



Universidade Federal do Maranhão
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
Mestrado



Estudo de validação da espécie de
***Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. (Iridaceae):**
Aspectos de farmacobotânica, química e biologia

MARIANA AMARAL OLIVEIRA

São Luís
2019

MARIANA AMARAL OLIVEIRA

Estudo de validação da espécie de
***Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. (Iridaceae):**
Aspectos de farmacobotânica, química e biologia

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências da Saúde como requisito parcial para obtenção
do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Denise Fernandes Coutinho Moraes

São Luís

2019

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

OLIVEIRA, MARIANA AMARAL.

Estudo de validação da espécie de *Eleutherine bulbosa* Mill. Urb. Iridaceae: Aspectos de farmacobotânica, química e biologia / MARIANA AMARAL OLIVEIRA. - 2019. 140 f.

Orientador(a): DENISE FERNANDES COUTINHO.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2019.

1. Antioxidante. 2. Coquinho. 3. Mediadores inflamatórios. 4. Modelo de ciatalgia. 5. Naftoquinonas. I. COUTINHO, DENISE FERNANDES. II. Título.

MARIANA AMARAL OLIVEIRA

Estudo de validação da espécie de *Eleutherine bulbosa* (Mill.)

**Urb. (Iridaceae): Aspectos de farmacobotânica, química e
biologia**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ciências da Saúde como requisito parcial para
obtenção do título de mestre.

Aprovada em 29/04/2019

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra. Denise Fernandes Coutinho Moraes
Universidade Federal do Maranhão
ORIENTADORA

Prof. Dra. Iracelle Carvalho Abreu
Universidade Federal do Maranhão
TITULAR

Prof. Dra. Lucilene Amorim Silva
Universidade Federal do Maranhão
TITULAR

Prof. Dr. Aramys Silva dos Reis
Universidade Federal do Maranhão - IMPERATRIZ
EXTERNO - TITULAR

*O saber a gente aprende com os mestres e com os livros,
A sabedoria se aprende é com a vida e com os humildes.*

Cora Coralina

À minha mãe, minha maior incentivadora,
Meu anjinho Arthur (*in memorium*)
e meu guerreiro Miguel
Dedico este trabalho

AGRADECIMENTOS

Ao meu filho querido Arthur (*in memorium*) que partiu cedo demais, mas foi meu maior incentivador para buscar ser uma pessoa melhor.

Ao meu bebê Miguel que chegou para trazer cor nos meus dias. A razão de toda minha vida e motivo de toda minha felicidade.

A minha mãe, minha fortaleza, por sempre acreditar na minha capacidade, por me cobrar para querer sempre mais. Por nunca me deixar desistir, por me ensinar tudo que sei. Tudo que sou devo a ela. Todas as minhas conquistas são dedicadas a ela.

Ao meu marido Nadiano por ter me apoiado e suportado em todos os momentos, sempre me apoiando e incentivando a nunca desistir.

Minhas irmãs Silvia Amélia e Mayara por todo suporte emocional. Meus sobrinhos-filhos Gabriel e Júlia que são os amores da minha vida.

Ao meu amado avô José Maria do Amaral (*in memorium*) que me ensinou desde pequena, a importância do saber. Sempre me estimulando e mostrando que conhecimento é poder. A minha avó Léa Amaral por todo carinho e cuidado.

A minha tia-mãe dourada, professora Flavia Amaral por me incentivar e me tratar como filha, por toda a paciência e todos os ensinamentos. Por ser meu espelho e fonte de inspiração e orgulho.

A professora Denise Coutinho por todo ensinamento e orientação. Por sua disponibilidade e toda atenção dispensada sempre com muito carinho.

A professora Socorro Cartágenes, minha madrinha científica, que sempre acreditou no meu potencial. Agradeço por todo apoio e amizade.

A professora Flavia Nascimento, sempre disposta a auxiliar em todas as etapas da pesquisa.

A Jéssyca, Tálison, Tássio, Antonio, Daniela, Natália e Alberto amigos do laboratório que me ajudaram nos experimentos, sempre com muita alegria e muitas histórias.

Aos colegas de turma, por todo companheirismo e amizade.

Aos professores e funcionários do Programa Ciências da Saúde.

Aos meus colegas de trabalho que me auxiliaram na organização dos meus horários para conseguir realizar as disciplinas.

A todos que me incentivaram e apoiaram.

Sem vocês nada disso seria possível.

RESUMO

A dor neuropática representa grupo heterogêneo de doenças com etiologias diferentes, que diferem em relação à localização, representando uma das principais condições dolorosas crônicas, com alta prevalência mundial, exigindo tratamento farmacológico com abordagem multidisciplinar, constituindo sério problema a saúde pública; o que tem ocasionado a busca de novas alternativas e/ou complementos terapêuticos, principalmente a partir de produtos naturais. Na perspectiva real de obtenção de novos agentes terapêuticos de origem vegetal, os estudos de validação das espécies vegetais devem ser estimulados para definição dos parâmetros de eficácia, segurança e qualidade. Nesse sentido, o objetivo deste estudo é contribuir com a validação de *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. (Iridaceae) (nome vernacular: coquinho), espécie nativa da América Tropical, de grande ocorrência no estado do Maranhão, Brasil e amplo uso terapêutico na população local; visando avaliar parâmetros farmacobotânicos, químicos e biológicos em modelo de dor neuropática; contribuindo para controle de qualidade de autenticidade e na padronização dos extratos da espécie. Folhas de *Eleutherine bulbosa* foram coletadas em habitat natural, submetidas à secagem e moagem, com obtenção dos extratos hidroalcoólicos por maceração (EbMac) e em aparelho Soxhlet (EbSox), nas relações de hidromódulo de 1:18 e 1:14, respectivamente; submetidos a caracterização química (*screening* químico, determinação do teor de polifenóis totais, determinação do teor de flavonoides e perfil cromatográfico por cromatografia de alta eficiência/CLAE acoplado a espectrômetro de massa/MS) e investigação do potencial analgésico em modelo de dor neuropática em ratos (análises comportamentais: deambulação forçada, alodínia mecânica e hiperalgesia térmica; análises bioquímicas: determinação da atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase) e ensaio *in vitro* (determinação da ciclooxigenase 1 e ciclooxigenase 2). Amostra do material vegetal fresco foi submetida à análise farmacobotânica (morfologia e anatomia) que possibilitam definição de parâmetros para avaliação de autenticidade da espécie vegetal, com emprego de investigação farmacognóstica convencional. As análises químicas demonstraram que EbMac e EbSox apresentam importantes classes de metabólitos secundários, com expressivos teores de fenóis totais e flavonoides; evidenciando nos cromatogramas vários compostos, especialmente de antraquinonas, naftoquinonas e flavonoides; principalmente no EbSox. Os extratos apresentaram atividade antinociceptiva na dor neuropática induzida pela compressão do nervo ciático (modelo de cialgia), em ratos, quando administrado por via oral, durante 15 dias de tratamento, com resultados mais expressivos em EbSox. Os animais tratados com EbMac e EbSox reduziram as concentrações de catalase e superóxido dismutase, demonstrando efeito antioxidante na dor neuropática; bem como ocasionaram inibição da atividade de ciclooxigenase 1 (COX-1) e ciclooxigenase 2 (COX-2), com maior potencial sobre COX-2, sinalizando que ação inibitória dos extratos por síntese de mediadores inflamatórios; resultados melhor evidenciados em EbSox. A extração das folhas de *Eleutherine bulbosa* em aparelho de Soxhlet demonstrou resultados mais expressivos nas análises químicas e biológicas em modelo de dor neuropática; podendo, assim, inferir melhor capacidade extrativa ao procedimento realizado em aparelho de Soxhlet, contribuindo efetivamente no estudo de padronização dessa espécie.

Palavras-chave: coquinho, antraquinonas, naftoquinonas, flavonoides, modelo de cialgia, antioxidante, mediadores inflamatórios.

ABSTRACT

Neuropathic pain represents a heterogeneous group of diseases with different etiologies that differ in relation to the location, representing one of the main chronic pain conditions, with high world prevalence, requiring pharmacological treatment with a multidisciplinary approach, constituting a serious public health problem; which has led to the search for new alternatives and / or therapeutic supplements, mainly from natural products. In the real perspective of obtaining new therapeutic agents of plant origin, validation studies of plant species should be stimulated to define parameters of efficacy, safety and quality. In this sense, the objective of this study is to contribute with the validation of *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. (Iridaceae) (vernacular names: coquinho,), native species of Tropical America, of great occurrence in the state of Maranhão, Brazil and wide therapeutic use in the local population; aiming to evaluate pharmacobotanical, chemical and biological parameters in neuropathic pain model; contributing to quality control of authenticity and standardization of the extracts of the species. Leaves of *Eleutherine bulbosa* were collected in natural habitat, submitted to drying and milling, obtaining hydroalcohol extracts by maceration (EbMac) and Soxhlet apparatus (EbSox), in the hydromodule ratios of 1:18 and 1:14, respectively; (chemical screening, determination of total polyphenol content, determination of flavonoid content and chromatographic profile by high performance chromatography / mass spectrometer coupled to mass spectrometer / MS) and investigation of the analgesic potential in a model of neuropathic pain in rats (behavioral analysis: forced deambulation, mechanical allodynia and thermal hyperalgesia; biochemical analysis: determination of the activity of catalase and superoxide dismutase enzymes) and in vitro assay (determination of cyclooxygenase 1 and cyclooxygenase 2). Sample of fresh plant material was submitted to the pharmacochemical analysis (morphology and anatomy) that allow the definition of parameters for the evaluation of authenticity of the plant species, using conventional pharmacognostic research. The chemical analyzes showed that EbMac and EbSox present important classes of secondary metabolites, with expressive contents of total phenomena and flavonoids; showing in the chromatograms various compounds, especially anthraquinones, naphthoquinones and flavonoids; especially in EbSox. The extracts presented antinociceptive activity in neuropathic pain induced by sciatic nerve compression (sciatica model) in rats when administered orally for 15 days of treatment, with more expressive results in EbSox. The animals treated with EbMac and EbSox reduced the concentrations of catalase and superoxide dismutase, demonstrating antioxidant effect in neuropathic pain; (COX-1) and cyclooxygenase-2 (COX-2), with greater COX-2 potential, signaling the inhibitory action of extracts by synthesis of inflammatory mediators; results best evidenced in EbSox. Extraction of the leaves of *Eleutherine bulbosa* in Soxhlet apparatus demonstrated more expressive results in chemical and biological analyzes in neuropathic pain model; thus, to infer better extraction capacity to the procedure performed in Soxhlet apparatus, effectively contributing to the study of standardization of this species.

Key-words: coconut, anthraquinones, naphthoquinones, flavonoids, sciatica model, antioxidant, inflammatory mediators.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Fases da Pesquisa e Desenvolvimento (P & D) de medicamentos a partir de espécies vegetais 32
- Figura 2.** Mecanismo de ação dor neuropática 39
- Figura 3.** Fármacos utilizados no tratamento farmacológico da dor neuropática 42
- Figura 4.** Aparelho placa quente (*hot plate*) utilizado no Laboratório de Estudo Experimental da Dor, Universidade Federal do Maranhão 45
- Figura 5.** Aparelho *Rotarod* utilizado no Laboratório de Estudo Experimental da Dor/Universidade Federal do Maranhão 45
- Figura 6.** Aparelho *Von Frey* utilizado no aparelho *Rotarod* utilizado no Laboratório de Estudo Experimental da Dor/Universidade Federal do Maranhão 46
- Figura 7.** Aspecto geral da espécie vegetal *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. (Iridaceae) 49
- Figura 8.** Fluxograma do delineamento experimental para investigação do potencial dos extratos hidroalcoólicos das folhas de *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. (Iridaceae) na dor neuropática, empregado nesse estudo. 68
- Figura 9.** Esquema do desenho experimental para investigação do potencial dos extratos hidroalcoólicos das folhas de *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. (Iridaceae) na dor neuropática, por análises comportamentais, bioquímicas e *in vitro* 69

- Figura 10.** *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. (Iridaceae) (A) Parte aérea das 74
folhas e bulbos; (B) Folhas; (C) Folhas com destaque para
nervação paralelinérvea.
- Figura 11.** *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. (Iridaceae). Características da 75
secção transversal da margem da folha. Em destaque, fibras
esclerenquimáticas (SC)
- Figura 12.** *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. (Iridaceae). (A) Feixe vascular 75
com dois polos de fibras esclerenquimáticas; (B) Feixe vascular
com fibras esclerenquimáticas somente junto ao floema.
- Figura 13.** *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. (Iridaceae). (A) Feixe vascular 76
FV com presença de fibras esclerenquimáticas SC; (B) Presença
de estômatos E na epiderme adaxial e abaxial dois pólos de
fibras esclerenquimáticas; (C) Presença de cristais prismáticos
CP ao longo do feixe vascular.
- Figura 14.** *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. (Iridaceae). Corte transversal 77
das folhas: Epiderme abaxial (Epb); estômatos (E); mesofilo (M);
Xilema (X); Floema (F); Fibras esclerenquimáticas (SC);
Epiderme adaxial (Epd).
- Figura 15.** *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. (Iridaceae): Cromatografia 81
líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas
dos extratos das folhas da espécie vegetal *Eleutherine bulbosa*
por extração por maceração 1:18
- Figura 16.** *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. (Iridaceae): Cromatografia 82
líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas
dos extratos das folhas da espécie vegetal *Eleutherine bulbosa*
por extração pelo aparelho de Soxhlet 1:14

- Figura 17.** Efeito dos extratos hidroalcoólicos das folhas de *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. (Iridaceae), obtidos por maceração e em aparelho de Soxhlet em teste comportamental pela avaliação de hiperalgesia térmica - Teste da Placa Quente (*hot plate*). 84
- Figura 18.** Efeito dos extratos hidroalcoólicos das folhas de *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. (Iridaceae) obtidos por maceração e em aparelho de Soxhlet em teste comportamental pela avaliação da deambulação forçada - Teste de *Rotarod*. 85
- Figura 19.** Efeito dos extratos hidroalcoólicos das folhas de *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. (Iridaceae) obtidos por maceração e em aparelho de Soxhlet em teste comportamental pela avaliação da alodínia mecânica - teste de *Von Frey*. 86
- Figura 20.** Efeito dos extratos hidroalcoólicos das folhas de *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. (Iridaceae) obtidos por maceração e em aparelho de Soxhlet na determinação da velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio pela enzima catalase (CAT). 87
- Figura 21.** Efeito dos extratos hidroalcoólicos das folhas de *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. (Iridaceae) obtidos por maceração e em aparelho de Soxhlet na capacidade de catalisação da reação entre o ânion superóxido e prótons pela enzima superóxido dismutase (SOD). 88
- Figura 22.** Percentual de inibição da ciclooxigenase-1 (COX-1) e ciclooxigenase-2 (COX-2) *in vitro*, induzido pelos extratos hidroalcoólicos das folhas de *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. (Iridaceae) obtidos por maceração e em aparelho de Soxhlet, testados nas concentrações de 2 µg/mL, 10 µg/mL e 50 µg/mL. 90

LISTA DE TABELAS

- Tabela 01.** Constituintes químicos isolados de *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. (Iridaceae) segundo estudo de revisão de Couto et al. (2016) 52
- Tabela 02.** Estudos desenvolvidos com *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. (Iridaceae) pelo Grupo de Produtos Naturais da Universidade Federal do Maranhão 61
- Tabela 03.** Avaliação qualitativa e semi-qualitativa dos constituintes químicos nos extratos hidroalcoólicos das folhas de *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. (Iridaceae) obtidos por maceração na relação de hidromódulo 1:18 e em aparelho de Soxhlet na relação de hidromódulo 1:14. 78
- Tabela 04.** Teor de polifenóis dos extratos das folhas de *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. (Iridaceae) obtidos por maceração na relação de hidromódulo 1:18 e em aparelho de Soxhlet na relação de hidromódulo 1:14 79
- Tabela 05.** Teor de flavonoides dos extratos das folhas de *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. (Iridaceae) obtidos por maceração na relação de hidromódulo 1:18 e em aparelho de Soxhlet na relação de hidromódulo 1:14 80
- Tabela 06.** Cromatograma obtido por LC-MS dos extratos das folhas de *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. (Iridaceae), obtidos por maceração no hidromódulo de 1:18 (representa relação droga/vegetal: etanol a 70% empregado neste estudo) (EbMac) e em aparelho de Soxhlet no hidromódulo de 1:14 (EbSox), via CLAE - MS, em modo de ionização negativa 83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AG	ácido gálico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
IASP	Associação Internacional do Estudo da Dor
APS	Atenção Primária a Saúde
CAT	catalase
cm	centímetro
COX-1	ciclooxigenase-1
COX-2	ciclooxigenase-2
COX	ciclooxigenase
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência acoplada
DN	dor neuropática
MS	espectrometria de massa
EROs	espécies reativas de oxigênio
EFNS	<i>European Federation of Neurological Societies</i>
EbMac	extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Eleutherine bulbosa</i> (Mill.) Urb. (Iridaceae) obtido por maceração na relação de hidromódulo 1:18
EbSox	extrato hidroalcoólico das folhas de <i>Eleutherine bulbosa</i> (Mill.) Urb. (Iridaceae) obtido em aparelho de Soxhlet na relação de hidromódulo 1:14
m/z	fragmentação de íons
g	grama
ICC	injúria de constrição crônica
IN	Instrução Normativa
IASP	<i>International Association for Study of Pain</i>
IASP	<i>International Association for the Study of Pain</i>
LNRP	limiar nociceptivo de retirada da pata
LNRPA	limiar nociceptivo de retirada da pata afetada
LNRPC	limiar nociceptivo de retirada da pata contralateral
LNRP	limiar nociceptivo de retirada da pata
mM	massa molar
MF	Medicamentos Fitoterápicos
MFFB	Memento Fitoterápico da Farmacopeia Brasileira

mgAG/g	micrograma de ácido gálico por grama
mgQE/g	micrograma de quercetina por grama
mg/mL	micrograma por mililitro
μL	microlitro
μm	<i>micrômetro</i>
mg/kg	miligrama por quilo
mL	mililitro
mL/min	mililitro por minuto
MS	Ministério da Saúde
nm	nanômetro
NeuPSIG	<i>Neuropathic Pain Special Interest Group</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
P & D	Pesquisa e Desenvolvimento
PNPMF	Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
PNPIC	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
pH	Potencial hidrogeniônico
PTF	Produtos Tradicionais Fitoterápicos
PGE2	prostaglandina E2
PGE	prostaglandinas
QE	quercetina
RENAME	Relação Nacional de Medicamentos Essenciais
RENISUS	Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
rpm	rotações por minuto
SUS	Sistema Único de Saúde
SOD	superóxido dismutase
°C	temperatura em graus Célsius
Tris-HCl	Tris (hidroximetil)aminometano hidrocloreídrico

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

1	INTRODUÇÃO	20
2	REFERENCIAL TEÓRICO	23
2.1	Fitoterapia, plantas medicinais, produtos derivados e os marcos regulatórios no Brasil nos últimos anos	23
2.2	A Fitoterapia e a Atenção Primária à Saúde	26
2.3	Estudos de validação	30
2.3.1	Estudo etnodirigido como ferramenta na seleção de espécies vegetais para validação	32
2.3.2	Obtenção do material vegetal, identificação botânica e processamento	33
2.3.3	Estudo químico	34
2.3.4	Estudo farmacológico	35
2.4	Dor neuropática	37
2.4.1	Fisiopatologia da dor neuropática	38
2.4.2	Mecanismos oxidativos na dor neuropática	40
2.4.3	Tratamento farmacológico	41
2.4.4	Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) de fármacos para o tratamento de dor neuropática	43
2.4.4.1	Modelos de avaliação pré-clínica de dor neuropática	43
2.5	<i>Eleutherine bulbosa</i> Mill. Urb.	47
3	OBJETIVOS	62
3.1	Objetivo geral	62
3.2	Objetivos específicos	62
4	MATERIAIS E MÉTODOS	63
4.1	Coleta da espécie vegetal e identificação botânica	63
4.2	Descrição morfo-anatômica	63
4.2.1	Análise morfológica	63
4.2.2	Análise anatômica	63
4.3	Obtenção dos extratos	63

4.4	Análise de caracterização química	64
4.4.1	<i>Screening</i> químico	64
4.4.2	Determinação do teor de polifenóis totais	65
4.4.3	Determinação do teor de flavonoides	65
4.5	Investigação química	65
4.6	Testes de atividade farmacológica	66
4.6.1	Caracterização do estudo	66
4.6.2	Animais	66
4.6.3	Modelo de cialgia	66
4.6.4	Delineamento experimental	67
4.7	Análises comportamentais, bioquímicas e <i>in vitro</i>	68
4.7.1	Análise comportamental	69
4.7.1.1	Teste de hiperalgia térmica (Teste da placa quente)	69
4.7.1.2	Avaliação da deambulação forçada – Teste de <i>Rotarod</i>	70
4.7.1.3	Avaliação da alodínia mecânica – Teste de <i>Von Frey</i>	70
4.7.2	Análise bioquímica	71
4.7.2.1	Determinação da enzima catalase (CAT)	71
4.7.2.2	Determinação da enzima superóxido dismutase (SOD)	72
4.7.3	Ensaio <i>in vitro</i>	72
4.7.3.1	Determinação da atividade das enzimas ciclooxigenase 1 (COX 1) e ciclooxigenase 2 (COX 2)	72
4.8	Análise estatística	73
5	RESULTADOS	74
5.1	Aspectos morfo-anatômica das folhas da espécie <i>Eleutherine bulbosa</i>	74
5.1.1	Características macroscópicas	74
5.1.2	Características microscópicas	74
5.2	Caracterização química	77
5.2.1	Constituição química qualitativa e semi-quantativa	78
5.2.2	Teor de polifenóis totais	79
5.2.3	Teor de flavonoides	79
5.3	Identificação química	80
5.3.1	Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada à espectrometria de massas (MS)	80

5.4	Parâmetros comportamentais e bioquímicos dos extratos hidroalcoólicos das folhas de <i>Eleutherine bulbosa</i> (Mill.) Urb. (Iridaceae) obtidos por maceração na relação de hidromódulo 1:18 e em aparelho de Soxhlet na relação de hidromódulo 1:14.	84
5.4.1	Parâmetros comportamentais	84
5.4.1.1	Avaliação de hiperalgia térmica (<i>Placa quente – hot plate</i>)	84
5.4.1.2	Avaliação da deambulação forçada – <i>Teste de Rotarod</i>	85
5.4.1.3	Avaliação da alodínia mecânica – <i>Teste de Von Frey</i>	86
5.4.2	Parâmetros bioquímicos	87
5.4.2.1	Efeito na atividade da enzima catalase	88
5.4.2.2	Efeito na atividade da enzima superóxido dismutase	88
5.4.3	Análise <i>in vitro</i>	88
5.4.3.1	Efeito sobre a inibição da enzima ciclooxigenase (COX)	89
6	DISCUSSÃO	91
7	CONCLUSÃO	103
	REFERÊNCIAS	104
	ANEXO 1	140

1 INTRODUÇÃO

A história comprova que o uso dos recursos naturais, com ênfase nas espécies vegetais, na cura e prevenção de doenças, remota desde os primórdios da civilização; constituindo prática inserida na cultura e tradição dos mais diversos países (SIMÕES et al., 2016). Esta prática popular, hoje conhecida como Fitoterapia, representa o acúmulo de conhecimentos sobre a ação das plantas por diversos grupos étnicos; constituindo durante séculos, a base terapêutica e, tendo sido por centenas de anos a única opção disponível para as populações (AMARAL, 2007; BRAGA, 2011).

Numerosas fases caracterizam a evolução da cura ou prevenção de doenças fundamentada no uso de plantas; sendo constatado que ora essa prática representava o primeiro e/ou único recurso terapêutico de grande parte da população, ora era relegada a um segundo plano, cedendo lugar à medicina científica, passando a representar um recurso terapêutico marginalizado e menosprezado, utilizado apenas pelas classes sociais menos favorecidas, sem acesso aos serviços de saúde institucionalizado (MOREIRA et al., 2014).

Entretanto, a análise da articulação da Fitoterapia na sociedade contemporânea demonstra que, tanto nos países desenvolvidos como em desenvolvimento, a partir dos anos 80, o uso de plantas como recurso terapêutico passou a ser integrado nas mais diversas classes sociais, não se restringindo somente às populações das zonas rurais ou regiões desprovidas de assistências à saúde (SIMÕES et al., 2016).

A ascensão da Fitoterapia no momento atual encontra-se fundamentada em vantagens como os custos reduzidos e valorização das tradições populares; bem como a comprovação, através dos avanços das pesquisas, dos efeitos sinérgicos decorrentes dos vários constituintes químicos presentes em uma espécie vegetal e da associação de mecanismos de ação por compostos agindo em alvos moleculares diferentes, contribuindo na eficácia (GONÇALVES, 2016; BRASIL, 2017). Valendo destacar, ainda, o incentivo da Organização Mundial de Saúde (OMS), reconhecendo o potencial terapêutico das plantas e ainda a inacessível política de saúde oficial para a maioria da população mundial (WHO, 2011).

O Brasil, refletindo tendência mundial, tem o uso de plantas e suas preparações derivadas, amplamente inserido na cura ou prevenção de doenças, atuando como prática tradicional, complementar ou alternativa à medicina ocidental convencional, reconhecida oficialmente pelo Ministério da Saúde através de várias publicações que constata os

benefícios garantidos pelo uso seguro, eficaz, qualificado e racional de várias espécies vegetais (BRASIL, 2006a; BRASIL, 2006b; BRASIL, 2011; BRASIL, 2017). Outros fatores importantes que incentivam o uso de plantas na terapêutica em nosso país são a rica biodiversidade e diversidade cultural, associadas às diferenças socioeconômicas na grande extensão do território nacional, com reconhecida desigualdade na distribuição dos recursos destinados a saúde, com concentração dos serviços especializados nas grandes áreas urbanas, favorecendo a uma parcela mínima da população, inviabilizando e/ou dificultando o acesso aos serviços públicos de saúde pela maioria da população (MORETTI, 2010; ROCHA et al., 2015).

Entretanto, apesar da atual Política Nacional de Saúde definir a oferta da Fitoterapia como terapêutica alternativa e/ou complementar nos serviços de saúde, é comprovado que a plena implantação ainda precisa vencer barreiras reais, tais como: investimentos incipientes em Pesquisa, Desenvolvimento e Inovação (P & D & I); falta de parcerias das universidades com as empresas; carência de estudos com as espécies vegetais nativas e de uso terapêutico popular; falta dos estudos de validação e padronização dos fitoterápicos e, ainda, a barreira institucional decorrente das normas e critérios para produção e comercialização (FREITAS, 2007; KLEIN et al., 2009; BRASIL, 2012).

Nesse cenário, a escassez dos estudos de validação das espécies vegetais empregadas na prática popular como medicamentos representa um grande gargalo na utilização racional e segura da Fitoterapia (BLAZÚS, 2008; BRASIL, 2009a; MATSUCHITA 2015).

Assim, visando uma contribuição efetiva para a real implantação da Política Nacional de Saúde com ênfase nas diretrizes da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS) (BRASIL, 2006a; BRASIL, 2017) e da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) (BRASIL, 2006b), o Grupo de Produtos Naturais da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) tem desenvolvido pesquisas com espécies vegetais, preferencialmente nativas, de amplo uso terapêutico popular e de grande ocorrência no Estado do Maranhão; com foco nos estudos de validação, na perspectiva real de garantir o acesso da população a produtos com eficácia, segurança e qualidade certificados.

Nesse segmento algumas espécies vegetais têm apresentado resultados promissores, indicando potencial para emprego como matéria-prima para fonte de novos medicamentos, valendo destacar as pesquisas já desenvolvidas com *Eleutherine bulbosa*

(Mill.) Urb. (Iridaceae) (nome vernacular: coquinho); representando espécie nativa e de larga ocorrência no continente americano, com amplo e diversificado uso popular (COUTO, 2012; COUTO et al., 2016).

Diante do exposto, em continuidade à linha de pesquisa do Grupo de Produtos Naturais da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), esse trabalho propõe desenvolver estudo de validação de *Eleutherine bulbosa*; com ênfase aos parâmetros farmacobotânico, químico e biológico em dor neuropática.

Os estudos de validação com *Eleutherine bulbosa* (coquinho), podem certificar a espécie como matéria-prima para novas opções terapêuticas, alicerçado nos parâmetros de eficácia, segurança e qualidade.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Fitoterapia, plantas medicinais, produtos derivados e os marcos regulatórios no Brasil nos últimos anos

No Brasil, apesar da grande biodiversidade e diversidade cultural, as diferenças socioeconômicas na grande extensão do território nacional trazem drásticas consequências na distribuição dos recursos destinados à saúde, uma vez que, a concentração de serviços especializados está situada nas grandes áreas urbanas e o alto custo, inviabiliza e/ou dificulta o acesso aos serviços públicos de saúde pela maioria da população. Este contexto favorece a preservação da utilização de plantas medicinais, o que contribui significativamente para ascensão do uso de plantas e produtos derivados pela população (AMARAL, 2007; GODINHO, 2017).

A necessidade da garantia da Fitoterapia eficaz e segura, incentivada pelas consignações internacionais, especialmente da Organização Mundial de Saúde (OMS); bem como a obrigatoriedade de conservação e uso sustentável dos recursos vegetais e preservação do saber popular, resultou na adoção de várias medidas e ações normativas estabelecidas pelo Governo Federal especialmente no âmbito da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Ministério da Saúde (MS) (GONÇALVES, 2016).

Nos últimos anos, alguns marcos regulatórios merecem destaque como a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS), publicado em 2006, visando a ampliação das terapêuticas fornecidas à população nas unidades de saúde, incluindo a Homeopatia, Medicina Tradicional Chinesa, Acupuntura, Hidroterapia, Medicina Antroposófica e Fitoterapia (BRASIL, 2006a).

Com a publicação da Portaria nº 849, em 27 de março de 2017, a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) foi ampliada com incorporação de outras terapêuticas como arteterapia, ayurveda, biodança, dança circular, meditação, musicoterapia, naturopatia, osteopatia, quiropraxia, reflexoterapia, reiki, shantala, terapia comunitária integrativa e yoga (BRASIL, 2017).

Na estruturação da Fitoterapia no Brasil, merece destaque ainda a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF), aprovada pelo Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006, com o objetivo de garantir à população brasileira o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional (BRASIL, 2006b).

O uso racional compreende a prescrição apropriada fundamentada no emprego de plantas e preparações derivadas com qualidade, segurança e eficácia; com disponibilidade oportuna e a preços acessíveis; garantindo a dispensação em condições adequadas e o consumo nas doses indicadas, nos intervalos definidos e no período de tempo indicado (JOÃO, 2010).

Houve também a aprovação do Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos e a criação do Comitê Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos através da Portaria Interministerial GM/MS nº 2.960, de 09 de dezembro de 2008, com objetivo de favorecer a implantação da Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos, garantindo o uso racional e seguro de plantas medicinais e fitoterápicos (BRASIL, 2018).

Vale enfatizar a publicação da Portaria GM/MS nº 886, de 20 de abril de 2010, que institui a Farmácia Viva no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS), definindo as etapas da cadeia produtiva de plantas medicinais: cultivo, coleta, processamento, armazenamento, manipulação, dispensação de preparações magistrais e oficinais de fitoterápicos. As ações dessa Portaria foram complementadas pela Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) nº 18, de 3 de abril de 2013, dispondo sobre o regulamento técnico de boas práticas de processamento e armazenamento de plantas medicinais, preparação e dispensação de produtos magistrais e oficinais de plantas medicinais e fitoterápicos em Farmácias Vivas no âmbito do SUS (BRASIL, 2010; 2013).

Em 2011, houve a publicação da primeira edição do Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira, que traz formulações de fitoterápicos reconhecidos para uso em farmácias de manipulação ou Farmácias Vivas ou mesmo para notificação de fitoterápicos industrializados; descrevendo, ainda, as formulações para preparações extemporâneas e as técnicas de extração para preparação de tinturas, extratos, além de pomadas, géis e cremes. Esse formulário destaca as indicações e restrições de uso de cada espécie vegetal e/ou suas formulações e visa contribuir na aplicação da Fitoterapia com qualidade baseada em evidências e em atendimento aos padrões de excelência, na tentativa de colaborar com a Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos (BRASIL, 2018) A RDC ANVISA/MS nº 26, de 13 de maio de 2014, normatiza o registro e notificação de fitoterápicos industrializados; sendo esses classificados em medicamentos fitoterápicos (MF) e produtos tradicionais fitoterápicos (PTF), cuja diferença básica está fundamentada na forma de certificação da segurança e eficácia; onde

o MF é avaliado através de ensaios clínico e o PTF pela tradicionalidade de uso (BRASIL, 2014a).

Em 2014, também foi publicada a Instrução Normativa (IN) ANVISA/MS nº 02, de 13 de maio de 2014, com as listas de espécies vegetais para a elaboração de medicamentos fitoterápicos ou produtos tradicionais fitoterápicos de registro simplificado, o que significa que a comprovação dos estudos de segurança e eficácia podem ser dispensados no momento do registro do fitoterápico industrializado junto à ANVISA, de acordo com o determinado na RDC ANVISA/MS nº 26/2014; sem, no entanto, dispensar os métodos para comprovação da qualidade (BRASIL, 2014a, 2014b).

Segundo a RDC ANVISA/MS nº 26/2014, para o registro simplificado de produto tradicional fitoterápico, sua segurança e eficácia devem ser determinadas por período mínimo de 30 anos de utilização ou pela presença na lista de PTF da INANVISA/MS nº 02/2014; ou, ainda, a presença nas monografias de fitoterápicos de uso tradicional da Comunidade Europeia (BRASIL, 2014a). Isso demonstra que mesmo apoiando a tradicionalidade do uso, existem critérios rigorosos para o registro ou notificação desses produtos. De acordo com a OMS, o uso tradicional representa uma prova documentada de que uma substância vem sendo utilizada durante, no mínimo, por três gerações, para um fim medicinal específico, oferecendo uma riqueza de observações (PANIZZA et al., 2012).

A introdução de plantas medicinais e fitoterápicos na Relação Nacional de Medicamentos Essenciais (RENAME), que consiste na lista de medicamentos para atender às necessidades prioritárias de saúde da população brasileira (componentes básicos, estratégicos e especializados), servindo de instrumento para racionalizar a prescrição, dispensação e o uso de medicamentos, sem dúvida, comprova o avanço na utilização da Fitoterapia no Brasil. Esta lista faz parte da estratégia de medicamentos proposta pela OMS desde 1978, sendo empregada para orientar a política dessa organização e de seus países membros. No Brasil, a relação contempla a lista de medicamentos disponibilizados pelo SUS, sendo constantemente atualizada por uma comissão técnica multidisciplinar, composta por órgãos do governo visando suprir as necessidades da população. A partir de 2007, duas plantas foram inseridas na RENAME e a edição atual dessa lista que consiste na nona edição (2017) contem doze plantas medicinais, incluindo suas formas farmacêuticas, inclusas na Relação Nacional de Medicamentos do Componente Básico da Assistência Farmacêutica (RENAME, 2017). A edição atual contempla *Aloe vera* (L.) Burm. f.; *Cynaras colymus* L.; *Glycine max* (L.)

Merr.; *Harpagophytum procumbens* DC. Ex Meissn.; *Maytenus silicifolia* Mart. Ex Reissek; *Mentha piperita* L.; *Mikania glomerata* Spreng.; *Plantago ovata* Forssk.; *Rhamnus purshiana* DC; *Salix alba* L.; *Schinus molle* Raddi e *Uncaria tomentosa* Willd. ex Roem. & Schult. (RENAME, 2017).

Em 2016, a RDC nº 84, de 17 de junho de 2016, aprovou o Memento Fitoterápico da Farmacopeia Brasileira (MFFB), com o intuito de orientar a prescrição de plantas medicinais e fitoterápicos. O MFFB apresenta monografias completas com conteúdo baseado em evidências científicas para auxiliar na conduta terapêutica do profissional prescritor de espécies. Este é um importante marco para a fitoterapia brasileira em prol da saúde pública do Brasil.

A análise das determinações normativas ora vigentes para a Fitoterapia no Brasil permite evidenciarmos que essa terapêutica vem sendo aplicada como tradicional e científica, regidas por parâmetros rigorosos pela ANVISA/MS, visando assegurar o uso de espécies vegetais validadas e seus produtos derivados com qualidade; e, assim, minimizar riscos à saúde dos pacientes dessa terapêutica. Mas vale um questionamento: essas determinações normativas garantem a oferta da Fitoterapia no Brasil com eficácia, segurança e qualidade, com grande acessibilidade a população?

2.2 A Fitoterapia e a Atenção Primária à Saúde

Definida como o primeiro contato do usuário com a rede assistencial do sistema de saúde, a Atenção Primária à Saúde (APS) é considerada complexa, exigindo intervenção ampla em diversos aspectos para que possa ter efeito positivo sobre a qualidade de vida da população, exigindo um conjunto de saberes para ser eficiente, eficaz e resolutive. É caracterizada principalmente, pela continuidade e integralidade da atenção, coordenação da assistência dentro do próprio sistema, atenção centrada na família, orientação e participação comunitária e competência sociocultural dos profissionais (STARFIELD, 2002).

A Atenção Primária à Saúde (APS) é considerada como estratégia para organização de sistemas de saúde pela OMS, tendo sido destacada desde a Conferência Internacional de Saúde de Alma-Ata em 1978, mobilizando profissionais, instituições, governos e a sociedade civil em busca de soluções aos problemas existentes nas políticas de saúde mundial. Em 2008, essa organização publicou um relatório intitulado “A Atenção Primária à Saúde: agora mais que nunca”, descrevendo as mudanças no contexto existente nos 30 anos desde a ocorrência da Conferência de Alma-Ata, demonstrando,

com dados científicos, a importância de destacar a APS como forma de melhorar o atendimento à saúde (BRASIL, 2012; WHO, 2018).

No Brasil, a APS foi incluída na agenda do governo, sendo gradativamente fortalecida, passando a representar a porta de entrada preferencial do SUS; merecendo destaque a implantação do Programa da Saúde da Família, na década de 90, como estratégia para a reestruturação do modelo de atenção; sendo, hoje, a Estratégia Saúde da Família (ESF), o programa mais importante dada a expressiva expansão de cobertura populacional (BORGES; BAPTISTA, 2010; RODRIGUES; SIMONI; MACHADO, 2012).

A Estratégia Saúde da Família, que visa a reorientação da assistência à saúde no SUS, com esforço na implantação de uma atenção primária efetiva, resolutive e coordenada, sem dúvida representa a ferramenta mais efetiva para a consolidação da Fitoterapia como mais um recurso terapêutico a ser incorporado nesse programa, principalmente por uma demanda da própria população que já utiliza plantas medicinais como recurso para cura de doenças (SLOMP JÚNIOR; SACRAMENTO, 2012; MALTA et al., 2016).

Discussões sobre Fitoterapia tornaram-se mais consistente na Atenção Primária a partir da constatação de que, simultaneamente ao uso de medicamentos industrializados convencionais, a população atendida em Unidades Básicas de Saúde (UBS) faz uso de plantas com fins terapêuticos, muitas vezes desconhecendo a possível existência de toxicidade e mesmo sua comprovada ação terapêutica, forma correta de cultivo, preparação, indicações e contraindicações, acreditando que, por serem plantas, não são prejudiciais à saúde, independente da forma e quantidade utilizada (TOMAZZONI, 2006) bem como a comprovação que muitas patologias comuns respondem bem à Fitoterapia como opção terapêutica (ELDIN; DUNFORD, 2001; BRASIL, 2012).

Os cuidados básicos de saúde exigem a utilização de todos os recursos locais adequados e disponíveis para prestar assistência eficaz e de alta resolutividade. Assim, a utilização adequada de plantas medicinais validadas na Atenção Primária representa um passo importante e mais uma opção medicamentosa a ser destinada à população na tentativa de melhorar sua saúde e qualidade de vida (SILVA et al., 2006; ANTONIO; TESSER; MORETTI-PIRES, 2014).

As diretrizes e responsabilidades institucionais estabelecidas pela Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (2006a) e Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (2006b) deveriam ter estimulado a implantação de

programas de Fitoterapia nos serviços de Atenção Primária à Saúde nas unidades de saúde do SUS (BRUNING et al., 2012).

Nesse segmento, a institucionalização do Programa Farmácia Viva, no âmbito do SUS, sob gestão estadual, municipal ou do Distrito Federal (BRASIL, 2010), considerado um programa de Atenção Básica à Saúde, também deveria contribuir significativamente para a inserção da Fitoterapia como recurso terapêutico, na perspectiva da promoção do uso correto e racional de plantas medicinais e fitoterápicos.

Nesse contexto, em 2012, foi publicado, pelo Ministério da Saúde, um Caderno de Atenção Primária direcionado para as plantas medicinais e Fitoterapia visando estimular a implantação da Fitoterapia no SUS com melhoria do acesso da população a produtos e serviços seguros e de qualidade, bem como sensibilizar e orientar gestores e profissionais de saúde na formulação e implantação de políticas, programas e projetos; e, ainda, estruturar e fortalecer a atenção em Fitoterapia, com ênfase na Saúde da Família (BRASIL, 2012).

Mas a análise do cenário da assistência à saúde pela Fitoterapia nos serviços públicos do Brasil no momento atual, mais de uma década após a publicação dessas determinações normativas, comprova que a oferta da tão propagada e divulgada terapêutica ainda não atingiu os níveis desejados no território nacional, especialmente nas regiões desprovidas de assistência médico-farmacêutica, a exemplo das regiões norte e nordeste (ARAÚJO et al., 2014; ANTONIO; TESSER; MORETTI-PIRES, 2014).

Estudo de Antonio; Tesser; Moretti-Pires (2014), visando caracterizar a inserção da Fitoterapia em Programas de Atenção Primária à Saúde, comprova que embora haja um aparente aumento da produção científica sobre o uso de fitoterápicos nos serviços de APS, o que parece ser estimulado pela biodiversidade brasileira, extensão territorial e tradicionalidade do uso de plantas medicinais; esse aumento é considerado incipiente, ou seja, são poucas as experiências publicadas na literatura científica até o momento. Algumas hipóteses foram sugeridas para esse fato, tais como: subnotificação, pouco interesse acadêmico em estudo sobre esse tema, pouco incentivo ao financiamento de pesquisas na área da Fitoterapia na APS; merecendo destaque, a subvalorização de alguns profissionais quanto à eficácia dessa terapêutica. No entanto, os autores alertam que os trabalhos registrados demonstram que a introdução da Fitoterapia nesses serviços possibilitou uma maior interação dos usuários com os profissionais de saúde e o desenvolvimento da visão crítica sobre o uso adequado de plantas medicinais e fitoterápicos.

Estudo desenvolvido por Araújo et al. (2014), visando analisar a inserção da Fitoterapia em unidades de saúde da família no município de São Luís, Maranhão, Brasil; comprova que, embora 94% dos diretores dos serviços entrevistados refiram acreditar que a oferta da Fitoterapia como terapia alternativa e/ou complementar traria benefícios à qualidade de vida da comunidade, esses desconheciam as normativas vigentes relacionadas à terapêutica no âmbito das políticas nacionais de saúde e não possuem capacitação na área.

A situação da Fitoterapia no município de São Luís segue ao lamentável modelo de diversas localidades brasileira. Embora o país possua grande extensão territorial, com riqueza de ecossistemas combinado a precárias condições socioeconômicas da população, favorecendo diversos agravos à saúde, com um legado cultural do conhecimento tradicional de plantas para fins terapêuticos, resultante da miscigenação da população brasileira, com forte influência indígena, europeia e africana. Tais elementos deveriam, em conjunto, estimular o processo de validação das plantas, especialmente as nativas, visando o desenvolvimento da Fitoterapia e consequente implantação nos serviços de saúde públicos e privados (AMARAL, 2007; ARAÚJO et al., 2014).

Com base nos aspectos gerais de caracterização da Fitoterapia na assistência à saúde disponibilizada à população brasileira, surgem alguns questionamentos: O que realmente tem dificultado a oferta da Fitoterapia na Atenção Básica à Saúde? Qual estratégia empregar para garantir a atuação efetiva dos profissionais da área de saúde para real e ampla assistência à saúde pela Fitoterapia? Quais plantas e preparações derivadas devem ser ofertadas?

É comprovado que embora existam essas já referidas ações e programas para estimular o uso de plantas medicinais e fitoterápicos na APS, a falta de qualificação dos profissionais de saúde na área é identificada como fator que dificulta a real inserção da Fitoterapia; situação agravada pela escassez dos cursos de graduação da área de saúde das universidades brasileiras com Fitoterapia em seus currículos; formando, portanto, profissionais que não detém conhecimento nessa área; realidade essa que contraria o princípio do SUS de educação continuada (BRASIL, 2012; ARAÚJO et al., 2014; IBIAPINA et al., 2014).

Entretanto, como agravante para a plena Assistência à Saúde pela Fitoterapia no Brasil, merece destaque ainda, a falta de comprovação de eficácia, segurança e qualidade de plantas e preparações derivadas ofertadas à população que seria possível através de estudos de validação, principalmente das espécies vegetais nativas e de uso terapêutico

popular; o que evidencia a necessidade de direcionamento de esforços e recursos no desenvolvimento desses estudos.

2.3 Estudos de validação

O cenário atual da crescente ascensão do uso de plantas e preparações derivadas, predominantemente fundamentada no empirismo da prática popular, sem comprovação científica dos parâmetros de eficácia, segurança e qualidade; bem como as determinações normativas do Governo Federal relacionadas à Política Nacional de Fitoterápicos e a evolução científica que vivemos no momento atual não permitem retrocessos, devendo-se garantir a utilização de recursos naturais de forma racional, apoiado nas ciências naturais e no método científico. Esse aspecto deve estimular os grupos de pesquisa na definição de critérios científicos para fundamentar o uso de tais recursos terapêuticamente; com base nos estudos de validação (BALBINO; DIAS, 2010; MIGLIATO et al., 2011; BORELLA et al., 2012; ARAÚJO et al., 2014).

A investigação baseada em metodologia científica, que busca avaliar eficácia e segurança das plantas de uso medicinal, caracteriza os estudos de validação; ou seja, a validação consiste em confirmar cientificamente as propriedades terapêuticas das plantas medicinais para permitir seu uso como medicamento em seres vivos (ABRANCHES, 2012). Assim, os estudos de validação transformam as plantas medicinais em produtos fitoterápicos; buscando a confirmação da eficácia farmacológica e da ausência de toxicidade da planta; fundamentados nos estudos botânicos, químicos, toxicológicos e farmacológicos (MACIEL et al., 2002; BRANDÃO, 2017).

Posicionar as plantas, especialmente as de amplo uso terapêutico popular, no alvo da investigação científica deve ser encarado como um dever social, certificando que a planta a ser empregada como medicamento, tenha sido objeto das mesmas exigências que outro medicamento de qualquer origem; com atendimento aos rigores técnicos e legais (MOREIRA et al., 2014).

Estudo de revisão de Veiga Junior; Pinto; Maciel (2005) já alertava que plantas da flora nativa são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas; com grande divergência quanto à indicação terapêutica; abordando, ainda, nesse estudo, o sério problema de saúde pública que representa a toxicidade das plantas de uso medicinal popular, alertando que dado os constituintes tóxicos, ação sinérgica e adulterações das plantas de uso popular podem ocorrer graves efeitos adversos; procurando, assim, desmistificar o falso dito popular “se natural, não

faz mal”, referenciando várias comprovações de reações tóxicas e efeitos adversos provocados por plantas medicinais.

Passados mais de uma década dessa revisão, uma breve análise de estudos locais do Grupo de Produtos Naturais da UFMA (BRITO et al., 2015; BRITO, 2016, GONÇALVES, 2016; GODINHO, 2017; FERREIRA, 2018) comprava que tal realidade não mudou, sendo evidenciado a necessidade de maior fiscalização, vigilância e controle de qualidade do material vegetal de uso medicinal pela população local; o que deve estimular os estudos de validação, possibilitando agregar valor biotecnológico e promover o seu uso em saúde pública.

Assim, a transformação de uma planta em medicamento, logo um produto tecnicamente elaborado, implica a utilização de operações de transformação tecnológica, fundamentados nos estudos de validação, devendo assegurar a preservação da integridade química e farmacológica do vegetal, garantindo a constância da ação biológica; bem como a segurança e qualidade na utilização (SIMÕES et al., 2010).

Então, na prática, como transformar uma planta em medicamento? Ou seja, como desenvolver os estudos de validação?

Da planta podemos chegar a um medicamento quando essa passa a ser alvo da interação inter e multidisciplinar, envolvendo estudos etnodirigidos, botânicos, agrônômicos, químicos, biológicos (farmacologia e toxicologia pré-clínica e clínica) e farmacêutico (desenvolvimento de metodologia analítica de controle de qualidade e produção tecnológica) (CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2005; CHABARIBERI et al., 2009; SIMÕES et al., 2010) (figura 1).

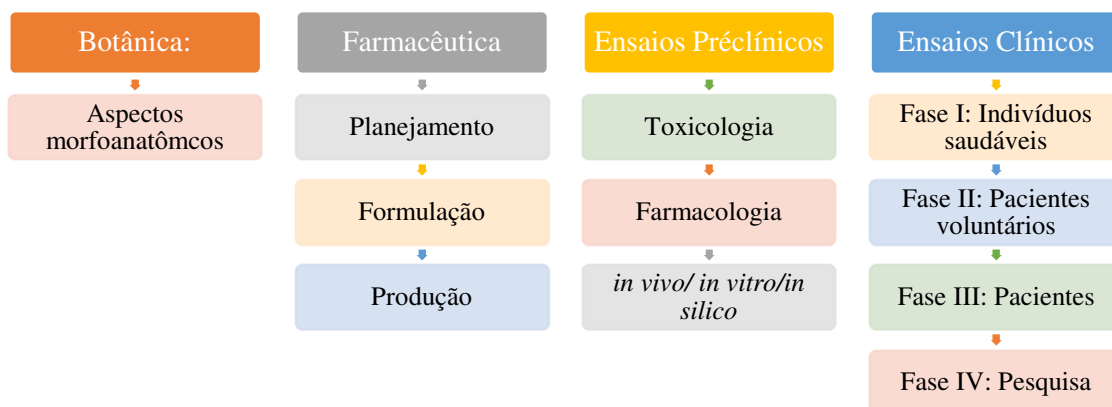


Figura 1. Fases da Pesquisa e Desenvolvimento (P & D) de medicamentos a partir de espécies vegetais
 Fonte: AMARAL (2007), modificada

2.3.1 Estudo etnodirigido como ferramenta na seleção de espécies vegetais para validação

Como qualquer outro medicamento, o processo de pesquisa e desenvolvimento (P & D) de fármacos a partir de plantas é complexo, longo e de alto custo; lidando com uma pergunta inicial: o que vale ser pesquisado? Em um país de rica biodiversidade como o Brasil, quais plantas selecionar para alvo de investigação? Essa riqueza da diversidade brasileira exige estratégias para definição e critérios para seleção do material para investigação científica. Nesse sentido, os estudos etnobotânicos e etnofarmacológicos, chamados em conjunto de estudos etnodirigidos, têm fornecido importantes subsídios, possibilitando a avaliação dos recursos naturais, especialmente de origem vegetal, empregados terapeuticamente pela população (ALBUQUERQUE et al., 2014a; GODINHO, 2017).

Os estudos etnodirigidos, com ênfase aos etnofarmacológicos, têm demonstrado grande contribuição na pesquisa de plantas medicinais, drogas vegetais, produtos tradicionais fitoterápicos e medicamentos fitoterápicos, pois o uso prolongado por determinados grupos étnicos e/ou populações tradicionais pode ser encarado como pré-triagem quanto à utilidade terapêutica (OLIVEIRA et al., 2009).

Nesse contexto, estudos internacionais e nacionais têm demonstrado que a seleção de plantas fundamentada nas investigações etnofarmacológicas leva a melhores resultados quando comparados à seleção aleatória de plantas para pesquisa (BALICK; COX, 1996; KHAFAGI; DEWEDAR, 2000; OLIVEIRA et al., 2011; GODINHO, 2014).

2.3.2 Obtenção do material vegetal, identificação botânica e processamento

A espécie vegetal selecionada para prosseguimento dos estudos de validação pode ser nativa ou exótica, obtida a partir do extrativismo ou do cultivo; que igualmente exigem o compromisso da exploração sustentável e de trabalharmos com exemplares de qualidade; o que é representado por material com características adequadas de autenticidade, integridade e pureza; nos quais devem ser asseguradas condições ideais de crescimento e desenvolvimento, na garantia de uso de material vegetal com maiores teores de princípios ativos e maior quantidade de fitomassa (MARTINS, 2005; BRASIL, 2006b; BRASIL, 2006c; YADAV; DIXIT, 2008; BRASIL, 2009).

A certificação da autenticidade do material, com a correta identificação botânica, é imprescindível, especialmente, porque na coleta etnodirigida, metodologia preferencialmente empregada para seleção do material botânico, as plantas são referenciadas pelo nome vernacular; sendo, assim, necessária a coleta do exemplar referido no inquérito, com preparo das exsicatas para identificação nos herbários idôneos (VERDAM; SILVA, 2010).

No cultivo devem ser monitorizados os fatores genéticos, ontogênico, ambientais (bióticos e abióticos) que influenciam a biossíntese dos metabólitos secundários; os quais são responsáveis pela atividade biológica da espécie vegetal alvo da investigação (MARTINS, 2005; GOBBO NETO; LOPES, 2010).

A literatura disponibiliza informações técnicas agronômicas para as boas práticas de plantio, colheita e processamento de material vegetal; estabelecendo condições ideais em relação à área, local, solo, tratos culturais, propagação, iluminação, cobertura, controle de pragas e doenças, colheita (parte do vegetal, hora, técnica, período e estação do ano), limpeza e descontaminação (VON HERTWIG, 1991; CORREA JÚNIOR; LIN; SCHEFFER, 1991; BRASIL, 2004; RODRIGUES, 2004; MARTINS, 2005; BRASIL, 2006c; BRASIL, 2009; AZEVEDO; MOURA, 2010).

No processo de pós-coleta, a planta poderá ser empregada no processo de validação na forma fresca ou poderá ser submetida a processos de conservação com estabilização e secagem. O processo de estabilização, que visa inativar enzimas, é realizado quando a planta apresenta algum metabólito que poderá ser destruído após o processo de coleta pela ação de enzimas que ainda encontram condições para continuarem atuando. O processo de secagem é um fenômeno físico de superfície que leva a eliminação de água com transferência de calor e massa, desta forma, aumenta o tempo de conservação da espécie, diminuindo a possibilidade de contaminação microbiana, além de reduzir o

volume, facilitando o transporte do material e a manipulação deste. Poderá ser realizada ao ar livre, por ar quente ou radiação infravermelha, entretanto, ao se controlar a temperatura e a velocidade do ar, é possível obter uma secagem de forma homogênea e mais rápida, com maior garantia na qualidade do material obtido (BRASIL, 2006).

Após a secagem do material será necessário submetê-lo ao processo de moagem, que deverá ser escolhido de acordo com a parte da planta que está em estudo. Desta forma, pode ser realizado por secção, utilizando facas ou tesouras para folhas, por contusão, em moinhos ou almofariz, para materiais mais duros ou por rasuração quando trabalhando com sementes ou cascas. Após esse processo, o material poderá ser submetido a métodos de extração por metodologias adequadas (BRASIL, 2006).

Matos (2007) afirma que “a melhor forma de se manter a qualidade das plantas medicinais e de suas preparações é assegurar uma correta sequência de operações desde o plantio, colheita, pré-processamento até o produto final que chega ao usuário”.

2.3.3 Estudo químico

As espécies vegetais apresentam composição química complexa, utilizando as diversas rotas biossintéticas para síntese dos metabólitos secundários, os quais não são comuns a todas as espécies, com distribuição restrita entre espécies ou gêneros pertencentes à uma mesma família botânica dentro do reino vegetal. Essas são as substâncias que respondem pela atividade biológica, com longa e bem-sucedida história nos processos de descoberta e desenvolvimento de fármacos quer seja empregado como plantas medicinais, drogas vegetais, produtos tradicionais fitoterápicos e medicamentos fitoterápicos, derivados semissintéticos, fitofármacos, protótipo ou análogo (SIMÕES et al., 2016).

Os estudos químicos ou fitoquímicos compreendem etapas de avaliação qualitativa e quantitativa de constituintes ou metabólitos secundários, isolamento e elucidação estrutural dos princípios ativos ou substâncias responsáveis pela ação biológica, empregando métodos químicos, físicos e/ou físico-químicos; envolvendo técnicas de caracterização, métodos cromatográficos, espectrometria de massas, espectroscopia no ultravioleta, no visível e no infravermelho; bem como a ressonância magnética nuclear (RMN) de próton e carbono 13 (WAGNER; BLADT, 1996; COLLINS et al., 1997; SILVERSTEIN et al., 2002; FALKENBERG et al., 2004; MATOS, 2009).

Como os estudos são usualmente realizados com os extratos vegetais, suas frações e substâncias isoladas, envolvendo várias etapas operacionais com diversas variáveis, que

podem alterar a estabilidade dos constituintes químicos e, conseqüentemente, a atividade biológica investigada, é fundamental o desenvolvimento e validação de metodologias analíticas para padronização dessas operações de extração. Esses estudos de padronização são orientados pelos marcadores ativos e/ou analíticos, com a identificação e determinação das substâncias químicas relacionadas aos efeitos biológicos, geralmente representados pelas que ocorrem em maior concentração ou potência farmacológica, assumindo papel fundamental para a garantia da eficácia (ARAGÃO, 2002; CAMURÇA-VASCONCELOS et al., 2005; COUTO, 2012; SIMÕES et al., 2016).

A análise química de constituintes ou metabólitos secundários representa parâmetro de avaliação de integridade indispensável no controle de qualidade, considerando que as matérias primas vegetais podem apresentar variabilidade na composição química, dependendo de vários fatores intrínsecos e extrínsecos, influenciando na concentração de constituintes químicos no material vegetal e, conseqüentemente, na segurança e eficácia (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

2.3.4 Estudo farmacológico

Como ilustrado na figura 1, a investigação farmacológica envolve as etapas dos ensaios pré-clínicos (*in vitro*, *in silico* e *in vivo*) e clínicos (fase I, II, III e IV) a serem explorados na perspectiva real de obter novas opções terapêuticas a partir de plantas.

Os extratos, frações, substâncias isoladas e identificadas a partir dos estudos químicos (seção 2.3.3) devem ser submetidos à investigação da atividade biológica envolvendo testes farmacológicos pré-clínicos e clínicos com foco nos parâmetros de eficácia e segurança em organismos vivos (MACIEL et al., 2002; SIMÕES et al., 2016).

As plantas, em função da ação dos seus constituintes químicos, geralmente sintetizados para fisiologia de defesa vegetal, podem desencadear alterações metabólicas prejudiciais aos demais seres vivos com intoxicações agudas ou crônicas, a exemplo de alergias na pele e mucosas, até distúrbios cardiovasculares, respiratórios, metabólicos, gastrintestinais, neurológicos e, em alguns casos, o óbito. Essas intoxicações podem estar relacionadas também a fatores associados ao indivíduo, à planta, ao modo de exposição e a questões ambientais. Desse modo, os ensaios farmacológicos devem contemplar a investigação da segurança no uso; valendo enfatizar os amplos e reconhecidos registros de toxicidade, principalmente hepatotoxicidade, nefrotoxicidade e dérmica, dado uso empírico de plantas sem estudos de validação (MOREIRA et al., 2014; CAMPOS et al., 2016; FERNANDES; FÉLIX; NOBRE, 2016).

O protocolo para investigação de toxicidade *in vitro*, *in silico* e *in vivo* deve atender as determinações normativas e contemplar: toxicidade aguda, toxicidade subcrônica, toxicidade crônica, mutagênese, carcinogênese, cardiotoxicidade, neurotoxicidade, reprodução e teratogênese, toxicocinética, efeitos locais sobre a pele e olhos, sensibilização cutânea e ecotoxicidade (TUROLLA, 2004; COSTA, 2013; FATIMA; NAYEEM,2018).

Os ensaios de avaliação de eficácia terapêutica podem ser direcionados para indicação terapêutica referida no inquérito etnofarmacológico ou ser realizado *screening* biológico segundo modelo clássico da farmacologia dos produtos naturais (SIXEL; PECINALLI, 2005; SIMÕES et al., 2016).

Segundo Foglio et al. (2017): “Do ponto de vista farmacológico é imprescindível a avaliação da atividade em diversos modelos, bem como avaliação toxicológica (citotoxicidade, toxicidade aguda, toxicidade em doses repetidas - toxicidade crônica, irritação dérmica primária e cumulativa, irritação ocular, sensibilidade cutânea e fototoxicidade). O delineamento destes estudos permite o fechamento do ciclo multidisciplinar no estudo com plantas medicinais”.

Na avaliação dos estudos de eficácia e segurança, a revisão de Cruz; Alvim (2017) comprova que predominam os estudos de validação direcionados para investigação da atividade antibacteriana, em modelos *in vitro*.

Apesar do reconhecido valor da representatividade dos diversos modelos *in vitro* e, especialmente, a necessidade desses serem estimulados em busca de metodologias *in vitro* mais precisas, exatas e sensíveis, na perspectiva real do emprego do Programa 3R's (*reduce, refine, replace*), deve ser enfatizado que o desenvolvimento dos ensaios *in vivo*, nas suas fases sucessivas é indispensável (BEDNARCZUK et al., 2010).

A literatura destaca as dificuldades e desafios dos estudos farmacológicos com espécies vegetais, a exemplo: composição química complexa associada aos efeitos sinérgicos dos constituintes químicos; a necessidade de comparação dos efeitos do extrato bruto, frações e substâncias isoladas; a grande variabilidade de composição química intraespécie dada as diversas variáveis aos quais são suscetíveis; composição reduzida de princípios ativos; substâncias com propriedades antagônicas entre si que dificultam a interpretação dos resultados, por mascaramento de efeitos e presença de impurezas nos extratos como íons inorgânicos que podem ter propriedades, ocasionado viés na investigação (MACIEL et al., 2002; SIXEL; PECINALLI, 2005).

2.4 Dor neuropática

A Associação Internacional do Estudo da Dor (IASP) define dor como uma experiência sensorial e emocional desagradável, associada com o atual ou potencial dano em tecidos, acompanhando o ser humano desde o início da civilização, sendo dividida nos tipos “nociceptiva” e “neuropática” (SOUSA, 2012).

Em condições fisiológicas, a dor constitui um mecanismo protetor do organismo que o alerta para lesões, levando à ativação de reflexos para minimizar os danos provocados ao organismo; representando uma das principais condições dolorosas crônicas, onde frequentemente não há nenhum dano tecidual (SOUSA, 2012).

A dor nociceptiva ocorre por ativação fisiológica de receptores ou da via dolorosa e está relacionada à lesão de tecidos ósseos, musculares ou ligamentares (BENNETT et al., 2006). Já a dor neuropática é definida como dor iniciada por lesão ou disfunção do sistema nervoso, sendo mais bem compreendida como resultado da ativação anormal da via nociceptiva (fibras de pequeno calibre e trato espinotalâmico) (MERSKEY et al., 1994).

Dor neuropática (DN) representa um grupo heterogêneo de doenças com etiologias diferentes, que diferem em relação à localização. Os distúrbios podem existir em qualquer lugar entre o receptor periférico e o cérebro. É uma das principais condições dolorosas crônicas; onde frequentemente não há nenhum dano tecidual (POSSO; PALMEIRA; MORAES VIEIRA, 2016).

A prevalência mundial da dor de natureza crônica, especialmente da dor neuropática, é alarmante, com registro de até 30% da população, representando sério problema de saúde pública (POSSO; PALMEIRA; MORAES VIEIRA, 2016). É estimada prevalência de 25 a 30% da população europeia (TORRANCE et al., 2006; BOUHASSIRA et al., 2008). Dados nacionais indicam prevalência de 28 a 41% na população brasileira (POSSO; PALMEIRA; MORAES VIEIRA, 2016). Estudo desenvolvido na cidade de São Luís, Estado do Maranhão, indica prevalência de 10% (VIEIRA et al., 2012).

Estudo de Bouhassira et al. (2008) indica que a prevalência da dor neuropática é maior em mulheres e em pacientes acima de 50 anos de idade.

A injúria ou a disfunção de nervos periféricos incluem uma variedade etiológica que podem originar dor espontânea ou intermitente, alodínia (dor em resposta a estímulos inócuos) e hiperalgia (aumento da sensibilidade dolorosa) (VITOR, 2009).

Exemplos de dor neuropática incluem dor fantasma devido a ruptura de grandes nervos periféricos, a dor com avulsão do plexo por causa de lesões em raízes nervosas e a dor que se sucede a acidente vascular cerebral como consequência do trato spino-trigêmio talâmico ou nas suas projeções corticais (JENSEN, 2002).

2.4.1 Fisiopatologia da dor neuropática

Os mecanismos relacionados à dor neuropática não estão completamente esclarecidos, entretanto, a sensibilização de receptores, redução dos limiares de ação, potenciais de ação ectópicos, liberação de neurotransmissores excitatórios, redução de neurotransmissores inibitórios e produção de mediadores químicos são fatores observados nesta condição dolorosa (figura 02) (HORST, 2011).

A dor neuropática é referida como uma dor não adaptativa provavelmente decorrente de estimulação inadequada dos nociceptores (ROWLAND; PEDLEY, 2011); representando dor que incapacita e influencia diretamente na qualidade de vida do paciente, constituindo grande desafio para saúde pública (GILRON; BARON; JENSEN, 2015). É uma síndrome complexa, com mecanismos biológicos pouco esclarecidos, envolvendo teorias inflamatórias e imunes.

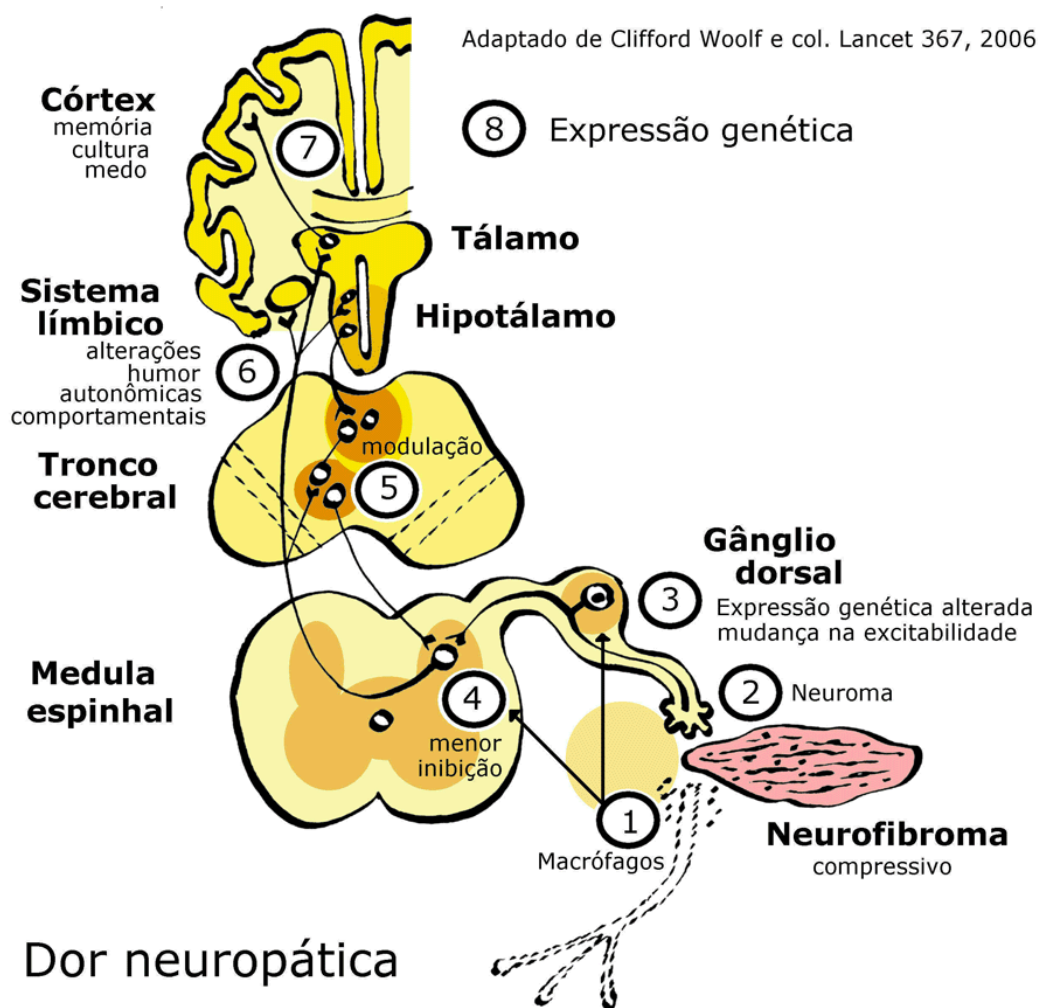


Figura 02. Mecanismo de ação dor neuropática

Fonte: Clifford Wood et al. (2006)

A lesão inicial do nervo obedece à cascata inflamatória que resulta no aumento da perfusão local, aumento da permeabilidade capilar, com concentração e ativação das células imunológicas inatas. Entretanto, substâncias imunoativas no local da lesão podem desencadear uma reação imunológica sistêmica, ativando células da micróglia e astrócitos, células gliais, localizadas na medula espinhal e no cérebro (VALLEJO, 2010).

A definição mais aceita sobre dor neuropática é aquela que define dor cuja origem se encontra no sistema nervoso somatossensorial; com lesões podendo levar a transmissões desordenadas e alteradas dos sinais sensoriais até a medula espinhal e cérebro (TREEDE et al., 2008).

2.4.2 Mecanismos oxidativos na dor neuropática

Substâncias antioxidantes são compostos capazes de retardar ou inibir oxidações celulares ou mesmo bloquear sua propagação. Estudo sugere que alterações nos níveis oxidativos, causam um estresse oxidativo, acarretando na quebra da homeostasia e tendo envolvimento no mecanismo de ação da dor neuropática (SALVEMINI et al., 2011).

Evidências sugerem que as espécies reativas de oxigênio (ERO's) participam na sensibilização de nociceptores periféricos, sendo capazes de modular os canais de sódio, aumentando frequência, desencadeando a dor neuropática (KRISHNAN et al., 2005).

A dor neuropática originada da lesão nervosa periférica resulta no aumento da excitabilidade dos neurônios como consequência da sensibilização. Estudos apoiam a hipótese de que o microambiente inflamatório e a liberação de mediadores são fundamentais para o desenvolvimento da dor neuropática. Tais mediadores incluem os eicosanóides, serotonina, neurotrofinas, citocinas, quimiocinas e ERO's. Dentre estes, destaca-se as ERO's, que são originadas pelo metabolismo celular ou lesão local e em situações que escapem ao sistema antioxidativo-catalase (CAT) e superóxidodismutase. (LEUNG, CAHILL, 2010).

a) Superóxido dismutase (SOD)

A atividade das SOD's nas células está diretamente envolvida na resposta a fatores estressores, sendo evidenciado que cada uma das SOD's atua independentemente e são reguladas de acordo com o grau de estresse oxidativo ao qual o organismo está exposto (BOWLER et al., 1992). SOD's também podem estar envolvidas na adesão celular e sinalização molecular em plantas (PRICE et al., 1994).

a) Catalase (CAT)

A catalase foi uma das primeiras enzimas estudadas, em 1923, quando Warburg sugeriu que a catalase continha ferro, através de um estudo de observação de um complexo enzima – substrato. Posteriormente descobriu-se que a catalase decompõe o peróxido de hidrogênio, um produto tóxico ao organismo, em água e oxigênio molecular (BOVERIS; CHANCE, 1973), além de evitar o acúmulo de metahemoglobina (GAETANI et al., 1989). Essa enzima também pode auxiliar os organismos a lidar com mudanças metabólicas, como a falta de nutrientes, hipótese proposta em estudo feito com catalase citosólica de larvas de *Caenorhabditis elegans* (TAUB et al., 1999).

b) Ciclooxigenases (COX)

Por volta da década de 1980 foram descobertos dois tipos de COX, denominados de ciclooxigenase-1(COX-1) e ciclooxigenase-2(COX-2). Assim, os mediadores originários da lise do ácido araquidônico pela COX-1 (enzima constitutiva), expressa em muitos tecidos, estão representados principalmente pelas prostaglandinas envolvidas na fisiologia renal, gastrointestinal, cardiovascular e do trato reprodutor. Por outro lado, a atividade da COX-2 (enzima induzida), presente em células inflamatórias, leva à síntese de prostaglandinas relacionadas ao processo inflamatório (GRISWOLD; ADAMS, 1996; CRAWFORD, 1997).

As isoformas da ciclooxigenase (COX-1 e COX-2) dita inicialmente constitutiva ou fisiológica estão presentes no sistema cardiovascular, onde desempenha a função de produzir TX, o qual é fundamental para uma correta agregação plaquetária. No sistema gastrointestinal a COX-1 sintetiza PGE₂ que está envolvida na formação de muco para a proteção gástrica. Por sua vez, a COX-2, dita inicialmente induzida ou patológica, é expressa na presença de um dano tecidual, formando PGE₂ relacionadas com o desenvolvimento de uma resposta inflamatória (celular e vascular) e dor. A COX-2 é expressa constitutivamente no corno dorsal do cordão espinhal e torna-se levemente aumentada após um trauma. Evidências sugerem que a expressão da COX-2 neste local pode facilitar a transmissão de impulsos nociceptivos (KUMMER; COELHO, 2002; CARVALHO et al., 2004).

2.4.3 Tratamento farmacológico

O tratamento farmacológico associado a dor neuropática necessita de abordagem multidisciplinar e consiste no tratamento dos sintomas, uma vez que raramente, o foco da dor pode ser tratado. Deve-se levar em consideração, aspectos emocionais e psicológicos relacionados a cronicidade da dor (COLLOCA et al., 2017). Tradicionalmente, o tratamento é iniciado com terapias conservadoras e complementar antes da utilização de intervenções como bloqueios nervosos (OLIVEIRA JÚNIOR; CORRÊA; FERREIRA, 2016).

Neuropathic Pain Special Interest Group (NeuPSIG), International Association for the Study of Pain (IASP) e European Federation of Neurological Societies (EFNS), propõem a divisão do tratamento da dor neuropática em fármacos de primeira, segunda e terceira linha (COLLOCA, 2017) (figura 03).

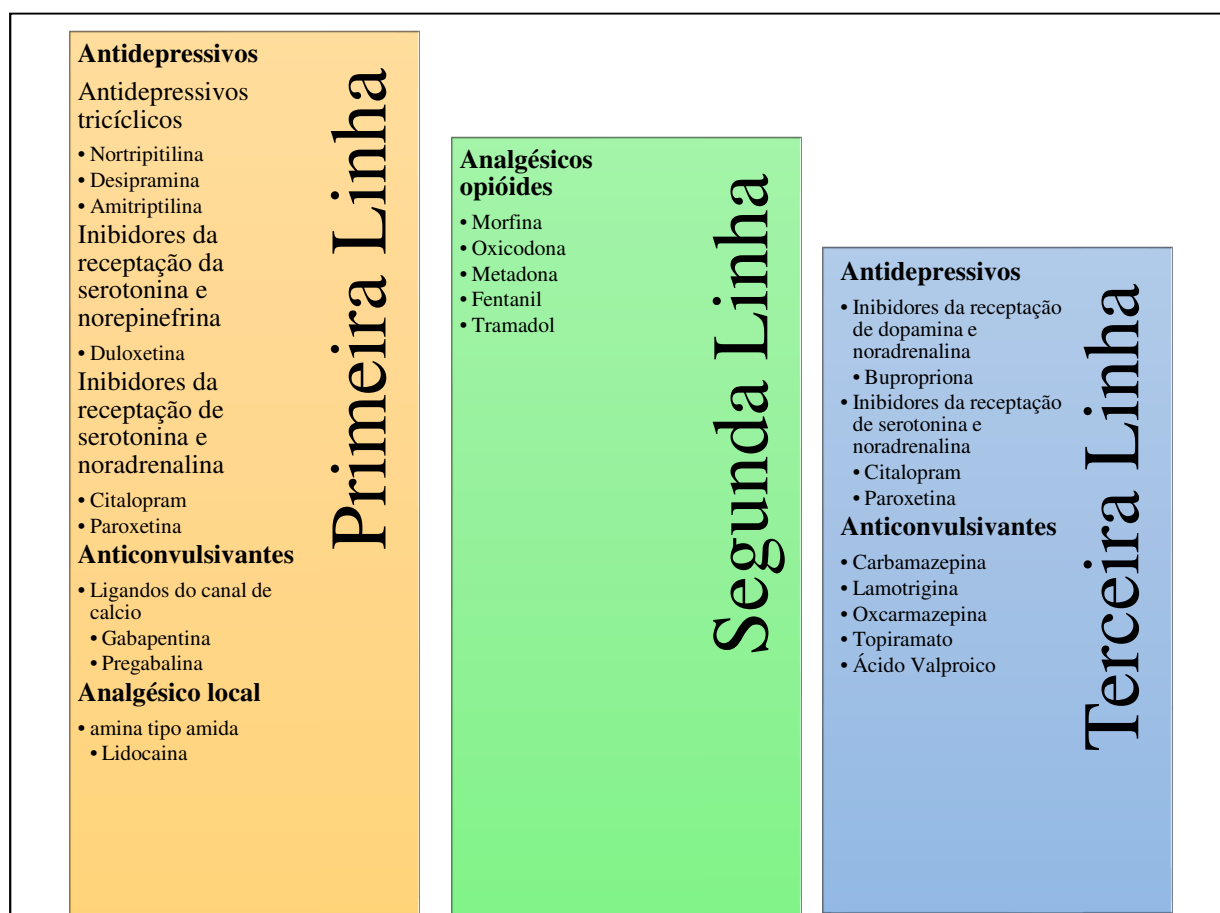


Figura 03. Fármacos utilizados no tratamento farmacológico da dor neuropática

Fonte: Colloca (2017)

O arsenal terapêutico disponibilizado para o tratamento da dor neuropática engloba fármacos específicos que vão desde a administração sistêmica até mesmo procedimentos anestésicos locais ou de administração intratectal; com restrições no uso ao longo prazo dado os efeitos colaterais e reações adversas, incluindo tolerância ou mesmo dependência (OLIVEIRA et al., 2006; OLIVEIRA JÚNIOR; CORRÊA; FERREIRA, 2016). É válido ressaltar, que o fármaco gabapentina (ácido 1-aminometilciclohexanoacético), fármaco de primeira linha é um aminoácido com a estrutura do neurotransmissor GABA (ácido gama-aminobutírico), que age modulando as transmissões das mensagens entre as células do sistema nervoso, reduzindo a atividade excitatória responsável pela dor neuropática e pelas crises convulsivas (CLIVATTI; SAKATA; ISSY, 2009). Utilizada como droga padrão para o tratamento de dor neuropática, apesar de amplamente utilizada, trata-se de um fármaco sujeito a controle especial pela Portaria nº 344/98 de medicamentos controlados, devido a numerosas reações adversas e efeitos colaterais, além de causar dependência (SOUZA; COMARELLA, 2014; GABAPENTINA..., 2019).

2.4.4 Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) de fármacos para o tratamento de dor neuropática

Estudo de revisão de Colloca et al. (2017) refere que o tratamento farmacológico da dor neuropática representa desafio, pois é direcionado para o tratamento dos sintomas, já que a origem da dor raramente é tratada.

Assim, é necessário a Pesquisa e Desenvolvimento (P&D) de novos fármacos como alternativa e/ou complemento terapêutico na dor neuropática.

2.4.4.1 Modelos de avaliação pré-clínica de dor neuropática

A busca de novos fármacos para inclusão no arsenal terapêutico da dor neuropática não tem sido tarefa fácil já que há uma diversidade de estado de dor crônica em humanos, sendo propostos numerosos modelos experimentais de dor animal que tentam simular as muitas condições de dor humana, a exemplo dos modelos cirúrgicos em ratos e camundongos, dadas as semelhanças genéticas e bioquímicas, como a lesão por constricção crônica ao nervo ciático, ligadura parcial do nervo isquiático, ligadura do nervo espinhal, lesão nervosa poupada, avulsão do plexo braquial, nervo ciático, transcrição e trisseção do nervo ciático (CHALLA 2015). Esses modelos envolvem diversas etapas de investigação, como testes bioquímicos gerais e diagnósticos específicos, testes comportamentais e neurológicos (motores, cognitivos, sensitivos ou combinando uma ou mais classes) (PINTO; KO, 2012).

Como clinicamente a dor neuropática está relacionada, na maioria das vezes a compressão dos nervos periféricos, os modelos animais de lesão nervosa periférica, a exemplo do modelo de compressão do nervo ciático, tem sido amplamente utilizado. A medula representa o centro de processamento primário da informação nociceptiva, envolvendo mecanismo de sensibilização central; o que é caracterizado pelo aumento da resposta das células do corno dorsal espinal aos estímulos aferentes, envolvendo diversas moléculas desse mecanismo, com destaque às espécies reativas do oxigênio (ERO's), sendo sugeridas como mediadores da dor neuropática. Assim, como um quadro de estresse oxidativos é estabelecido no local da lesão, pode ser usada a técnica de determinação de enzimas antioxidantes, como a CAT e SOD, consideradas como marcadores da defesa antioxidativas enzimáticas (GUEDES, 2007).

Como mediadores químicos inflamatórios são substâncias liberadas em uma área tecidual lesada ou por células adequadamente ativadas que coordenam o processo da resposta inflamatória, esses podem ser investigados nos modelos animais de avaliação de dor neuropática, atuando como determinantes do seguimento da neuroinflamação no sistema nervoso lesionado ou doente, mostrando uma contribuição importante para investigação da dor neuropática. Assim, nos modelos empregados podem ser determinados: bradicininas, trifosfato de adenosina, eicosanóides, produtos da lipoxigenases, histamina, citocinas e quimiocinas e produtos das enzimas endoperóxido sintases (ciclooxigenases ou COX). A ciclooxigenase-1 (COX-1) é a forma constitutivamente encontrada na maioria dos tecidos, promovendo a homeostase (embora sua expressão possa ser elevada após um traumatismo celular); enquanto a forma ciclooxigenase-2 (COX-2), cuja expressão em repouso é baixa, é rapidamente incrementada pela ação de mediadores inflamatórios (citocinas) após lesão (OLIVEIRA JÚNIOR; PORTELLA JUNIOR; COHEN, 2016).

Moreira Lima (2017) apresenta estudo em modelo de dor neuropática pós-traumática enfatizando os fundamentos de testes de análise comportamental como parâmetro do sucesso do tratamento; destacando os testes da placa quente (*hot plate*), *Rotarod* e *Von Frey*; enfatizando, ainda, a importância de quantificar proteínas como SOD e CAT; bem como a influência das citocinas para o sucesso do tratamento de dor e inflamação.



Figura 04. Aparelho placa quente (*hot plate*) utilizado no Laboratório de Estudo Experimental da Dor/Universidade Federal do Maranhão
Fonte: autor

Para avaliação da atividade analgésica central, muitos estudos empregam o teste da placa quente (*hot plate*) (figura 04), caracterizado como teste de nocicepção térmica que avalia o tempo em que os animais permanecem sobre uma chapa metálica aquecida ($55 \pm 0,5^\circ\text{C}$) até reagirem ao estímulo térmico como comportamento de levantar ou lambe as patas; com aferições realizadas em intervalos de tempo (30, 60, 90 e 120) minutos após a administração do material em análise (SILVA et al., 2013).



Figura 05. Aparelho *Rotarod* utilizado no Laboratório de Estudo Experimental da Dor/Universidade Federal do Maranhão
Fonte: autor

Dentre os testes neurológicos motores para avaliação neurológica, diversos estudos têm empregado o teste de *Rotarod* ou de barra rotatória, com ou sem aceleração, fundamentado no uso de barra ou cilindro rotatório, sendo um dos mais antigos empregados na área de estudo dos efeitos motores induzidos por uso de drogas em estudos pré-clínicos e na descrição do fenótipo de mutantes induzidos geneticamente para doenças cerebelares, extrapiramidais e neuromusculares. Os parâmetros avaliados no teste de *Rotarod* incluem: tempo de latência (ou de resistência para queda), distância total percorrida (dependente da frequência de rotação, da existência ou não da rotação e do tempo da latência). Assim, o teste de *Rotarod*, representa um teste de desempenho do animal baseado na atividade motora forçada na barra rotatória, com velocidade regulável em rotações por minutos, incluindo a avaliação do tempo da marcha (segundos) ou a resistência (PINTO; KO, 2012).



Figura 06. Aparelho *Von Frey* utilizado no Laboratório de Estudo Experimental da Dor/Universidade Federal do Maranhão

Fonte: autor

O teste de *Von Frey* ou de avaliação de alodínia mecânica é fundamentado no uso de filamentos de *Von Frey* para avaliar a sensibilidade tecidual nociceptiva a um estímulo mecânico. Os experimentos são realizados com um anestesiómetro eletrônico (figura 06), que consiste em um transdutor de pressão adaptado a um contador digital de força expressa em gramas (g). O contato do transdutor da pressão com a pata é realizado através de uma ponta descartável de polipropileno. Na fase de adaptação ao teste, os animais são colocados em caixas de acrílico durante 15-30 minutos. O assoalho da caixa é feito de arame não maleável na forma de rede. As alterações nos limiares nociceptivos são avaliados exercendo uma pressão, por entre malhas da rede, linearmente crescente no centro da planta da pata do animal até a produção de uma resposta caracterizada como sacudida (*flinches*) da pata estimulada. Os estímulos são repetidos por até seis vezes após a retirada da pata. A intensidade de hipernocicepção é quantificada como a variação na pressão obtida subtraindo-se a média dos três valores expressos em gramas (força) observada antes do procedimento experimental (0 hora) da média de três valores em gramas (força) após a administração dos estímulos, que variam de acordo com o experimento (SILVA et al., 2013).

Silva et al. (2013) apresentam estudo de revisão de diversos modelos de avaliação pré-clínica da atividade antinociceptiva de extrato vegetal, fração ou substância isolada: enfatizando fundamentos, vantagens e desvantagens desses modelos, destacando:

contorções abdominais induzidas por ácido acético, teste da formalina, teste de *Randall-Selitto*, teste de *Von Frey*, dor orofacial induzida pela formalina, teste da placa quente e teste da retirada da cauda (*tail-flick*), entre outros.

Para o desenvolvimento dos ensaios experimentais do nosso estudo foram empregados: análises comportamentais (avaliação da deambulação forçada - teste de *Rotarod*, avaliação da alodínia mecânica - teste de *Von Frey* e hiperalgesia térmica - teste da placa quente), bioquímicas (determinação da atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase) e ensaio *in vitro* (determinação da ciclooxigenase 1 e ciclooxigenase 2).

2.5 *Eleutherine bulbosa* Mill. Urb.

A espécie *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb, pertence à família Iridaceae, e compreende uma erva de pequeno porte que apresenta diversas sinonímias botânicas, *Bermudiana bulbosa* (Mill. Molina; *Bermudiana congesta* (Klatt) Kuntze; *Cipuraplicata*(Sw.) Griseb.; *Eleutherine americana* (Aubl.) Merr. ex K.Heyne; *Eleutherine anomala* Herb.; *Eleutherine longifolia* Gagnep.; *Eleutherine plicata* (Sw.) Herb.; *Eleutherine plicata* Herb. ex Klatt; *Eleutherine subaphylla* Gagnep.; *Ferrariaparvi flora* Salisb.; *Galatea Americana* (Aubl.) Kuntze; *Galatea bulbosa*(Mill.) Britton, *Galateaplicata* (Sw.) Baker; *Ixia americana* Aubl.; *Sisyrinchium altissimum* Ten.; *Sisyrinchium americanum* (Aubl.) Lemée; *Sisyrinchium bulbosum* Mill.; *Sisyrinchium capitatum* Pers.; *Sisyrinchium congestum* Klatt; *Sisyrinchium elatum* Seub. ex Klatt; *Sisyrinchium intihuatanense* (Vargas) Ravenna; *Sisyrinchium latifolium* Sw.; *Sisyrinchium palmifolium* var. *Intihuatanense* Vargas; *Sisyrinchium plicatum* (Sw.) Spreng.; *Sisyrinchium racemosum* Pers. (KEW, 2012).

Apesar da diversidade de sinonímias científicas, é constatado que predomina o uso de *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb., *Eleutherine americana* (Aubl.) Merr. ex K. Heyne e *Eleutherine plicata* Herb. Ex Klatt. Nesse estudo optou-se pelo uso da sinonímia *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. dada à predominância dos estudos inventariados com uso dessa nomenclatura.

Diversos nomes vernaculares são referidos, tais como: marupari, marupazinho (SCHULTES; RAFFAULF, 1990; PROJETO..., 2019), marupapiranga (SCHULTES; RAFFAULF, 1990), coquinho, lírio-folha-de-palmeira, marupá, marupaí, marupá-piranga, palmeirinha (PROJETO...,2019) e ruibarbo-do-campo (BRASILEIRO et al;

2006). Em outros países é conhecida como jasinhuaste, pacahuasten, pachahuaste, pachahuasten, piri-piri, yagua Piripiri, yahuarpiripiri e wá-ro (PROJETO..., 2019).

A espécie *Eleutherine bulbosa* é nativa e de larga ocorrência no continente americano (ZHENGXIONG et al., 1984; ANWAR-BRUNI et al., 1996; AFANAS'EV et al., 1999; JOHNSON, 1999; LORENZI; MATOS, 2002; PARAMAPOJN et al., 2008; SARALAMP et al., 2009; NASCIMENTO et al., 2012). No Brasil, é de grande ocorrência na região amazônica, principalmente no Estado de Roraima (REVILLA, 2001; REVILLA, 2002).

Eleutherine bulbosa é uma planta herbácea bulbosa e rizomatosa, com caule, em formato de uma touceira, de 20 a 30 cm de altura aproximadamente (SCHULTES; RAFFAULF, 1990). Apresenta bulbos vermelhos ou vinho com escamas semelhantes a uma cebola. De composição completa, suas folhas são simples, simétricas, inteiras, verticiladas e plissadas longitudinalmente, com inflorescência em panículas de flores rosas, no ápice de um escapo (LORENZI; MATOS, 2002; REVILLA, 2002; ROCHA, 2006) (figura 07).



Figura 07. Aspecto geral da espécie vegetal *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. (Iridaceae)

Fonte. Autor

Diversos estudos etnofarmacológicos referem o amplo emprego terapêutico popular do bulbo da planta, predominando o uso em desordens gastrointestinais (gastralgia, histeria, diarreia, vermes intestinais, anti-diarrêica, cólica, desintéria, úlceras

gástricas), sendo ainda referido uso em cicatrização de ferimentos superficiais como abortivo (WENINGER et al., 1982; SCHULTES, 1990; DUKE; VASQUEZ, 1994; VILLEGAS et al., 1997; LIN et al., 2002; LORENZI; MATOS, 2002; REVILLA, 2002a).

A investigação química da espécie evidenciou a presença de derivados quinônicos, saponinas, alcaloides, flavonoides, taninos, triterpenos, fenóis simples, derivados cumarínicos, ácidos orgânicos e esteroides (KING, ALTMAN, 1956; SOUSA, 2006; BARAÚNA; ROCHA, 2007; COUTO et al., 2016).

Estudos indicam a presença de antraquinonas (KOMURA et al., 1983) e seus glicosídeos (SHIBUYA et al., 1997). *Screening* fitoquímico, realizado em extrato das folhas, revelou a presença de alcaloides, esteroides quinonas, antraquinonas, cumarinas e flavonoides (DELGADO et al., 1997).

Outro estudo de prospecção fitoquímica com extratos hidroalcoólicos indicou a presença de alcaloides, catequinas, flavanonas e cumarinas nas folhas e caule (SOUSA et al., 2005). A presença de alcaloides foi confirmada em estudo de Rocha (2006) e Baraúna; Rocha (2008). Compostos fenólicos, derivados cumarínicos, depsídeos e depsidonas, açúcares redutores e ácidos orgânicos também foram evidenciados na espécie (BARAÚNA; ROCHA, 2008).

Estudo de Paramapojn et al. (2008) identificou, pela primeira vez, naftopirona e eleuterinosa A, juntamente com eleuterinosa B, isoeleuterina, eleuterina e eleuterol. Baseado nos resultados de análises químicas de exemplares da espécie oriundos de localidades diferentes, nesse estudo os autores sugerem eleuterol, isoeleuterina e eleuterina como constituintes predominantes na espécie.

Gallo et al. (2010) identificaram, em extratos de bulbo da espécie, quatro novos policetídeos: (*R*)-4-hydroxyeleutherin, eleuthone, eleuterinol-8-*O*- β -D-glucosídeo e isoeleuthoside C (dihydroisoeleutherin-5-*O*- β -D-gentiobiosídeo); além de eleutherina, isoeleutherina, eleutherinol, eleutherol, eleuthoside B (eleutherol-4-*O*- β -D-gentiobiosídeo), eleuthoside C (dihydroeleutherin-5-*O*- β -D-gentiobiosídeo), hongconina (4-oxodihydroisoeleutherina) e elecanacina.

Oliveira Neto et al. (2007), em estudo biomonitorado, indicam uma sapogenina esteroidal, como princípio ativo para propriedades analgésica periférica e anti-edematogênica.

Estudos de investigação das propriedades farmacológicas foram desenvolvidos com extrato de folhas e/ou bulbos, bem como substâncias isoladas de *Eleutherine bulbosa*, principalmente eleuterol, eleuterina, isoeleuterina, elecanacina e isoeleuterol

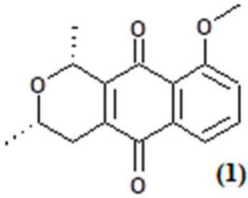
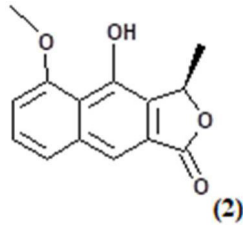
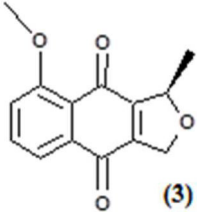
demonstrando atividade antimicrobiana (CHEN et al., 1984; LORENZI; MATOS, 2002), antifúngica (ZHENGXIONG et al., 1984; ALVES et al., 2003; JINZHONG et al., 2006; MENEZES et al., 2009), inibitória da replicação do vírus HIV (HARA et al, 1997), antibacteriana (VORAVUTHIKUNCHAI et al., 2007; MAHABUSARAKAM et al., 2009; PADHI; PANDA, 2015), antioxidante (IFESAN et al., 2009), anti-edematogênica e analgésica periférica, mas não central (BARAÚNA; ROCHA, 2008), giardicida contra *Giardia lamblia* (AMARAL, 2007; NEIVA et al., 2016) e amebicida contra *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* (NASCIMENTO et al., 2012).

Estudo de revisão das propriedades farmacológicas e composição química tem demonstrado potencial da espécie como agente antimicrobiana, antiinflamatórios, inibidor da α -glicosidase, replicação do HIV e topoisomerase II; destacando a presença de naftaleno, naftoquinona e antraquinona (INSANU; KUSMARDIYANIA; HARTATIA, 2014).

Couto et al. (2016), em estudo de revisão, constatam a predominância dos estudos químicos realizados com bulbos de *Eleutherine bulbosa*, destacando a presença de naftoquinonas e antraquinonas (tabela 01).

O potencial terapêutico de *Eleutherine bulbosa* já evidenciado nesses estudos com a inclusão dessa espécie na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde (RENISUS) (BRASIL, 2009) tem estimulado os estudos de validação pelo Grupo de Produtos Naturais da Universidade Federal do Maranhão. Nesse sentido, desde ano de 2007, a espécie integra o elenco alvo de investigação dos nossos estudos, como demonstra a tabela 02.

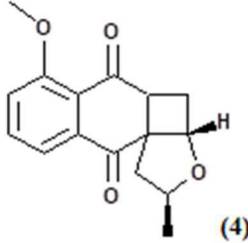
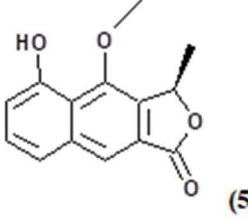
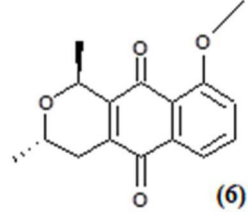
Tabela 01. Constituintes químicos isolados de *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. (Iridaceae) segundo estudo de revisão de Couto et al (2016)

Nomenclatura da espécie vegetal referida nos estudos inventariados *	Composto químico	Nomenclatura química**	Estrutura**	Referência
	eleuterina	1 <i>H</i> -Naphtho[2,3- <i>c</i>]pyran-5,10-dione 3,4-dihydro-9-methoxy-1,3-dimethyl-, (1 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)- 1 <i>H</i> -Naphtho[2,3- <i>c</i>]pyran-5,10-dione, 3,4-dihydro-9-methoxy-1,3-dimethyl-, (1 <i>R</i> - <i>cis</i>)-; 1 <i>H</i> -Naphtho[2,3- <i>c</i>]pyran-5,10-dione, 3,4-dihydro-9-methoxy-1β,3β-dimethyl- (8 <i>CI</i>)		Schmid, et al.,1950; Hara et al., 1997; Alves et al., 2003; Nielsen & Wege, 2006; Han et al., 2008; Paramapojna et al., 2008; Xijing et al., 2009; Kusuma et al., 2010; Phoem & Voravuthikunchai, 2012
<i>Eleutherine americana</i> (Aubl.) Merr. ex K.Heyne*	eleuterol	Naphtho[2,3- <i>c</i>]furan-1(3 <i>H</i>)-one, 4-hydroxy-5-methoxy-3-methyl-, (3 <i>R</i>)- Naphtho[2,3- <i>c</i>]furan-1(3 <i>H</i>)-one, 4-hydroxy-5-methoxy-3-methyl- (8 <i>CI</i>); Naphtho[2,3- <i>c</i>]furan-1(3 <i>H</i>)-one, 4-hydroxy-5-methoxy-3-methyl-, (R)-		Weniger et al., 1982; Hara et al., 1997 ; Alves et al., 2003;Jinzhong et al.,2006 ; Paramapojna et al., 2008 ; Cavalcanti et al., 2009
	eleuterinona	Naphtho[2,3- <i>c</i>]furan-4,9-dione, 1,3-dihydro-8-methoxy-1-methyl-, (1 <i>S</i>)- (+)-		Alves et al., 2003; Xijing et al., 2009

* nomenclatura adota pelos autores representando sinônimas botânicas da espécie *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb., nome oficial definido atualmente nas bases de dados e institutos botânicos ;

** nomenclatura química e estrutura do *Chemical Abstract*; NI: não informado

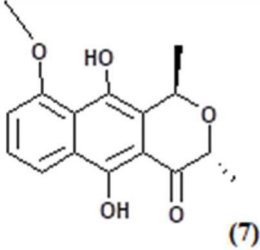
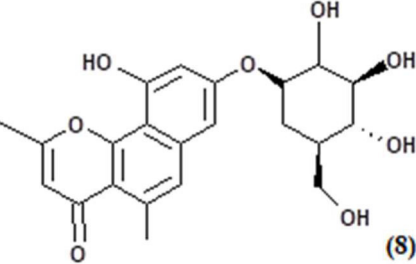
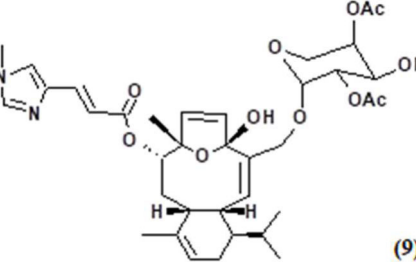
Tabela 01. (Continuação)

Nomenclatura da espécie vegetal referida nos estudos inventariados *	Composto químico	Nomenclatura química**	Estrutura**	Referência
	elecanacina	10 <i>H</i> -Naphtho[2',3':2,3]cyclobuta[1,2- <i>b</i>]furan-5,10(3 <i>aH</i>)-dione, 1,2,4,4 <i>a</i> -tetrahydro-6-methoxy-2-methyl-, (2 <i>S</i> ,3 <i>aS</i> ,4 <i>aS</i> ,10 <i>aS</i>)-(+)	 <p style="text-align: right;">(4)</p>	Hara et al., 1997; Nielsen & Wege 2006
	<i>Eleutherine americana</i> (Aubl.) Merr. ex K.Heyne*	isoeleuterol	Naphtho[2,3- <i>c</i>]furan-1(3 <i>H</i>)-one, 5-hydroxy-4-methoxy-3-methyl-, (3 <i>R</i>)- Naphtho[2,3- <i>c</i>]furan-1(3 <i>H</i>)-one, 5-hydroxy-4-methoxy-3-methyl-, (R)-	 <p style="text-align: right;">(5)</p>
	isoeleuterina	1 <i>H</i> -Naphtho[2,3- <i>c</i>]pyran-5,10-dione, 3,4-dihydro-9-methoxy-1,3-dimethyl-, (1 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-1 <i>H</i> -Naphtho[2,3- <i>c</i>]pyran-5,10-dione, 3,4-dihydro-9-methoxy-1,3-dimethyl-, (1 <i>R</i> -trans)-; 1 <i>H</i> -Naphtho[2,3- <i>c</i>]pyran-5,10-dione, 3,4-dihydro-9-methoxy-1β,3α-dimethyl-(8 <i>Cl</i>)	 <p style="text-align: right;">(6)</p>	Schmid et al., 1951 ; Hara et al., 1997 ; Alves et al., 2003 ; Nielsen & Wege, 2006; Paramapojna et al 2008 ; Song et al., 2009 ; Xijing et al., 2009 ; Nascimento et al., 2012 ; Phoem & Voravuthikunchai, 2012

* nomenclatura adota pelos autores representando sinônimas botânicas da espécie *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb., nome oficial definido atualmente nas bases de dados e institutos botânicos ;

** nomenclatura química e estrutura do *Chemical Abstract*; NI: não informado

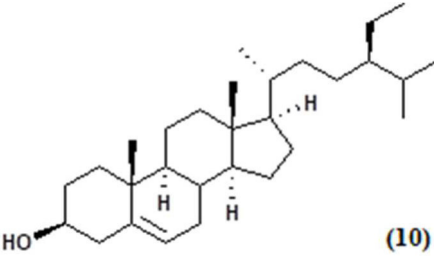
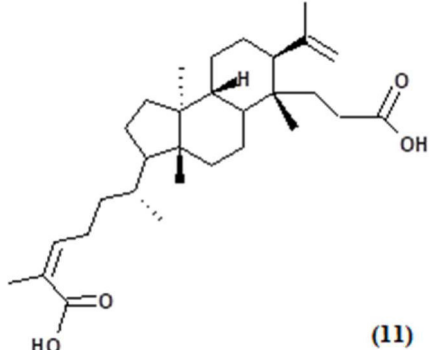
Tabela 01. (Continuação)

Nomenclatura da espécie vegetal referida nos estudos inventariados *	Composto químico	Nomenclatura química**	Estrutura**	Referência
	hongconina	1 <i>H</i> -Naphtho[2,3- <i>c</i>]pyran-4(3 <i>H</i>)-one, 5,10-dihydroxy-9-methoxy-1,3-dimethyl-,(1 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)- 1 <i>H</i> -Naphtho[2,3- <i>c</i>]pyran-4(3 <i>H</i>)-one, 5,10-dihydroxy-9-methoxy-1,3-dimethyl-, (1 <i>R</i> -trans)-	 <p>(7)</p>	Zhengxiong et al., 1981; Chen, et al., 1986;Xijing et al 2009
<i>Eleutherine americana</i> (Aubl.) Merr. ex K.Heyne*	eleutherinoside A	4 <i>H</i> -Naphtho[1,2- <i>b</i>]pyran-4-one, β-D-glucopyranosyloxy)-10-hydroxy-2,5-dimethyl	 <p>(8)</p>	Ganzera et al., 2009
	eleuthoside B	Naphtho[2,3- <i>c</i>]furan-1(3 <i>H</i>)-one, 4-[(6- <i>O</i> -β-D-glucopyranosyl-β-D-glucopyranosyl)oxy]-5-methoxy-3-methyl-, (3 <i>R</i>)-	 <p>(9)</p>	Ganzera et al., 2009

* nomenclatura adota pelos autores representando sinônimas botânicas da espécie *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb., nome oficial definido atualmente nas bases de dados e institutos botânicos ;

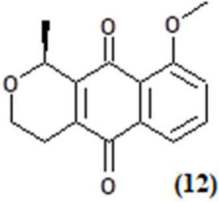
** nomenclatura química e estrutura do *Chemical Abstract*; NI: não informado

Tabela 01. (Continuação)

Nomenclatura da espécie vegetal referida nos estudos inventariados *	Composto químico	Nomenclatura química**	Estrutura**	Referência
beta-sitosterol	Nimboesterol (6CI); Stigmast-5-en-3β-ol (8CI); (-)-β Sitosterol;(24R)-Ethylcholest-5-en-3β-ol; (24R)-Stigmast-5-en-3β-ol; 22,23-Dihydrostigmasterol; 24 Ethylcholestero	 <p style="text-align: right;">(10)</p>	Xijing et al., 2009	
				NI
<i>Eleutherine americana</i> (Aubl.) Merr. ex K.Heyne*	NI	4,8-Dihydroxy-3-Methoxy-1-methyl-anthra-9,10-quinone-2-carboxylic acid methyl ester	NI	Xijing et al., 2009
		kadsuric acid	1H-Benz[e]indene-6-propanoic acid, 3-[(1R,4Z)-5-carboxy-1-methyl-4-hexenyl]-2,3,3a,4,6,7,8,9,9a,9b-decahydro-3a,6,9b-trimethyl-7-(1-methylethenyl)-, (3R,3aR,6S,7S,9aR,9bS)- (9CI);3,4-Secolanosta-4(28),9(11),24-triene-3,26-dioic acid, (24Z)-;1H-Benz[e]indene-6-propanoic acid, 3-(5-carboxy-1-methyl-4-hexenyl)-2,3,3a,4,6,7,8,9,9a,9b-decahydro-3a,6,9b-trimethyl-7-(1-methylethenyl)-, [3R-[3α(1R*,4Z),3αα,6β,7α,9αα,9bβ]]-	 <p style="text-align: right;">(11)</p>

* nomenclatura adota pelos autores representando sinonímias botânicas da espécie *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb., nome oficial definido atualmente nas bases de dados e institutos botânicos ; ** nomenclatura química e estrutura do *Chemical Abstract*; NI: não informado

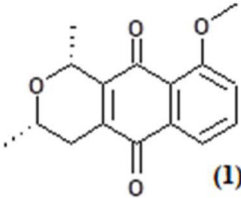
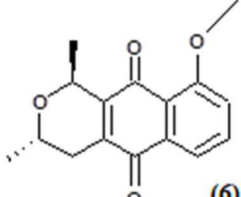
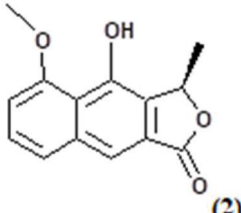
Tabela 01. (Continuação)

Nomenclatura da espécie vegetal referida nos estudos inventariados *	Composto químico	Nomenclatura química**	Estrutura**	Referência
<i>Eleutherine americana</i> (Aubl.) Merr. ex K.Heyne*	NI	(-)-3-[2-(acetyloxy)propyl]-2-hydroxy-8-methoxy-1,4-naphthoquinone	NI	Han et al., 2008; Malheiros, 2008
	NI	2,5-Dimethyl-10-hydroxynaphthopyrone 8-O- β -d-glucopyranoside	NI	Paramapojna et al., 2008
	NI	3-methoxy-1-methylan-thraquinone-2-carboxylic acid methyl ester	NI	Phoem; Voravuthikunchai, 2012
	NI	methyl ethers of 3,4,8-trihydroxy-1-methyl-anthra-9,10-quinone-2-carboxylic acid methyl ester 4-6	NI	Komura et al., 1983
<i>Eleutherine bulbosa</i> (Mill.) Urb.	NI	anthracene-9,10-dione-1,5-diol-4-methoxy-3-methyl-2-carboxylic acid methyl ester	NI	Wenigeret al.,1982
	eleutheriona	Naphtho[2,3-c]furan-4,9-dione, 1,3-dihydro-8-methoxy-1-methyl-, (1S)-(+)	 (12)	Alves et al., 2003 ;Xijing et al., 2009

* nomenclatura adota pelos autores representando sinônimas botânicas da espécie *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb., nome oficial definido atualmente nas bases de dados e institutos botânicos ;

** nomenclatura química e estrutura do *Chemical Abstract*; NI: não informado

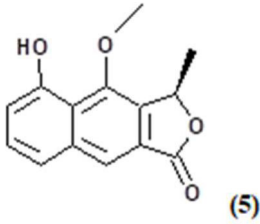
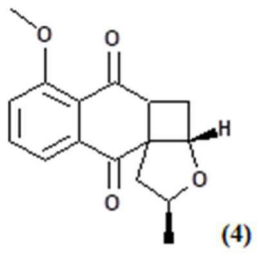
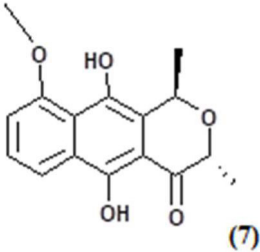
Tabela 01. (Continuação)

Nomenclatura da espécie vegetal referida nos estudos inventariados *	Composto químico	Nomenclatura química**	Estrutura**	Referência
<i>Eleutherine bulbosa</i> (Mill.) Urb.	eleuterina	1 <i>H</i> -Naphtho[2,3- <i>c</i>]pyran-5,10-dione, 3,4-dihydro-9-methoxy-1,3-dimethyl-, (1 <i>R</i> ,3 <i>S</i>)-1 <i>H</i> -Naphtho[2,3- <i>c</i>]pyran-5,10-dione, 3,4-dihydro-9-methoxy-1,3-dimethyl-, (1 <i>R</i> - <i>cis</i>)-; 1 <i>H</i> -Naphtho[2,3- <i>c</i>]pyran-5,10-dione, 3,4-dihydro-9-methoxy-1β,3β-dimethyl- (8CI)		Schmid, et al.,1950; Hara et al., 1997; Alves et al., 2003; Nielsen & Wege, 2006; Han et al., 2008; Paramapojna et al., 2008; Xijing et al., 2009; Kusuma et al., 2010; Phoem; Voravuthikunchai, 2012
	isoeleuterina	1 <i>H</i> -Naphtho[2,3- <i>c</i>]pyran-5,10-dione, 3,4-dihydro-9-methoxy-1,3-dimethyl-, (1 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-1 <i>H</i> -Naphtho[2,3- <i>c</i>]pyran-5,10-dione, 3,4-dihydro-9-methoxy-1,3-dimethyl-, (1 <i>R</i> trans)-; 1 <i>H</i> -Naphtho[2,3- <i>c</i>]pyran-5,10-dione, 3,4-dihydro-9-methoxy-1β,3α-dimethyl- (8CI)		Schmid et al., 1951; Hara et al., 1997; Alves et al., 2003; Nielsen ; Wege, 2006; Paramapojna et al 2008; Song et al., 2009; Xijing et al., 2009; Nascimento et al., 2012; Phoem; Voravuthikunchai, 2012
	eleuterol	Naphtho[2,3- <i>c</i>]furan-1(3 <i>H</i>)-one, 4-hydroxy-5-methoxy-3-methyl-, (3 <i>R</i>)-Naphtho[2,3- <i>c</i>]furan-1(3 <i>H</i>)-one, 4-hydroxy-5-methoxy-3-methyl- (8CI); Naphtho[2,3- <i>c</i>]furan-1(3 <i>H</i>)-one, 4-hydroxy-5-methoxy-3-methyl-, (R)-		Weniger et al., 1982; Hara et al., 1997; Alves et al., 2003; Jinzhong et al.,2006; Paramapojna et al., 2008; Cavalcanti et al., 2009

* nomenclatura adota pelos autores representando sinônimas botânicas da espécie *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb., nome oficial definido atualmente nas bases de dados e institutos botânicos ;

** nomenclatura química e estrutura do *Chemical Abstract*; NI: não informado

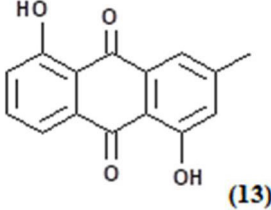
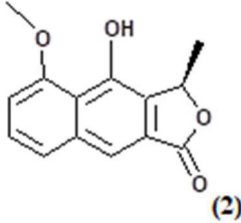
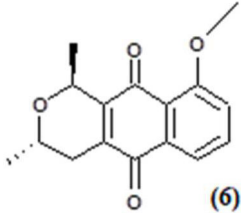
Tabela 01. (Continuação)

Nomenclatura da espécie vegetal referida nos estudos inventariados *	Composto químico	Nomenclatura química**	Estrutura**	Referência
	isoeleuterol	Naphtho[2,3- <i>c</i>]furan-1(3 <i>H</i>)-one, 5-hydroxy-4-methoxy-3-methyl-, (3 <i>R</i>)-Naphtho[2,3- <i>c</i>]furan-1(3 <i>H</i>)-one, 5-hydroxy-4-methoxy-3-methyl-, (R)-	 <p>(5)</p>	Hara et al., 1997 ; Jinzhong et al.,2006; Xijing et al., 2009
<i>Eleutherine bulbosa</i> (Mill.) Urb.	elecanacina	10 <i>H</i> -Naphtho[2',3':2,3]cyclobuta[1,2- <i>b</i>]furan-5,10(3 <i>aH</i>)-dione, 1,2,4,4 <i>a</i> -tetrahydro-6-methoxy-2-methyl-, (2 <i>S</i> ,3 <i>aS</i> ,4 <i>aS</i> ,10 <i>aS</i>)-(+)	 <p>(4)</p>	Hara et al., 1997; Nielsen; Wege, 2006
	hongconina	1 <i>H</i> -Naphtho[2,3- <i>c</i>]pyran-4(3 <i>H</i>)-one, 5,10-dihydroxy-9-methoxy-1,3-dimethyl-, (1 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-1 <i>H</i> -Naphtho[2,3- <i>c</i>]pyran-4(3 <i>H</i>)-one, 5,10-dihydroxy-9-methoxy-1,3-dimethyl- (1 <i>R</i> -trans)-	 <p>(7)</p>	Zhengxiong et al., 1981; Chen, et al., 1986; Xijing et al., 2009

* nomenclatura adota pelos autores representando sinónimas botânicas da espécie *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb., nome oficial definido atualmente nas bases de dados e institutos botânicos ;

** nomenclatura química e estrutura do *Chemical Abstract*; NI: não informado

Tabela 01. (Continuação)

Nomenclatura da espécie vegetal referida nos estudos inventariados *	Composto químico	Nomenclatura química**	Estrutura**	Referência
<i>Eleutherine bulbosa</i> (Mill.) Urb.	crisofanol	9,10-Anthracenedione, 1,8-dihydroxy-3-methyl-Anthraquinone, 1,8-dihydroxy-3-methyl- (8CI); 1,8-Dihydroxy-3-methyl-9,10-anthracenedione; 1,8-Dihydroxy-3-methyl-9,10-anthraquinone; 1,8-Dihydroxy-3 methylanthraquinone; 2-Methyl-4,5-dihydroxyanthraquinone; 3-Methyl-1,8-dihydroxyanthraquinone; 3-Methylchryszazin; 4,5-Dihydroxy-2-methylanthraquinone	 <p>(13)</p>	Weniger et al., 1982; Lorenzi; Matos, 2002
<i>Eleutherine plicata</i> (Sw.) Herb.* ex Klatt *	eleuterol	Naphtho[2,3- <i>c</i>]furan-1(3 <i>H</i>)-one, 4-hydroxy-5-methoxy-3-methyl-, (3 <i>R</i>)-Naphtho[2,3- <i>c</i>]furan-1(3 <i>H</i>)-one, 4-hydroxy-5-methoxy-3-methyl- (8CI); Naphtho[2,3- <i>c</i>]furan-1(3 <i>H</i>)-one, 4-hydroxy-5-methoxy-3-methyl-, (R)-	 <p>(2)</p>	Weniger et al., 1982; Hara et al., 1997 ; Alves et al., 2003; Jinzhong et al., 2006 ; Paramapojna et al., 2008 ; Cavalcanti et al., 2009
	isoeleuterina	1 <i>H</i> -Naphtho[2,3- <i>c</i>]pyran-5,10-dione, 3,4-dihydro-9-methoxy-1,3-dimethyl-, (1 <i>R</i> ,3 <i>R</i>)-1 <i>H</i> -Naphtho[2,3- <i>c</i>]pyran-5,10-dione, 3,4-dihydro-9-methoxy-1,3-dimethyl-, (1 <i>R</i> trans)-; 1 <i>H</i> -Naphtho[2,3- <i>c</i>]pyran-5,10-dione, 3,4-dihydro-9-methoxy-1β,3α-dimethyl- (8CI)	 <p>(6)</p>	Schmid et al., 1951 ; Hara et al., 1997 ; Alves et al., 2003 ; Nielsen & Wege, 2006; Paramapojna et al 2008 ; Song et al., 2009 ; Xijing et al., 2009 ; Nascimento et al., 2012 ; Phoem & Voravuthikunchai, 2012

* nomenclatura adota pelos autores representando sinônimas botânicas da espécie *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb., nome oficial definido atualmente nas bases de dados e institutos botânicos ; ** nomenclatura química e estrutura do *Chemical Abstract*; NI: não informado

Tabela 02. Estudos desenvolvidos com *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. (Iridaceae) pelo Grupo de Produtos Naturais da Universidade Federal do Maranhão

Título	Natureza da publicação	Ano de publicação
Estudo de validação de <i>Eleutherine bulbosa</i> (Mill.) Urb: aspectos da farmacobotânica e química	Monografia de graduação	2017
Controle de qualidade de drogas vegetais: estudo farmacobotânico de <i>Eleutherine bulbosa</i> (Mill.) Urb.	Relatório de Iniciação Científica	2017
<i>Eleutherine bulbosa</i> (Mill.) Urb.: a review study. Journal of Medicinal Plant Research , v. 10, p. 286-297, 2016	Artigo	2016
Extrato hidroalcoólico padronizado de <i>Eleutherine bulbosa</i> (Mill) Urb. e de preparações fitoterápicas para uso terapêutico como giardicida. 2015, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020150161930, título: "Extrato hidroalcoólico padronizado de <i>Eleutherine bulbosa</i> (Mill) Urb. e de preparações fitoterápicas para uso terapêutico como giardicida", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial, Depositante (s): CAROLYNA LOPES LEITÃO COUTO; Universidade Federal do Maranhão, Depósito: 06/07/2015	Patente	2015
Padronização de extratos de <i>Eleutherine bulbosa</i> (Mill.) Urb. no desenvolvimento de fitoterápicos	Monografia de graduação	2014
Plant species used in giardiasis treatment: Ethnopharmacology and in vitro evaluation of anti-Giardia activity. Revista Brasileira de Farmacognosia , v. 24, p. 215-224, 2014	Artigo	2014
<i>Eleutherine bulbosa</i> (Mill.) Urb. (Iridaceae): estudo de revisão e padronização dos extratos no desenvolvimento de fitoterápico giardicida	Dissertação	2013
<i>Eleutherine bulbosa</i> (Mill.) Urb.: estudo farmacobotânico e padronização dos extratos na pesquisa e desenvolvimento de fitoterápicos	Monografia de graduação	2013
Bioprospecção de espécies vegetais empregadas em giardíase em São Luis, Maranhão	Relatório de Iniciação Científica	2013
Potencial giardicida de espécies vegetais: aspectos da etnofarmacologia e bioprospecção	Tese	2007

Diante do exposto, evidenciando-se o potencial da espécie, bem como a recomendação ao estímulo dos seus estudos dada à inclusão na RENISUS (2009), esse trabalho visa a continuidade dos estudos de validação com *Eleutherine bulbosa*, apresentando parâmetros farmacobotânicos para os estudos de autenticidade da espécie, aspectos químicos e biológicos, com ênfase na investigação do potencial em modelo de dor neuropática.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Desenvolver estudo de validação de extrato das folhas da espécie *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb., com ênfase aos parâmetros farmacobotânicos, químicos e biológicos em modelo de dor neuropática, visando contribuição efetiva no desenvolvimento de novas opções terapêuticas a partir de insumo de origem vegetal de grande representatividade no Estado do Maranhão.

3.2 Objetivos específicos

- ✓ Realizar caracterização farmacobotânica da espécie, fornecendo parâmetros de autenticidade dessa droga vegetal;
- ✓ Aplicar ensaios qualitativos e quantitativos de caracterização e doseamento dos constituintes químicos de extratos das folhas de *Eleutherine bulbosa* obtidos por diferentes procedimentos extrativos;
- ✓ Analisar o potencial dos extratos das folhas de *Eleutherine bulbosa* obtidos por diferentes procedimentos extrativos na modulação da dor neuropática;
- ✓ Padronizar a obtenção de extrato das folhas de *Eleutherine bulbosa*, visando maior potencial farmacológico na dor neuropática.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Coleta da espécie vegetal e identificação botânica

Amostras das folhas de *Eleutherine bulbosa* foram coletadas manualmente, em área de cultivo natural, no município de Paço do Lumiar, bairro Maioba (2°30'30.64''S/44°09'16.68''O), Estado do Maranhão, Brasil, no mês de maio de 2016. Com o material coletado foram preparadas exsiccatas e enviadas ao Herbário do Maranhão do Departamento de Biologia/UFMA para identificação botânica. O material foi catalogado no acervo do Herbário do Maranhão sob número 9.348.

4.2 Descrição morfo-anatômica

4.2.1 Análise morfológica

As folhas foram analisadas *in natura*, à vista desarmada e com auxílio de estereomicroscópio; com registro da filotaxia, composição, cor, consistência, superfície da lâmina foliar, tamanho, contorno, ápice, base, margem e sistema de nervação (VIDAL, 2007; OLIVEIRA, 2009).

4.2.2 Análise anatômica

Para a análise da organização interna das folhas de *Eleutherine bulbosa* foram realizadas secções transversais, obtidas à mão livre. As secções foram clarificadas com hipoclorito de sódio 50%, lavadas com água destilada e coradas com soluções de azul de Astra e fucsina básica, ambos a 0,5%. Depois foram montadas entre lâmina e lamínula, usando glicerina 50% (KRAUS; ARDUIN, 1997).

Para a análise frontal das epidermes foram realizadas secções paradérmicas, usando lâmina de aço. Em seguida, as preparações foram coradas com azul de Astra e/ou fucsina básica e montadas com glicerina 50%.

As descrições, ilustrações e fotomicrografias foram realizadas com auxílio de microscópio óptico, acoplado com câmera fotográfica digital.

4.3 Obtenção dos extratos

As folhas coletadas (item 4.1) foram submetidas à secagem em estufa com circulação de ar, em temperatura de 38°C; seguida de trituração em moinho de facas, para obtenção de pó moderadamente grosso (250 - 710 µm) (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

O material seco e moído foi submetido a dois procedimentos extrativos: a quente com uso de aparelho de Soxhlet e a frio por maceração, para comparativo da eficácia entre os mesmos, visando contribuição na padronização dos extratos da espécie em estudo. Desta forma, amostra de 500 g do material seco foi submetida à extração em aparelho de Soxhlet, utilizando etanol a 70% como solvente; na relação de hidromódulo de 1:14 (EbSox) (COUTO; 2012). Foi, também, realizada extração por maceração, empregando 500 g do material seco e etanol a 70%, na relação de hidromódulo 1:18 (EbMac). Essas variáveis (hidromódulo e procedimento extrativo a frio/a quente) empregadas para obtenção dos extratos foram definidas como as que mais influenciaram na otimização dos extrativos segundo Couto (2012), para padronização de extrato com atividade giardicida desta mesma espécie vegetal.

Parte das soluções extrativas foi reservada para análises químicas e o restante submetido à concentração sob pressão reduzida em rotaevaporador. Para os ensaios biológicos os resíduos secos foram solubilizados em salina, para concentração final de 5 mg/mL. Todas as soluções foram esterilizadas em membrana filtrante de 0,22 µm, mantidas em frascos estéreis, a 4 °C..

4.4 Análise de caracterização química

4.4.1 *Screening* químico

Os extratos hidroalcoólicos das folhas de *Eleutherine bulbosa* foram submetidos a métodos de avaliação qualitativos e semi quantitativos dos constituintes químicos (COSTA, 1998; FALKENBERG et al., 2004; MATOS, 2009).

Os critérios adotados quanto ao grau de intensidade dos constituintes analisados foram representados pelos símbolos: +++ reação fortemente positiva; ++ reação moderadamente positiva; + reação fraca e - negativo.

4.4.2 Determinação do teor de polifenóis totais

A quantificação de polifenóis totais foi realizada utilizando 100 µL da solução do extrato hidroalcoólico das folhas de *Eleutherine bulbosa* (2 mg/mL), 100 µL do reagente Folin-

Ciocalteau (Merck) e 1,0 mL da solução de carbonato de sódio a 20%, por duas horas em temperatura ambiente, ao abrigo da luz. Concentrações de ácido gálico (Merck) foram utilizadas como padrão. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro UV-VIS (Lambda 35, Perkin Elmer) a 760 nm e os resultados expressos em miligramas de equivalência a ácido gálico (GA) por grama de extrato seco (WOISKY; SALATINO, 1998; CHAILLOU et al., 2004; ABREU et al., 2006; CUNHA et al., 2009).

4.4.3 Determinação do teor de flavonoides

As concentrações de flavonoides totais foram obtidas com 500 µL da solução do extrato (2 mg/mL) e 500 µL de solução metanólica de cloreto de alumínio a 5%, por 30 minutos, em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Concentrações conhecidas de quercetina (Merck) foram utilizadas como padrão. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro UV-VIS (Lambda 35, Perkin Elmer) a 425 nm e os resultados expressos em miligrama de equivalência a quercetina (QE) por grama de extrato seco (WOISKY; SALATINO, 1998; CHAILLOU et al., 2004; ABREU et al., 2006; DUTRA et al., 2008).

4.5 Investigação química

A identificação dos compostos dos extratos hidroalcoólicos das folhas de *Eleutherine bulbosa* foi realizada por cromatografia de alta eficiência (CLAE) acoplado a espectrômetro de massa. CLAE-LC-20AD (Shimadzu) equipado com mecanismo de duplo pistão serial (TANDEM) de micro volume e detector de arranjo de fotodiodo acoplado com espectrômetro de massas Amazon Speed ETD Bruker acoplado a um sistema HPLC modelo CBM-20A- Shimadzu. A fase móvel utilizada foi água Mili-Q com 0,1% de ácido fórmico (eluente A) e metanol (eluente B). A eluição foi utilizada em gradiente linear de 0,1 min 25%B 2 min – 25% B 10 min 40% B 20min 50%B 40 min 60%B 50 min 70%B 60 min 100%B para os extratos obtidos nas duas metodologias, utilizando coluna analítica Phenomenex Luna C18 (250 x 4,6 mm - 5µm). O volume da amostra injetado no sistema foi de 25 µL com fluxo de 12 L/min, pressão de 27 psi, temperatura de 300°C e fluxo para massas de 0,6 mL/min, A identificação foi obtida com base na massa do íon molecular na fragmentação do íon molecular e fragmentação de íons (m/z) comparados com os descritos na literatura.

A porcentagem de cada substância foi calculada pela área do pico no cromatograma em comparação com o padrão de fragmentação. Os resultados foram confirmados através da análise visual dos espectros de massa e por comparação dos dados com a literatura sobre extratos de *Eleutherine bulbosa* (COLLINS, 2006).

4.6 Testes de atividade farmacológica

4.6.1 Caracterização do estudo

Este estudo foi caracterizado como ensaio pré-clínico experimental, com distribuição aleatória dos grupos de animais. Para realização dos procedimentos experimentais foram obedecidas as normas éticas da *International Association for Study of Pain* (IASP), que regulam experimentos realizados em animais (COMMITTEE FOR RESEARCH AND ETHICAL ISSUES OF THE IASP, 1983).

4.6.2 Animais

Foram utilizados 30 ratos da linhagem Wistar, espécie *Rattus norvegicus*, adultos, machos, com peso 200 – 300g, obtidos do Biotério Central da UFMA. Os animais foram mantidos no Biotério Setorial do Prédio de Pesquisa e Pós-Graduação do Centro de Ciências Biológicas e Saúde (CCBS/UFMA), sob condições controladas de luz (ciclo claro-escuro por 12 horas), temperatura de 22 +/- 2°C e umidade do ar 40 a 60%, com ração comercial da marca Labima® e água *ad libitum*. Os protocolos experimentais utilizados neste projeto foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFMA sob número 23115.004175/2017-51 (Anexo01).

4.6.3 Modelo de ciatalgia

Os animais foram anestesiados com injeção intraperitoneal de cloridrato de cetamina 2,5% (90 mg/kg) e cloridrato de xilazina 1,75% (10 mg/kg). Após a tricotomia, no local do procedimento, foi feita uma incisão paralela às fibras do bíceps femoral da coxa direita do animal, expondo assim o nervo ciático. Seguindo o modelo descrito por Bennet; Xie (1998), com modificações do grupo de estudo do Laboratório Experimental de Estudo da Dor (LEED)/UFMA, que efetuou a compressão no tronco comum do ciático da pata direita com uma força média de 0,44 Kgf, através de aparato desenvolvido no LEED/UFMA, com finalidade de induzir dor neuropática no trajeto do nervo ciático (Patente – BR 10 2017 000325 6, depositada em: 06/01/2017), em seguida foi feita a sutura por planos.

Finalizando este procedimento, o local da incisão foi suturado com fio de nylon não absorvível e desinfetado com solução de rifampicina. Os animais pertencentes ao grupo SHAM foram submetidos ao procedimento anestésico e de isolamento do nervo ciático, porém não receberam nenhuma compressão neste nervo. O grupo controle não foi submetido a nenhuma intervenção cirúrgica.

4.6.4 Delineamento experimental

Os animais foram distribuídos em subgrupos (n=5) (figura 08):

- a) Controle (n=05) ⇒ animais que não foram submetidos à intervenção cirúrgica;
- b) SHAM (n=05) ⇒ animais nos quais foi realizada a incisão dos tecidos até a visualização do nervo ciático, porém o nervo não foi comprimido;
- c) Salina (n=05) ⇒ animais em que o nervo ciático foi isolado e comprimido em seu tronco comum, tratados com NaCl 0,9%;
- d) EbMac50 mg/Kg (n=05) ⇒ animais em que o nervo ciático foi isolado e comprimido no tronco comum, tratados por via oral do primeiro dia (D1) após indução até o décimo quinto dia (D15) com extrato das folhas de *Eleutherine bulbosa* obtidos por maceração (50 mg/Kg);
- e) EbSox 50 mg/Kg (n=05) ⇒ animais em que o nervo ciático foi isolado e comprimido no tronco comum, tratados por via oral do primeiro dia (D1) após indução até o décimo quinto dia (D15) com extrato das folhas de *Eleutherine bulbosa* obtidos em aparelho de Soxhlet (50 mg/Kg);
- f) Gabapentina ⇒ animais em que o nervo ciático foi isolado e comprimido no tronco comum, tratados por via oral do primeiro dia (D1) após indução até o décimo quinto dia (D15) com Gabapentina (1 mg/Kg).

Os animais foram tratados no primeiro dia (D1) após a indução até o décimo quinto dia (D15), com avaliações comportamentais em D0, D1, D5, D10 e D15. Em seguida os animais foram eutanasiados com anestésicos (cetamina 240 mg/kg e xilazina 30 mg/kg) para coleta do sangue para retirada do soro para as análises bioquímicas (atividade da enzima catalase e enzima superóxido dismutase).

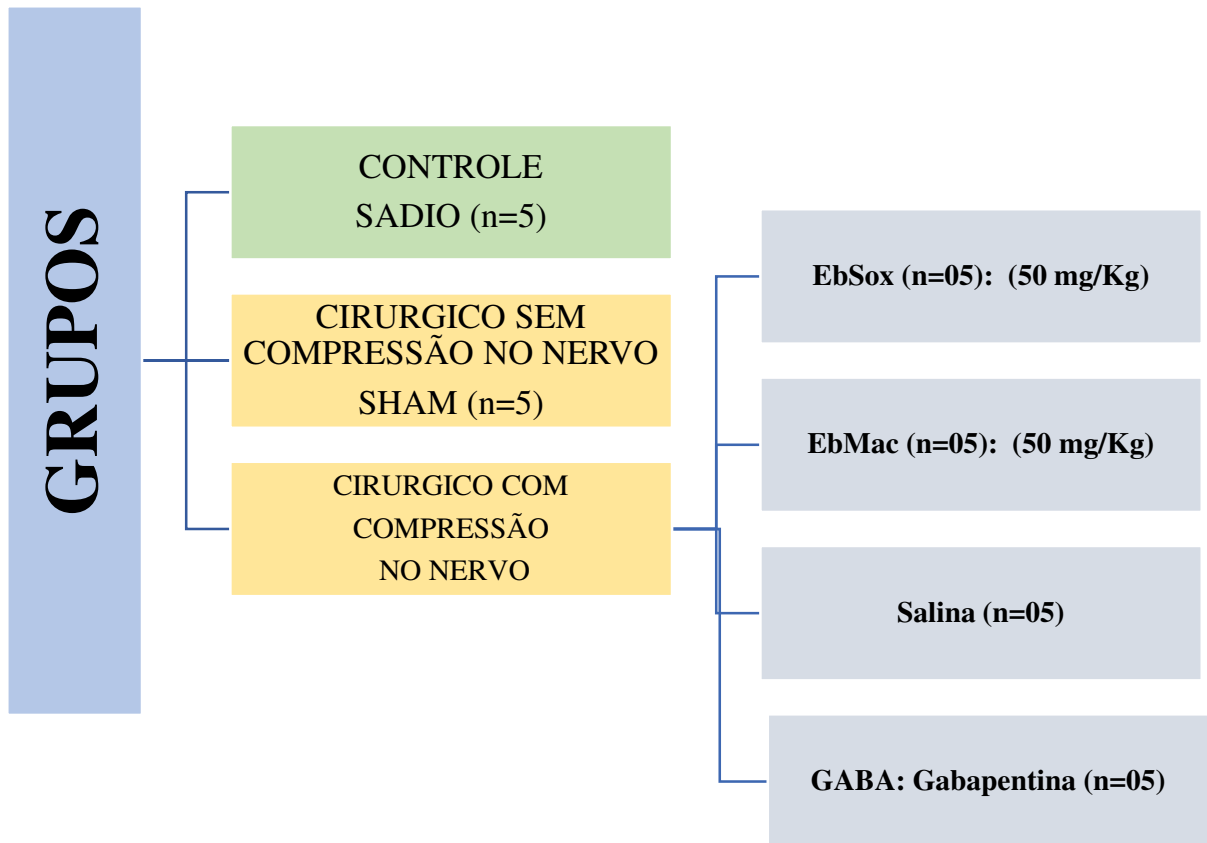


Figura 08. Fluxograma do delineamento experimental para investigação do potencial dos extratos hidroalcoólicos das folhas de *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. (Iridaceae) na dor neuropática, empregado nesse estudo.

Fonte: autor

4.7 Análises comportamentais, bioquímicas e *in vitro*

Para avaliação do potencial dos extratos hidroalcoólicos das folhas de *Eleutherine bulbosa*, nos grupos experimentais (Controle, Salina, SHAM, EbMac, EbSox e Gabapentina) foram realizadas análises comportamentais (avaliação da deambulação forçada - Teste de *Rotarod*, avaliação da alodínia mecânica - Teste de *Von Frey* e hiperalgesia térmica - Teste da placa quente), bioquímicas (determinação da atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase); além de ensaio *in vitro* para avaliação das enzimas COX-1 e COX-2 (figura 09).

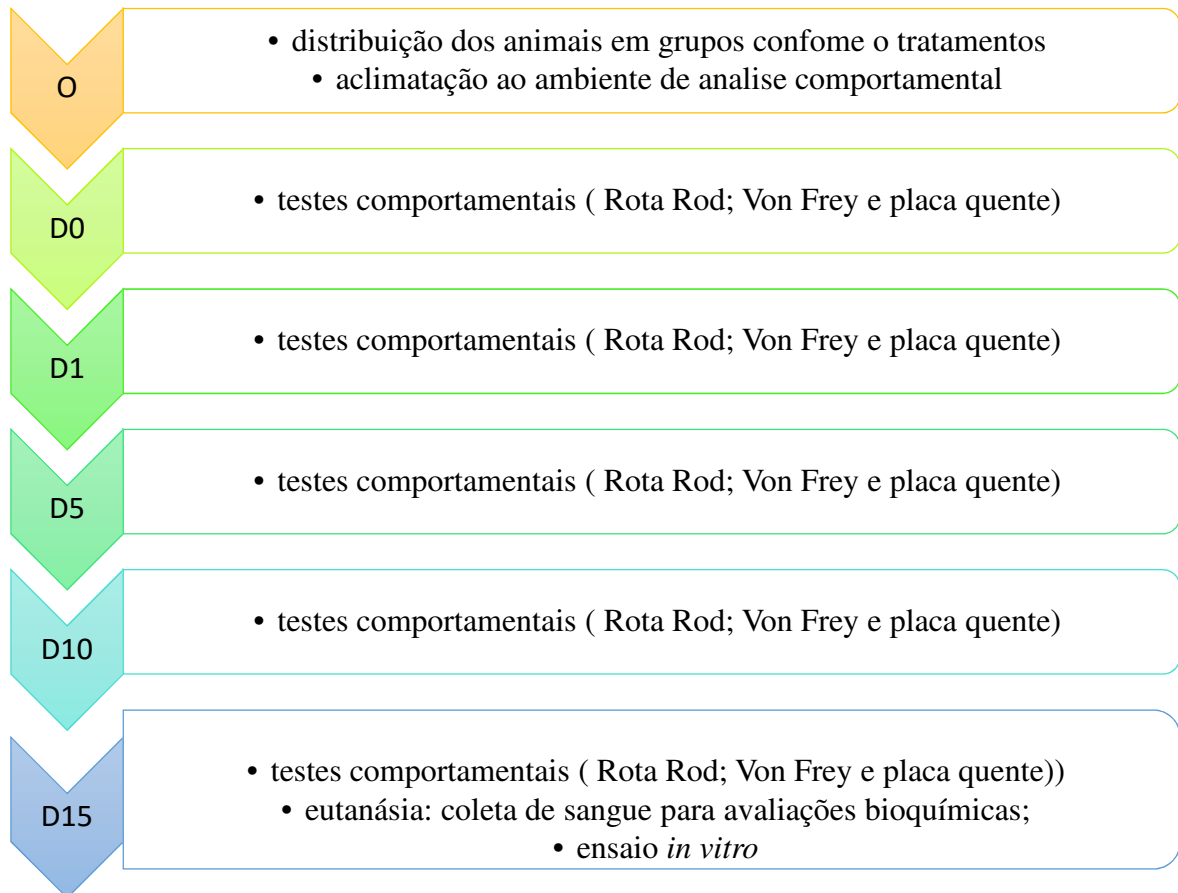


Figura 09. Esquema do desenho experimental para investigação do potencial dos extratos hidroalcoólicos das folhas de *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. (Iridaceae) na dor neuropática, por análises comportamentais, bioquímicas e *in vitro*

Fonte: autor

4.7.1 Análise comportamental

4.7.1.1 Teste de hiperalgia térmica (Teste da placa quente)

O teste proposto por Woolfe; Mc Donald (1944) consiste em quantificar o tempo de reação do animal ao estímulo térmico, ou seja, do momento em que o animal é colocado em uma placa quente ($55\text{ °C} \pm 1,0\text{ °C}$) até observar quanto tempo leva para manifestar uma resposta (lamber, morder, saltar e/ou levantar as patas). Essas alterações comportamentais são indicativas de nocicepção, já que são respostas integradas supraespinhalmente (YANAMOTO; NOZAKI-TAGUCHI; CHIBA, 2002).

4.7.1.2 Avaliação da deambulação forçada – Teste de Rotarod

O aparelho de *Rotarod* é uma barra giratória, com velocidade regulável em rotação por minutos (r.p.m.) localizada 40 cm de altura em relação a pequenas pranchas que desligam automaticamente o contador digital de tempo com a queda dos animais da barra. O espaço é subdividido em cinco espaços de 20 cm onde os animais são colocados separados durante o teste (KALFF et al., 2010)

Os animais foram colocados no *Rotarod* (modelo IITC *Life Science*, Califórnia, Estados Unidos) na velocidade de 16 RPM por um período de tempo de 300 segundos. A utilização do membro afetado foi avaliada pela deambulação forçada. O uso da pata foi graduado em uma escala numérica que varia de 5 a 1, em que: 5 = uso normal do membro; 4 = claudicação leve; 3 = claudicação grave; 2 = intermitente desuso da pata afetada; 1 = completo desuso da pata afetada (KALFF et al., 2010).

4.7.1.3 Avaliação da alodínia mecânica - Teste de Von Frey

O uso de filamentos de *Von Frey* é um método empregado para avaliar a sensibilidade tecidual ao estímulo mecânico, no sentido de avaliar a influência de drogas sobre a sensibilidade nociceptiva em animais (CUNHA et al., 2004).

A alodínia mecânica foi realizada com um analgesímetro digital (modelo Insight, São Paulo, Brasil), que consiste em um transdutor de pressão conectado a um contador digital de força expressa em gramas (g). O contato do transdutor de pressão com a pata dos animais foi realizado por meio de uma ponteira descartável de polipropileno com 0,5 mm de diâmetro adaptada ao aparelho (VIVANCOS et al., 2004; KALFF et al., 2010).

Para adaptação ao ambiente, os animais foram colocados em caixas de acrílico medindo 12 x 20 x 17cm, cujo assoalho consiste de uma rede de malha de 5mm², constituída de arame não maleável de 1mm de espessura, durante 15 minutos antes do experimento. Espelhos foram posicionados 25 cm abaixo das caixas de experimentação para facilitar a visualização da região plantar das patas dos animais. O experimentador aplicou, por entre as malhas da rede, uma pressão linearmente crescente no centro da região plantar de pata do rato até o animal produzir uma resposta caracterizada como sacudida (“*flinch*”) da pata estimulada. Os estímulos foram repetidos por até seis vezes, nas patas ipsilateral e contralateral, até o animal apresentar três medidas similares de resposta “*flinch*” após a retirada da pata (VIVANCOS et al., 2004; KALFF et al., 2010).

O limiar nociceptivo de retirada da pata (LNRP) foi definido como o percentual de força para provocar uma suspensão ativa na pata ipsilateral afetada e foi determinado da seguinte maneira:

$$\text{LNRP}(\%) = \frac{\text{LNRPA}}{\text{LNRPA} + \text{LNRPC}} \times 100$$

Onde :

LNRP é o limiar nociceptivo de retirada da pata;

LNRPA é limiar nociceptivo de retirada da pata afetada;

LNRPC limiar nociceptivo de retirada da pata contralateral.

4.7.2 Análise bioquímica

Os animais dos diferentes grupos experimentais foram eutanasiados com anestésicos (cetamina 240 mg/kg e xilazina 30 mg/kg), com coleta do sangue, obtido por punção da artéria aorta abdominal, seguida de extração do soro por centrifugação a 3.000 rpm por 10 minutos, para avaliação enzimática (catalase e superóxido dismutase

4.7.2.1 Determinação da enzima catalase (CAT)

A atividade da catalase (CAT) é diretamente proporcional à taxa de decomposição do peróxido de hidrogênio, obedecendo a cinética de pseudo primeira ordem. Assim, a atividade da catalase pode ser medida através da avaliação do consumo de peróxido de hidrogênio.

O teste consiste em avaliar a diminuição da absorbância no comprimento de onda de 240 nm, sendo este o comprimento de onda onde há maior absorção pelo peróxido de hidrogênio. Em cubeta de quartzo, foram adicionados 955µL do tampão fosfato e 30µL de amostra de soro dos grupos experimentais, esta cubeta foi colocada em espectrofotômetro e descontada contra um branco de tampão fosfato. Em seguida, foram adicionados 35 µL do peróxido de hidrogênio e 15 µL para amostra de soro e foi feito o monitoramento da diminuição da absorbância no comprimento de onda selecionado. Os resultados foram expressos em pmoles/mg de proteína (BOVERIS; CHANCE, 1973).

4.7.2.2 Determinação da enzima superóxido dismutase(SOD)

A atividade da SOD foi determinada segundo Giannopolitis; Ries (1977). Alíquota de 15 µL do soro foi adicionada a 1485 µL de solução de trabalho (tampão de fosfato de potássio 50 mM pH 7,8, riboflavina 1,3 mM, metionina 13 mM, NBT 63 mM e EDTA 0,1 mM). No ensaio foram empregados dois brancos, ambos contendo 15 µL de tampão de fosfato de potássio 50 mM pH 7,8 e 1485µL de solução de trabalho, para reação com incidência de luz, que pela fotorredução do NBT ocorre formação do composto azul de formazana e outro branco ser empregado no escuro. A absorbância foi obtida em espectrofotômetro a 560 nm. No cálculo da atividade da enzima o valor da absorbância do branco do escuro foi subtraído dos valores de absorbância das amostras. Os resultados foram expressos em unidade/mg de proteína.

4.7.3 Ensaio *in vitro*

4.7.3.1 Determinação da atividade das enzimas ciclooxigenase 1 (COX-1) e ciclooxigenase 2 (COX-2)

O ensaio foi realizado de acordo com as recomendações do fabricante (*COX Colorimetric Inhibitor Screening - Cayman Chemical®*). Placa de 96 poços foi inicialmente identificada, sendo os testes de inibição realizados em triplicata, para cada concentração testada (2, 10 e 50 µg/mL) das amostras de EbMac e EbSox e para os controles da reação: **BW** – controle sem enzima; **A** - com enzima somente, sem inibidor. Os 03 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 03 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 extratos hidroalcoólicos das folhas de *Eleutherine bulbosa* (EbMac e EbSox) 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 EbMac e EbSox (separadamente) diluídos em etanol 70%, nas concentrações 2, 10 e 50 µg/mL. Após a mistura de todos estes reagentes em cada poço, foi agitada cuidadosamente a placa por alguns segundos e incubadas por 5 minutos. Em seguida, foram adicionados 20 µL da solução com substrato colorimétrico, em cada poço da placa e após isso, foram adicionados 20 µL do ácido araquidônico (empregado como substrato da reação enzimática, catalisada pela COX). A placa foi novamente agitada, cuidadosamente, incubada por 02 minutos a 25 °C, para leitura em leitor de placas tipo Elisa (EPOCH) a 590 nm.

4.8 Análise estatística

A comparação das médias de diferentes grupos experimentais foi realizada pelo teste *t de Student* ou análise de variância univariada (*One-way ANOVA*), seguida pelo teste de *Tukey*. Na avaliação de duas fontes de variabilidade, foi utilizado análise de variância bivariada (*TWO-way – ANOVA*). O valor de $p < 0,05$ foi considerado como indicativo de significância e os dados obtidos foram analisados através do *software GraphPad® (GraphPad software 7.0, San Diego, CA)*.

5 RESULTADOS

5.1 Aspectos morfo-anatômica das folhas da espécie *Eleutherine bulbosa*

5.1.1 Características macroscópicas

Eleutherine bulbosa consiste em uma espécie herbácea, perene, rizomatosa, bulbosa, apresentando suas folhas em touceiras que podem atingir até 40 cm de altura. Os bulbos são formados por escamas. As folhas são simples, com média de 30 cm de comprimento x 2,5 cm de largura. São simétricas, lanceoladas, com margem inteira, ápice atenuado; base decorrente e verticilada (figura 10). É possível observar nervação paralelinérvea, superfície glabra e rugosa, apresentando o limbo inteiro.

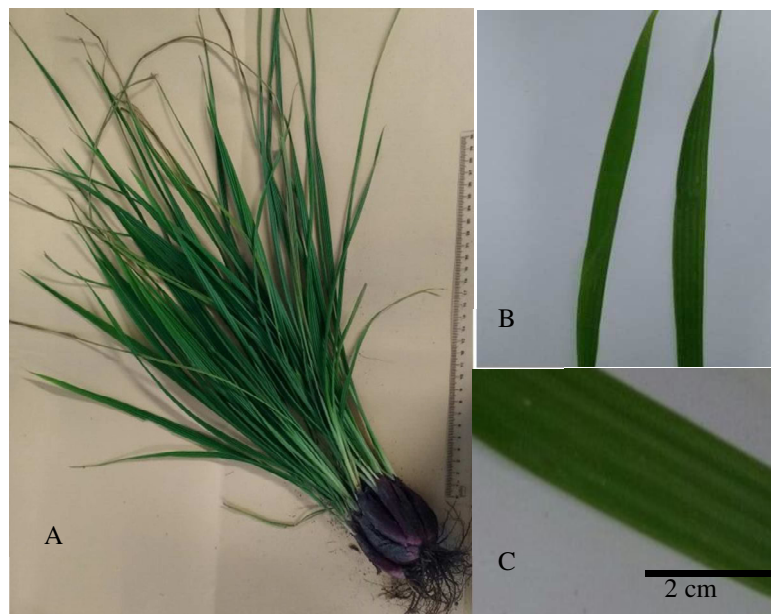


Figura 10. *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. (Iridaceae) (A) Parte aérea das folhas e bulbos; (B) Folhas; (C) Folhas com destaque para nervação paralelinérvea.

Fonte: autor

5.1.2 Características microscópicas

Transversalmente, a folha da espécie apresenta mesófilo homogêneo, composto por parênquima do tipo comum; sendo observados frequentes idioblastos contendo cristais prismáticos de oxalato de cálcio e eventualmente, drusas. Na visão transversal, é possível observar estômatos nas duas faces da epiderme foliar, caracterizando folha anfiestomática, no entanto, com maior frequência na epiderme adaxial. A epiderme, em vista transversal, apresenta

células bulbosas, sendo mais evidenciada estas características, na face inferior da epiderme. Cutícula lisa é evidenciada nas duas faces da epiderme (figuras 11 a 13).

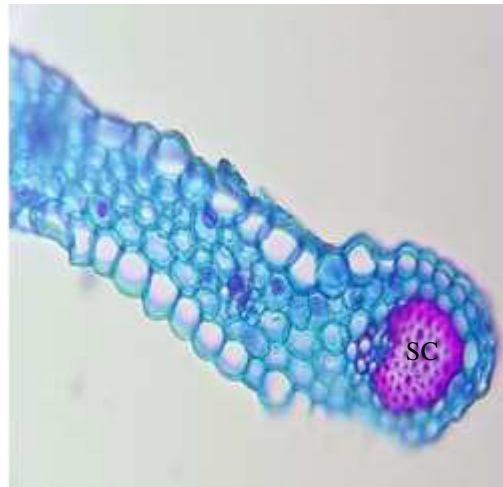


Figura 11. *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. (Iridaceae). Características da secção transversal da margem da folha. Em destaque, fibras esclerenquimáticas (SC)
Fonte: autor

Ao longo do mesófilo são observados vários feixes colaterais de diferentes tamanhos, estes, apresentando grupamento de fibras esclerenquimáticas junto ao floema, e localizados junto à face abaxial da epiderme. Na região da margem, é evidenciado grupamento maciço de fibras esclerenquimáticas junto aos vasos (figuras 11 a 13).

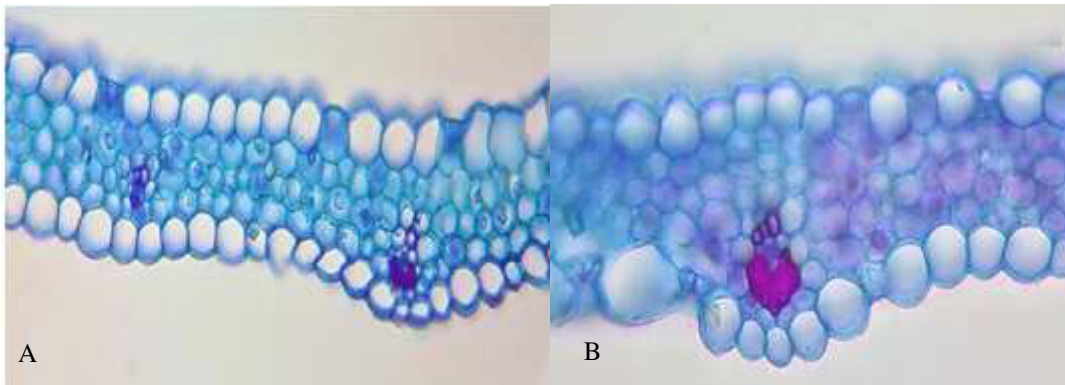


Figura 12. *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. (Iridaceae). (A) Feixe vascular com dois pólos de fibras esclerenquimáticas; (B) Feixe vascular com fibras esclerenquimáticas somente junto ao floema.
Fonte: autor

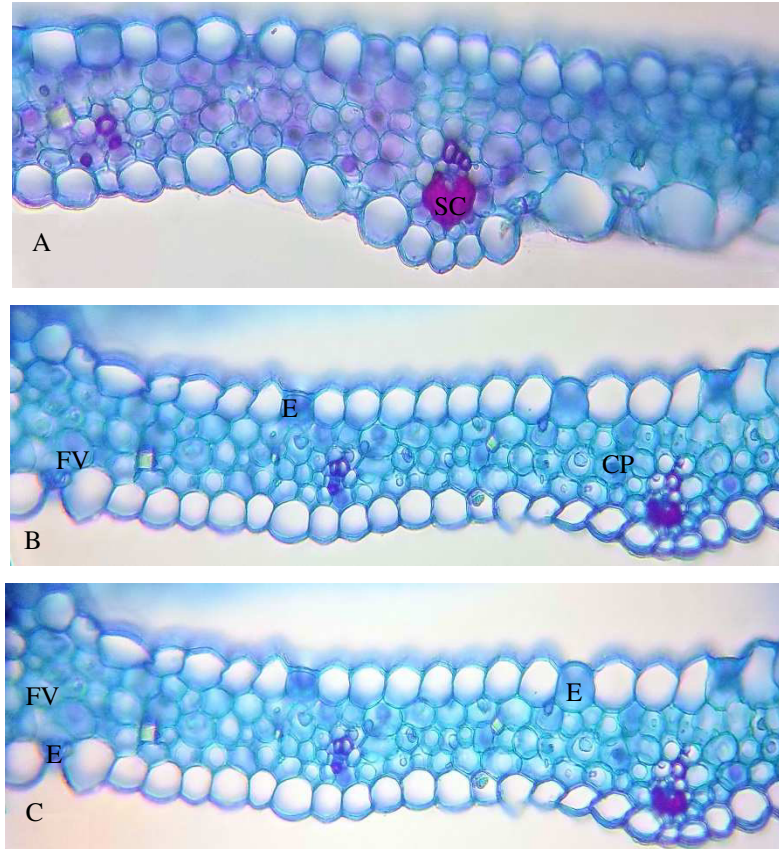


Figura 13. *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. (Iridaceae). (A) Feixe vascular FV com presença de fibras esclerenquimáticas SC; (B) Presença de estômatos E na epiderme adaxial e abaxial dois pólos de fibras esclerenquimáticas; (C) Presença de cristais prismáticos CP ao longo do feixe vascular.

Fonte: autor

Em nível das nervuras mais proeminentes, observa-se formato côncavo convexo com a convexidade voltada para a face abaxial. No interior, existe apenas um feixe vascular colateral com o xilema voltado para face adaxial e o floema para face abaxial juntamente com um grupamento de fibras esclerenquimática. Nessa região, há idioblastos contendo cristais prismáticos de oxalato de cálcio. Junto com os vasos, há grupamentos de fibras esclerenquimáticas localizadas nos dois polos dos vasos ou somente concentradas junto ao floema (figura 14).

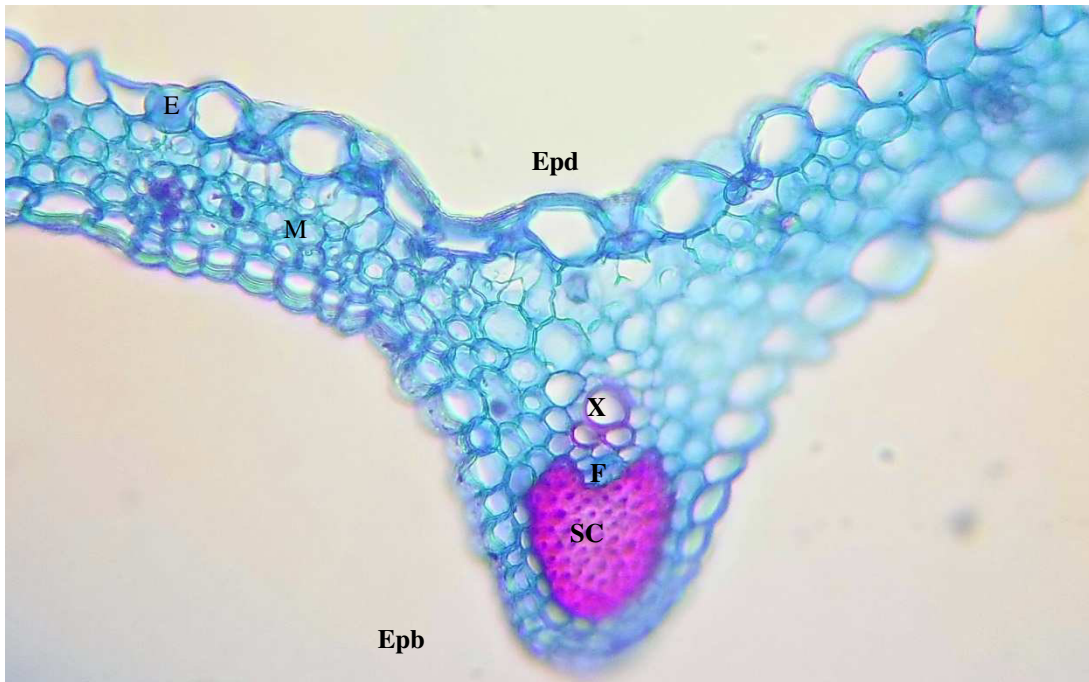


Figura 14. *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. (Iridaceae). Corte transversal das folhas: Epiderme abaxial (Epb); estômatos (E); mesofilo (M); Xilema (X); Floema (F); Fibras esclerenquimáticas (SC); Epiderme adaxial (Epd).

Fonte: autor

5.2 Caracterização química

5.2.1 Constituição química qualitativa e semi-quantitativa

Para avaliar as classes de metabólitos secundários presentes nos extratos em estudo, foram realizadas análises fitoquímicas qualitativas e semi-quantitativas que tiveram como expressão do resultado a mudança de coloração, formação de precipitado e/ou formação de espuma (tabela 03).

Tabela 03. Avaliação qualitativa e semi-qualitativa dos constituintes químicos nos extratos hidroalcoólicos das folhas de *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. (Iridaceae) obtidos por maceração na relação de hidromódulo 1:18 e em aparelho de Soxhlet na relação de hidromódulo 1:14.

METABÓLICOS SECUNDÁRIOS	RELAÇÃO PROCEDIMENTO EXTRATIVO/HIDROMÓDULO	
	Maceração 1:18	Soxhlet 1:14
antocianinas, antocianidinas ^a	-	-
flavonas, flavonois e xantonas	++	++
chalconas	-	-
flavononois	-	-
flavanonas	+	+++
fenóis	+++	+++
taninos hidrolisáveis	-	-
taninos condensáveis	+	+++
esteroides	+++	++
triterpenoides	+	+
cumarinas	+++	+++
resinas	-	-
saponinas	-	+
alcaloides	+	+
catequinas	-	-

^a critérios adotados para expressar os resultados: +++ reação fortemente positiva; ++ reação moderadamente positiva; + reação fraca, - reação negativa. Resultados expressos como média dos ensaios de avaliação qualitativa e semi-quantitativa dos constituintes químicos realizados em triplicata no extrato hidroalcoólico das folhas de *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. obtidos por maceração no hidromódulo 1:18 (representa relação droga/vegetal: etanol a 70% empregado neste estudo) e em aparelho de Soxhlet no hidromódulo de 1:14.

Os resultados obtidos nos ensaios de avaliação qualitativa e semi-quantitativa dos constituintes químicos nos extratos hidroalcoólicos das folhas de *Eleutherine bulbosa* demonstra a presença de compostos fenólicos, tendo sido detectados cumarinas, taninos condensados, flavanonas, flavonas, flavonóis e xantonas; além de alcaloides, esteroides e triterpenos. Foram constatados resultados negativos para antocianinas, antocianidinas, chalconas, flavononois, taninos hidrolisáveis, resinas e catequinas. As saponinas foram detectadas apenas no extrato obtido por extração em aparelho de Soxhlet. Os resultados evidenciam que há influência do procedimento extrativo, com variações semi-quantitativas com resultados mais significativos para algumas classes de metabólitos (flavanonas, taninos condensados e saponinas) no EbSox; já esteroides foi melhor detectado em EbMac.

5.2.2 Teor de polifenóis totais

A quantificação de compostos fenólicos dos extratos hidroalcoólicos das folhas de *Eleutherine bulbosa* obtido por maceração no hidromódulo 1:18 e em aparelho de Soxhlet no hidromódulo de 1:14 está demonstrada na tabela 04, demonstrando que houve discreta diferença entre EbMac e EbSox em relação ao teor de polifenóis.

Tabela 04. Teor de polifenóis dos extratos das folhas de *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. (Iridaceae) obtidos por maceração na relação de hidromódulo 1:18 e em aparelho de Soxhlet na relação de hidromódulo 1:14

Extrato/Relação de hidromódulo*	$\mu\text{g/mL}$ (ácido gálico)	%	mgAG/g^{**}
EbMac	$6,75 \pm 0,04$	$16,86 \pm 0,09$	$168,62 \pm 0,97$
EbSox	$7,05 \pm 0,20$	$17,62 \pm 0,51$	$176,25 \pm 5,10$

*EbMac: extrato hidroalcoólico das folhas de *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. obtido por maceração no hidromódulo 1:18 (representa relação droga/ vegetal: etanol a 70% empregado neste estudo); EbSox: extrato hidroalcoólico das folhas de *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. obtido em aparelho de Soxhlet no hidromódulo de 1:14; **equivalentes de ácido gálico (AG)

5.2.3 Teor de flavonoides

A quantificação de flavonoides dos extratos hidroalcoólicos das folhas de *Eleutherine bulbosa* obtidos por maceração no hidromódulo 1:18 e em aparelho de Soxhlet no hidromódulo de 1:14 está demonstrada na tabela 05; evidenciando valores mais expressivos em EbSox.

Tabela 05. Teor de flavonoides dos extratos das folhas de *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. (Iridaceae) obtidos por maceração na relação de hidromódulo 1:18 e em aparelho de Soxhlet na relação de hidromódulo 1:14

Extrato / Relação de hidromódulo*	µg/mL (quercetina)	%	mgQE/g**
EbMac	5,69 ± 0,11	2,85 ± 0,05	28,49 ± 0,55
EbSox	8,33 ± 0,15 ^a	4,16 ± 0,07 ^a	41,65 ± 0,74 ^a

*EbMac: extrato hidroalcoólico das folhas de *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. obtido por maceração no hidromódulo 1:18 (representa relação droga/ vegetal: etanol a 70% empregado neste estudo); EbSox: extrato hidroalcoólico das folhas de *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. obtido em aparelho de Soxhlet no hidromódulo de 1:14; **equivalentes de quercetina (QE). ^a indica diferenças significativas em relação à EbMac 1:18 ($p \leq 0,05$), ANOVA *one-way* seguido de *Tukey*

5.3 Identificação química

5.3.1 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplada à espectrometria de massas (MS)

Os extratos em estudo foram avaliados por CLAE, utilização detecção por espectrometria de massa (MS) tendo sido detectados vários compostos principalmente da classe das quinonas (figuras 15 e 16 / tabela 06).

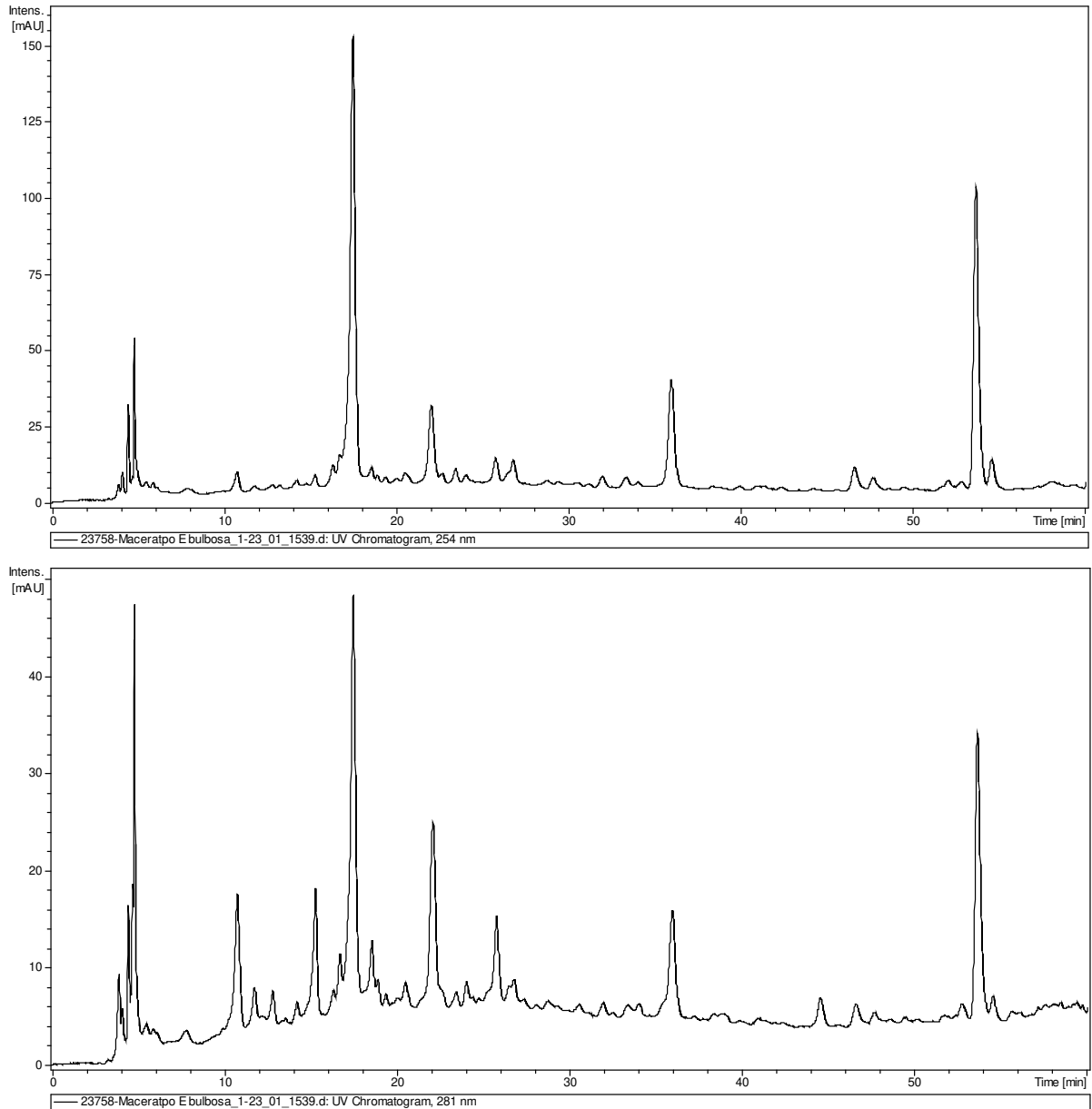


Figura 15. Cromatograma obtido por LC-MS do extrato das folhas de *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. (Iridaceae), obtidos por maceração no hidromódulo de 1:18 (representa relação droga/ vegetal: etanol a 70% empregado neste estudo).

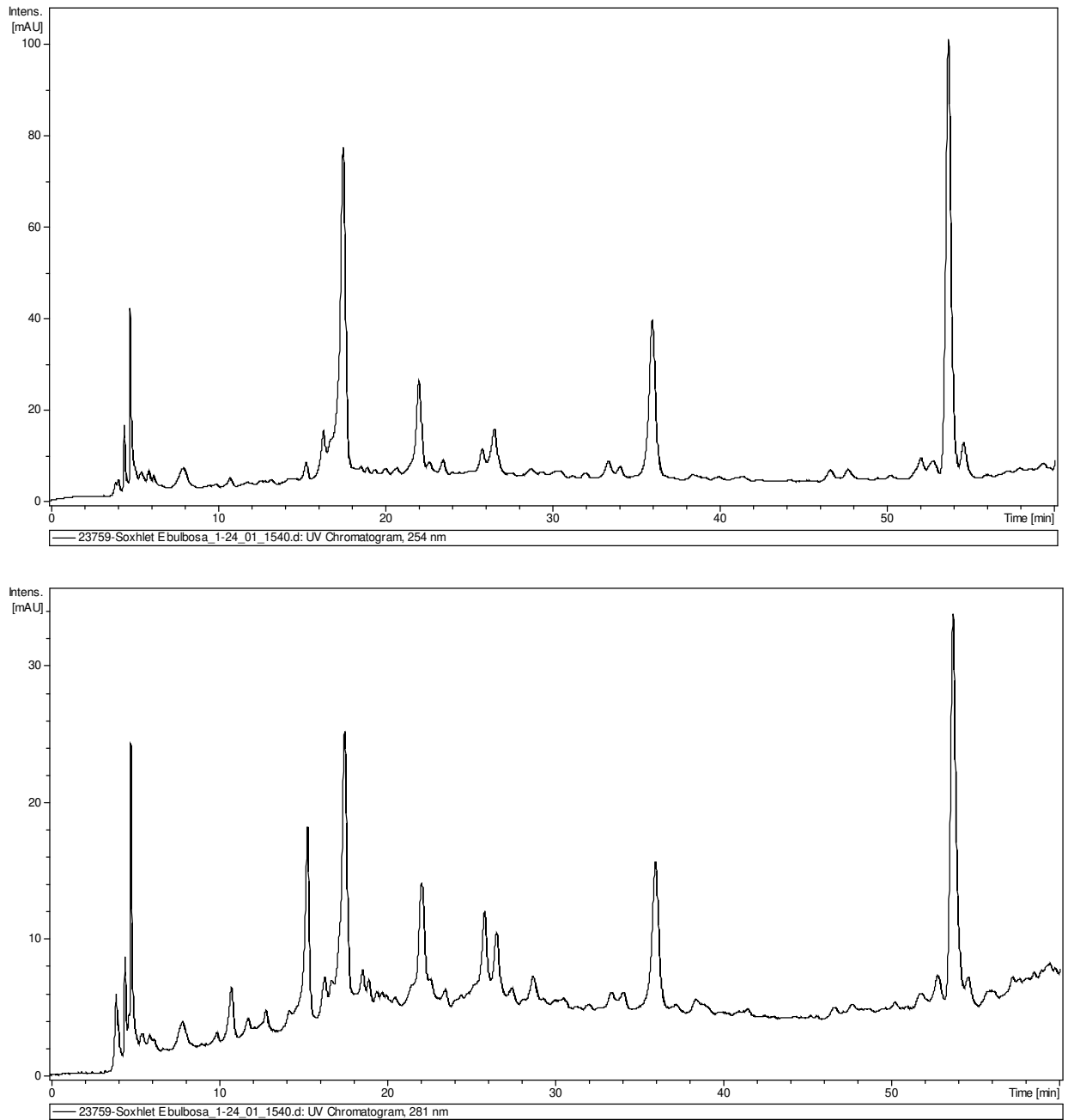


Figura 16. Cromatograma obtido por LC-MS do extrato das folhas de *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. (Iridaceae), obtidos em aparelho de Soxhlet no hidromódulo de 1:14 (representa relação droga/ vegetal: etanol a 70% empregado neste estudo).

Tabela 06. Cromatograma obtido por LC-MS dos extratos das folhas de *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. (Iridaceae), obtidos por maceração no hidromódulo de 1:18 (representa relação droga/ vegetal: etanol a 70% empregado neste estudo) (EbMac) e em aparelho de Soxhlet no hidromódulo de 1:14 (EbSox), via CLAE - MS, em modo de ionização negativa.

	Fórmula molecular	MSⁿ product ions (<i>m/z</i>)	Sugestão de identificação	Grupo de compostos	EbMac	EbSox
1	C ₁₆ H ₁₆ O ₄	228, 158	eleutherin	naftoquinonas	+	+
2	C ₁₃ H ₁₄ O ₄	161	7-acetyl-3,6-dihydroxy-8-methyl-3,4-dihydronaphthalen-1(2H)-one	naftoquinonas	+	
3	C ₁₈ H ₁₄ O ₇	-	4,8-Dihydroxy-3-methoxy-1-methylanthra-9,10-quinone-2-carboxylic acidmethylester	antraquinonas		+
4	C ₁₇ H ₁₆ O ₆	225	eleuthinone A	naftoquinonas	+	+
5	-	257	eleuthinone B	naftoquinonas	+	+
6	-	290, 164	catequina glicosilada	catequina glicosilada	+	
7	C ₁₆ H ₁₆ O ₅	167	eleuthone		+	+
8	C ₂₀ H ₂₂ O ₉	286, 388	eleuthoside A	naftalenos	+	+
9	-	165, 275	phloridzin	chalconaaurona	+	+
10	C ₂₈ H ₃₈ O ₁₅	453, 291	eleutherinoside B	naftalenos	+	
11	C ₁₄ H ₁₂ O ₅	165	eleucanarol	naftalenos	+	+
12	C ₂₁ H ₂₄ O ₉	259, 301, 403	Dihydroeleutherinol-glucoside	naftoquinonas	+	+
13	-	271, 315, 417		naftalenos		+
14	C ₂₁ H ₂₂ O ₉	-	eleutherinol-glucoside	naftoquinonas		+
15	C ₂₀ H ₂₀ O ₉	-	eleutherinoside A	naftalenos		+
16	C ₁₆ H ₁₆ O ₆		3-[2-(acetyloxy)propyl]-2-hydroxy-8-methoxy-1,4-naphthoquinone	naftoquinonas	+	+
17	C ₁₈ H ₁₄ O ₈	219, 313	eleuthraquinone B	antraquinonas	+	+

5.4 Parâmetros comportamentais e bioquímicos dos extratos hidroalcoólicos das folhas de *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. (Iridaceae) obtidos por maceração na relação de hidromódulo 1:18 e em aparelho de Soxhlet na relação de hidromódulo 1:14

5.4.1 Parâmetros comportamentais

5.4.1.1 Avaliação de hiperalgia térmica (Placa quente -hot plate)

Os resultados comprovaram que somente o grupo tratado com EbSox (50 mg/Kg) teve efeito estatisticamente significativo quando comparado ao grupo salina a partir do décimo dia (D10) de tratamento, mantendo-se até o décimo quinto dia (D15) de avaliação. Possivelmente, esse efeito seja atribuído aos procedimentos extrativos utilizados e a influência dos mesmos na eficácia dos extratos obtidos (figura 17).

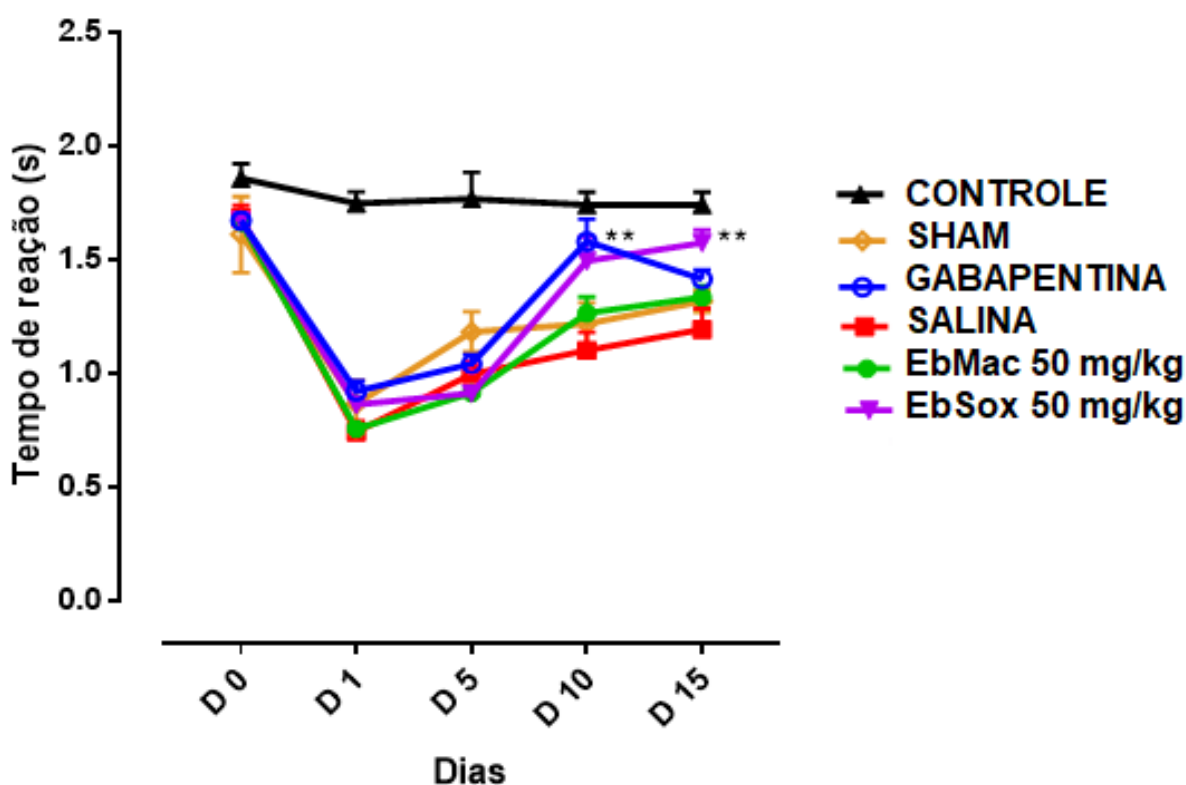


Figura 17. Efeito dos extratos hidroalcoólicos das folhas de *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. (Iridaceae), obtidos por maceração e em aparelho de Soxhlet em teste comportamental pela avaliação de hiperalgia térmica - Teste da Placa Quente (*hot plate*). EbMac: extrato hidroalcoólico das folhas de *Eleutherine bulbosa* obtido por maceração no hidromódulo de 1:18 (representa relação droga/ vegetal: etanol a 70% empregado neste estudo); EbSox: extrato hidroalcoólico das folhas de *Eleutherine bulbosa* obtido em aparelho de Soxhlet no hidromódulo de 1:14. As barras representam média \pm S.E.M (n = 5 por grupo), análise estatística realizada por *two way ANOVA/Tukey*. Os asteriscos (**) indicam diferença significativa (p < 0,0001).

5.4.1.2 Avaliação da deambulação forçada – *Teste de Rotarod*

Na avaliação da marcha dos animais submetidos à indução de dor neuropática por período de 15 dias, foi possível observar que no dia 1 (D1) após a indução, ocorreu diferença significativa de todos os grupos quando comparados ao grupo controle. Evidenciando, ainda, que o tratamento na dose de 50 mg/Kg foi efetivo após 15 dias, independentemente do procedimento extrativo ao qual as folhas de *Eleutherine bulbosa* foram submetidos. Os EbMac e EbSox apresentaram diferenças quando comparados ao grupo salina; entretanto, quando se compara EbMac e EbSox (50 mg/Kg) não se observa diferença na eficácia (figura 18).

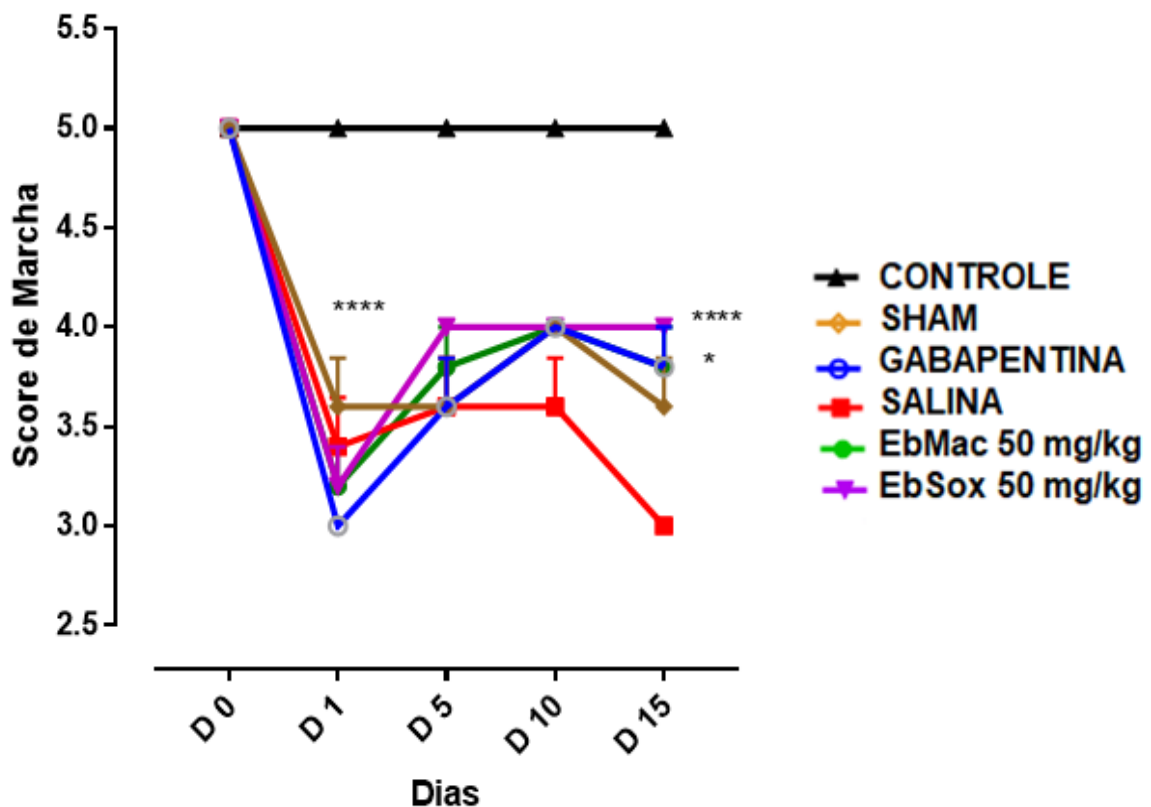


Figura 18. Efeito dos extratos hidroalcoólicos das folhas de *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. (Iridaceae) obtidos por maceração e em aparelho de Soxhlet em teste comportamental pela avaliação da deambulação forçada - Teste de *Rotarod*. EbMac: extrato hidroalcoólico das folhas de *Eleutherine bulbosa* obtido por maceração no hidromódulo de 1:18 (representa relação droga/ vegetal: etanol a 70% empregado neste estudo); EbSox: extrato hidroalcoólico das folhas de *Eleutherine bulbosa* obtido em aparelho de Soxhlet no hidromódulo de 1:14. As barras representam média \pm S.E.M (n = 5 por grupo), análise estatística realizada por *twoway ANOVA/Tukey*. Os asteriscos (****) indicam diferença significativa ($p < 0,0001$).

5.4.1.3 Avaliação da alodínia mecânica – Teste de Von Frey

Os resultados permitem constatar que a indução da dor foi efetiva, pois houve redução do limiar nociceptivo de retirada da pata em todos os grupos estudados em relação ao controle (sadio). Evidenciando que o tratamento com *Eleutherine bulbosa* confere proteção, aumentando o limiar a nocicepção dos animais tratados a partir do décimo dia (D10) de tratamento, independentemente do método de extração, constatamos um efeito estatisticamente significativo quando comparado ao grupo salina (figura 19).

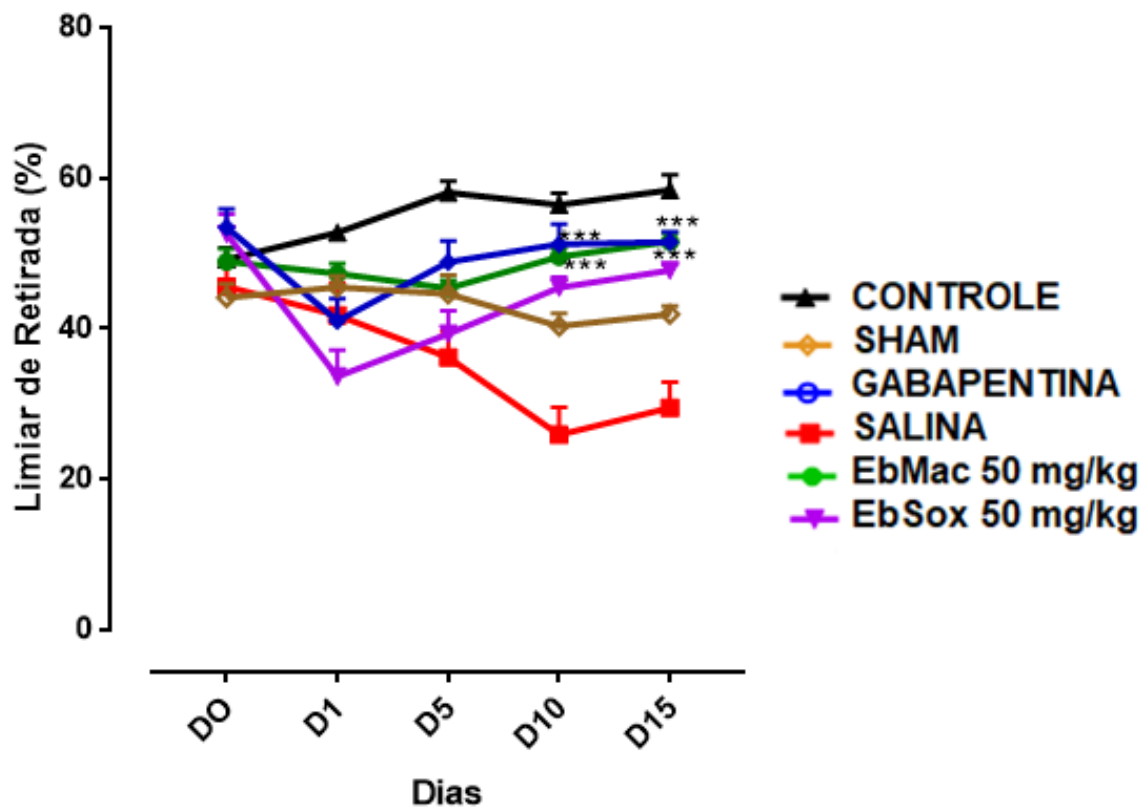


Figura 19. Efeito dos extratos hidroalcoólicos das folhas de *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. (Iridaceae) obtidos por maceração e em aparelho de Soxhlet em teste comportamental pela avaliação da alodínia mecânica - teste de *Von Frey*. EbMac: extrato hidroalcoólico das folhas de *Eleutherine bulbosa* obtido por maceração no hidromódulo de 1:18 (representa relação droga/ vegetal: etanol a 70% empregado neste estudo); EbSox: extrato hidroalcoólico das folhas de *Eleutherine bulbosa* obtido em aparelho de Soxhlet no hidromódulo de 1:14. As barras representam média \pm S.E.M (n = 5 por grupo), análise estatística realizada por *twoway ANOVA/Tukey*. Os asteriscos (***) indicam diferença significativa ($p < 0,0001$).

5.4.2 Parâmetros bioquímicos

5.4.2.1 Efeito na atividade da enzima catalase

Em relação a atividade dos extratos em estudo na velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio pela enzima catalase (CAT), os resultados evidenciam que nos animais tratados com extrato hidroalcoólico das folhas de *Eleutherine bulbosa* obtido em aparelho de Soxhlet (EbSox) ocorreu redução da atividade da CAT de 84,62%, quando comparado ao grupo salina (figura 20).

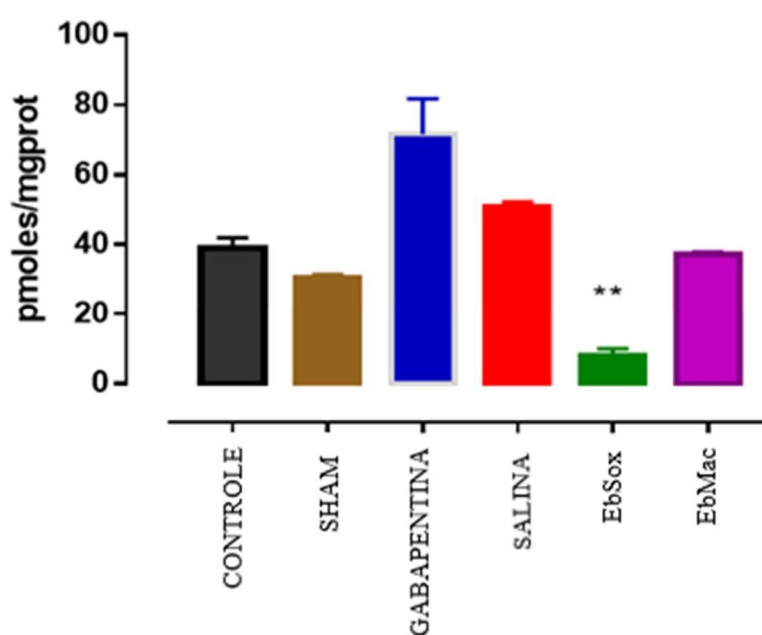


Figura 20. Efeito dos extratos hidroalcoólicos das folhas de *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. (Iridaceae) obtidos por maceração e em aparelho de Soxhlet na determinação da velocidade de decomposição do peróxido de hidrogênio pela enzima catalase (CAT). EbMac: extrato hidroalcoólico das folhas de *Eleutherine bulbosa* obtido por maceração no hidromódulo de 1:18 (representa relação droga/ vegetal: etanol a 70% empregado neste estudo); EbSox: extrato hidroalcoólico das folhas de *Eleutherine bulbosa* obtido em aparelho de Soxhlet no hidromódulo de 1:14. As barras representam média \pm S.E.M (n = 5 por grupo), análise estatística realizada por *twoway* ANOVA/Tukey. Os asteriscos (**) indicam diferença significativa ($p < 0,0001$) quando comparado ao grupo salina.

5.4.2.2 Efeito na atividade da enzima superóxido dismutase

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) foi avaliada segundo a capacidade de catalisação da reação entre o ânion superóxido e prótons resultando em peróxido de hidrogênio. A atividade da SOD nos animais tratados com extrato hidroalcoólico das folhas de *Eleutherine bulbosa* obtido por extração em aparelho de Soxhlet (EbSox) mostrou redução significativa de 50 % quando comparado com o grupo salina, sugerindo, assim, um efeito protetor (figura 21).

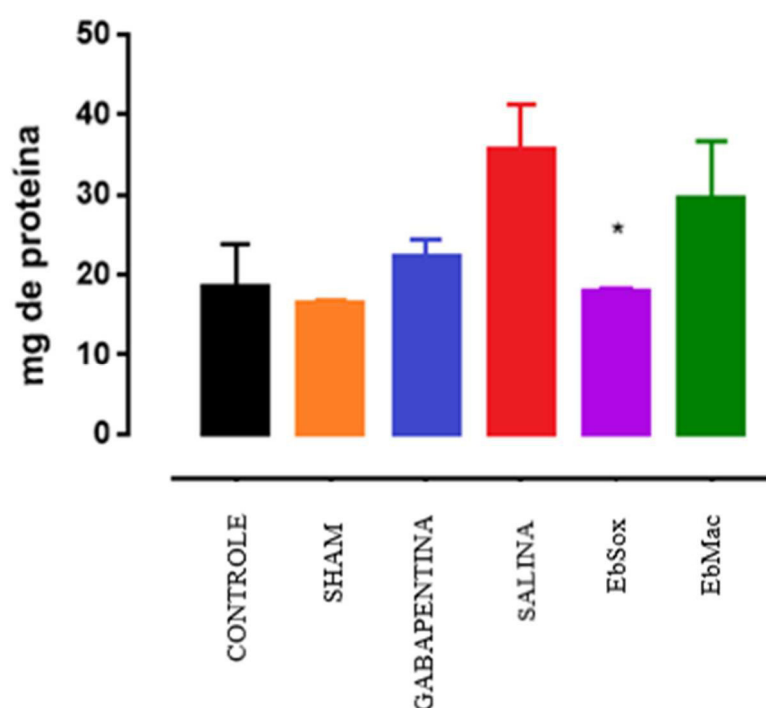


Figura 21. Efeito dos extratos hidroalcoólicos das folhas de *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. (Iridaceae) obtidos por maceração e em aparelho de Soxhlet na capacidade de catalisação da reação entre o ânion superóxido e prótons pela enzima superóxido dismutase (SOD). EbMac: extrato hidroalcoólico das folhas de *Eleutherine bulbosa* obtido por maceração no hidromódulo de 1:18 (representa relação droga/ vegetal: etanol a 70% empregado neste estudo); EbSox: extrato hidroalcoólico das folhas de *Eleutherine bulbosa* obtido em aparelho de Soxhlet no hidromódulo de 1:14. As barras representam média \pm S.E.M (n = 5 por grupo), análise estatística realizada por *twoway ANOVA/Tukey*. O asterisco (*) indica diferença significativa ($p < 0,0001$) quando comparado ao grupo salina.

5.4.3 Análise *in vitro*

5.4.3.1 Efeito sobre a inibição da enzima ciclooxigenase (COX)

Os ensaios *in vitro* de inibição das COX-1 e COX-2 realizados no presente estudo, demonstraram que EbMac e EbSox possuem potencial ação inibidora destas enzimas; com efeitos inibidores chegando até 60% para COX-2, utilizando o EbSox (figura 22).

Os resultados também mostram que o percentual de inibição da COX-1 induzido pelo EbMac, apesar de levar a inibição da enzima, não apresenta dose dependente, visto que a concentração de 10 µg/mL não teve efeito sobre a inibição, enquanto a concentração inferior (2 µg/mL) apresentou uma inibição de aproximadamente 7%, enquanto na concentração mais alta testada (50 µg/mL) volta a ter aumento da inibição em torno de 20% da COX-1. Já EbSox ocasiona inibição sobre COX-1 dose dependente.

Os resultados do percentual de inibição da COX-2, induzido pelo EbSox, também não apresentam um efeito dose dependente, já que a concentração de 10 µg/mL teve efeito inibição de aproximadamente 1%, enquanto a concentração inferior (2 µg/mL) ocasionou inibição de 13%, e na concentração mais alta (50 µg/mL) volta a ter aumento da inibição em torno de 60%.

Já no percentual de inibição da COX-1 induzido pelo EbSox e percentual de inibição da COX-2 induzido pelo EbMac, apresentam efeito dose dependente.

Ao comparar os resultados de efeito inibidor ocasionado pelo EbSox, constatamos que este apresentou melhor efeito inibidor sobre a COX-1 e COX-2; permitindo afirmamos que a extração em aparelho de Soxhlet, favorece uma melhor extração dos princípios ativos associado à inibição da ciclooxigenase da espécie em estudo.

O EbMac na concentração de 50 µg/mL ocasionou inibição de aproximadamente 20% da COX-1 e 40% sobre a COX-2. Assim também ocorreu com EbSox que na concentração de 50 µg/mL levou a inibição de aproximadamente 30% da COX-1 e 60% sobre a COX-2. Resultados esses relevantes, pois como é referido que a COX-2 está mais associada com os processos inflamatórios, é interessante que os extratos tenham maior seletividade para esta enzima, assim os resultados aqui obtidos demonstram também o potencial desta espécie na seletividade da COX-2.

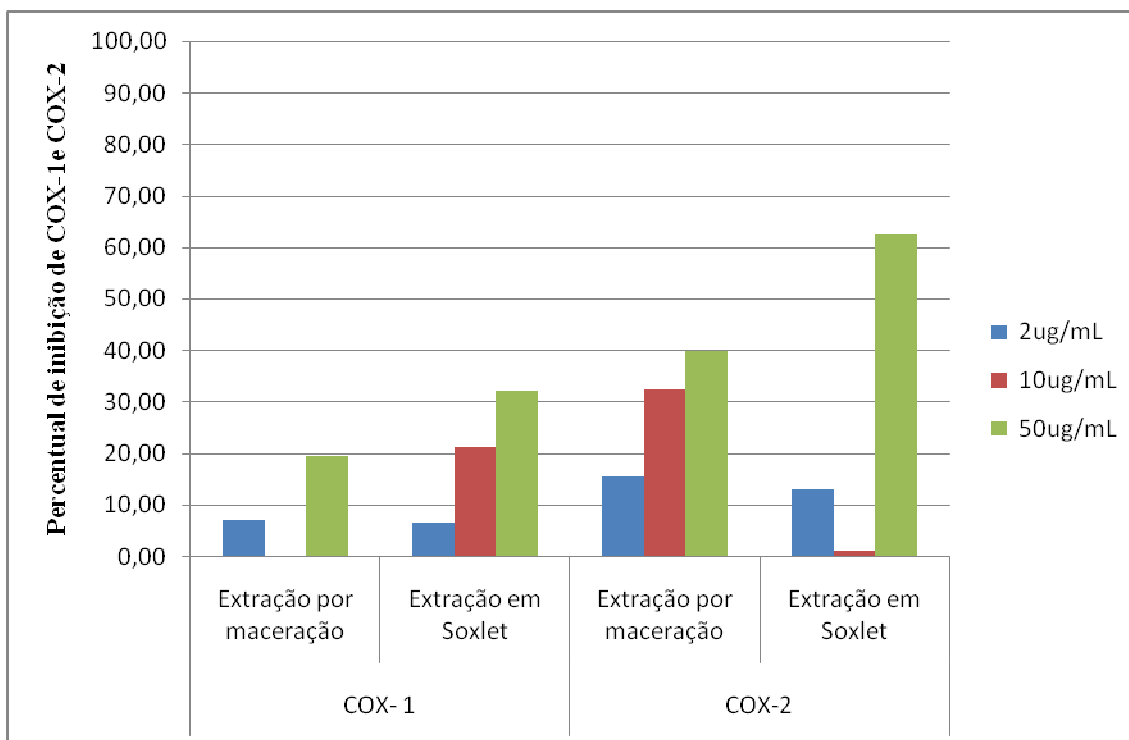


Figura 22. Percentual de inibição da ciclooxygenase-1 (COX-1) e ciclooxygenase-2 (COX-2) *in vitro*, induzido pelos extratos hidroalcoólicos das folhas de *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. (Iridaceae) obtidos por maceração e em aparelho de Soxhlet, testados nas concentrações de 2 µg/mL, 10 µg/mL e 50 µg/mL. EbMac: extrato hidroalcoólico das folhas de *Eleutherine bulbosa* obtido por maceração no hidromódulo de 1:18 (representa relação droga/ vegetal: etanol a 70% empregado neste estudo); EbSox: extrato hidroalcoólico das folhas de *Eleutherine bulbosa* obtido em aparelho de Soxhlet no hidromódulo de 1:14. As barras representam média ± S.E.M (n =5 por grupo), análise estatística realizada por *twoway ANOVA/Tukey*.

6 DISCUSSÃO

O potencial das espécies vegetais como fitoterápico e/ou fitofármaco, na perspectiva real de obtenção de novas alternativas e/ou complementos terapêuticos para as nosologias da sociedade contemporânea, é justificado pelo amplo espectro das diversas substâncias resultantes do metabolismo secundário, podendo agir por diferentes mecanismos (SIMÕES et al., 2016). Nesse sentido, a busca por compostos bioativos de origem vegetal, com ênfase aos com alta capacidade antioxidante, aumentou consideravelmente nas duas últimas décadas, principalmente devido ao seu potencial preventivo e no tratamento de doenças cardiovasculares, doenças crônicas e neurodegenerativas, a exemplo da dor neuropática, a qual tem elevada prevalência na população mundial, ocasionando decréscimo na qualidade de vida dos indivíduos e também há gastos excessivos do sistema público de saúde (GIL-CHÁVEZ et al., 2013; SCHAEFER et al., 2014).

A necessidade de garantir a sociedade, o acesso a preparações de origem vegetal com certificação de eficácia, segurança e qualidade, devem, em conjunto, estimular os estudos de validação, principalmente das espécies vegetais reconhecidas de amplo uso popular, como *Eleutherine bulbosa*, de grande ocorrência na região Amazônica onde é popularmente utilizada para diversas enfermidades (MARTINS et al. 2005; OLIVEIRA NETO et al., 2007).

Assim, o presente trabalho realizou estudo de validação das folhas da espécie *Eleutherine bulbosa*, visando definição de características farmacobotânicas como parâmetros de autenticidade da espécie; e, também, estudo químico e biológico em modelo de cialgia para roedores, para investigação do potencial terapêutico para tratamento da dor neuropática, trabalhando com extratos hidroalcoólicos obtidos por procedimentos extrativos diferentes (maceração e em aparelho de Soxhlet), dado reconhecimento da necessidade de padronização dos extratos vegetais, pois esses representam as preparações intermediárias ou acabadas mais frequentemente empregadas nas formulações fitoterápicas, sendo essencial a garantia da uniformidade da preparação vegetal, com reprodutibilidade e constância da sua qualidade, o que está diretamente relacionada a estabilidade química da matéria prima vegetal em todas as etapas operacionais, avaliada pela integridade dos constituintes químicos e/ou controle da atividade biológica (SIMÕES et al., 2016).

Migliato et al. (2011) definem que os estudos de padronização devem priorizar a avaliação dos extrativos vegetais por meio de planejamento fatorial, enfatizando a definição das

variáveis que influenciam na extração, já que essa representa a etapa fundamental na obtenção de fitoterápicos, garantindo a separação de substâncias de interesse da matriz complexa.

No estudo das variáveis que podem influenciar a extração é imprescindível a avaliação da granulometria, qualidade e quantidade de solvente, método extrativo (maceração, infusão, percolação, decocção, extração em aparelho de Soxhlet, extração em contracorrente, extração assistida por microondas, ultrassom, fluido supercrítico e turbólise), temperatura, tempo, tensão superficial e pH (FONSÊCA, 2005; TIWARI et al., 2011; SIMÕES et al., 2016).

Assim, em continuidade ao estudo de validação de *Eleutherine bulbosa* desenvolvido pelo Grupo de Produtos Naturais da UFMA, com ênfase na padronização dos extrativos das folhas da espécie, no nosso estudo utilizamos extratos obtidos por procedimento a frio (maceração) e a quente (aparelho de Soxhlet) e atividade do solvente, visando avaliar a influência dessas variáveis (procedimento extrativo e temperatura) na extração, fundamentado nos parâmetros químico e biológico em modelo de dor neuropática.

Na etapa do estudo de validação das folhas de *Eleutherine bulbosa*, em busca da definição de características farmacobotânicas como parâmetros de autenticidade, e, assim, contribuir no controle de qualidade de material vegetal de amplo uso e ocorrência, foram realizadas análises morfológica e anatômica.

Macroscopicamente foi possível verificar que as folhas são simples com média de 30 cm de comprimento x 2,5 cm de largura, pecíolo medindo 6,5 cm de comprimento, herbácea, simétrica, lanceolada, com margem inteira, ápice atenuado; base decorrente e verticilada. Características essas que corroboram aos estudos de Revilla (2001) e Revilla (2002) que definem a espécie com folhas simples, inteiras, plissadas longitudinalmente, com média de 25 cm de comprimento. Goldblatt et al. (2008) e Borges (2012) descrevem a espécie como erva perene, bulbosa, com folhas simples, laminares, paralelinérveas e bifaciais medindo aproximadamente 30 cm de comprimento. Foi possível observar, ainda, nervação paralelinérvea, superfície glabra e rugosa, com o limbo inteiro; essas características macroscópicas também foram evidenciadas em estudos realizados por Lorenzi; Matos (2002) e Baraúna; Rocha (2006); as quais são comuns em espécies de monocotiledôneas. Dessa forma, é possível observar que as características evidenciadas no exemplar em estudo condizem com as já descritas na literatura.

No estudo anatômico foi constatado que a folha apresenta mesofilo homogêneo, idioblasto contendo drusas de oxalato de cálcio; com presença de cutícula fina e lisa,

esclerênquima nos feixes vasculares, junto ao floema e apresenta estômatos nas duas faces da epiderme. A lâmina foliar em gêneros com folhas unifaciais tem feixes vasculares em duas fileiras com pólos de xilema em direção ao centro da folha. Tais características são compatíveis ao estudo de Goldblatt (2008), que também apontam esclerênquima nos pólos do floema e xilema, além de feixes vasculares presentes em duas fileiras com pólos de xilema voltados para o centro da folha. Castro (2013) em estudo local evidencia características anatômicas semelhantes ao nosso estudo.

Na análise da epiderme foi possível evidenciar a presença de estômatos em forma de halteres nas duas faces da epiderme, na epiderme inferior e superior, caracterizando uma planta anfiestomática; compatível as características do estudo de Castro (2013). Nas folhas da espécie em estudo, também foram observados raros cristais prismáticos de oxalato de cálcio. Em estudo realizado a fresco das epidermes dos catafilos de *Eleutherine plicata* foi evidenciado idioblastos com vacúolos contendo uma substância de coloração rosa, sugestiva de antocianinas em ambas as faces; enquanto no mesofilo destes catafilos foram visualizados idioblastos com cristais prismáticos de oxalato de cálcio (VIEIRA, 1992; BORGES, 2012). Em conjunto, as características macroscópicas e microscópicas evidenciadas) nesse estudo, com emprego de investigação farmacognóstica convencional, em concordância com alguns estudos já realizados com a espécie, permitem definirmos parâmetros para avaliação de autenticidade do material vegetal.

Para avaliar a influência das variáveis da extração (procedimento extrativo, quantidade de solvente e temperatura) empregadas nesse estudo, com base nos parâmetros químicos, nos extrativos das folhas de *Eleutherine bulbosa*, foram realizadas investigações fundamentadas no *screening* químico, determinação do teor de polifenóis totais, determinação do teor de flavonoides e perfil cromatográfico por cromatografia de alta eficiência (CLAE) acoplado a espectrômetro de massa (MS); bem como avaliação de rendimento nos extratos hidroalcoólico das folhas de *Eleutherine bulbosa* obtidos por maceração (EbMac) e em aparelho de Soxhlet (EbSoX)

No *screening* químico foram evidenciadas diversas classes de metabólitos secundários em ambos os extratos (alcaloides, esteroides, triterpenos, cumarinas, taninos condensados, flavanonas, flavonas, flavonóis e xantonas); resultados esses parcialmente semelhantes a outros estudos de investigação química com a espécie (ALBUQUERQUE, 1989; VIEIRA, 1991;

VIEIRA, 1992; DELGADO et al.1997; LORENZI; MATOS, 2002; SOUSA et al., 2005; ROCHA, 2006; COUTO et al., 2016; MALHEIROS, 2008).

Variação qualitativa e/ou quantitativa de constituintes químicos numa espécie pode ser relacionada a diversos fatores como a sazonalidade, índice pluviométrico, ritmo circadiano, temperatura, altitude, idade e desenvolvimento da espécie, radiação ultravioleta, nutrientes, poluição atmosférica e ação de patógenos (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Entretanto, na investigação da influência do procedimento extrativo, constatamos que há variações semi-quantitativas em função do método extrativo; com resultados mais significativos para algumas classes de metabólitos (flavanonas, taninos condensados e saponinas) no EbSox. Estudo de Couto (2012) demonstra que na avaliação da eficácia dos extratos hidroalcoólicos das folhas de *Eleutherine bulbosa* obtidos por diferentes procedimentos extrativos e hidromódulos, alguns metabólitos (flavonas, flavonóis, xantonas, flavanonas, taninos condensados e esteroides) sofrem influência dessas variáveis em relação à avaliação semi-quantitativa. Estudo de Castro (2013) também demonstra influência das variáveis da extração em *screening* químico, segundo mesma metodologia empregada no nosso estudo (MATOS, 2009).

O doseamento de compostos fenólicos e flavonoides pode ser considerado uma alternativa simples e de baixo custo para investigação de eficácia extrativa, logo para o controle de qualidade de extratos vegetais (BRITO et al., 2016).

Seguindo a metodologia descrita neste trabalho, na quantificação de compostos fenólicos os extratos EbMac e EbSox indicaram valores de 168,62 e 176,25 (mgAG)/g, respectivamente; evidenciando, assim, resultados semelhantes nos dois extratos. Estudos de Couto (2012) e Castro (2013) demonstraram resultados mais significativos nos extratos hidroalcoólicos das folhas de *Eleutherine bulbosa* obtidos em aparelho de Soxhlet em todas as relações de hidromódulos investigadas.

A quantificação de flavonoides nos extratos EbMac e EbSox indicaram valores de 24,50 e 41,65 (mgQE)/g, respectivamente; indicando, assim, resultados mais expressivos também no EbSox. Resultado também constatado nos estudos de Couto (2012) e Castro (2013).

A composição química foi investigada por cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando detector de espectrometria de massa; possibilitando identificar compostos já previamente elucidados em outros estudos (tabela 01)(SCHMID et al.,1950; HARA et al., 1997; ALVES et al., 2003; NIELSEN; WEGE, 2006; HAN et al., 2008; PARAMAPOJNA et al.,

2008; GANZERA et al., 2009; XIJING et al., 2009; GALLO et al., 2010; KUSUMA et al., 2010; PHOEM; VORAVUTHIKUNCHAI, 2012).

Comparando os resultados obtidos por CLAE-MS no EbMac e EbSox, vale destacar que foi possível identificar diferenças substanciais nos compostos encontrados nos extratos obtidos por maceração e em aparelho de Soxhlet; justificando a diferença da composição química dos extratos aos estudos propostos, a exemplo de compostos identificados apenas em EbSox, como *4,8-dihydroxy-3-methoxy-1-methylanthra-9,10-quinone-2-carboxylic acidmethylester; eleutherinol-glucoside e eleutherinoside A*.

Assim, podemos evidenciar que na maioria das metodologias de investigação química empregadas nesse estudo (*screening* químico, teor de flavonoides e perfil cromatográfico por CLAE-MS) obtivemos resultados mais expressivo em EbSox.

Na investigação do potencial analgésico dos extratos hidroalcoólico das folhas de *Eleutherine bulbosa* obtidos por maceração (EbMac) e em aparelho de Soxhlet (EbSox) sobre a dor neuropática foram realizados análises comportamentais (deambulação forçada - teste de *Rotarod*, alodínia mecânica - teste de *Von Frey* e hiperalgesia térmica - teste da placa quente), análises bioquímicas (determinação da atividade das enzimas catalase e superóxido dismutase) e ensaio *in vitro* (determinação da ciclooxigenase 1 e ciclooxigenase 2). Para esses ensaios, ambos os extratos (EbMac e EbSox) foram utilizados em dose de 50 mg/kg, empregando modelo experimental de injúria de constrição crônica (ICC) que visa avaliar uma dor neuropática de caráter mais periférico, visto que lesiona a parte sensitiva do nervo ciático, conforme descrito por Bennet e Xie (1998).

Inicialmente foi avaliada a alodinia térmica através do teste da placa quente (*hot plate*) ou hiperalgesia térmica. O teste induz respostas comportamentais de movimento do animal tais como: lambar, morder a pata ou pular, que são consideradas resposta nociceptora supraespinhal (ARAUJO, 2009).

Na avaliação da alodinia térmica indicou que no D1 após a indução da dor neuropática, o grupo tratado com EbSox apresentou uma diminuição no tempo de latência em 49,4%; o grupo SHAM em 41% e o grupo salina 42% em comparação ao grupo controle, evidenciando quadro de hiperalgesia térmica (figura 14).

Após a lesão tecidual, os nociceptores são sensibilizados e os estímulos previamente leves ou ineficazes se tornam dolorosos (VERRY et al., 2006). Assim, analisando os grupos experimentais observa-se que hiperalgesia no D1 foi devido ao recente processo cirúrgico. No

D5 de tratamento o grupo SHAM aumentou o tempo de resposta ao teste em relação ao grupo salina em 27% e o grupo tratado com EbMac e EbSox em 4%. No D10 de tratamento houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos salina e EbSox, resultando em um aumento no tempo de latência, fator indicativo de analgesia, de 86,12%.

Assim, constatamos nesse ensaio que somente o EbSox teve efeito estatisticamente significativo a partir do D10 de tratamento, sendo mantido até D15; indicando efeito antinociceptivo.

Moreira Lima (2017) em estudo de avaliação da eficácia do extrato etanólico das folhas de *Arrabidaea chica* Verlot e suas frações em modelo experimental de dor neuropática, induzida por compressão do nervo ciático em ratos, no teste de avaliação de hiperalgesia térmica comprovou que a administração do extrato aumentou significativamente o limiar de percepção da dor.

Estudo de França (2018) de avaliação do potencial farmacológico de extrato hidroalcoólico das folhas de *Persea americana* Miller, obtidos por maceração, em dose de 500 mg/kg, em modelo semelhante ao nosso estudo, também comprova que a administração do extrato aumentou o limiar de percepção da dor em ensaio de hiperalgesia térmica.

A atividade locomotora foi avaliada pelo teste de *Rotarod* demonstrando que os grupos induzidos com dor neuropática apresentaram alteração na atividade locomotora quando comparado ao grupo controle (score 5), que apresenta marcha coordenada. Os animais tratados com EbMac e EbSox apresentaram melhora do score a partir do D5 até o final do estudo (figura 15), independentemente do método de extração, demonstrando eficácia no tratamento, podendo ser comparados ao grupo tratado com gabapentina, droga padrão empregada nesse estudo; evidenciando, assim, que o tratamento com EbMac e EbSox foi eficaz na melhora da deambulação dos animais após a injúria nervosa. Essa melhora pode ser explicada pela atividade anti-inflamatória, conforme será descrito posteriormente pelos testes antioxidantes e de inibição da COX.

Estudo de Leite (2017) de avaliação da atividade antinociceptiva do óxido de rosa, monoterpeno presente em diversas espécies vegetais, com comprovadas propriedades sedativas, antinociceptivas e antidepressivas, em roedores, empregando o teste de *Rotarod*, demonstrou que o grupo tratado com o óxido de rosa (50 mg/kg) não mostrou reduções significativas no tempo de permanência da barra giratória, quando comparado ao controle, permanecendo até o final do tempo do experimento; confirmaram sua ação antinociceptiva.

Estudo de avaliação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória do extrato hidroalcoólico das folhas de *Eugenia puniceifolia* (HBK) DC., por ensaios em camundongo, empregando investigação de performance motora pelo *Rotarod*, comprovou que o grupo tratado com extrato (250 mg/kg) não demonstrou alterações no número de quedas dos animais ($2,12 \pm 0,61$) quando comparado ao grupo controle positivo, tratado com diazepam (2 mg/kg, i.p.) que apresentou expressivo aumento no número de quedas dos animais, indicando potencial efeito antinociceptivo, atribuído a presença de flavonoides (BASTING, 2012).

Na avaliação da atividade locomotora pelo teste de *Rotarod*, estudo de Moreira Lima (2017) evidenciou melhora significativa da marcha, com restabelecimento do escore padrão normal, dos animais tratados com extrato etanólico das folhas de *Arrabidaea chica*. Resultado semelhante ao obtido em estudo de França (2018) com extrato hidroalcoólico das folhas de *Persea americana* em investigação de dor neuropática por modelo semelhante ao nosso estudo.

Para avaliar a influência dos EbMac e EbSox sobre a sensibilidade nociceptiva em animais foi realizado o teste de *Von Frey* que possibilita avaliar, através do estímulo mecânico inócuo e crescente (alodínia mecânica), a sensibilidade tecidual provocada pela incisão (SILVA et al., 2013).

A sensibilização periférica faz parte da patogênese da dor neuropática devido a uma ação aumentada nos terminais de nociceptores, decorrentes da ação de neuromediadores inflamatórios, levando a chamada alodinia e hiperalgesia e, conseqüentemente, uma diminuição do limiar da dor, indução de descargas ectópicas e aumento dos canais de sódio (MAKUCH et al., 2013).

Na avaliação dos resultados do teste de *Von Frey* (alodínia mecânica), com resposta induzida pela estimulação mecânica na pata traseira dos animais, constatamos que a indução da dor neuropática foi efetiva, uma vez que, todos os grupos induzidos mostraram melhora quando comparado ao grupo controle. Os grupos tratados com EbMac e EbSox apresentaram proteção aumentando o limiar a nocicepção dos animais tratados a partir do D10, independentemente do método de extração, com efeito estatisticamente significativo quando comprado ao grupo salina. O grupo tratado com EbMac e EbSox apresentou a partir de D10 de tratamento uma melhora do limiar nociceptivo de 34,62% e 41,86%, respectivamente, quando comparado ao grupo salina (figura 19).

Estudo de Guginski (2007) com extrato etanólico de *Melissa officinalis* L. (100 mg/kg, vo) sobre a dor neuropática, avaliada em modelo de neuropatia induzida pela constrição parcial

do nervo ciático em camundongos, demonstrou ser efetivo em reduzir completamente a alodínia mecânica; atribuindo o potencial antinociceptivo, a ocorrência de ácido rosmarínico, presente em grandes quantidades no extrato.

Estudo de avaliação do efeito antinociceptivo de extrato hidroalcoólico a partir das cascas de *Citrus reticulata* Blanco, em camundongos, indicam importante ação antinociceptiva, empregando modelo fundamentado em investigação da alodinia mecânica; atividade biológica essa atribuída aos compostos fenólicos, entre os quais flavonoides, como hesperitina, nobiletina, tangeritina e naringenina (SCHNEIDER, 2014).

Estudo de Kraus (2017) de avaliação do potencial terapêutico do extrato etanólico das partes aéreas (inflorescências) de *Combretum leprosum* Mart., no modelo experimental de neuropatia periférica em camundongos, induzida pelo esmagamento do nervo ciático, comprovou que no teste da hiperalgesia mecânica (teste de *Von Frey*) foi possível verificar que a dose de 100 mg/Kg é capaz de reduzir a frequência de resposta, com redução da hiperalgesia mecânica evidente a partir do 7º dia; indicando potencial efeito antinociceptivo.

Na avaliação da alodinia mecânica, estudo de Moreira Lima (2017) evidenciou que os animais tratados com extrato etanólico das folhas de *Arrabidaea chica* apresentaram melhora, com diminuição de 48,6% na alodinia ao final do tratamento. França (2018) com extrato hidroalcoólico das folhas de *Persea americana* em investigação de dor neuropática, fundamentado na no teste de *Von Frey* comprova melhora no limiar nociceptivo em 25% no grupo tratado quando comparado ao grupo gabapentina.

Estudos demonstram que os agentes antioxidantes têm um papel determinante na dor neuropática; demonstrando que o estresse oxidativo ocasiona a alteração da homeostasia do estado redox do organismo (JAGGI, 2011). Assim, o estresse oxidativo, decorrendo do desequilíbrio entre a geração de compostos oxidantes e a atuação dos sistemas de defesa antioxidante, pode estar envolvido na patogênese da dor neuropática (NAIK et al., 2006; GUEDES, 2007; BARBOSA et al., 2010). O sistema de defesa antioxidante tem a função de inibir e/ou reduzir os danos causados pela ação deletéria dos radicais livres e/ou espécies reativas não radicais; sistema esse que, usualmente, é dividido em enzimático (superóxido dismutase, catalase e glutationala peroxidase) e não-enzimático (BARBOSA et al., 2010).

Assim, para investigar a capacidade de ativar mecanismo do sistema de defesa antioxidante, para prevenir o acúmulo de espécies reativas, com base em agentes enzimáticos,

nesse estudo investigamos o potencial de EbMac e EbSox, sobre a atividade das enzimas catalase (CAT) e superóxido dismutase (SOD).

Nesse ensaio, constatamos que nos animais tratados com EbSox houve uma redução no nível da enzima catalase de 84,62%, quando comparados ao grupo salina, sugerindo um efeito protetor.

É válido ressaltar a presença de um segundo sistema enzimático antioxidante composto pela enzima SOD, que tem a capacidade de catalisar a desmutação do radical ânion superóxido $O_2^{\cdot-}$, convertendo em oxigênio e peróxido de hidrogênio (BABIOR, 1997). Assim, a atividade da SOD foi avaliada segundo a capacidade de catalisação da reação entre o ânion superóxido e prótons resultando em peróxido de hidrogênio; com resultados demonstrando que nos animais tratados com EbSox mostrou redução significativa de 50 %, quando comparado com o grupo salina; indicando, também, efeito protetor.

Estudo de Guedes (2007) de investigação da participação de espécies ativas de oxigênio como mediadores da dor neuropática, comprovou, em modelo *in vivo*, por secção do nervo ciático em ratos, que houve redução da atividade de CAT nos animais (D3 e D7) após a cirurgia de secção do nervo ciático (denervado) e no grupo SHAM; enquanto SOD só diminuiu no grupo denervado; constatando que a estimulação noniceptiva induzida pela cirurgia de seccionamento do nervo ciático causa alterações em sistemas antioxidantes com CAT e SOD.

Moreira Lima (2017) evidenciou que as frações clorofórmica e butanólica obtidas do extrato etanólico das folhas de *Arrabidaea chica*, ocasionaram redução significativa de CAT, em 88,1%; enquanto nas frações clorofórmica, hexânica, acetato de etila e butanólica houve redução da atividade de SOD, em 85 %, 70%, 60% e 34%, respectivamente.

Na avaliação do efeito antioxidante do extrato hidroalcoólico das folhas de *Persea americana*, estudo de França (2018) comprova redução de 45% da concentração de CAT.

Estudo de avaliação da atividade antioxidante com extrato metanólico de *Eleutherine bulbosa* evidenciou atividade dose dependente (DRAGO et al., 2010). Couto (2012) constata maior potencial antioxidante no extrato hidroalcoólico das folhas de *Eleutherine bulbosa* obtido por Soxhlet na relação de hidromódulo de 1:14, demonstrando que procedimento extrativo e hidromódulo são variáveis que influenciam na atividade antioxidante dessa espécie.

Estudos evidenciam a atividade antioxidante a presença de flavonoides (CIOFFI et al., 2002; FURUSAWA et al., 2005; SUZGEÇ et al., 2005; ALVES et al., 2007) assim a atividade sobre CAT e SOD evidenciada nesse trabalho no EbSox, pode ser atribuída ao elevado teor de

polifenóis, principalmente flavonoides, os quais tiveram, resultados mais expressivos nos extratos obtidos em aparelho de Soxhlet.

Estudos referem que a relação entre a função neuroimune e a nocicepção devem ser direcionadas para a participação das citocinas quimiocinas e neurotrofinas no desenvolvimento e na manutenção das síndromes dolorosas crônicas, com ênfase na dor neuropática (VAN DE BEEK et al., 2001; ALEXANDER et al., 2005; BACKONJA et al., 2008).

As citocinas pró-inflamatórias, produzidas pelas células imunes, astroglia e microglia, na medula espinal desempenham um papel importante na patogênese da dor neuropática (OLD et al., 2015). Esses fatores iniciam uma cascata de neuroinflamação, eventos relacionados que podem manter-se e piorar a lesão original, causando dor e cronicidade (VALSECCHI et al., 2011).

A prostaglandina H₂ sintase, também conhecida como ciclooxigenase (COX), atua como efetor secundário na via metabólica da cascata do ácido araquidônico, também envolvido em processos dolorosos e inflamatórios. O ácido araquidônico é metabolizado pelas enzimas COX e originam prostaglandinas que irão desempenhar variadas funções biológicas através da ativação de receptores específicos. A COX-1 está relacionada com a manutenção da homeostase celular, enquanto que a COX-2 possui importante função na mediação da resposta inflamatória (ZHU BT., 2008; LIU et al., 2012). A inflamação além de induzir COX-2, resulta na produção de prostaglandinas (PGE) (LIU et al., 2012). A prostaglandina E₂ (PGE₂) é um fator indutor de dor, capaz de sensibilizar neurônios sensoriais primários, gerar sensibilização central e facilitar a liberação de neuropeptídeos relacionados à dor (VANEGAS; SCHAIBLE, 2001).

Os ensaios *in vitro* de inibição das COX-1 e COX-2, realizados no presente estudo, demonstraram que EbMac e EbSox, possuem potencial ação inibidora destas enzimas; com efeitos inibidores chegando até 60% para COX-2, utilizando o EbSox (figura 22).

Os resultados demonstram que percentual de inibição da COX-1, induzido pelo EbMac, não apresenta dose resposta; mas o EbSox ocasiona inibição sobre COX-1 dose dependente. Em relação ao percentual de inibição da COX-2, induzido pelo EbSox, também não apresenta um efeito dose resposta, mas o percentual de inibição da COX-2 induzido pelo EbMac, apresenta efeito dose resposta.

Ao comparar os resultados de efeito inibidor ocasionado pelo EbSox, constatamos que este apresentou melhor efeito inibidor sobre a COX-1 e COX-2; permitindo afirmamos que a

extração em aparelho de Soxhlet, favorece uma melhor extração dos princípios ativos associado à inibição da ciclooxigenase da espécie em estudo.

O resultado de EbSox sob COX-2 é relevante pois está associada aos processos inflamatórios, evidenciando que as concentrações testadas mostraram maior seletividade para esta enzima (COX-2), o que denota um potencial promissor para um fitoterápico com potencial seletivo para inibir a ciclooxigenase induzida.

França (2018) evidenciou que extrato hidroalcoólico das folhas de *Persea americana* ocasionou inibição de COX-1 e COX-2, em 60% e 76%, respectivamente; atribuindo tal efeito a presença de β -amirina, evidenciado na espécie.

O potencial terapêutico do extrato etanólico das folhas de *Arrabidaea chica* e suas frações para o tratamento de dor neuropática, comprovado pelos modelos comportamentais (avaliação da deambulação forçada - Teste de *Rotarod*, avaliação da alodínia mecânica - Teste de *Von Frey*, hiperalgesia térmica - Teste da placa quente e descarga de peso – *Weightbearing*), bioquímicas (determinação da atividade das enzimas catalase, superóxido dismutase e glutatona peroxidase) e ensaio *in vitro* (determinação de citocinas) é atribuída a presença de antocianidinas, flavonoides e triterpenos constatados no material vegetal (MOREIRA LIMA, 2017).

Em síntese podemos inferir que, fundamentado na metodologia proposta para a padronização dos extratos das folhas de *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb., com base em parâmetros químicos e biológicos; a espécie tem potencial terapêutico para tratamento da dor neuropática, o que pode ser atribuído a presença de flavonoides antraquinonas e naftoquinonas, evidenciadas nas análises de investigação química; comprovando-se, porém, resultados mais expressivos no EbSox.

A literatura refere diversos procedimentos extrativos classificados em sistema aberto ou fechado, frio ou quente, exaustivo ou não; destacando a maceração, percolação e extração em aparelho de Soxhlet como os procedimentos mais frequentemente usados (PRISTA et al., 1983; FONSECA, 2005).

Na maceração a matéria prima vegetal é acondicionada em recipiente fechado, em temperatura ambiente, durante período prolongado (horas ou dias), sob agitação ocasional e sem renovação do líquido extrator (processo estático); não conduzindo ao esgotamento da matéria prima vegetal, seja devido à saturação do líquido extrator ou ao estabelecimento de um equilíbrio difusional entre o meio extrator e o interior da célula. Este processo fica restrito

quando se trabalha com substâncias ativas pouco solúveis, plantas com elevado índice de intumescimento e possíveis proliferações microbianas (PRISTA et al., 1983; NAVARRO, 2005).

A extração em aparelho de Soxhlet é utilizada, sobretudo, para extrair sólidos com solventes voláteis, exigindo o emprego do aparelho de Soxhlet; onde em cada ciclo da operação, o material vegetal entra em contato com o solvente renovado; assim, o processamento possibilita uma extração altamente eficiente, empregando uma quantidade reduzida de solvente, em comparação com as quantidades necessárias nos outros processos extrativos, para se obter os mesmos resultados qualitativos e quantitativos (PRISTA et al., 1983 ; SIMÕES et al., 2016).

A temperatura do processo extrativo pode influenciar de maneira positiva, ocasionando aumento da solubilidade de determinado princípio ativo, diminuição da viscosidade do solvente e aumento da velocidade de difusão; justificado os processos de extração a quente serem mais rápidos do que aqueles realizados a temperatura ambiente. Mas deve ser considerado o risco do emprego indiscriminado de temperatura elevada nas extrações, dada a alteração e/ou inativação dos princípios ativos termolábeis ou termosensíveis, sendo recomendado avaliar a influência dessa variável para todas as espécies vegetais e seus farmacógenos (PRISTA et al., 1983; MIGLIATO et al., 2011; SIMÕES et al., 2016).

Assim, para garantir eficácia e segurança no uso de preparações vegetais é imprescindível os estudos de padronização dos extratos; que não deve ser restrita a avaliação e controle de qualidade da integridade química, mas, especialmente, contemplar o doseamento biológico; como empregado no nosso estudo.

7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no estudo de validação das folhas da espécie *Eleutherine bulbosa*, com ênfase aos parâmetros farmacobotânicos, químicos e biológicos em modelo de dor neuropática; visando padronizar a obtenção dos extrativos na perspectiva de maior potencial farmacológico em doença de alta prevalência mundialmente, demonstraram:

a) características macroscópicas e microscópicas das folhas da espécie, que possibilitam definição de parâmetros para avaliação de autenticidade do material vegetal, com emprego de investigação farmacognóstica convencional como: presença de idioblastos no mesofilo contendo cristais prismáticos de oxalato de cálcio e eventualmente, drusas, além de fibras esclerenquimáticas localizadas juntos aos vasos;

b) os extratos hidroalcoólicos das folhas da espécie *Eleutherine bulbosa* obtidos por maceração (EbMac) e em aparelho de Soxhlet (EbSox) apresentam importantes classes de metabólitos secundários em ambos os extratos, com expressivos teores de fenóis totais e flavonoides; evidenciando, porém, alguns resultados mais significativos no EbSox;

c) os cromatogramas obtidos por CLAE, com detecção por espectrometria de massa, detectaram vários compostos, principalmente da classe das quinonas; evidenciando que EbSox tem uma grande quantidade de compostos de média polaridade (antraquinonas) e apolares (naftoquinonas, e flavonoides);

d) os extratos apresentaram atividade antinociceptiva na dor neuropática induzida pela compressão do nervo ciático (modelo de ciatalgia), em ratos, quando administrado por via oral, durante 15 dias de tratamento, com resultados mais expressivos em EbSox;

e) os animais tratados com EbMac e EbSox reduziram as concentrações de catalase e superóxido dismutase, demonstrando efeito antioxidante na dor neuropática; bem como ocasionaram inibição da atividade de ciclooxigenase 1 (COX-1) e ciclooxigenase 2 (COX-2), com maior potencial sobre COX-2, permitindo inferir que a ação inibitória dos extratos por síntese de mediadores inflamatórios; resultados esses também melhor evidenciados em EbSox;

Em conjunto, comprovamos que o extrato hidroalcoólico das folhas de *Eleutherine bulbosa* obtido em aparelho de Soxhlet demonstrou resultados mais expressivos nas análises químicas e biológicas em modelo de dor neuropática (ação antinociceptiva e antioxidante), sugerindo tais atividades a presença de flavonoides antraquinonas e

naftoquinonas; podendo, assim, inferir melhor capacidade extrativa ao procedimento realizado em aparelho de Soxhlet, contribuindo efetivamente no estudo de padronização dessa espécie.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRANCHES, M. V. Plantas Medicinais e Fitoterápicos: abordagem teórica com ênfase em nutrição. Viscosa: A. S. SISTEMAS, 2012. 201p.

AFANAS'EV SA, LASUKOVA TV, CHERNIAVSKII AM, VECHERSKII I, Ponomarenko IV 1999. The effect of histochrome on the lipid peroxidation indices during the surgical treatment of patients with ischemic heart disease of different functional classes. *EkspKlinFarmakol*62:32-34. ok

ALBUQUERQUE, J. M. Plantas Medicinais de Uso Popular. Brasília, ABEAS/MEC, 100pp, 1989.

ALBUQUERQUE, U. P.; LUCENA, R. F. P.; ALENCAR, N. L. Métodos e técnicas para coleta de dados etnobiológicos. 2010a. In: ALBUQUERQUE, U. P.; LUCENA, R. F. P.; CUNHA, L. V. F. C. Métodos e técnicas na pesquisa etnobiológica e etnoecológica. (Org.). NUPPEEA, p.41- 64, 2010.

ALEXANDER, G.M.; VAN RIJN, M.A.; VAN HILTEN, J.J.; PERREAULT, M.J.; SCHWARTZMAN, R. J. Changes in cerebrospinal fluid levels of pro-inflammatory cytokines in CRPS. *Pain*, v. 116, p. 213-219, 2005.

ALVES, R. R. N. (eds.), *Methods and Techniques in Ethnobiology and Ethnoecology*. New York: Springer, 2014. ok

ALVES T.M.A.; SILVA A.F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T.S.M.; SMÂNIA E.F.A.; SMÂNIA, Jr.A.; ZANI, C.L. Biological screening of Brazilian medicinal plants. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 95, n.3, p. 367-373, Rio de Janeiro, 2000

ALVES, T.M.A.; KLOOS, H.; ZANI, C. L. Eleutherinone, a Novel Fungitoxic Naphthoquinone from *Eleutherine bulbosa* (Iridaceae). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v.98, n. 5, p:709-712, 2003.

ALVIM, N. A. T.; FERREIRA, M. A.; CABRAL, I. E.; ALMEIDA FILHO, A. J. O uso de plantas medicinais como recurso terapêutico: das influências da formação profissional às implicações éticas e legais de sua aplicabilidade como extensão da prática de cuidar realizada pela enfermeira. *Revista Latino-Americana de Enfermagem*, v.14, n.3, 2006.

AMARAL, F. M. M. Potencial giardicida de espécies vegetais: aspectos da etnofarmacologia e bioprospecção. João Pessoa, 346p. Tese de Doutorado, Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2007.

AMARAL, F.M.M; GUERRA, R.N.; NASCIMENTO, FRF, RIBEIRO, M.N.S., AZEVEDO, A, P, S; CASTRO, A.T.O, COUTO, C.L.L Patente 2015, BR1020150161930 Extrato hidroalcoólico de *Eleutherine bulbosa* Mill Urb e de preparações fitoterápicas para uso como terapêutica como giardicida. 06/07/2015

ANTONIO, G. D.; TESSER, C. D.; MORETTI-PIRES, R. O. Fitoterapia na atenção primária à saúde. *Revista de Saúde Pública*, v. 48, p. 541- 553, 2014.

ANWAR-BRUNI DM, HOGAN SE, SCHWARTZ DA, WILCOX CM, BRYAN RT, LENNOX JL 1996. Atovaquone is effective treatment for the symptoms of gastrointestinal microsporidiosis in HIV-1-infected patients. *AIDS* 10:619-623.

ARAGÃO, C. F. S. Desenvolvimento de metodologias analíticas para padronização de extratos de *Cissampelos sympodialis* Eichl (milona). 2002, 210f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2002.

ARAUJO NETO, V. Estudo das atividades antinociceptiva e antioxidantes de *Sideroxylon obtusifolium* (Sapotaceae) Dissertação mestrado Universidade Federal de Sergipe, 2009

ARAUJO, R. F.; ROLIM-NETO, P. J.; SOARES-SOBRINHO, J. L.; AMARAL, F. M. M.; NUNES, L. C. C. Phytomedicines: Legislation and Market in Brazil. *Revista Brasileira de Farmácia*, v.94, p.331-341, 2013.

ARAUJO, W. R. M.; SILVA, R. V.; BARROS, C. S.; AMARAL, F. M. M. Inserção da fitoterapia em unidades de saúde da família de São Luís, Maranhão: realidade, desafios e estratégias. *Revista Brasileira de Medicina de Família e Comunidade*, v. 9, p. 258-263, 2014.

AZEVEDO, C. D.; MOURA, M. A. Cultivo de plantas medicinais: guia prático. Niterói: Programa Rio Rural, 2010. 19 p.

BACKONJA, M. M.; COE, C.L.; MULLER, D.A.; Schell, K. Altered cytokine levels in the blood and cerebrospinal fluid of chronic pain patients. *Journal of Neuroimmunology*, v. 195, p.157-163, 2008.

BALBINO, E. E.; DIAS, M. F. Farmacovigilância: um passo em direção ao uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 20, p. 992 - 1000, 2010.

BALICK, M. J., COX, P. A. *Plants, people and culture: the science of ethnobotany*. New York: HPHLP, 1996.

BARAÚNA, R.A.; ROCHA, J.C.S. Avaliação fitoquímica e farmacológica do extrato aquoso de *Eleutherine plicata*. *Resumos do XVII Seminário de Iniciação Científica - UFPA*, Belém, Brasil, 2006

BASTING, R. T. Avaliação da atividade anti-inflamatória e antinociceptiva do extrato hidroalcoólico de *Eugenia punicifolia* (Kunth) DC. 2012. 101f. Universidade Estadual Paulista. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Ciências Biológicas). Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2012.

BECK, B. D. (2001). Use of Toxicology in the Regulatory Process. In Hayes, A. W. Principles and Methods of Toxicology. 4ª Edição. Estados Unidos da América. Editora Taylor & Francis, pp. 24-35

BEDNARCZUK, V.O; VERDAM, M.C.S ; MIGUEL, M.D. ; MIGUEL, O.G. Tests in vitro and in vivo used in the toxicological screening of natural products. Visão Acadêmica, v.11, n.2, 2010.

BENNETT, G. J, XIE Y.K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. Pain, v. 33, p. 87-107, 1988.

BENNETT, M. I.; ATTAL, N.; BACKONJA, M. M.; BARON, R.; BOUHASSIRA, D.; FREYNHAGEN, R.; SCHOLZ, J.; TÖLLE, T. R.; WITTCHEN, H. U.; JENSEN, T.S. Using screening tools to identify neuropathic pain. Pain, v.127, n. 3,, p.199-203, 2007.

BEN-SMITH, A. LAMMAS, D. A. & BEHNKE, J.M. Effect of oxygen radicals and differential expression of catalase and superoxide dismutase in adult Heligmosomoides polygyrus during primary infections in mice with differing response phenotypes. Parasite immunology. 2002; 119-129.

BIAZÚS, M. A. Estrutura e organização da cadeia de suprimento de insumos para fitoterápicos. 2008. 100f. Dissertação (Mestrado em Administração) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2008.

BORELLA, J. C.; RIBEIRO, N. S.; TEIXEIRA, J. C. L.; CARVALHO, D. M. A. Influência do processo extrativo nas propriedades físico-químicas dos extratos de *Calendula officinalis* L. (Asteraceae). Revista Eletrônica de Farmácia, v.9, n.2, p. 25-36, 2012.

BORGES, E. S. Estudos farmacognósticos, fitoquímicos e atividades biológicas de *Eleutherine plicata* Herb. 2012. 108f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém, Pará, 2012

BOUHASSIRA D., LANTÉRIOMINET M. ATTAL N. LAURENT B. TOUBOL C. Prevalence of chronic pain with neuropathic characteristics in the general population *Pain* 2008 jun, v 136 380-7

BOVERIS A. & CHANCE B. The mitochondrial generation of hydrogen peroxide. General properties and effect of hyperbaric oxygen, *Biochem J.* 1973 Jul;134(3):707-16.

BOWLER, C., MONTAGU, M. V., & INZE, D. Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual review of plant biology.* 1992; 43(1), 83-116

BRAGA, C. M. Histórico da utilização de plantas medicinais. 2011. 24f. Monografia (Graduação Licenciatura em Biologia à distância) - Universidade de Brasília, Brasília, 2011.

BRAGA, M.F Mapeamento de QTL *Quantitative trait loci* associados a resistência do maracujá à bacteriose Piracicaba: Escola Superior de agricultura, 2011 286p Tese (Doutorado): Piracicaba SP 2011

BRANDÃO, A. Fitoterapia, com certeza. *Pharmacia Brasileira*, n. 81, p. 22 - 28, 2011.

BRANDÃO, M. G. L. Plantas medicinais e fitoterápicos. Disponível em: <<http://www.ceplamt.org.br/wp-content/uploads/2014/02/Plantas-Medicinais-e-Fitoterapicos2009.pdf>>. Acesso em: 02 nov. 2018.

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.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 26 de 09 de março de 2014. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. Diário Oficial da União. Brasília DF, 14 maio 2014a. Disponível em: <www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 21 out. 2018.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa nº 02 de 13 de maio de 2014. Publica a “Lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado” e a “Lista de produtos tradicionais fitoterápicos de registro simplificado”. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 14 maio 2014b. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 21 out. 2018.

BRASIL. Formulário de fitoterápicos da farmacopeia brasileira. Brasília, DF, 126f. 2011a. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/hotsite/farmacopeiabrasileira/conteudo/Formulario_de_Fitoterapicos_da_Farmacopeia_Brasileira.pdf>. Acesso em: 21 out. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação sobre fitoterápicos. Brasília, 2004. Disponível em: <<http://www.cpqba.unicamp.br/plmed/docs/Resolucao%20RDC%2048%20de%2016032004.PDF>>. Acesso em: 19 nov. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2006a. Portaria ANVISA-MS nº 971, de 03 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. DOU, 2006a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. 2006b. Decreto nº 5813 de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. DOU, 2006b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução- RDC nº 18, de 3 de abril de 2013. Dispõe sobre as boas práticas de processamento e armazenamento de plantas medicinais, preparação e dispensação de produtos magistrais e oficinais de plantas medicinais e fitoterápicos em farmácias vivas no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS). Diário Oficial da União. Brasília, DF, 14 de mar. de 2013b. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 21 out. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria Interministerial nº 2.960, de 9 de dezembro de 2008. Aprova o Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos e cria o Comitê Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 10 dez. 2008b. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2008/pri2960_09_12_2008.html>. Acesso em: 21 out. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria MS/GM nº 1, de 2 de janeiro de 2015. Estabelece a Relação Nacional de Medicamentos Essenciais – RENAME 2014 no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS) por meio da atualização do elenco de medicamentos e insumos da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais - RENAME 2012. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 5 jan. 2015. Disponível em: < http://http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2015/prt0001_02_01_2015.html> Acesso em: 21 out. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria MS/GM nº 1, de 2 de janeiro de 2015. Estabelece a Relação Nacional de Medicamentos Essenciais – RENAME 2014 no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS) por meio da atualização do elenco de medicamentos e insumos da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais - RENAME 2012. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 5 jan. 2015. Disponível em: < http://http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2015/prt0001_02_01_2015.html> Acesso em: 21 out. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 886, de 20 de abril de 2010. Institui a Farmácia Viva no âmbito do Sistema Único de Saúde. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 22 abr. 2010b. Disponível

em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2010/prt0886_20_04_2010.html>.

Acesso em: 21 out. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica. Brasília: Ministério da Saúde, 2012. 154 p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria nº 971, de 3 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. Brasília, Diário Oficial da União, Brasília, DF, 4 maio 2006a. Disponível em: <<http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/pnpic.pdf>>. Acesso em: 27 fev.2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. 2009a. Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Brasília: Ministério da Saúde, 2009a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Relação Nacional de Medicamentos Essenciais: RENAME 2017 / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. – Brasília: Ministério da Saúde, 2017. 210 p.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa nº 02 de 13 de maio de 2014. Publica a “Lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado” e a “Lista de produtos tradicionais fitoterápicos de registro simplificado”. Diário Oficial da União. Brasília, DF, 14 maio 2014b

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. 2009a. Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Brasília: Ministério da Saúde, 2009a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. Relação Nacional de Medicamentos Essenciais : RENAME 2017 / Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. – Brasília : Ministério da Saúde, 2017. 210 p.

BRASILEIRO, B.G.; PIZZIOLLO V.R.; RASLAN D.S.; JAMAL, C. M.; SILVEIRA, D. Antimicrobial and cytotoxic activities screening of some Brazilian medicinal plants used in Governador Valadares district. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 42, n. 2, abr./jun., 2006.

BRATMAN, S. Guia prático de medicina alternativa: uma avaliação realista dos métodos alternativos de cura. Rio de Janeiro: Campus, 1998.

BRITO, M. C .A.; GODINHO, J. W. L. S.; FERREIRA, T. T. D.; LUZ, T. R. S. A.; LEITE, J. A. C.; MOARES, D. F. C.; AMARAL, F. M. M. Trade and quality control of medicinal plants in Brazil. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, v.8, p. 32 - 39, 2016.

BRITO, M. C. A. FARMACOVIGILÂNCIA EM FITOTERAPIA: controle de qualidade do mesocarpo de *Attalea speciosa* Mart. Ex Spreng. (babaçu). 2015. 112 p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal do Maranhão, São Luís. 2015.

BRUNING, M. C. R.; MOSEGUI, G. B. G.; VIANNA, C. M. M. A. utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu – Paraná: a visão dos profissionais de saúde. *Ciência & Saúde Coletiva*, v.17, p.2675 - 2685, 2012.

CAMPOS, S. C.; SILVA, C. G.; CAMPANA, P. R. V.; ALMEIDA, V. L. Toxicidade de espécies vegetais. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v.18, p.373-382, 2016.

CAMURÇA-VASCONCELOS, A. L. F.; MORAIS, S. M.; SANTOS, L. F. L.; ROCHA, M. F. G.; BEVILAQUA, C. M. L. Validação de plantas medicinais com atividade anti-helmíntica. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 7, n. 3, p. 97–106, 2005.

CARDOSO, C. M. Z. Manual de controle de qualidade de matérias-primas vegetais para farmácia magistral. São Paulo: Pharmabooks, 2009.148p.

CASTRO, A. T. O. *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb.: estudo farmacobotânico e padronização dos extratos na pesquisa e desenvolvimento de fitoterápicos. 2013. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Farmácia) - Universidade Federal do Maranhão, São Luis, 2013.

CAVALCANTE, P. O.; CUNHA, N. R.; MOREIRA, L. E. L.; PAULA, A.C.; COSTA, S. M. O.; CAVALCANTI, E. S. B.; MORAIS, S. M.; ALENCAR, J. E. S. 2009. Atividade anticolinesterásica de eleuterol isolado de *Eleutherine plicata* Herb. In: Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 32, 2009, Fortaleza. Anais..., Fortaleza: Sociedade Brasileira de Química, 2009.

CHABARIBERI, R, A O.; POZZI, A. C. S.; ZERAIK, M. L.; YARIWAKE, J. H. Determinação espectrométrica dos flavonóides das folhas de Maytenus (Celastraceae) e de Passiflora (Passifloraceae) e comparação com método CLAE-UV. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 19, n. 4, p. 860-864, 2009.

CHAILLOU, L. L.; HERRERA, H. A.; MAIDANA, J. F. Estudo de própolis de Santiago Del Estero, Argentina. *Ciên Tecnol Aliment*, v. 24, p. 11-15, 2004

CHALLA, S. R. Surgical animal models of neuropathic pain: pros and cons. *International Journal of Neurocience*, v. 125, n. 3, p.170 – 174, 2015.

CHEN, Z.; HUANG, H.; WANG, C.; LI, Y.; DING, J.; USHIO, S.. Honconin, a new naphthalene derivative from Hong-Cong, the rhizome of *Eleutherine americana* Merr. and Heyne (Iridaceae). Chemical and Pharmaceutical Bulletin, v.34, p. 2743–2746, 1986.

CLIVATTI, J.; SAKATA, R.K.; ISSY, A. M. Revisão sobre o uso de gabapentina para controle da dor pós-operatória. Revista Brasileira de Anestesiologia, v. 59, p. 87-98, 2009.

COLLINS, C.; BRAGA, G.; BONATO, P. Introdução aos métodos cromatográficos. 7. ed. Campinas: Ed. UNICAMP. 1997. 279p.

COLLOCA, L.; LUDMAN, T.; BOUHASSIRA, D.; BARON, R.; DICKENSON, A. H.; YARNITSKY, D.; FREEMAN, R.; TRUINI, A.; ATTAL, N.; FINNERUP, N. B.; ECCLESTON, C.; BENNETT, D. L.; DWORKIN, R.H.; RAJA, S. N. Neuropathic pain. Nature Reviews Disease Primers, v. 16, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5371025/> . Acesso em: 17 jul. 2018.

CORREA JÚNIOR, C.; LIN, C. M.; SCHEFFER, M. Cultivo de plantas medicinais, condimentares e aromáticas. Curitiba: EMATER-Paraná, 1991. 162 p.

COSTA, A.F.E. et al. Plantas medicinais utilizadas por pacientes atendidos nos ambulatórios do Hospital Universitário Walter Cantídio da Wellyson da Cunha Araújo Firmo et al. 94 Cad. Pesq., São Luís, v. 18, n. especial, dez. 2011 Universidade Federal do Ceará. Pesq. Med. Fortaleza, v. 1, n. 2, p. 20-25, 1998.

COSTA, T. N. Avaliação da toxicidade aguda e subcrônica do *Aspidosperma subincanum* (Apocynaceae) em camundongos. Goiânia, 68 p. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Universidade Federal de Goiás, 2013.

COUTO, C. L. L. *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. (Iridaceae): Estudos de revisão e padronização dos extratos na pesquisa e desenvolvimento de fitoterápico giardicida. 2012.110 p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2012.

COUTO, C. L. L.; MORAES, D. F. C.; CARTÁGENES, M. S. S.; AMARAL, F. M. M.; GUERRA, R. N. *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb.: a review study. *Journal of Medicinal Plants Research*, v.10, p. 286 - 297, 2016.

CRUZ, M. T.; ALVIM, M. N. Fitoterápicos: estudos com plantas para fins terapêutico e medicinal. Disponível em: <<http://www3.izabelahendrix.edu.br/ojs/index.php/aic/article/view/395>>. Acesso em: 05 dez. 2018.

CUNHA, T. M.; VERRI, W. A.; VIVANCOS, G. G.; MOREIRA, I. F.; REIS, S.; PARADA, C. A.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. Anelectronic pressure-meter nociception pawtest for mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 37, n. 3, p. 401 – 407, 2004.

DEL ARCO R, NARDI SNT, BASSI TG, PASCHOAL VDA. Diagnosis and medical treatment of neuropathic pain in leprosy. *Rev. Latino-Am. Enfermagem*. 2016; 24: e 2731. [Access 28/06/2018]; Available in: http://www.scielo.br/pdf/rlae/v24/pt_0104-1169-rlae-24-02731.pdf DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1518-8345.0676.2731>.

DEL CASTILLO, J.M.M.; LORENTE, M.J. (S.D.). Ensayos Clínicos con Productos Fitoterapéuticos. *Plantas Medicinales Y Fitoterapia IV*, pp. 131-136.

DELGADO, H. S.; HERRERA, J. E. H.; SIFUENTES, T. C.; RUÍZ, J. G.; DÁVILA, M. M.; ISERN, F. R. Plantas medicinales de la Amazonia peruana utilizadas por curanderos y chamanes com fines anticonceptivos. Iquitos: Instituto Peruano de Seguridad Social/Instituto de Medicina Tradicional, 1997.

DUARTE, M.C.T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. *Revista MultiCiência*, n. 7, 2006.

DUKE JA, VASQUEZ R 1994. *Amazonian ethnobotanical dictionary*. London: Boca Raton/Ann Arbor/ CRC.

DRAGO, B. C.; MATSUMURA, L. Y. R.; SILVA, R. M. G. Avaliação antioxidante de extratos e frações de *Eleutherine bulbosa* Mill por meio de seqüestro do radical DPPH e do efeito quelante do íon ferro. In: XXII Congresso de Inovação Científica – UNEP, 2010. São Paulo.

ELDIN, S.; DUNFORD, A. Fitoterapia na atenção primária à saúde. São Paulo: Editora Manole Ltda, 2001. 163p.

FALKENBERG, M. B.; SANTOS, R. I.; SIMÕES, C. M. O. Introdução a fitoquímica experimental. In: SIMÕES, C.O.M.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS: Florianópolis: Editora da UFSC, 2004. p.163-179.

FARIAS, M. R. Avaliação da qualidade de materias-primas vegetais. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia da planta ao medicamento. 6. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, p. 263-288, 2010.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 5.ed. Brasília: Anvisa. 2010.

FATIMA, N.; NAYEEM, N. Toxic effects as a result of herbal medicine intake. Disponível em: <<https://cdn.intechopen.com/pdfs/51762.pdf>>. Acesso em 23 jul. 2017.

FERNANDES, C. P. M.; FÉLIX, S.R.; NOBRE, M. O. Toxicidade dos fitoterápicos de interesse do SUS: uma revisão. Semina: Ciências Biológicas e da Saúde, v. 37, p. 83-96, 2016.

FERREIRA, T. T. D. Estudo etnofarmacológico de espécies vegetais empregadas em crianças no município de São Luís, Maranhão, Brasil. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2018.

FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; SOUSA, I. M. O.; RODRIGUES, R. A. F. Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: um modelo multidisciplinar . Disponível em: <http://www.multiciencia.unicamp.br/artigos_07/a_04_7.pdf>. Acesso em: 06 dez. 2017.

FONSÊCA, S.G.C. Farmacotécnica de Fitoterápicos. Laboratório de Farmacotécnica. Departamento de Farmácia, 2005, 64 p.

FRANÇA, L.G Avaliação Pré-clínica de *Persea americana* Miller : caracterização química, toxicidade e potencial farmacológico na modulação da dor neuropática em ratos Tese Doutorado RENORBIO- UFMA, 2018

FREITAS, A. Estrutura de mercado do segmento de fitoterápicos no contexto atual da indústria farmacêutica brasileira. Brasília: Ministério da Saúde, 2007. 28p.

GABAPENTINA Prati-Donaduzzi. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=27896352016&pIdAnexo=4214010>. Acesso em: 22 jan 2019.

GALLO, F. R.; PALAZZINO, G.; FEDERICI, E.; IURILLI, R.; GALEFFI, C.; CHIFUNDERA, K.; NICOLETTI, M. Polyketides from *Eleutherine bulbosa*. Natural Product Research, v. 24, p. 1578 - 1586, 2010.

GANZERA, M.; NISCHANG, I.; SIEGL, C.; SENZENBERGER, B.; SVEC, F.; STUPPNER, H. Application of MEKC and monolithic CEC for the analysis of bioactive naphthoquinones in *Eleutherine americana*. Electrophoresis, v.30, p. 3757–3763, 2009.

Giannopolitis, C.N. and Ries, S.K. (1977) Superoxide Dismutases I. Occurrence in Higher Plants. *Plant Physiology*, 59, 309-314

GILLIN F.D., REINER D.S., SUFFNESS M. Bruceantin, a potent amoebicide from a plant, *Brucea antidysenterica*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 22, p. 342-345, 1982.

GIL-CHÁVEZ, G.J. et al. Technologies for extraction and production of bioactive compounds to be used as nutraceutical and food ingredients: an overview. *Reviews In Food Science And Food Safety*, v.12, n.1, p.5–23, 2013)

GILRON I.; BARON R. JENSEN T. Neuropathic pain: principles of diagnosis and treatment *Mayo clinic proc* v 90 n 4 p 532-545, 2015

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*, v.30, p.374 - 381, 2007.

GODINHO, J. W. L. Atenção Farmacêutica em Fitoterapia: avaliação da comercialização e controle de qualidade de produtos a base de folhas de *Passiflora* spp. adquiridos em farmácias no município de São Luís, Maranhão, Brasil. São Luís: Universidade Federal do Maranhão, 2014, 27p. (Monografia (Graduação) – Curso de Farmácia) -Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2014.

GODINHO, J. W. L. S. Estudo de validação de *Attalea speciosa* Mart. ex. Spreng: aspectos da etnofarmacologia e química. 2017. 132 p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal do Maranhão, São Luís. 2017.

GOLDBLATT, P.; RODRIGUEZ, A.; POWEL, M.P.; DAVIES, T.J.; MANNING, J.C.; VAN DER BAN, K.M.; SAVOLAINEN, V. Iridaceae “out of Australasia”? Phylogeny, biogeography, and divergence time based on plastid DNA sequences. *Systematic Botany*, v. 33, n. 3, p. 495-508, 2008.

GONÇALVES, M. C. FARMACOVIGILÂNCIA EM FITOTERAPIA: comércio e controle de produtos vegetais adquiridos em estabelecimentos farmacêuticos no município de São Luís, estado do Maranhão. 2016. 117 p. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) – Universidade Federal do Maranhão, São Luís. 2016.

GUEDES, R. Efeito da secção do nervo ciático, como modelo de dor neuropática, sobre marcadores de estresse oxidativo e defesas antioxidantes na medula espinal de ratos. 2007. 114f. Tese (Programa de Pós Graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

GRISWOLD, D.E.; ADAMS, J.L. Constitutive cyclooxygenase (COX-1) and inducible cyclooxygenase (COX-2): rationale for selective inhibition and progress to date. *Research Veterinary*, v.16, p. 181-206, 1996.

GURIB-FAKIM, A. Medicinal plants: traditions of yesterday. *Molecular Aspect of Medicine*, n. 27, p. 1-93, 2006.

GUGINSKI, G. Análise das propriedades farmacológicas do extrato etanólico de *Melissa officinalis* L. Florianópolis, 2007. 110 p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina.

HAN, A.R.; MIN, H.Y.; NAM, J. W.; LEE, N. Y.; WIRYAWAN, A.; SUPRAPTO, W.; LEE, S.K.; LEE, K. R.; SEO, E. K. Identification of a new naphthalene and Its derivatives from the bulb of *Eleutherine americana* with inhibitory activity on lipopolysaccharide-induced nitric oxide production. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v. 56, p.1314-1316, 2008.

HARA, H.; MARUYAMA, N. ; YAMASHITA, S. ; HAYASHI, Y. ; LEE, K. H. ; BASTOW, K.F. ; CHAIRUL, M. R. ; IMAKURA, Y. ; Elecanacin, a novel new naphthoquinon from the bulb of *Eleutherine americana*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, v.45, p. 1714-1716, 1997.

HELFAND, W.H.; COWEN, D.L. Pharmacyan illustrated history. New York: Harry N. Abrams, 1990.

HINZ, B and Brune, K Cyclooxygenase-2 10 yars later J. Pharmacol Exp Ther 300 (2), 367-375,2001

HORST, Andrea Efeito da N-acetilcisteína sobre proteínas de sinalização e parâmetros oxidativos em medula espinal de ratos com dor neuropática Tese doutorado Programa de pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2017

IBIAPINA, W. V.; LEITÃO, B. P.; BATISTA, M. M.; PINTO, D. S. Inserção da Fitoterapia na Atenção Primária aos Usuários do SUS. Revista de Ciências da Saúde Nova Esperança, v. 12, p. 58 - 68. 2014.

IEYAMA, T.; GUNAWAN-PUTERI, M.D.P.T.; KAWABATA, J. a-Glucosidase inhibitors from the bulb of *Eleutherine americana*, Food Chemistry, v.128, p. 308–311, 2011.

IFESAN, B.O.T.; VORAVUTHIKUNCHAI, S.P. Effect of *Eleutherine americana*Merr. extract on enzymatic activity and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus* in broth and cooked pork, Foodborne Pathogens and Disease, v. 6, n. 6, 2009.

INSANUA, M.; KUSMARDIYANIA, S.; HARTATIA, R. Recent studies on phytochemicals and pharmacological effects of *Eleutherine Americana* Merr. Procedia Chemistry, v. 13, p. 221 - 228, 2014.

JAGGI, A.S; JAIN, V.; SIGH, N. Animal models of neuropathic pain Fundam Clin Pharmacol v 25 p 1-28, 2011

JENSEN, T. S. Anticonvulsants in neuropathic pain: rationale and clinical evidence. European Journal of Pain, v. 6, suppl. A, p. 61-68, 2002.

JINZHONG, X. ; FENG, Q. ; WENJUAN, D. ; GEXIA, Q. ; NAILI, W. ; XINSHENG, Y. 2006. New bioactive constituents from *Eleutherin eamericana*. Chinese Journal of Chemistry, v. 26, p. 320-323, 2006.

JOÃO, J. W. S. Reflexões sobre o uso racional de medicamentos. Pharmacia Brasileira, v.78, p. 15 - 16, 2010.

JOHNSON T 1999. *CRC Ethnobotany Desk Reference*. New York: CRC Press.

KALFF, K.M. Pre-treatment with capsain in a rat osteoarthritis models reduces the symptoms of pain and bone damage induced by monosodium iodoacetate. Eur J. Pharmacol n 641 p 108-113, 2010

KEW.org. *Royal Botanic Gardens*. <http://www.kew.org/>, acesso em maio 2018

KING, E.L. AND ALTMAN, C. (1956) A Schematic Method of Deriving the Rate Laws for Enzyme-Catalyzed Reactions. The Journal of Physical Chemistry, 60, 1373-1378. <http://biokin.com/king-altman/index.html> <http://dx.doi.org/10.1021/j150544a010>

KHAFAGI, I.K., DEWEDAR, A. The efficiency of random versus ethno-directed research in the evaluation of Sinai medicinal plants for bioactive compounds. Journal of Ethnopharmacology, v. 71, p. 365 - 376, 2000.

KLEIN, T.; LONGHINI, R.; BRUSCHI, M. L.; MELLO, J. C. P. Fitoterápicos: um mercado promissor. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, v.30, p.241-248, 2009.

KOMURA, H.; MIZUKAWA, K.; MINAKATA, H.; HUANG, H.; QIN, G. New anthraquinones from *Eleutherine americana*. Chemical and Pharmaceutical. Bulletin, v. 31, p. 4206-4208, 1983.

KRAUS, J. E. & ARDUIN, M. 1997. Manual básico de métodos em morfologia vegetal, EDUR, Seropédica, 198 p. MAUSETH, J. D. 1991

KRAUS, S. I. Potencial terapêutico do extrato etanólico de *Combretum leprosum* no modelo experimental de neuropatia periférica camundongos. 2017. 72 f. Universidade Federal de Santa Catarina. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em Ciências Biológicas). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

KRISHNAN, A.V Oxaliplatin: induced neurotoxicity and development of neuropathy Muscle nerve v 32 p 51-60, 2005

KUMMER CL, COELHO TCRB. Antiinflamatórios não esteróides inibidores da ciclooxigenase-2 (COX-2): aspectos atuais. Rev Bras Anesthesiol 2002;52:498-512

KUNLE, O. F.; EGHAREVBA, H. O.; AHMADU, P. O. Standardization of herbal medicines - A review. International Journal of Biodiversity and Conservation, v. 4, n. 3, p. 101 - 112, 2012.

KUNTORINI EM, NUGROHO LH 2010. Structural development and bioactive content of red bulb plant (*Eleutherine americana*); a traditional medicines for local Kalimantan people. *Biodiversitas*11(2): 102-106.

KUSUMA, I. W.; ARUNG, E.T.; ROSAMAH, E.; PURWATININGSIH, S.; KUSPRADINI, H.; SYAFRIZAL, A. J.; KIM, Y. U.; SHIMIZU, K. Antidermatophyte and antimelanogenesis compound from *Eleutherine americana* grown in Indonesia. Journal Natural Medicine, v. 64, n. 2, p. 223-226, 2010.

LEITE, L. C. T. F. Avaliação da atividade antinociceptiva do óxido de rosa em roedores. 2017. 105f. Universidade Federal do Piauí. Tese (Doutorado em Farmacologia) – Universidade Federal do Piauí, Teresina, 2017.

LEUNG, L.; CAHILL C.M. THF-alpha and neuropathic pain - a review. *J Neuroinflammation*, London, v. 7, n. 27, p. 1-11, 2010

LIN J, PUCKREE T, MVELASE TP 2002. Anti-diarroal evaluation of some medicinal plants used by Zulu tradicional healer. *Journal of ethnofarmacology* 79(1):53.

LIU, T.; GAO, Y. J.; JI, R. R. Emerging role of Toll-like receptors in the control of pain and itch. *Neuroscience Bulletin*, v. 28, p. 131 - 144, 2012.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa: Plantarum, 2002. 512p.

MACIEL, M. A.; PINTO, A. C.; VEIGA J. R.; GRYNBERG, N.F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*, v.25, p.429 - 438, 2002.

MAKUCH, W.; MIKA, J.; ROJEWSKA, E.; ZYCHOWSKA, M.; PRZEWLOCKA, B. Effects of selective and non-selective inhibitors of nitric oxide synthase on morphine - and endomorphin-1-induced analgesia in acute and neuropathic pain in rats. *Neuropharmacology*, v. 75, p. 445-457, 2013.

MAHABUSARAKAM, W.; HEMTASIN, C.; CHAKTHONG, S.; VORAVUTHIKUNCHAI, S.P.; OLAWUMI, I.B. Naphthoquinones, Anthraquinones and Naphthalene Derivatives from the Bulbs of *Eleutherine americana*. *Planta Medica*, v, 76, p. 345-349, 2010.

MALHEIROS, L. C. S. Isoeleuterol e isoeleuterina: potenciais marcadores químicos da tintura de *Eleutherine plicata* Herb.(Iridaceae) e atividades microbiológica e antioxidante. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Pará, Belém, 2008.

MALTA, D.C.; SANTOS, M. A. S.; STOPA, S.R.; VIEIRA, J. E. B.; MELO, E. A.; REIS, A. A. C. A Cobertura da Estratégia de Saúde da Família (ESF) no Brasil, segundo a Pesquisa Nacional de Saúde, 2013. *Ciências &Saúde Coletiva*, v. 21, p. 327 - 338, 2016.

MARTINS, E. L. P; BRANDÃO, M. G. L. Qualidade de amostras comerciais preparadas com *Aesculus hippocastanum* L. (castanha-da-Índia). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.16, n.2,p. 224-229, Abr./Jun. 2006.

MARTINS, P. M. Influência de parâmetros de secagem e armazenamento sobre princípios ativos do guaco e calêndula. Campos dos Goytacazes, 128p. Tese (Doutorado em Produção Vegetal). Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2005.

MARTINS, P. M. Processamento de plantas medicinais. Disponível em: <http://www.sgc.goias.gov.br/upload/links/arq_251_arquivoA22.pdf>. Acesso em 04 nov. 2017.

MATOS, F. J. A. Introdução à Fitoquímica Experimental. 3. ed. Fortaleza: Edições UFC, 2009. 148p.

MATOS, F. J. A. Plantas medicinais: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste no Brasil. 3. ed. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2007.

MATSUCHITA, H. L. P.; MATSUCHITA, A. S .P. A Contextualização da Fitoterapia na Saúde Pública. *UNICIÊNCIAS*, v.19, n.1, p.86-92, 2015.

MAZZARDO-MARTINS, L. et al. Glycogen synthase kinase 3-specific inhibitor AR-A014418 decreases neuropathic pain in mice: evidence for the mechanisms of action. *Neuroscience*, v. 226, n. 13, p. 411-420, 2012.

MENEZES T.O.A.; ALVES A.C.B.A.; VIEIRA J.M.S.; MENEZES S.A.F., ALVES B.P.; MENDONÇA L.C.V. Avaliação in vitro da atividade antifúngica de óleos essenciais e extratos de plantas da região amazônica sobre cepa de *Candida albicans*. Revista de Odontologia da UNESP ; v.38(3), p. 184-91, 2009.

MERSKEY, H. AND BOGDUK, N. Classification of Chronic Pain. 2nd Edition, IASP Task Force on Taxonomy. IASP Press, Seattle, 1994

MIGLIATO, K. F.; CORRÊA, M. A.; SALGADO, H. R. N.; TOGNOLLI, J. O.; SACRAMENTO, L. V. S.; MELLO, J. C. P.; GIANNINI, M. J. S. M.; ALMEIDA, A. M. F.; PIZZOLITTO, A. C. Planejamento experimental na otimização da extração dos frutos de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. Química Nova, v.34, n.4, p. 695-699, 2011.

MOREIRA LIMA, F.C.V Efeito de *Arrabidaea chica* Verlot na dor neuropática pós traumática em ratos p 79f Tese doutorado em Biotecnologia Programa de pós graduação em Biotecnologia, Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO/CCBS) UFMA, 2017

MORAIS VIEIRA, 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 p. 239-51, 2012

MOREIRA, D. L.; TEIXEIRA, S. S.; MONTEIRO, M. H. D.; DE-OLIVEIRA, A. C.C. A. X.; PAUMGARTTEN F. J. R. Traditional use and safety of herbal medicines. Revista Brasileira de Farmacognosia, Curitiba, v. 24, n. 2, p. 248-257, 2014 .

MORETTI, P. C. R.; NASCIMENTO, F. R. F.; NEIVA, V. A.; SANTOS, G. M. C.; REIS, A. S.; RIBEIRO, M. N. S.; AMARAL, F. M. M. Padronização dos extratos de *Stachytarpheta yennensis*(Rich.) Vahl. na pesquisa e desenvolvimento de fitoterápicos giardicidas. In: JORNADA DE PARASITOLOGIA E MEDICINA TROPICAL DO MARANHÃO, 21, 2010, São Luís. Resumos da XXI Jornada de Parasitologia e Medicina Tropical do Maranhão. São Luís: EDUFMA, 2010.

NAIK, A.K.; TANDAN, S.K.; DUDHGAONKAR, S.P.; JADHAV, S.H.; KATARIA, M.; PRAKASH, V.R.; KUMAR, D. Role of oxidative stress in pathophysiology of peripheral neuropathy and modulation by N-acetyl-L-cysteine in rats. *European Journal of Pain*, v. 10, , p. 573–579, 2006.

NASCIMENTO, M. S.; VIEIRA, J. M. S.; MALHEIROS, L. C. S.; JUNIOR, J. O. C. S.; RODRIGUES, L. C. S.; BARBOSA, W. L. R. Characterisation of isoeleutherine in aqueous extract of *Eleutherine plicata* Herb., iridaceae, active against *entamoeba histolytica/ entamoeba dispar in-vitro*. *International journal of pharmaceutical sciences and research*, v.3, n. 4, p. 1096-1100, 2012.

NAVARRO, D. F. Estudo Químico, Biológico e Farmacológico das espécies *Allamanda blanchettii* *Allamanda schottii*na obtenção de moléculas bioativas de potencial terapêutico. 2005. 293f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2005.

NEIVA, V. A.; RIBEIRO, M. N. S.; CARTAGENES, M. S. S.; COUTINHO-MORAES, D. F.; NASCIMENTO, F. R.; REIS, A. S.; AMARAL, F. M. M. Estudos Pré-clínicos de atividade giardicida de *Chenopodium ambrosioides* L. e a padronização dos extratos na pesquisa e desenvolvimento de fitoterápicos. *Revista de Ciências da Saúde (São Luis)*, v. 13, p. 155-165, 2011

NEIVA, V. A.; RIBEIRO, M.N.S.; NASCIMENTO, F.R.F.; CARTAGENES, M.S.S.; MOARES, D.F.C.; AMARAL, F. M. M. Plant species used in giardiasis treatment: ethnopharmacology and *in vitro* evaluation of anti-*Giardia* activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.24, p. 215-224, 2014.

NETTO, E.M.1; SHUQAIR, N.S.M.S.A.Q.1; BALBINO, E.E.1; CARVALHO, A.C.B. Comentários sobre o Registro de Fitoterápicos New bioactive constituents from *Eleutherine americana*. *Chinese Journal of Chemistry*, v. 26, p. 320-323, 2006

NIELSEN, L. B.; WEGE, D. The enantioselective synthesis of elecanacin through an intramolecular naphthoquinone-vinyl ether photochemical cycloaddition. *Organic Biomolecular Chemistry*, v. 4, p.868-876, 2006.

NOLDIN, V.F.; FILHO, V.C.; MONACHE, F.D.; BENASSI, J.C.; CHRISTMANN, I.L.; PEDROSA, C.P.; YUNES, R.A. Composição química e atividades biológicas das folhas de *Cynarascolymus* L. (alcachofra) cultivada no Brasil. *Química Nova*, v. 26, n. 3, p.331-334, 2003.

OLD, E. A.; CLARK, A.K.; MALCANGIO, M., The role of glia in the spinal cord in neuropathic and inflammatory pain. *Handbook of Experimental Pharmacology*, v.227, p. 145–170, 2015.

OLIVEIRA JÚNIOR, J. O.; PORTELLA JUNIOR, C. S. A.; COHEN, C. P. Inflammatory mediators of neuropathic pain. *Revista Dor*, v. 17, suppl 1, p. S35-42, 2016.

OLIVEIRA, D. R.; LEITÃO, G.G.; COELHO, T.S.; SILVA, P.E.A.; LOURENÇO, M.C.S.; LEITÃO, S.G., Ethnopharmacological versus random plant selection methods for the evaluation of the antimycobacterial activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 21, 793-806, 2011.

OLIVEIRA, F. C.; ALBUQUERQUE, U. P.; FONSECA-KRUELV, V. S.; HANAZAKI, N. Avanços nas pesquisas etnobotânicas no Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, v.23, n.2, p.590-605, 2009.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M. K. *Farmacognosia – Identificação de drogas vegetais*. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 436p, 2014..

OLIVEIRA NETO A.R., PINTO M.A., SILVA I.R., MORAES S.C., GOMES M.L. O uso de *Eleutherine plicata* no tratamento de doenças gastrointestinais na Amazônia paraense. *VIII Congresso de Ecologia do Brasil*. Caxambu, Brasil, 2007

PADHI, S.; PANDA, K. Antibacterial activity of *Eleutherinebulbosa* against multidrug-resistant bacteria Laxmipriya. *Journal of Acute Medicine*, v. 5, p. 53 – 61, 2015.

PANIZZA, S. T.; VEIGA, R. S.; ALMEIDA M. C. Uso tradicional de plantas medicinais e fitoterápicos. São Luís: Conbrafito, 2012. 267 p.

PAPICH, M. G. Principles of analgesic drug therapy. *Seminar Veterinary Medicin Surgery* v.12, p. 80-93, 1997.

PARAMAPOJNA, S.; GANZERAB, M.; GRITSANAPANA, W.; STUPPNERB, H. Analysis of naphthoquinone derivatives in the Asian medicinal plant *Eleutherineamericanaby* RP-HPLC and LC–MS. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v.47, p. 990-993, 2008.

PHOEM, A. N.; VORAVUTHIKUNCHAI, S. P. Growth Stimulation/Inhibition Effect of Medicinal Plants on Human Intestinal Microbiota. *Food Science and Biotechnology*, v. 2, n. 3, p.739-745, 2012.

PINTO, W. B. V. R.; KO, G. M. Teste de Rotarod: contribuições no estudo das doenças neuromusculares, das síndromes extrapiramidais e das ataxias cerebelares. *RESBCAL*, v.1 n.2, p. 202-212, 2012.

POSSO, I. P.; ARAÚJO, C. C.; VIEIRA, E. B. M. Epidemiologyofneuropathicpain. *Revista Dor*, v. 17, p. S11-14, 2016.

PRISTA, L. N.; MORGADO, R. M. R. Técnica Farmacêutica e Farmácia Galênica. 3. ed. Gráfica Maia Lopes, Lda. Porto, 1983.1321p.

PROJETO: “Extrativismo não-madeireiro e desenvolvimento sustentável na Amazônia (ITTO – PD 31/99 Rev. 3 (I)”. ittorolac.org/enciclopedia-botanica/Iridaceae/eleutherine.../download, acesso em janeiro de 2019 *Química Nova*, v.28, p.519 - 528, 2005.

REEVES, G.; CHASE, M. W.; GOLDBLATT, P.; RUDALL, P.; FAY, M. F.; COX, A. V.; LEJEUNE, B.; CHIES, T. S. Molecular systematics of Iridaceae: Evidence from four plastid DNA regions. *American Journal of Botany*, v.88, n.11, p.2074–2087, 2001

RENAME 2012. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 5 jan. 2015. Disponível em: <http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2015/prt0001_02_01_2015.html<<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 21 out. 2017. Estabelece a Relação Nacional de Medicamentos Essenciais – RENAME 2014 no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS) por meio da atualização do elenco de medicamentos e insumos da Relação Nacional de Medicamentos Essenciais

REVILLA J 2001. *Plantas da Amazônia: oportunidades econômicas e sustentáveis*. Manaus: SEBRAE-AM/INPA.

REVILLA J 2002a. *Plantas úteis da Bacia Amazônica*. Manaus: INPA/SEBRAE. v.1.

REVILLA J 2002b. *Apontamentos para a cosmética amazônica*. Manaus: SEBRAEAM/INPA.

ROCHA, F. A. G.; ARAÚJO, M. F. F.; COSTA, N. D. L.; SILVA, R. P. O uso terapêutico da flora na história mundial. *HOLOS*, v. 1, p. 49 - 61, 2015.

ROCHA, J.C.S.; BARAÚNA, R.A. Avaliação fitoquímica e farmacológica do extrato aquoso de *Eleutherine plicata*. In: XVII Seminário de Iniciação Científica - UFPA, 2006. Belém. Livro de Resumos do XVII Seminário de Iniciação Científica – UFPA. Belém: Universidade Federal do Pará, 2006.

RODRIGUES, A. G.; SIMONI, C.; MACHADO, G. N. As plantas medicinais e fitoterapia no contexto da atenção básica/Estratégia Saúde da Família. In: Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica – Brasília: Ministério da Saúde, 2012. p. 26 -35.

RODRIGUES, V. G. S. Cultivo, uso e manipulação de plantas medicinais. Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2004. 25p.

ROWLAND LP, PEDLEY TA. Tratado de Neurologia do Merritt. 13a. Edição, Editora ... Edição, Editora Manole, 2011

SA'RONI, P.; NURENDAH, A. Penelitanefek anti inflamasibeberapatanamanobatpadatikusputih. In: Konggres Biologi Nasional VIII , 1987, Purwokerto . Review KonggresBiologi Nasional VIII , Purwokerto, 1987

SALVEMINI, D, LITTLE J.W, DOYLE, T., NEUMANN W. Roles of reactive oxygen and nitrogen specieis of pain Free Radical Biology & Medicine v 51 p 951-966, 2011

SARALAMP P, CHUAKUL W, TEMSIRIRIRKKUL R, CLAYTON T 1996. Medicinal Plants in Thailand. *Amarin Printing and Publishing*, 2009

SCHAEFER, C.; SADOSKY, A.; MANN, R.; DANIEL, S.;PARSONS, B.; TUCHMAN, M.; ANSCHEL, A.; STACEY,B.R.; NALAMACHU, S.;NIESHOFF, E. Pain severity and the economic burden of neuropathic pain in the United States: BEAT Neuropathic Pain Observational Study. *Clinico Economics & Outcomes Research*, v. 6, p. 483 - 96. 2014.

SCHMID, H.; MEIJER, T. M.; EBNOTHER, A. Uber die Konstitution des Eleutherols. (Inhaltsstoffe aus *Eleutherine bulbosa* (Mill.) Urb. I. II. *Helvetica Chimica Acta*, v. 33, p. 595-613, 1950.

SCHNEIDER, A. C. A. Avaliação da atividade antinociceptiva e antiartrítica de extrato bruto hidroalcoólico de *Citrus reticulata* (ponkan) em camundongos. 2014. 73 f. Universidade do Sul de Santa Catarina. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Universidade do Sul de Santa Catarina, Tubarão, 2014.

SCHULTES RE, RAFFAUF RF 1990. The healing forest. medicinal and toxic plants of the northwest amazonia. *Dioscorides Press* :218-219

SHIBUYA H, FUKUSHIMA T, OHASHI K, NAKAMURA A, RISWAN S, KITAGAWA I 1997. Chemical and Pharmaceutical. *Bulletin*45:1130-1134.

SILVA, J. C.; SARAIVA, S. R. G. L.; OLIVEIRA JÚNIOR, R. G.; ALMEIDA, J. R. G. S. Modelos experimentais para avaliação da atividade antinociceptiva de produtos naturais: uma revisão. *Revista Brasileira de Farmácia*, v. 94, p. 18-23, 2013.

SILVA, M. I. G.; GONDIM, A. P. S.; NUNES, I. F. S.; SOUSA, F. C. F. Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE). *Revista Brasileira de Farmacognosia*. João Pessoa, v.16, p. 455 - 462, 2006.

SILVERSTEIN, R. G.; BRASSLER, G. C.; MORRIL, T. C. Spectrometric identification of organic compounds. 6. ed. New York: John Wiley and Sons. 2002. 419p.

SIMÕES, C. O. M.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS: Florianópolis: Editora da UFSC, 2010. 1104p.

SIXEL, P. J.; PECINALLI, N. R. Características farmacológicas Gerais das plantas medicinais. *Infarma*, v.16, nº 13-14, 2005.

SLOMP JUNIOR, H.; SACRAMENTO, H. T. Atenção à saúde com plantas medicinais e fitoterapia. In: Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica – Brasília: Ministério da Saúde, 2012. p. 52 - 70.

SONG, S-H.; MIN, H-Y.; HAN, A-R.; NAM, J-H.; SEO, E-K.; PARK, S.W.; LEE, S. H.; LEE, S. K. Suppression of inducible nitric oxide synthase by (-)-isoeleutherin from the bulbs of *Eleutherine americana* through the regulation of NF- κ B activity. *International Immunopharmacology*, v.9, p. 298–302, 2009.

SOUSA, R. S. M. A disfunção redox espinhal na dor neuropática. 2012. 71f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímica em Saúde) - Instituto Politécnico do Porto, Porto, 2012.

SOUSA, S. M.; FARIAS, J.C.; COSTA, G. C.; CARVALHO JUNIOR, P. S.; Silva, L. A.; GONCALVES, J. R. S.; PRADO, M. S. A. Análise fitoquímica de folhas e caule de *Eleutherine plicata* Herb. In: XX Reunião Anual da Federação de Sociedades de Biologia Experimental-FeSBE, 2005, Águas de Lindóias - SP. Federação de Sociedades de Biologia Experimental, 2005. v. 19.

SOUZA, L. S.; COMARELLA, L. Comparação da eficácia e segurança da gabapentina no tratamento da dor na síndrome de Guillain-Barré. *Revista Saúde e Desenvolvimento*, v.5, p. 198 – 208, 2014.

STARFIELD, B. Atenção primária: equilíbrio entre necessidades de saúde, serviços e tecnologia. Brasília: UNESCO; Ministério da Saúde, 2002. 726 p.

SUCHER, N.J.; CARLES, MC. Genome-Based Approaches to the Authentication of Medicinal Plants. *Planta Medica*, v. 74, n. 6, p. 603 - 623, 2008.

TIMBRELL, J. A. (2009). Principles of Biochemistry Toxicology. 4ª Edição. Nova Iorque. Editora Informa Heathcare. pp.12-14

TIWARI P, KUMAR B, KAUR M, KAUR G, KAUR H . Phytochemical screening and extraction: A review. International e Pharmaceutica Scientia1(1): 98-106, 2011

THIBAUT, K. et al. Antinoinceptive and anti-allodynic effects of oral PL37 a complete inhibitor of enkephalin-catalyzing enzymes, in a rat model of peripheral neuropathic pain induced by vincristine. European Journal of Pharmacology, v. 600, p. 71-77, 2008.

TOMAZZONI, M. I.; NEGRELLE, R. R. B.; CENTA, M. L. Fitoterapia popular: a busca instrumental enquanto prática terapêutica. Texto & Contexto Enfermagem. Florianópolis, v. 15, n. 1, p. 115 - 121, 2006.

TORRANCE N. SMITH B.H, BENNETT M.I., LEE A.J. The epidemiology of chronic pain of predominantly neuropathic origin. Results from a general population survey Pain v 7 p 281-289, 2005

TREDE, Neuropathic pain: redefinition and a grading system for clinical and research purposes Neurology v 70 p 1630-35

TUROLLA, M. S. R. Avaliação dos aspectos toxicológicos dos fitoterápicos: um estudo comparativo. São Paulo, 146p. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Universidade de São Paulo, 2004.

VALLEJO, R TILLEY DM, VOGEL L, BENJAMIN R.. The role of glia and the immune system, in the development and maintenance of neuropathic pain PainPractMalde p 167-184 2010

VALSECCHI, A. E.; FRANCHI, S.; PANERAI, A.E.; ROSSI, A.; SACERDOTE, P.; COLLEONI, M. The soy isoflavone genistein reverses oxidative and inflammatory state neuropathic pain, neurotrophic and vasculature deficits in diabetes mouse model. *European Journal of Pharmacology*, v. 650, p. 694 - 702, 2011.

VAN DE BEEK, W.J.; REMARQUE, E.J.; WESTENDORP, R.G.; VAN HILTEN, J. J. Innate cytokine profile in patients with complex regional pain syndrome is normal. *Pain*, v. 91, p. 259-261, 2001.

VANEGAS,H.; SHAIBLE,H.G.; Prostaglandins and cyclooxygenases in the spinal cord *Prog Neurobiological* v 64 p 327-363, 2001

VEIGA JÚNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. Plantas medicinais: cura segura? *Química Nova*, v.28, p.519 - 528, 2005.

VERDAM, M. C. S.; SILVA, C. B. O estudo de plantas medicinais e a correta identificação botânica. *Visão Acadêmica*, v.11, n.1, p. 7 - 13, 2010.

VERRIJR., W. A.; CUNHA, T. M.; PARADA, C. A.; POOLE, S.; CUNHA, F. Q.; FERREIRA, S. H. Hyper nociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development?. *Pharmacology & Therapeutics*, v. 112, n. 1, p. 116-138, 2006.

VIDAL, W. N.; VIDAL, M. R. R. Botânica: organografia. Viçosa: Imprensa Universitária UFV. p.124, 2007. Collins

VIEIRA, E.B.M. Prevalence, characteristics and factors associated with chronic pain with and without neuropathic characteristics in São Luis, Brasil *J. Pain Symptom Manage* v 44 p 239-51, 2012

VIEIRA, L. S. Manual de medicina popular: a fitoterapia da Amazônia. Belém: FCAP Serviço de documentação e informação, 1991. 248p.

VILLEGAS LF, FERNÁNDEZ ID, MALDONADO H, TORRES R, ZAVALETA A, VAISBERG AJ, HAMMOND GB 1997. *Journal of Ethnopharmacology* 55:193- 200, 1997

VITOR, A. O. Atividade antinoceptiva de um componente bioativo presente em veneno de sapo *Rhinella jimi* sobre dor neuropática experimental. 2009. 85f. Dissertação (Mestrado em Ciências Fisiológicas) - Universidade Estadual do Ceará, Ceará, 2009.

VIVANCOS G.G., VERRI, W.A.; CUNHA, T.M; SHIVO, I.R; PARADA, C.A.; CUNHA, F.Q. FERREIRA S.H. Na eletronic pressure-meter nociception pawtest for rats *Braz Med Biol Res* 2004 v 37 p 391-399

VON HERTWIG, I. F. Plantas aromáticas e medicinais: plantio, colheita, secagem, comercialização. 2. ed. São Paulo: Ícone, 1991. 414 p.

VORAVUTHIKUNCHAI SP, LMSUWAN S, CHUSRI S 2007. New perspectives on herbal medicines for bacterial infections. *Natural Products II* 18:41-101. 2007

WAGNER, H.; BLADT, S. Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. 2. ed. Berlim: Springer, 1996. 384p.

WENIGER, B.; HAAG-BERRURIER, M.; ANTON, R. Plants of Haiti used as antifertility agents. *Journal of Ethnopharmacology*, v.6, p. 67-84 1982.

WHITE, H. S. Drogas antiepilépticas. In: GENNARO, A. R. Remington: a ciência e a prática da farmácia. 20. ed. Rio de Janeiro: Nova Guanabara, 2004. cap. 81.

WOISKY, R. G; SALATINO, A. Analysis os propolis: some parameters ondprodecure for chemical fuality control. *Journal Apicultural Research*, 1998.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). The world health report 2008: primary health care now more than ever. Geneva: Who. 2008. 156 p. Disponível em: <http://www.pmf.sc.gov.br/arquivos/arquivos/pdf/31_03_2010_9.22.37.70fbb6ffd32f6598e4de044a8feeacdc.pdf>. Acesso em: 10 nov. 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). The world medicines situation 2011: traditional medicines: global situation, issues and challenges. Geneva: WHO, 2011. 12p.

XIJING, L.; NAO-LI, E.; RONG-XIAN, L. Effect of *Eleutherine americana* extracts on rats vascular ring of aorta ex vivo. China Pharmacy, 2009.

YADAV, N.P.; DIXIT, V.K. Recent approaches in herbal drug standardization. International Journal of Integrative Biology, v. 2, p. 195–203, 2008.

YAMAMOTO T, NOZAKI-TAGUCHI N, CHIBA T. Analgesic effect of intrathecally administered orexin-A in the rat formalin test and ... Br J Pharmacol 2002;137:170–6

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. Plantas medicinais sob a ótica da Química Medicinal Moderna. Chapecó: Argos, 2001. 500p.

ZHENGXIONG, C. ; HUIZHU, H. ; CHENGRUUI, W. ; YUHUI, L. ; JIANMI, D. ; SANKAWA, U. ; NOGUCHI, H. ; IITAKA, Y. Hongconin, a new naphthalene derivative from the rhizome of *Eleutherine americana* (Hong-Cong). Heterocycles, v. 22, p. 691-694, 1984.

ANEXO 1



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

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada “**Estudo farmacobotânico e farmacológico de Eleutherine bulbosa (MILL) URB (IRIDACEAE): Parâmetros clínicos e oxidativos em modelo de dor neuropática**” registrada com o nº 23115.004175/2017-51, sob a responsabilidade de **Denise Fernandes Coutinho**, 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 **APROVADO** pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA - UFMA) da Universidade Federal do Maranhão.

FINALIDADE	() ENSINO (X) PESQUISA () EXTENSÃO
Vigência da autorização	05/2017 à 12/2017
Espécie/linhagem/raça	Ratos (Wistar)
Nº de animais	24 animais
Peso/Idade	200-300g
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central – UFMA

Profa. Dra. Lucilene Amorim Silva
Presidente da Comissão de Ética no uso de animais-CEUA
UFMA|