferir que a espécie vegetal *P. americana* apresenta um potencial para que sejam elaborados fármacos com a finalidade analgésica e anti-inflamatória.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- O Extrato Hidroalcoólico de *Persea americana* possui ação anti-inflamatória em modelos experimentais agudos, demonstrado pela diminuição do edema de pata induzido por diferentes agentes flogísticos de natureza osmótica (dextrana) e celular (carragenina).
- A ação anti-inflamatória do EHPa envolve o processo de inibição das enzimas Cicloxigenases, principalmente a COX tipo 2, em sinergismo com a modulação de histamina e/ou serotonina.
- A atividade antinociceptiva do Extrato Hidroalcoólico de *P. americana* apresentou características de atividade predominantemente periférica, sendo evidenciada pela redução do número de contorções abdominais e redução do tempo de resposta na segunda fase do teste da formalina.
- A via opioide parece não estar envolvida na ação central do EHPa. No entanto, há a participação de receptores opioides periféricos na ação desenvolvida pela espécie.
- O EHPa apresentou efeito central, sugerindo o antagonismo de receptores do tipo NMDA.

REFERENCIAS

- ABAIDE, E.R. et al. Yield, composition, and antioxidant activity of avocado pulp oil extracted by pressurized fluids. **Food and Bioproducts Processing**. v. 102, p. 289-298, 2017.
- ABUBAKAR, A.N.F.; ACHMADI, S.S.; SUPARTO, I.H.. Triterpenoid of avocado (*Persea americana*) seed and its cytotoxic activity toward breast MCF-7 and liver HepG2 cancer cells. **Asian Pac. J. Trop. Biomed**. V.5, n7, p. 397-400, 2017.
- ABUBAKAR, M. G., ADAMU, L.. Antinociceptive effects of avocado leaf extracts (*Persea americana*) on rats. **Toxicology Letters**. S89. 2013.
- ADEYEMI, O.O., OKPO, S. O., OGUNTI, O. O. Analgesic and anti-inflammatory effects of the aqueous extract of leaves of *Persea Americana* Mill (Lauraceae). **Fitoterapia**, p. 375-380, 2002.
- ALESSANDRI A.L., et al. Resolution of inflammation: mechanisms and opportunity for drug development. **Pharmacol Ther**. v.139, n.2, p.189-212, 2013.
- ALMEIDA, A.P; MIRANDA, M.M; SIMONI, I.C., et al. Flavonol monoglycosides isolated from the antiviral fractions of *Persea americana* (Lauraceae) leaf infusion. **Phytother Res** , v. 12, p.562-567, 1998.
- ALMEIDA, G.V.B; SAMPAIO, A.C. O Abacate no mundo, no Brasil e na CEAGESP. **Sociedade Brasileira de Fruticultura**, 2013. Available from: . Accessed: oct. 31, 2017.
- ALVÁREZ, J.M.; CUCA, L.E.; CARRASCO-PANCORBO, A., et al. Phenolic constituents of leaves from *Persea caerulea* Ruiz & Pav; Mez (Lauraceae). **Biochem. Syst. Ecol**, v.67, p.53–57, 2016.
- ANDRADE, E.L.; MEOTTI, F.C.; CALIXTO, JB. TRPA1 antagonists as potential analgesic drugs. **Pharmacology Therapy**. v.133 n.2 p.189-204, 2012.
- ANDREASEN, J.T. et al. UCCB01-125, a dimeric inhibitor of PSD-95, reduces inflammatory pain without disrupting cognitive or motor performance: Comparison with the NMDA receptor antagonist MK-801. **Neuropharmacology** v. 67, p. 193–200, 2013.
- ANSARI, P. et al. Evaluation of Antinociceptive Activity of Methanol Extract from *Cleome rutidosperma* in Mice. **Chinese Herbal Medicines**, v.8, n.3, p. 273-279, 2016.
- ANVISA. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Farmacopeia Brasileira, volume 1. 5ª Ed. Brasilia,2010.
- ARONOFF G.M. What Do We Know About the Pathophysiology of Chronic Pain? Implications for Treatment Considerations. **Medical Clinics of North America**, v.100, n.1, p.31-42, 2016.

ARRIGO, J.S. et al Anti-nociceptive, anti-hyperalgesic and anti-arthritic activity of amides and extract obtained from *Piper amalago* in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 179, n.17, p. 101-109, 2016.

ASAOLU, M. F., ASAOLU, S.S., FAKUNLE, J.B.;EMMAN-OKON,B.O.; AJAYI, E.O. Evaluation of in vitro Antioxidant Activities of Methanol Extracts of *Persea americana* and *Cnidoscullus aconitifolius*.Paquistão **Journal of Nutrition**. 2010.

ASCENÇÃO, M.D.; LUSTOSA, V.R.; SILVA, L.J. Canabinoides no tratamento da dor crônica. **Rev Med Saude Brasilia**. v.5, n.3, p.255-263, 2016.

ATTAL, N., et al. EFNS guidelines on the pharmacological treatment of neuropathic pain: 2009 revision. **European Journal Neurology**. Apr 9. 2010.

BAGAL S.K et al. Recent progress in sodium channel modulators for pain. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**. v. 24, n.16, p. 3690-3699, 2014.

BARATTA, M. T; DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G., et al. Chemical composition, antimicrobial and antioxidative activity of Laurel, Sage, Rosemary, Oregano and Coriander essential oils. **Journal of essential oil research**, v. 10, n. 6, p. 618-627, 1998.

BARBOSA-FILHO, J. M; YOSHIDA, M; GOTTLIEB, O. R., et al. Benzoyl esters and amides, styrylpyrones and neolignans from the fruits of *Aniba riparia*. **Phytochemistry**, v. 26, n. 9, p. 2615-2617,1987.

BARDONI, R. Role of Presynaptic Glutamate Receptors in Pain Transmission at the Spinal Cord Level. **Curr Neuropharmacol**. v.11, n.5, p.477–483, 2013.

BARROSO, G. M; GUIMARÃES, E. F; ICHASO, C. L. F, et al. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. 2. ed. v. 1, 309 p. Viçosa: UFV, 2002.

BARROT, M. Tests and models of nociception and pain in rodents. **Neuroscience**. v.1;p. 39-50, 2012.

BASHIR, U.; COLVIN, L.A.; The place of pharmacological treatment in chronic pain. **Anaesthesia & Intensive Care Medicine**. v. 14, n.12, p.528-532, 2013.

BIASI-GARBIN, R.P. et al. Antifungal potential of plant species from Brazilian caatinga against dermatophytes. **Rev. Inst. Med. Trop**. Sao Paulo, v.58, n.18, 2016.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção a Saúde. Portaria nº 1083, de 02. de outubro de 2012. Aprova o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Dor Crônica. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 02 outubro 2012.

CAMPOS, M.M., CALIXTO, J.B.. Involvement of B1 e B2 receptors in bradykinin-induced rat paw edema. **Br. J. Pharmacol.**, v 114, p. 1005-1013, 1995.

CARVALHO, P.R. et al. Quinoline Alkaloids Isolated from *Choisya Aztec-Pearl* and Their Contribution to the Overall Antinociceptive Activity of This Plant. **Plos One**. v. 21, 2016.

CASTARDO, J. C. et al. Antiinflammatory effects of hydroalcoholic extract and two biflavonoids from *Garcinia gardneriana* leaves in mouse paw oedema. **J Ethnopharmacol**, v.118, n.3, p.405-11, 2008.

CECHINEL-FILHO, V; ZAMPIROLO, J.A.; STULZER, H.K., ET AL. Antispasmodic effects of *Persea cordata* bark fractions on guinea pig ileum. **Fitoterapia**, v.78, n.2,p.25-8, 2006.

CHANDRASEKHARAN, J.A.; SHARMA-WALIA, N.. Lipoxins: nature's way to resolve inflammation. **J Inflamm Res** 8:181–192, 2015.

CHEN, L.; YANG, G.; GROSSER, T. Prostanoids and inflammatory pain. **Prostaglandins Other Lipid Mediat**.v.58, n.66, p.104-105, 2013.

CHEN, Y. et al. Nitric oxide synthase modulates CFA-induced thermal hyperalgesia through cytokine regulation in mice, **Mol. Pain**. v.6, 2010.

Chen Y. C. Beware of docking! **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 36, n. 2, p. 78-95, 2014.

CHIECHIO S, NICOLETTI F. Metabotropic glutamate receptors and the control of chronic pain. **Curr Opin Pharmacol**. v. 12, n.1, p. 28-34, 2012.

CLEGG L.E.; GABHANN, M.F. Molecular mechanism matters: Benefits of mechanistic computational models for drug development. **Pharmacological Research**, v.99, p. 149-54, 2015.

COUTINHO, M.A.S.; MUZITANO, M.F.; COSTA, S.S. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Rev. Virtual Quim.**, v.1, n.3, p. 241-256, 2009.

COUTO et al. Antinociceptive effect of extract of *Emilia sonchifolia* in mice. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 134, n. 2, p. 348-353, 2011.

CRUZ, M.P. et al. Antinociceptive and Anti-inflammatory Activities of the Ethanolic Extract, Fractions and Flavones Isolated from *Mimosa tenuiflora* (Willd.) Poir (Leguminosae), **Plos One**, v. 11, n.3, 2016.

CURY, Y. et al. Pain and analgesia: The dual effect of nitric oxide in the nociceptive system. **Nitric Oxide**. v.25, n.3, p.243-54, 2011.

CURY, Y.; PICOLO, G.; GUTIERREZ, V.P.; FERREIRA, S.H. Pain and analgesia: the dual effect of nitric oxide in the nociceptive system. **Nitric Oxide**.; v.25, p.243-257, 2011.

CUSHNIE, T.P.; CUSHNIE, B.; LAMB, A.J.. Alkaloids: an overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities. **Int J Antimicrob Agents**. v.44, n.5, p. 377-386, 2014.

DAIOUTO, E.R. et al. Composição química e atividade antioxidante da polpa e resíduos de abacate 'hass'1. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal , v. 36, n. 2, p. 417-424, 2014.

DALE, R., STACY, B. Multimodal Treatment of Chronic Pain. **Medical Clinics of North America**. Disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0025712515001509>>Acesso em: 28 de outubro de 2017.

DEL REFUGIO RAMOS, M.; JERZ, G.; VILLANUEVA, S., et al. Two glucosylated abscisic acid derivatives from avocado seeds (*Persea americana* Mill. Lauraceae cv. Hass). **Phytochemistry**, v. 65, n.7,p. 955-962.

DUARTE, I.G.; LORENZETTI, B.B.; FERREIRA, S.H. **Acetylcholine induces peripheral analgesia by the release of nitric oxide**. In: Nitric oxide from L-arginine: a bioregulatory system. S. Moncada e E.A.Higgs, ed. 165-71, 1990.

ENNA, S.J.; MCCARSON, K.E. The role of GABA in the mediation and perception of pain. **Adv Pharmacol**, v.54, p. 1-27, 2006.

FERNANDES, J. B; GOTTLIEB, O. R; MAIA, J. G. S. Chemistry of Brazilian Lauraceae. 34. Neolignans from an Aniba Species. **Phytochemistry**, v. 15, n. 6, p. 1033-1036, 1976.

FLAMBÓ, D.F.A.L.P. **Atividades Biológicas dos Flavonoides: Atividade Antimicrobiana**. [Dissertação]. Universidade Fernando Pessoa. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Porto, Portugal, 2013.

FREIRE M.O; VAN DYKE T.E. Natural resolution of inflammation. **Periodontol**. v.63, n.1, p.149-164, 2013.

FREIRE, M.A.; GUIMARÃES, J.S., LEAL, W.G.; PEREIRA A. Pain modulation by nitric oxide in the spinal cord. **Front Neurosci**. v.3, p.175–181, 2009.

FREIRE, M.A. et al. Pain modulation by nitric oxide in the spinal cord, **Front. Neurosci**. v.3, p. 175–181, 2009.

GILRON, I.; JENSEN T.S.; DICKENSON, A.H. Combination pharmacotherapy for management of chronic pain: from bench to bedside. **Lancet Neurol**, V. 12, n. 11, 2013.

GRIFFIN, R.B.; WOOLF, C.J. Farmacologia da analgesia. In: GOLAN, D. E et al. **Princípios de Farmacologia: A base fisiopatológica da farmacoterapia**. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009. p 240-259.

GUZMAN-RODRIGUEZ, J.J. et al. The defensin from avocado (*Persea amaericana* var. *drymifolia*) PaDef induces apoptosis in the human breast cancer cells line MCF-7. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 82, p. 620-627, 2016.

HAANPAA, M. et al. NeuPSIG guidelines on neuropathic pain assessment. **Pain**, v. 152, n. 1, p. 14-27, 2011.

HEADLAND, S.E.; NORLING, L.V.. The resolution of inflammation: Principles and challenges. **Semin Immunol**. V.27, n.3, p.149-160, 2015.

HERNANDEZ, A.I.G. et al. Validación preclínica de actividad analgésica periférica y central de la decocción de hojas frescas de *Persea americana* Mill. (aguacate) y *Musa x paradisiaca* L. (plátano). **Revista Cubana de Plantas Medicinales**. v.19,n.1, p.225-234, 2014.

HUANG, X. et al. Dynamic high pressure microfluidization-assisted extraction and antioxidant activities of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) leaves flavonoid. **Food Bioprod Process**. v.91, n.1, p.1-6, 2013.

HUNSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**. v. 30, n. 1, p. 103-14, 1987.

HURTADO-FERNÁNDEZ, E.; PACCHIAROTTA, T.; MAYBORODA, O. A., et al. Quantitative characterization of important metabolites of avocado fruit by gas chromatography coupled to different detectors (APCI-TOF MS and FID). **Food research international**, v.62, p.801-811, 2014.

International Association for the Study of Pain-IASP. **Iasp Taxonomy**, 2012. Disponível em <http://www.iasp-pain.org/Education/Content.aspx?ItemNumber=1698#Pain> Acesso em 15 de outubro de 2015.

JIN, W. Y.; LIU, Z., LIU, D., YU, L.C.. Antinociceptive effects of galanin in the central nucleus of amygdala of rats, na involvement of opioide receptors. **Brain Research**, v.1320, p. 16-21, 2010.

JOHNSON, J.W.; GLASGOW, N.G.; POVYSHEVA, N.V. Recent insights into the mode of action of memantine and ketamine. **Current Opinion in Pharmacology**, v.20, p.54–63, 2015.

JOHNSTON, P.G. et al. Evidence-based use of indomethacin and ibuprofen in the neonatal intensive care unit. **Clinics in Perinatology**, v. 39, n. 1, p. 111-36, 2012.

KAULMANN, A.; BOHN, T. Carotenoids, inflammation, and oxidative stress--implications of cellular signaling pathways and relation to chronic disease prevention. **Nutr Res**, v. 34, n. 11, p. 907-29, 2014.

KAWAMATA T, OMOTE K. Activation of spinal N-methyl-Daspartate receptors stimulates a nitric oxide/cyclic guanosine 3,5- monophosphate/glutamate release cascade in nociceptive signaling. **Anesthesiology** v. 91, p. 1415–1424,1999.

KLAUMANN, P.R.; WOUK, A.F.P.F.; SILLAS, T. Patofisiologia da dor. **Archives of Veterinary Science**, v. 13, n.1, p.1-12, 2008.

KOBUCHI, H.; VIRGILI, F.; PACKER, L. Assay of inducible form of nitric oxide synthase activity: effect of flavonoids and plant extracts. **Methods in Enzymology**, v. 301, p. 504–513, 1999.

KOBUCHI, H.; VIRGILI, F.; PACKER, L. Assay of inducible form of nitric oxide synthase activity: effect of flavonoids and plant extracts. **Methods in Enzymology**, v. 301, p. 504–513, 1999.

KOSTER, R., ANDERSON, M., BEER, E.J. Acetic acid for analgesic screening. **Federation Proceeds**. v.18, p. 412, 1959.

KRAYCHETE, D.C.; CALASANS, M.T.A.; VALENTE, C.M.L.. Citocinas pró-inflamatórias e dor. **Rev. Bras. Reumatol.**, v.46, n.3, p.199-206, 2006.

KSOURI, W.M. et al. LC–ESI-TOF–MS identification of bioactive secondary metabolites involved in the antioxidant, antiinflammatory and anticancer activities of the edible halophyte *Zygophyllum album* Desf. **Food Chemistry**, v.139, p.1073- 1080, 2013.

KUMAR CH, RAMESH A, KUMAR JNS, ISHAQ BM. A review on hepatoprotective activity of medicinal plants. **Int J Pharm Sci Res**. v.3, p.501-515, 2011.

KUMAR, S.; PANDEY, A.K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. **The Scientific World Journal**. v. 1, 2013.

LALL, N. et al. Antifungal activity of naphthoquinones and triterpenes isolated from the root bark of *Euclea natalensis*. **South African Journal of Botany**, v.72, n.4, p.579-83, 2006.

LAPA, A. J. **Métodos de Avaliação da Atividade Farmacológica de Plantas Medicinais**. Cytel, 2002.

LI, Q. et al. Potent anti-inflammatory and analgesic steroidal alkaloids from *Veratrum taliense*. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 179, p. 274-279, 2016.

LIU E.H. et al. Elevated prepronociceptin, nociceptin/orphanin FQ and nocistatin concentrations in rat chronic constriction nerve injury and diabetic neuropathic pain models. **Neurosci Lett**.v.506, n. 1, p.104-106, 2012.

LO, T.N., ALMEIDA, A.P., BEAVEN, M.A. Dextran and carrageenan evoke diferente inflammatory response in rat with respect to composition of infiltrates and effect of indomethacin. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v.221, p.261-267, 1982.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2.ed.. –Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008.

LOTTENBERG, A. M. P. Importância da gordura alimentar na prevenção e no controle de distúrbios metabólicos e da doença cardiovascular. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia*, São Paulo, v.53, n.5, p. 595-607, 2009.

MACCHIONI, F; PERUCCI, S; CIONI, P., et al. Composition and acaricidal activity of *Laurus novocanariensis* and *Laurus nobilis* essential oils against *Psoroptes cuniculi*. **Journal of essential oil research**, v. 18, n. 1, p. 111-114, 2006.

MADRINÃN-RESTREPO, S. 1996. Systematic studies in Lauraceae. Monograph of *Rhodostemonodaphne*. Ph.D. dissertation, Harvard University, Cambridge, Massachusetts, USA. <
<https://open.library.ubc.ca/media/stream/pdf/831/1.0099290/2>> Acesso em: 31 de outubro de 2017.

MASRESHA, B.; MAKONNEN, E.; DEBELLA, A. In vivo anti-inflammatory activities of *Ocimum suave* in mice. **Journal of Ethopharmacology**, v. 142, p. 201 – 205, 2012.

MATOS, F.J. **Introdução à fitoquímica experimental**. 2.ed. Fortaleza: Edições UFC; 1997. 141p.

MERRER, J et al. Reward processing by the opioid system in the Brain. **Physiological Reviews**, v.89, p. 1379-1412, 2009.

MERTENS, P. et al. Anatomy, physiology and neurobiology of the nociception: a focus on low back pain (part A). **Neurochirurgie**.v.61, n.3, p.22-34, 2015.

METCALFE, D. D. Mast cells and mastocytosis. **Blood**, v. 15, p. 946–956, 2008.

MOHAGHEGHZADEH, A; FARIDI, P.; SHAMS-ARDAKANI, M., et al. Medicinal smokes. **J Ethnopharmacol**, v.108, n.2, p.161-84. 2006.

MONIKAA, P.; GEETHAA, A. The modulating effect of *Persea americana* fruit extract on the level of expression of fatty acid synthase complex, lipoprotein lipase, fibroblast growth factor-21 and leptin – A biochemical study in rats subjected to experimental hyperlipidemia and obesity. **Phytomedicine**, India v.22 n. 10, p. 939-945, 2015.

MONTE, L.O. **Efeito antinociceotivo do salicilato de bornila em camundongos**. [Dissertação]. Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. João Pessoa, PB, 2014.

MOREL, V. et al. Memantine, a promising drug for the prevention of neuropathic pain in rat. **Eur J Pharmacol.**, v.5, n.721, p.382-390, 2013.

MORENO, E.; ORTIZ, B.L.; RESTREPO, L.P.. Total phenolic content and antioxidant activity of pulp extracts of six tropical fruits. **Rev. Colomb. Quim.** 2014, 43 (3), 41-48.

MUIR W.W. NMDA receptor antagonists and pain: ketamine. **Vet Clin North Am Equine Pract.** v.26, n.3, p.565-578, 2010.

MULLA, W.A. et al. Antioxidant, Antinociceptive and Anti-inflammatory Activities of Ethanolic Extract of Leaves of *Alocasia indica* (Schott.) **J Young Pharm.** v.2, n.2, p.137-143, 2010.

MURAKOSHI, S; ISOGAI, A; CHANG, F.C., ET AL. MURAKOSHI, S. et al. Effects of two components from the avocado leaves (*Persea americana* Mill) and the related compounds on the growth of silkworm larvae, *Bombyx mori* L. **Japanese Journal of Applied Entomology and Zoology (Japan)**, v. 20, p.87-91, 1976.

NADIPELLY, J. et al. Anti-nociceptive activity of a few structurally related trimethoxy flavones and possible mechanisms involved. **J Basic Clin Physiol Pharmacol.** v.27, n.2, p. 109–119, 2016.

Nascimento, D.C.H, Sakata, R.K. Dependência de opioide em pacientes com dor crônica. **Rev Dor.** v.12, n.2, p.160-165, 2011.

NATHAN, C.; DING, A.. Nonresolving inflammation. **Cell.** v140, n.6, p.871-882, 2010.

NICKEL, F.T. et al. Mechanisms of neuropathic pain. **European Neuropsychopharmacology.**, v. 22, n.2, p. 81-91, 2012.

NOVAIS, M.H; SANTOS, I; MENDES, S; PINTO-GOMES, C. Studies on pharmaceutical ethnobotany in Arrabida Natural Park (Portugal). **J Ethnopharmacol**, v.93, p.183-95, 2004.

NUCCI-MARTINS, C. et al. Antinociceptive effect of hydroalcoholic extract and isoflavone isolated from *Polygala molluginifolia* in mice: evidence for the involvement of opioid receptors and TRPV1 and TRPA1 channels. **Phytomedicine.** v. 23, p. 429-440, 2016.

OBERLIES, N. H; ROGERS, L. L; MARTIN, J.M., et al. Cytotoxic and insecticidal constituents of the unripe fruit of *Persea americana*. **J Nat Prod**, v. 61, p. 781-785, 1998.

ODO, C.E. et al. Acute toxicity investigation and anti-diarrhoeal effect of the chloroform-methanol extract of the seeds of *Persea americana* in albino rats. **Journal of Pharmacy Research.** v.6, p. 331-335, 2013.

OJEWOLE, J.A.O.; AMABEOKU, G.J. Anticonvulsant Effect of *Persea americana* Mill (Lauraceae) (Avocado) Leaf Aqueous Extract in Mice. **Phytother. Res.** v.20, p. 696–700, 2006.

- OLIVEIRA et al. Citocinas e dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 61, n. 6, p. 255-265, 2011.
- PANDURANGAN, K. et al. Antinociceptive effect of certain dimethoxy flavones in mice. **Eur J Pharmacol**, v. 727, p. 148-157, 2014.
- PATIL, R.A. et al Antinociceptive activity of acute and chronic administration of *Murraya koenigii* L. leaves in experimental animal models. **Indian J Pharmacol**. v.44, n.1, p.15-19, 2012.
- PERTOVAARA A. The noradrenergic pain regulation system: a potential target for pain therapy. **Eur J Pharmacol**. v.15, n.716, p.2-7, 2013.
- PETERSON, J., LAGIOU, P., SAMOLI, E., KATSOUYANNI, K., VECCHIA, C.L., DWYER, J., TRICHOPOULOS, D.. Flavonoid intake and breast cancer risk: a case – control study in Greece. **British Journal of Cancer**, v.89, n.7, p 1255 – 1259, 2003.
- PHANG, L.K.D.; TAN, K.H. Current pharmacological modalities for control of chronic non-cancer pain. **Trends in Anaesthesia and Critical Care**. v.3, p283-288, 2013.
- POZHARITSKAYA, O. N. et al. Antiinflammatory activity of a HPLC-fingerprint aqueous infusion of aerial part of *Bidens tripartite* L. **Phytomedicine**, v. 17, p. 463 – 468, 2010.
- ROCHA, A.P.C et al. Dor: Aspectos Atuais da Sensibilização Periférica e Central. **Rev Bras Anestesiol**, v. 27, n.1, p. 94-105, 2007.
- ROCHA, A.P.C.; LEMONICA, L.; BARROS, G.A.M. Uso de Medicções por Via Subaracnóidea no Tratamento da Dor Crônica. **Rev Bras Anestesiol**. v.52, n.5, p.628 – 643, 2002.
- RODRIGUEZ-SANCHEZ, D. et al. Activity-guided identification of acetogenins as novel lipophilic antioxidants present in avocado pulp (*Persea Americana*). *Journal of Chromatography B*. v. 943, p.37-45, 2013.
- RODRIGUEZ-SAONA, C.R; MAYNARD, D.F; PHILLIPS, S., et al. Avocadofurans and their tetrahydrofuran analogues: Comparison of growth inhibitory and insecticidal activity. **J Agric Food Chem**, v. 48, p.3642-5, 2000.
- RODRIGUEZ-SAONA, C.R; MAYNARD, D.F; PHILLIPS, S., et al. Effects of alkyl side-chain length on insecticidal activity. **J Nat Prod**, v. 62, p.191-193, 1999.
- ROSSI, M. H; YOSHIDA, M; MAIA, J. G. S. Neolignans, Styrylpyrones and Flavonoids from an *Aniba species*. **Phytochemistry**, v. 45, n. 6, p. 1263-1269, 1997.

- RUSCHEWEYH R, et al. Long-term potentiation in spinal nociceptive pathways as a novel target for pain therapy. **Mol Pain**. v.7, n.20, 2011.
- RUVIARO LF, FILIPPIN LI. Prevalência de dor crônica em uma Unidade Básica de Saúde de cidade de médio porte. *Rev Dor*. 2012;13(2):128-31.
- SARAGUSTI, A.C. et al. Involvement of the L-arginine-nitric oxide pathway in the antinociceptive caused by fruits of *Prosopis strombulifera* (Lam.) Benth. **Journal Ethnopharmacology**. v. 140, p. 117-122, 2012.
- SCHLEMPER, S.R. D. M.; SCHLEMPER, V., SILVA; D. D., et al. Antibacterial activity of *Persea cordata* stem barks. **Fitoterapia**, v.72, p.73-75, 2001.
- SCORA, R. W.; BERGH, B. The origins and taxonomy of avocado (*Persea americana*) mill. Lauraceae. **Acta Horticulturae, Leuven**, v. 275, p. 387–394, 1990.
- SILVA, J.C. **Efeito antinociceptivo e anti-inflamatório de *Annona vepretorum* Mart. (Annonaceae) em roedores**. [Dissertação]. Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais do Semiárido. Petrolina, Pernambuco ,2013b.
- SILVA, J.C. et al. Modelos experimentais para avaliação da atividade antinociceptiva de produtos naturais: uma revisão. **Rev. Bras. Farm.** v.94, n.1, p. 18-23, 2013a.
- SILVA, R.H.M. et al. Antinociceptive Activity of *Borreria verticillata*: *In vivo* and *In silico* Studies. **Frontiers in Pharmacology**. v.8, p.283-291, 2017.
- SIMIC, A; SOKOVIC, M. D; RISTIC, M., et al. The chemical composition of some Lauraceae essential oils and their antifungal activities. **Phytotherapy Research**, v. 18, p. 713-717, 2004.
- SOUTO, A.L. et al. Anti-Inflammatory Activity of Alkaloids: An Update from 2000 to 2010. **Molecules**, v.16, p. 8515-8534, 2011.
- STEIN C. Opioids, sensory systems and chronic pain. **Eur J Pharmacol**. v.716, n.15, p.179-187, 2013.
- TAJIMA N. et al. Activation of NMDA receptors and the mechanism of inhibition by ifenprodil. **Nature**. 2016 v.534, n.7605 p.63-68.
- TJOLSEN, A. et al The formalin test: an evaluation of the method. **Pain**. v. 51, n. 1, p. 5-17, 1992.
- VANE JR: Co-induction of nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase: interactions between nitric oxide and prostanoids. **Br J Pharmacol** 114: 1335-42, 1995.
- VIEIRA, M.E.B et al. Prevalence, characteristics, and factors associated with chronic pain with and without neuropathic characteristics in São Luís, Brazil. **J Pain Symptom Manage**, v. 44, n.2, p.239-241, 2012.

- VILLASEÑOR, I. M. et. al. Bioactivity studies on beta-sitosterol and its glucoside. **Phytotherapy Research**, v.16, p. 417-21, 2002.
- VINEGAR, R., SCHREIBER, W., HUGO, R. Biphasic development of carrageenan edema in rats. **J. Pharmacol. Exp. Ther.** v.166, p. 96–103, 1969.
- VITECEK et al. Arginine-Based inhibitors of nitric oxide synthase: Therapeutic potential and challenges. **Mediators of Inflammation**. v.12, p. 1-22, 2012.
- VODOVOTZ, Y. et al. Translational systems biology of inflammation. **PLoS Computational Biology**, v.4, p.1– 6. 2008.
- VUCKOVIC, S. et al. The antinociceptive effects of magnesium sulfate and MK-801 in visceral inflammatory pain model: The role of NO/cGMP/K(+)ATP pathway. **Pharm Biol**. v.53, n.11, p. 1621-1627, 2015.
- WANG, J.D., GOFFER, Y. B.A. AMPA receptors and pain—A future therapeutic intervention? **Techniques in Regional Anesthesia and Pain Management**. v.14, n.2, p.59-64, 2010.
- WHITTLE, B.A. Release of a kinin by intraperitoneal injection of chemical agents in mice. **J Neuropharmacol**. v.3, p. 369 – 378, 1964.
- WIENTARSIH, I et al. Anti Lithiasis Activity of Avocado (*Persea americana* Mill) Leaves Extract in White Male Rats. **Journal of Biosciences**. v. 19 n. 1, p 49-52, 2012.
- WIGG, M.D; AL-JABRI, A.A; COSTA, S.S., et al. In vitro virucidal and virustatic anti HIV-1 effects of extracts from *Persea americana* Mill. (avocado) leaves. **Antivir Chem Chemother**, v. 7, p.179-83, 1996.
- WRIGHT, C.I. et al. Herbal medicines as diuretics: A review of the scientific evidence. **Journal of Ethnopharmacology**, v.114, p.1- 31, 2007.
- YEMITAN, O.K.; ADEYEMI, O.O. Mechanistic assessment of the analgesic, anti-inflammatory and antipyretic actions of *Dalbergia saxatilis* in animal models. **PHARMACEUTICAL BIOLOGY**, v. 55, n. 1, p. 898–905, 2017.
- ZHU, Y. et al. Gastroprotective Effects of Ascaridole on Gastric Ulcer in Rats. **Chinese Herbal**. v. 4, p. 58-62, 2012.

ANEXO A



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS-
CEUA CIAEP:01.0341.2014

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**Mecanismo de ação da atividade antinociceptiva e antiinflamatória da *Persea americana***", registrada com o nº 23115.001913/2016-27, sob a responsabilidade de Maria do Socorro de Souza Cartagenes que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi considerado **Aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA- UFMA) da Universidade Federal do Maranhão em reunião de 07/06/2016.

FINALIDADE	() ENSINO (X) PESQUISA () EXTENSÃO
Vigência da autorização	01/03/2016 a 01/04/2018
Espécie/linhagem/raça	Camundongo/ Mus Musculus var. Swiss
Nº de animais	240
Peso/Idade	25-30 g/ 45 dias
Sexo	Macho
Origem	Biotério de criação UFMA

Profa. Dra. Lucilene Amorim Silva

Presidente da Comissão de Ética no uso de animais - CEUA UFMA