



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
INSTITUTO MULTIDISCIPLINAR DE SAÚDE**



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM CIÊNCIAS  
FISIOLÓGICAS  
SOCIEDADE BRASILEIRA DE FISIOLOGIA - SBFis**

**LORENA LÔBO BRITO MORBECK**

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTI-INFLAMATÓRIA,  
ANTINOCICEPTIVA, CICATRIZANTE, SEDATIVA E DO POTENCIAL  
TOXICOLÓGICO DO EXTRATO ETANÓLICO, FRAÇÕES E  
SUBFRAÇÕES DO CAULE/CASCA DE *Ctenodon martii* Benth**

Vitória da Conquista, BA

2024

**LORENA LÔBO BRITO MORBECK**

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTI-INFLAMATÓRIA,  
ANTINOCICEPTIVA, CICATRIZANTE, SEDATIVA E DO POTENCIAL  
TOXICOLÓGICO DO EXTRATO ETANÓLICO, FRAÇÕES E  
SUBFRAÇÕES DO CAULE/CASCA DE *Ctenodon martii* Benth**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia, Universidade Federal da Bahia, como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências Fisiológicas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra Regiane Yatsuda  
Universidade Federal da Bahia - UFBA

Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mariluze Peixoto Cruz  
Universidade Federal da Bahia – UFBA.

Vitória da Conquista, BA

2024

Biblioteca Universitária Campus Anísio Teixeira – SIBI/UFBA

M827

Morbeck, Lorena Lôbo Brito.

Avaliação das atividades anti-inflamatória, antinociceptiva, cicatrizante, sedativa e do potencial toxicológico do extrato etanólico, frações e subfrações do caule/casca de *Ctenodon martii* Benth / Lorena Lôbo Brito Morbeck. -- Vitória da Conquista, BA: UFBA, 2024.

175 f.; il.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Regiane Yatsuda.

Co-orientadora: Prof.<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mariluze Peixoto Cruz.

Tese (Doutorado – Programa de Pós-Graduação Multicêntrico em Ciências Fisiológicas da Sociedade Brasileira de Fisiologia) - Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar em Saúde, 2024.

1. Bioativos. 2. Modelo in vivo. 3. Fitoterápicos. I. Universidade Federal da Bahia, Instituto Multidisciplinar em Saúde. II. Yatsuda, Regiane. III. Cruz, Mariluze Peixoto. IV. Título.

CDU: 615(043.2)

LORENA LÔBO BRITO MORBECK


**"AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTI-INFLAMATÓRIA,  
ANTINOCICEPTIVA, CICATRIZANTE, SEDATIVA E DO POTENCIAL  
TOXICOLÓGICO DO EXTRATO ETANÓLICO, FRAÇÕES E SUBFRAÇÕES  
DO CAULE/CASCA DE *Ctenodon martii* Benth"**

Esta tese foi julgada adequada à obtenção do grau de doutora em Ciências Fisiológicas e aprovada em sua forma final pelo Programa Multicêntrico de Pós-Graduação em Ciências Fisiológicas, Universidade Federal da Bahia. Vitória da Conquista – BA, 19 de dezembro de 2024.



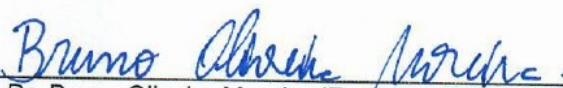
---

Prof.ª Dr.ª Regiane Yatsuda (Orientadora)  
Universidade Federal da Bahia - UFBA/IMS



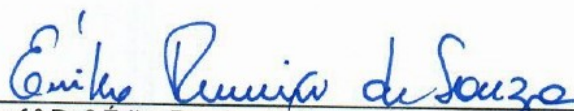
---

Prof. Dr. Lucas Miranda Marques (Examinador Interno)  
Universidade Federal da Bahia - UFBA/IMS



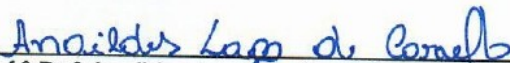
---

Prof. Dr. Bruno Oliveira Moreira (Examinador Externo)  
Universidade Federal da Bahia - UFBA/IMS



---

Prof.ª Dr.ª Érika Pereira de Souza (Examinadora Externa)  
Faculdade Independente do Nordeste - FAINOR



---

Prof.ª Dr.ª Anaildes Lago de Carvalho (Examinadora Externa)  
Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia - UESB

Dedico este trabalho à **Deus**, o centro de tudo em minha vida. Sem Ele, nada seria possível. Sua presença constante me fortalece. A Ele entrego toda a honra, a glória e a minha eterna gratidão.

Ao meu amado esposo, **Hegberto Gibran Santos Morbeck**, por compartilhar comigo momentos de crescimento, conquistas e alegrias de forma única. A você dedico também todo o meu amor.

À minha filha, **Maria Lôbo Morbeck**, cuja existência é a maior fonte de inspiração e amor incondicional. Filha, você trouxe sentido à minha vida.

Aos meus pais, **Nancy Gleide Lôbo Brito** e **Djalma Oliveira Brito**, por todo apoio, amor dedicado e pelos princípios de integridade que me guiam ao longo da vida.

À minha irmã, **Larissa**, por sua amizade eterna, e aos meus sobrinhos, **Isabela** e **Rodrigo**, por trazerem leveza, alegria e ternura aos meus dias.

À minha orientadora, **Dra. Regiane Yatsuda**, por todos os ensinamentos, pelo conhecimento generosamente compartilhado e pela amizade que tanto valorizo.

E aos meus queridos amigos do **Grupo Anti-inflamatório**, com quem tive a honra de compartilhar esta caminhada. Gratidão e carinho!

## AGRADECIMENTOS

**À Deus**, o centro de tudo em minha vida, palavras jamais serão suficientes para expressar minha gratidão. A Ele, que é digno de toda honra, glória e louvor, dedico este trabalho. Minha gratidão começa no reconhecimento de quem Ele é e se renova a cada dia pelas obras que tem realizado e continua a realizar em minha vida.

**A toda minha família**, que, de maneira direta e indireta, contribuiu para esta conquista. Obrigada pelo apoio incondicional, pelas palavras de força, pelas orações e por acreditarem em mim. Amo muito vocês!

Agradeço às **instituições públicas financiadoras**: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação de Amparo à Pesquisa e à Inovação Tecnológica do Estado da Bahia (FAPESB 141/2019), pelo incentivo financeiro que viabilizou esta pesquisa.

Também agradeço às **instituições parceiras**, a Universidade Federal da Bahia (UFBA/IMS-CAT) e Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), por colaborarem no desenvolvimento desta pesquisa e formação acadêmica.

Ao **Programa Multicêntrico de Pós-Graduação** e à Sociedade Brasileira de Fisiologia, pela oportunidade e incentivo ao conhecimento. O doutorado trouxe aprendizados valiosos que levarei por toda a vida.

À minha orientadora, **Dra. Regiane Yatsuda**, minha eterna gratidão por acreditar em mim desde a graduação. Sua paciência, amizade e ensinamentos foram pilares fundamentais para a construção deste trabalho. Rê, sou profundamente grata por sua empatia, altruísmo e por ser exemplo inspirador de pesquisadora e ser humano.

À minha orientadora, **Dra. Mariluze Peixoto Cruz**, pela paciência, disponibilidade e ensinamentos que enriqueceram esta pesquisa. Obrigada, Mari, por suas palavras de incentivo e força, e, acima de tudo, por sua amizade. Você é maravilhosa.

As minhas amigas, **Pâmala Évelin Pires Cedro e Talita Costa dos Santos**, por sua amizade, apoio e parceria inestimáveis ao longo desta caminhada. Vocês tornaram os desafios mais leves e os momentos felizes ainda mais especiais. Como sempre dizemos, “da UFBA para a vida!”.

Aos meus colegas de pós-graduação, **Talita Costa dos Santos, Rafael Santos Dantas Miranda Dórea, Thiago Macedo Lopes Correia, Manoela Rios Trindade e Brenda Oliveira Lima**, agradeço pela convivência enriquecedora, pela troca de conhecimentos e pelo apoio ao longo desta jornada.

Aos pesquisadores e professores **Dr. Lucas Miranda Marques, Dr. Bruno Oliveira Moreira, Dra. Telma de Jesus Soares, Dra. Amélia Cristina Magalhães Gusmão e Dr. Avaldo de Oliveira S. Filho**, pelo suporte técnico, auxílio e disponibilidade durante esta pesquisa.

**Às professoras e amigas Dra. Érika Pereira de Souza e Dra. Kelle Oliveira Silva**, minha eterna gratidão por me acolher desde o início desta jornada. O carinho, apoio e generosidade de vocês foram fundamentais, e guardarei com amor tudo o que aprendi ao longo do caminho ao lado de vocês.

Ao querido **Tonho (Antônio Correia Freire)**, por sua indispensável ajuda nas coletas e identificações, sempre com dedicação e presteza.

Aos amigos do **Grupo Anti-inflamatório**, começando da 1ª geração **Talita Costa dos Santos, Rafael Santos Dantas Miranda Dórea, Sarah Rocha Lima Braga, Alana Pereira Prado**, 2ª geração **Ananda Brito Soares, Ketleen Lucas do Carmo, Leonardo Oliveira Silva Bastos, Lucas Limeira Moreira, Mateus da Silva Pereira, Vinicius Calebe Soares Souza, Luiza Amorim Rocha, Kaic Santos Pereira**, agora a 3ª geração **Isaias Negreiros Dantas, Izabella Cardoso de Souza, Paloma Brito Coutinho, Larissa Santana Gomes, Luis Felipe Bião Silveira, Livia Oliveira Lima, Géssica Santos da Silva, Adrielli Trindade Brito, Yuri Guimarães Bomfim**. Agradeço pelo carinho, confiança e respeito demonstrados ao longo deste trabalho, além dos momentos descontraídos e lanches compartilhados. Foi um privilégio enorme fazer parte de uma equipe tão comprometida e unida, onde tive a oportunidade de aprender tanto quanto ensinei.

Aos técnicos e servidores **Antônio Carlos, Perivaldo Santos, Gideon Oliveira, Janeide Muritiba, Sérgio do Prado, José Cláudio Amorim e Robson da França**, pela ajuda essencial com materiais e infraestrutura para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos queridos profissionais de **Limpeza e Segurança**, cujo trabalho tornou meus dias mais leves e acolhedores. Obrigada pelo carinho, pelas conversas e pelos momentos de descontração na copa. O que seria de mim seu aquele cafezinho!

Por fim, agradeço a **Todos** que, de alguma forma, estiveram ao meu lado nesta jornada, contribuindo para torná-la mais enriquecedora e gratificante. Este não é o fim, mas o início de uma longa caminhada, que sigo com o coração cheio de gratidão e esperança.

*“Se eu vi mais longe, foi por estar sobre ombros de gigantes.”*  
*Isaac Newton*



**MORBECK**, Lorena Lôbo Brito. Avaliação das atividades anti-inflamatória, antinociceptiva, cicatrizante, sedativa e do potencial toxicológico do extrato etanólico, frações e subfrações do caule/casca de *Ctenodon martii* Benth. 2024. Tese (Doutorado) – Instituto Multidisciplinar em Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2024.

## RESUMO

O estudo de plantas medicinais estabelece interdependência entre a química e a medicina, impulsionando o desenvolvimento de novos medicamentos. Esse campo de pesquisa é particularmente relevante em países com alta biodiversidade, como o Brasil, que apresenta escassos estudos científicos que comprovam a eficácia e a segurança desses recursos naturais. Nesse contexto, a planta *Ctenodon martii*, coletada na Floresta Nacional Contendas do Sincorá, na Bahia, mostrou em estudos prévios “*in vivo*” ação antinociceptiva e anti-inflamatória, o que reforça sua relevância como objeto de investigação científica. Dando continuidade a essas descobertas, o presente estudo buscou avaliar, as atividades anti-inflamatória, antinociceptiva, sedativa, cicatrizante e o potencial toxicológico do extrato etanólico, bem como de frações e subfrações de diclorometano obtidas do caule/casca de *C. martii*, ampliando o entendimento sobre suas propriedades bioativas. Extrato etanólico do caule/casca da planta foi particionado originando a fração de diclorometano, que por técnica de cromatografia em sílica originou as subfrações D1, D2, D3, D4 e D5. Posteriormente, a subfração D2 foi submetida a um novo subfracionamento, utilizando cromatografia em coluna de Sephadex, originando D2SS.1, D2SS.2 e D2SS.3. Perfis fitoquímicos e cromatográficos dos compostos fracionados foram avaliados por CG-EM. Os resultados obtidos tiveram suas variáveis testadas quanto à distribuição normal e variância homogênea, os valores foram considerados significantes quando apresentaram  $p < 0,05$ . Para os bioensaios com as subfrações e sub-subfrações na dose de 25 mg/kg, utilizou camundongos machos *Balb/c*. As atividades antinociceptiva em comparação ao grupo controle veículo, foram observadas em D2, D3, D4, D5, D2SS.1, D2SS.2 e D2SS.3 no teste de contorção abdominal por ácido acético; em formalina na 1ª fase por D2, D3, D2SS.2 e D2SS.3, e na 2ª fase D2, D3, D4, D2SS.2 e D2SS.3; no teste *Von Frey* houve hipernocicepção em D2, D3, D2SS.1, D2SS.2 e D2SS.3. Quanto à atividade anti-inflamatória em comparação ao controle veículo foram observadas, no edema da pata em D2, D3, D2SS.2 e D2SS.3; recrutamento de neutrófilos em D2, D3, D4, D2SS.1, D2SS.2 e D2SS.3; produção de óxido nítrico e no extravasamento vascular em D2, D3 e D4. Subfrações D2 e D3 reduziram produção de citocinas TNF- $\alpha$  e IL-1 $\alpha$  detectados por ELISA e expressão de TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-17 determinado por qPCR. Ao avaliar a inflamação crônica, ratos *Wistar*, foram testados com extrato etanólico e comparado ao controle do veículo, houve redução na formação de granulomas e exsudato nas doses de 25 e 50 mg/kg; área da ferida excisional diminuída nas doses de 25 e 12,5 mg/kg, apoiando achados histológicos. No teste do labirinto em cruz elevada, não houve efeitos sedativos ou déficit locomotor. O potencial toxicológico por DL<sub>50</sub>, acompanhados por ensaios hematológicos e bioquímicos não indicaram toxicidade e letalidade. Esses resultados revelam que *Ctenodon martii* é uma fonte promissora para o isolamento de novos compostos bioativos e agentes terapêuticos, com potencial para uso fitoterápico.

**Palavras-chave:** Bioativos, *Ctenodon martii*, Fração diclorometano, Modelo *in vivo*.

**MORBECK**, Lorena Lôbo Brito. Evaluation of anti-inflammatory, antinociceptive, healing, sedative activities and toxicological potential of the ethanolic extract, fractions and subfractions of the stem/bark of *Ctenodon martii* Benth. 2024. Tese (Doutorado) – Instituto Multidisciplinar em Saúde, Universidade Federal da Bahia, Vitória da Conquista, 2024.

## ABSTRACT

The study of medicinal plants establishes interdependence between chemistry and medicine, driving the development of new drugs. This field of research is particularly relevant in countries with high biodiversity, such as Brazil, which has scarce scientific studies proving the efficacy and safety of these natural resources. In this context, the plant *Ctenodon martii*, collected in the Contendas do Sincorá National Forest, in Bahia, showed in “*in vivo*” studies antinociceptive and anti-inflammatory action, which reinforces its relevance as an object of scientific investigation. Continuing these discoveries, the present study sought to evaluate the anti-inflammatory, antinociceptive, sedative, healing activities and the toxicological potential of the ethanolic extract, as well as of fractions and subfractions of dichloromethane obtained from the stem/bark of *C. martii*, expanding the understanding of its bioactive properties. The ethanolic extract of the plant stem/bark was partitioned, yielding a dichloromethane fraction, which, using silica chromatography, yielded subfractions D1, D2, D3, D4, and D5. Subsequently, subfraction D2 was subjected to a new subfractionation, using Sephadex column chromatography, yielding D2SS.1, D2SS.2, and D2SS.3. Phytochemical and chromatographic profiles of the fractionated compounds were evaluated by GC-MS. The results obtained had their variations tested for normal distribution and homogeneous variance; values were considered significant when compared at  $p < 0.05$ . For bioassays with subfractions and sub-subfractions at a dose of 25 mg/kg, male *Balb/c* mice were used. The antinociceptive activities compared to the vehicle control group were observed in D2, D3, D4, D5, D2SS1, D2SS.2 and D2SS.3 in the abdominal writhing test with acetic acid; In formalin in the 1st phase by D2, D3, D2SS.2 and D2SS.3, and in the 2nd phase D2, D3, D4, D2SS.2 and D2SS.3; In the *Von Frey* test there was hypernociception in D2, D3, D2SS.1, D2SS.2 and D2SS.3. Regarding the anti-inflammatory activity compared to the vehicle control, no paw edema was observed in D2, D3, D2SS.2 and D2SS.3; neutrophil recruitment in D2, D3, D4, D2SS.1, D2SS.2 and D2SS.3; nitric oxide production and no vascular extravasation in D2, D3 and D4. D2 and D3 subfractions reduced the production of cytokines TNF- $\alpha$  and IL-1 $\alpha$  detected by ELISA and expression of TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-17 determined by qPCR. When evaluating chronic inflammation, *Wistar* rats were tested with ethanolic extract and compared to vehicle control, there was a reduction in the formation of granulomas and exudate at doses of 25 and 50 mg/kg; excisional wound area decreased at doses of 25 and 12.5 mg/kg, supporting histological findings. In the elevated plus maze test, there were no sedative effects or locomotor deficit. The toxicological potential by DL<sub>50</sub>, accompanied by hematological and biochemical assays, did not indicate toxicity and lethality. These results reveal that *Ctenodon martii* is a promising source for the isolation of new bioactive compounds and therapeutic agents, with potential for phytotherapeutic use.

**Keywords:** Bioactives, *Ctenodon martii*, Dichloromethane fraction, *In vivo* model.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Imagem 1	Exsicata (Nº 2293328) <i>Aeschynomene martii</i> .....	39
Figura 1	Prancha com resultados anteriores extrato etanólico.....	44
Figura 2	Prancha com resultados anteriores frações.....	45
Imagem 2	Planta <i>Ctenodon martii</i> em seu habitat, na Floresta Nacional Contendas do Sincorá (FLONA), Contendas do Sincorá-BA.....	48
Figura 3	Esquema de realização e tratamento granuloma.....	62
Figura 4	Esquema da realização e tratamento das feridas excisionais.....	63
Quadro 1	Protocolo de análise semiquantitativa de cortes histológicos.....	64
Figura 4	Esquema da realização e tratamento feridas de queimadura.....	67
Figura 5	Descrição das medidas do labirinto em cruz elevado.....	68
Figura 6	Cromatograma da Subfração de diclorometano – D1.....	75
Figura 7	Cromatograma da Subfração de diclorometano – D2.....	76
Figura 8	Cromatograma da Subfração de diclorometano – D3.....	76
Figura 9	Cromatograma da Subfração de diclorometano – D4.....	76
Figura 10	Cromatograma da Subfração de diclorometano – D5.....	77
Figura 11	Cromatograma da sub-subfrações de diclorometano D2 (D2SS.1)..	77
Figura 12	Cromatograma da sub-subfrações de diclorometano D2 (D2SS.2)..	77
Figura 13	Cromatograma da sub-subfrações de diclorometano D2 (D2SS.3)..	78
Figura 14	Efeito das subfrações de diclorometano do caule/casca da <i>Ctenodon martii</i> no teste de contorção abdominal induzida por ácido acético (0,6%) em camundongos.....	79
Figura 15	Efeito das subfrações de diclorometano do caule/casca da <i>Ctenodon martii</i> na resposta à nocicepção induzida pela injeção intraplantar de formalina 1,0 % em camundongos.....	80
Figura 16	Efeito das subfrações de diclorometano do caule/casca da <i>Ctenodon martii</i> na inibição da nocicepção mecânica pelo teste de <i>Von Frey</i> .....	82
Figura 17	Efeito das subfrações e sub-subfrações D2 de diclorometano do caule/casca da <i>Ctenodon martii</i> no edema de pata induzido por carragenina.....	83
Figura 18	Expressão de genes inflamatórios qPCR.....	84

Figura 19	Efeito das subfrações de diclorometano do caule/casca da <i>Ctenodon martii</i> sobre a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida por carragenina.....	86
Figura 20	Efeito das subfrações de diclorometano caule/casca da <i>C. martii</i> sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ e IL-1 $\alpha$ induzida por carragenina.....	88
Figura 21	Efeito das subfrações de diclorometano caule/casca da <i>C. martii</i> sobre a produção de nitrito induzida por carragenina.....	89
Figura 22	Efeito das subfrações de diclorometano caule/casca da <i>C. martii</i> na permeabilidade vascular, teste de azul de Evans.....	90
Figura 23	Avaliação do crescimento de tecido granulomatoso.....	92
Figura 24	Cicatrização de ferida excisional.....	93
Figura 25	Modelo experimental de ferida gerada por queimadura.....	96
Figura 26	Análise quantitativa por labirinto em cruz elevado.....	97

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Sequência dos primers utilizados na qPCR.....	58
Tabela 2	Rendimentos do extrato etanólico, frações e subfrações de diclorometano, do caule/casca da <i>Ctenodon martii</i> .....	72
Tabela 3	Cromatografia de Camada Delgada com os perfis fitoquímicos, do extrato etanólico, frações e subfrações da <i>C. martii</i> .....	73
Tabela 4	Substâncias identificadas por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa, das subfrações de diclorometano de <i>C. martii</i> .....	74
Tabela 5	Substâncias identificadas por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa, das sub-subfrações D2 de <i>C. martii</i> .....	75
Tabela 6	Avaliação semiquantitativa das feridas excisionais frente aos parâmetros hemorragia, exsudato, colagenização, reepitelização e queratinização.....	94
Tabela 7	Análises histopatológicas sobre a quantidade de neutrófilos, macrófagos, linfócitos, fibroblastos, fibrócitos e vasos sanguíneos.....	95
Tabela 8	Análises dos parâmetros etológicos sobre o comportamento.....	100
Tabela 9	Toxicidade aguda.....	101
Tabela 10	Parâmetros hematológicos de ratos <i>Wistar</i> machos.....	103
Tabela 11	Parâmetros hematológicos de ratos <i>Wistar</i> fêmeas.....	104
Tabela 12	Parâmetros bioquímicos de ratos <i>Wistar</i> machos.....	105
Tabela 13	Parâmetros bioquímicos de ratos <i>Wistar</i> fêmeas.....	105

## LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de Variância
ATP	Adenosina trifosfato
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
Cg	Carragenina
CG-EM	Cromatografia Gasosa Acoplada a Espectrometria de Massa
CHCM	Concentração hemoglobínica média
COX-1	Ciclooxigenase do tipo 1
COX-2	Ciclooxigenase do tipo 2
CPGR	Peptídeos relacionados geneticamente à calcitonina
D	Subfração de Diclorometano
DL <sub>50</sub>	Dose letal mediana
DMSO	Dimetilsulfoxido
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
D.P.	Desvio padrão
DRG	Gânglios da Raiz Dorsal
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etileno diamino tetra acético
ELISA	<i>Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assa</i>
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FGF	Fator de crescimento dos fibroblastos
GABA	Ácido $\gamma$ -aminobutírico
GABA <sub>A</sub>	Receptor do tipo A para ácido gama amino butírico
GFs	Fatores de crescimento
GMP <sub>c</sub>	Monofosfato cíclico de guanosina
i-NOS	Síntese do óxido nítrico induzível
HCM	Hemoglobina corpuscular média
i.p.	Intraperitoneal
ICAM-1	Molécula de adesão intercelular-1
ICAM-2	Molécula de adesão intercelular-1
IL-10	Interleucina-10
IL-1ra	Antagonista de receptor de IL-1

IL-1 $\alpha$	Interleucina-1 $\alpha$
IL-1 $\beta$	Interleucina-1 $\beta$
IL-6	Interleucina-6
K <sub>ATP</sub>	Canais de potássio sensíveis à ATP
L-NAME	N $\omega$ -nitro-L-arginina
m/s	Metros/segundo
mmHg	Milímetro de mercúrio
mg	Miligrama
m/v	Relação entre massa e volume
NOS	Óxido nítrico sintase
PAF	Fator de ativação plaquetária
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PBS	Salina tamponada com fosfatos
PGs	Prostaglandinas
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RDW	Amplitude de Distribuição dos Eritrócitos
s.c.	Subcutânea
SNC	Sistema Nervoso Central
TGO	Transaminase Glutâmico Oxalacética
TGF- $\beta$	Fator de transformação do crescimento beta
TGP	Transaminase Glutâmico Pirúvica
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral-alfa
VCAM	Molécula de adesão celular vascular
VCM	Volume Corpuscular Médio
VEGF	Fato de crescimento do endotélio vascular
v/v	Relação entre volume e volume

## LISTA DE SIGLAS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
FAPESB	Fundação de Amparo à Pesquisa e à Inovação Tecnológica do Estado da Bahia
FLONA	Floresta Nacional Contendas do Sincorá
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
OMS	Organização Mundial da Saúde
OECD	Organisation for Economic Cooperation and Development
RENAME	Relação Nacional de Medicamentos Essenciais
UFBA	Universidade Federal da Bahia
UESB	Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia
UNICAMP	Universidade de Campinas
FDA	Food and Drug Administration



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>21</b>
2.1. INFLAMAÇÃO .....	21
2.1.1 Inflamação Granulomatosa .....	25
2.1.2 Inflamação e o Reparo Tecidual.....	27
2.2 NOCICEPÇÃO E DOR.....	30
2.2.1 Mecanismos Neurais da Nocicepção .....	31
2.2.2 Interação entre Inflamação, nocicepção e dor.....	34
2.3 BIOPROSPECÇÃO DE PLANTAS MEDICINAIS.....	36
2.3.1 <i>Ctenodon martii</i> .....	38
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>43</b>
3.1 OBJETIVO GERAL .....	43
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	43
<b>4 METODOLOGIA .....</b>	<b>44</b>
4.1 DADOS PRÉVIO SOBRE PROPRIEDADES BIOATIVAS DE <i>Ctenodon martii</i> .....	44
4.2. COLETA E IDENTIFICAÇÃO DA <i>Ctenodon martii</i> .....	47
4.3 ANÁLISE FITOQUÍMICA.....	48
4.3.1 Preparo do Extrato Etanólico, Frações e Subfrações Orgânicas .....	48
4.3.2 Reações de Caracterização dos Metabólitos Secundários .....	50
4.3.3 Análise por cromatografia acoplada a espectrometria de massa (CG-EM) das subfrações.....	52
4.4 BIOENSAIO.....	53
4.4.1 Animais.....	53
4.4.2 Teste de Contorções Abdominais Induzidas por Ácido Acético .....	53
4.4.3 Nocicepção Induzida Pela Injeção Intraplantar de Formalina.....	54
4.4.4 Avaliação da Hipernocicepção – Teste de pressão crescente na pata .....	54
4.4.4.1. Edema de Pata.....	55
4.4.5 Expressão de Genes Inflamatórios.....	56
4.4.6 Recrutamento de Neutrófilos para a Cavidade Peritoneal.....	58
4.4.6.1 Quantificação de Citocinas por ELISA .....	59
4.4.6.2 Avaliação da Produção do Óxido Nítrico (NO) por Determinação de Nitrito..	59
4.4.7. Avaliação da Permeabilidade Vascular .....	60
4.4.8. Avaliação de resposta inflamatória crônica.....	60
4.4.8.1 Crescimento de Tecido Granulomatoso.....	61
4.4.8.2 Modelo Experimental de Ferida Excisional.....	62
4.4.8.2.1 Avaliação histológica .....	64
4.4.8.3 Modelo Experimental de Ferida por Queimadura.....	66
4.4.9. Labirinto em Cruz Elevado .....	
4.4.10. Determinação da Toxicidade Aguda e Teste de Letalidade (DL <sub>50</sub> ).....	69
4.4.10.1 Análises dos parâmetros bioquímicos e hematológicos .....	70
4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	30

<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>72</b>
5.1 ANÁLISE QUÍMICA DA PLANTA <i>Ctenodon martii</i> .....	72
5.1.1 Rendimento do Extrato etanólico, frações e subfrações .....	72
5.1.2 Análise Fitoquímica em CCD .....	73
5.1.3 Análise CG-EM das amostras fracionadas de diclorometano .....	73
5.2 BIOENSAIOS .....	79
5.2.1 Avaliação da Atividade Antinociceptiva .....	79
5.2.1.1 Contorção Abdominal Induzida por Ácido Acético .....	79
5.2.1.2 Nocicepção Induzida Pela Injeção Intraplantar de Formalina.....	80
5.2.1.3 Teste de Von Frey - Hipernocicepção .....	82
5.2.2 Avaliação da Atividade Anti-inflamatória .....	83
5.2.2.1 Edema de pata .....	83
5.2.2.2 Quantificação de citocinas por qPCR.....	84
5.2.2.3 Recrutamento de Neutrófilo para cavidade peritoneal.....	86
5.2.2.4 Ensaio para Quantificação de Citocinas ELISA.....	88
5.2.2.5 Avaliação da Produção do Óxido Nítrico .....	89
5.2.2.6 Avaliação da Permeabilidade Vascular .....	90
5.2.3 Avaliação da Atividade Anti-inflamatória em modelo crônico .....	91
5.2.3.1 Modelo Granulomatoso .....	91
5.2.3.2 Cicatrização de ferida excisional .....	93
5.2.3.2.1 Análise Semiquantitativa corte histológico de feridas excisionais .....	94
5.2.3.2.2 Análise Histopatológica de Feridas Excisionais .....	95
5.2.3.3 Cicatrização de feridas por queimadura .....	96
5.2.4 Avaliação Locomotora e Sedativa por Labirinto em Cruz Elevado .....	97
5.2.4.1 Análise quantitativa de entrada nos braços.....	97
5.2.4.2 Análise Etológica .....	99
5.2.5 Avaliação Toxicológica Aguda e Teste de Letalidade (DL50) .....	101
5.2.5.1 Triagem farmacológica comportamental e toxicidade aguda .....	101
5.2.5.2 Análise dos parâmetros hematológicos e bioquímicos.....	102
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>106</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>136</b>
REFERÊNCIAS.....	136
APÊNDICE .....	170
ANEXO.....	172

## 1 INTRODUÇÃO

A inflamação é um processo biológico multifacetado que se ativa em resposta a estímulos nocivos, como lesões, infecções, isquemia, toxinas ou desordens autoimunes. Esse mecanismo envolve a liberação de mediadores químicos, resultando nos sinais clássicos da inflamação: rubor, calor, edema, dor e perda de função (Eze *et al.*, 2019).

Esses sinais refletem a ativação das células do sistema imunológico e alterações vasculares destinadas à proteção do organismo (Rood *et al.*, 2023). Apresentando aguda, com uma resposta rápida que visa conter lesões e promover a reparação tecidual, ou crônica, marcada por duração prolongada e respostas inadequadas ou persistentes, o processo inflamatório pode levar a danos teciduais e comprometer a função de órgãos afetados (Leuti *et al.*, 2020).

Durante o processo inflamatório, diversas células, incluindo as do endotélio vascular, são ativadas e produzem mediadores, como citocinas e quimiocinas, que atuam de forma quimiotática, recrutando leucócitos para o local da lesão (Rood *et al.*, 2023). Esses leucócitos desempenham a função de fagocitar invasores patogênicos e detritos celulares gerados, contribuindo para o controle da inflamação (Cai *et al.*, 2021).

A resolução da inflamação é um processo ativo, coordenado por células e mediadores pró-resolutivos especializados (Eze *et al.*, 2019). Neutrófilos desempenham um papel chave, com seus fagolisossomos, que contêm enzimas degradativas e produzem espécies reativas de oxigênio (ROS) para eliminar invasores e restos celulares. A produção inadequada ou tardia desses mediadores pode levar à persistência da inflamação, promovendo a infiltração contínua de leucócitos e liberação excessiva de ROS, resultando em danos teciduais e na transição de uma inflamação aguda para crônica (Cai *et al.*, 2021).

Células imunes circulantes, como neutrófilos, monócitos e células T, são recrutadas para locais de dano tecidual e inflamação, frequentemente infiltrando também os sistemas nervoso periférico e central (Ma *et al.*, 2024). A ativação dessas células leva à expressão de diversos mediadores inflamatórios, incluindo citocinas, quimiocinas, lipídios e proteases, que exercem efeitos diretos sobre neurônios

sensoriais periféricos e centrais de segunda ordem, além de influenciar células imunes e tecidos adjacentes, regulando a dor de forma complexa (Raja *et al.*, 2020).

Essa interligação entre inflamação e dor é evidente, pois a dor é um dos sinais cardinais da resposta inflamatória (Raja *et al.*, 2020). A liberação de mediadores inflamatórios durante a inflamação estimula diretamente os nociceptores, neurônios sensoriais especializados na detecção da dor, que inervam tecidos periféricos como pele, articulações e órgãos internos. Esses nociceptores tornam-se sensibilizados a estímulos mecânicos, térmicos e químicos, amplificando a percepção da dor (Ma *et al.*, 2024; Raja *et al.*, 2020).

À medida que a inflamação persiste, essa sensibilização pode intensificar-se, prolongando a dor e, em casos de falha na resolução do processo inflamatório, contribui para a transição de uma resposta aguda para estado crônico, resultando em danos teciduais contínuos e desconforto prolongado, impactando na qualidade de vida do paciente (Parisien *et al.*, 2022; Ribeiro *et al.*, 2017).

Durante a inflamação, mediadores inflamatórios sensibilizam os nociceptores, amplificando a percepção da dor. Essa relação sublinha a importância de desenvolver novos tratamentos para a dor, que demandam uma abordagem baseada em estudos que considerem diversos limiares de dor, o estado da doença e os tipos de lesões (Parisien *et al.*, 2022). Esses estudos visam encontrar um sistema que modula as funções celulares neuronais e imunológicas, essenciais na experiência da dor. As terapias que visam esses sistemas se mostram promissoras como novos analgésicos (Fisher & Clarkson, 2024).

No entanto, a utilização de medicamentos para o tratamento da dor apresenta desafios significativos. As limitações de resistência, o potencial para vícios e as interações farmacológicas frequentemente dificultam a continuidade das terapias com eficácia inalterada. A dor crônica, frequentemente associada a condições como osteoartrite, artrite, doenças oncológicas e neuropatias, apresenta uma epidemiologia complexa, complicando o desenvolvimento de soluções efetivas e impactando seriamente a qualidade de vida dos pacientes (Fisher & Clarkson, 2024; Parisien *et al.*, 2022).

Mediante a essas condições patológicas, vê-se a necessidade de buscar novas alternativas para o uso de medicamentos fitoterápicos com finalidade profilática, curativa, paliativa ou para fins de diagnóstico (Eze *et al.*, 2019)

O Brasil é conhecido por sua vasta biodiversidade, incluindo uma grande variedade de plantas medicinais com potencial terapêutico. A biodiversidade brasileira, que compreende de 15% a 20% da diversidade global, oferece um enorme potencial para o desenvolvimento de terapias naturais, sendo grande parte ainda inexplorada (Zhou *et al.*, 2021). Assim, esse recurso é uma base valiosa para a pesquisa científica e o desenvolvimento de novos tratamentos, combinado ao conhecimento tradicional de diferentes culturas e etnias do país associado ao uso de plantas medicinais (Palhares *et al.*, 2021). Neste contexto, o Brasil apresenta uma rica história etnofarmacológica. Estima-se que cerca de 30% dos medicamentos terapêuticos sejam derivados de recursos naturais, especialmente plantas e microrganismos (Zhou *et al.*, 2021).

Com o avanço de estudos genômicos, principalmente após o Projeto Genoma Humano, abriu-se um novo campo para a pesquisa e tratamento de doenças por meio de bioativos naturais. Além disso, a diversidade cultural do Brasil impulsiona o uso de fitoterápicos, consolidando o país como um importante polo de desenvolvimento de soluções terapêuticas naturais (Zhou *et al.*, 2021).

Nesse sentido, a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, aprovada por meio do Decreto Nº 5.813, de 22 de junho de 2006, estabeleceu diretrizes e linhas prioritárias para o desenvolvimento de ações pelos diversos parceiros em torno de objetivos comuns voltados à garantia do acesso seguro e uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos em nosso país ao desenvolvimento de tecnologias e inovações, assim como ao fortalecimento das cadeias e dos arranjos produtivos, ao uso sustentável da biodiversidade brasileira e ao desenvolvimento do Complexo Produtivo da Saúde (Brasil, 2006).

*Ctenodon martii* (Benth.) D.B.O.S. Cardoso, P.L.R. Moraes & H.C. Lima, conhecida popularmente como tripa de galinha, é uma planta nativa do Nordeste Brasileiro, faz parte da família Fabaceae, é um subarbusto que cresce principalmente no bioma tropical sazonalmente seco do Brasil (Cardoso, Moraes & Lima, 2020). Estudos sistemáticos moleculares indicaram mudança na classificação do gênero anteriormente escrito *Aeschynomene* para o gênero *Ctenodon*, após resultados das análises filogenéticas moleculares da linhagem sendo restabelecido corretamente o gênero da espécie *Ctenodon martii* (Domingues *et al.*, 2022; Cardoso *et al.*, 2020).

Devido à ampla distribuição de *Ctenodon martii*, na região semiárida da caatinga em Contendas do Sincorá (BA), o presente trabalho teve como objetivo dar continuidade às pesquisas anteriores (Morbeck; Cruz; Yatsuda, 2018; Oliveira; Cruz; Yatsuda, 2016), avaliando “*in vivo*” as atividades anti-inflamatórias, antinociceptiva, cicatrizante, sedativa e o potencial toxicológico do extrato etanólico, frações e subfrações do caule/casca dessa espécie. Planta rica em atividade biológica, destacando-se como promessa para estudos químicos e farmacológicos voltados ao fracionamento, isolamento e identificação de compostos bioativos.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

### 2.1. INFLAMAÇÃO

A inflamação é uma resposta tecidual bem regulada que tem como objetivo primário eliminar patógenos e remover tecido danificado, restabelecendo a homeostase no local afetado. O influxo de células imunes, como neutrófilos, monócitos e macrófagos, associado à liberação de mediadores inflamatórios, citocinas, quimiocinas, eicosanoides, entre outros, que orquestram a resposta inflamatória resultando nos sinais cardinais da inflamação: vermelhidão, inchaço, calor, dor e perda de função (Meizlish *et al.*, 2021).

Diversas vias de sinalização atuam em conjunto para regular esses processos patológicos. Após a identificação de uma lesão ou infecção, o objetivo inicial é a eliminação de agentes patogênicos e a reparação do tecido danificado (Kim & Lee, 2024). No entanto, embora os processos inflamatórios sejam projetados para combater patógenos, eles também podem causar danos ao tecido do hospedeiro devido à liberação descontrolada de mediadores inflamatórios (Kim & Lee, 2024; Meizlish *et al.*, 2021).

Circuitos de comunicação entre células imunes e teciduais conduzem a propagação de sinais inflamatórios e regulam a apoptose das células afetadas (Nie *et al.*, 2022). A falha em controlar a inflamação pode resultar em uma resposta inflamatória excessiva ou prolongada, levando a danos irreversíveis aos tecidos. Ponto de controle e mecanismos regulatórios agem para equilibrar a ativação e a supressão da inflamação, prevenindo assim respostas prejudiciais (Guarnizo *et al.*, 2023).

O processo inflamatório segue um curso bem definido. Inicialmente, o reconhecimento do dano leva ao recrutamento de neutrófilos (fase I), seguido pela entrada de monócitos mediados por sinais dos neutrófilos (fase II). Fagócitos então liberam sinais que inibem a continuação do recrutamento de neutrófilos (fase III), com o encerramento da resposta sendo orquestrado por macrófagos que adotam um perfil anti-inflamatório após fagocitar neutrófilos apoptóticos (fase IV) (Knethen & Barbosa, 2021).

Os sinais moleculares gerados em resposta ao dano tecidual ou invasão microbiana são reconhecidos por células apresentadoras de antígenos (APCs), como macrófagos residentes ou células dendríticas (DCs), estrategicamente localizadas perto do local da lesão. O início da resposta inflamatória deve ser rigidamente regulado para evitar danos excessivos ao tecido (Meizlish *et al.*, 2021).

A inflamação aguda, mediada por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), como o receptor Toll-like 9 (TLR9), ativa a produção de citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-1 (IL-1), que promovem o recrutamento de neutrófilos e monócitos. A infiltração inicial de neutrófilos é rapidamente seguida pela chegada de macrófagos, que participam da fagocitose de patógenos e restos celulares, promovendo a resolução da inflamação através da liberação de mediadores anti-inflamatórios (Juráňová *et al.*, 2017; Kanai *et al.*, 2024).

A infecção ou lesão provoca a morte celular necrótica, que resulta no rompimento das membranas celulares e na liberação de componentes intracelulares que contêm padrões moleculares associados a danos (DAMPs). Esses DAMPs são rapidamente detectados por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) expressos por leucócitos, ativando vias de sinalização inflamatória e promovendo a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-1 (IL-1) e o fator de necrose tumoral (TNF), intensificando a resposta inflamatória (Lambert *et al.*, 2021). A amplificação dessa resposta é crucial para a eliminação de patógenos, mas se não for adequadamente regulada, pode causar danos teciduais adicionais e contribuir para condições inflamatórias crônicas (Horner *et al.*, 2023).

Um evento chave no início da inflamação é a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como as interleucinas 1 alfa e 1 beta (IL-1 $\alpha$ / $\beta$ ) e IL-18, no tecido lesado. Este processo é mediado pela ativação do fator nuclear kappa beta (NF- $\kappa$ B), desencadeada pela ligação de DAMPs ou PAMPs aos receptores Toll-like (TLRs) (López *et al.*, 2020).

A ativação do NF- $\kappa$ B não apenas promove a liberação de IL-1 $\beta$  e IL-18, mas também integra vias de sinalização mais complexas. Estudos recentes indicam que NF- $\kappa$ B pode ser ativado por novos componentes da resposta imune, como sensores citoplasmáticos de DNA, intensificando a resposta inflamatória em tecidos lesionados (Guo *et al.*, 2024). Isso amplia o papel dos TLRs, que não apenas respondem a DAMPs, mas também interagem com proteínas adaptadoras, como



MyD88 e TRIF, para potencializar as respostas imunes. Outro aspecto importante é a descoberta de novos inibidores naturais de caspase-1, que podem reduzir a ativação excessiva de IL-1 $\beta$  e IL-18, um avanço potencial na modulação de doenças inflamatórias crônicas (Guo *et al.*, 2024; López *et al.*, 2020).

Os mediadores inflamatórios desempenham um papel crucial no desenvolvimento e na progressão de várias condições inflamatórias, com destaque para o óxido nítrico (NO). A produção de NO é regulada pelas enzimas NO-sintase constitutiva (c-NOS) e induzível (i-NOS), sendo liberado em pequenas quantidades em condições normais. No entanto, em situações patológicas, como inflamação e choque séptico, as quantidades de NO aumentam significativamente, exacerbando o processo inflamatório. Pesquisas recentes indicam o envolvimento de NO em doenças crônicas inflamatórias, ligadas ao estresse oxidativo e imunomodulação (Iwata *et al.*, 2020; Morris *et al.*, 2022).

O estresse oxidativo está intimamente relacionado com inflamação, envolvendo múltiplos mediadores como hormônios, citocinas e espécies reativas de oxigênio (ROS). O óxido nítrico (NO) é um dos principais mediadores, com papel dual: protege o sistema vascular em quantidades controladas, mas causa danos teciduais e ao DNA quando produzido em excesso. No contexto inflamatório, o recrutamento de neutrófilos ao local de lesão é essencial para a resposta imune precoce, mas sua ativação excessiva pode ser prejudicial, necessitando de regulação rigorosa para evitar danos adicionais aos tecidos (Iwata *et al.*, 2020; Xiang *et al.*, 2023).

A inflamação começa com o recrutamento de neutrófilos ao local da lesão em resposta a sinais quimiotáticos, e sua função vai além da defesa inicial, incluindo a modulação da resposta imunológica. Estudos recentes destacam que a desregulação da atividade dos neutrófilos pode exacerbar doenças inflamatórias crônicas. A ativação excessiva desses leucócitos está relacionada à exacerbação de doenças autoimunes, requerendo abordagens terapêuticas inovadoras para o controle adequado da inflamação (Rawat & Shrivastava, 2022; Soehnlein *et al.*, 2017).

A liberação de citocinas pró-inflamatórias e a ativação de leucócitos durante a inflamação podem ser mediadas por canais de panexinas, que criam poros na membrana plasmática, facilitando a comunicação célula-ambiente. Esses canais,

particularmente Panx1, desempenham um papel essencial na formação de macrófagos multinucleados, ativação de células T e quimioatração de leucócitos para amplificar a resposta imune. Disfunções nesses canais estão ligadas a condições inflamatórias crônicas (Chen *et al.*, 2023; Rusiecka *et al.*, 2022).

O recrutamento de células inflamatórias para o local da lesão é mediado por múltiplos sinais que regulam interações entre células endoteliais e leucócitos circulantes. Em inflamações agudas induzidas por TNF $\alpha$ , os canais Panx1 facilitam a adesão e extravasamento de leucócitos pela parede vascular. Estudos recentes demonstram que a deleção de Panx1 reduz a expressão de moléculas de adesão em células vasculares, inibindo o recrutamento de leucócitos (Rusiecka *et al.*, 2022; Yanguas *et al.*, 2017).

A adesão e o extravasamento de leucócitos dependem significativamente da expressão de P-selectina (CD62P), ICAM1 (CD54) e ICAM2 (CD102) no endotélio. Essas moléculas de adesão são reconhecidas por integrinas  $\beta$ 2, como CD11b-CD18, expressas pelos neutrófilos. O recrutamento de neutrófilos é mediado por agentes quimiotáticos, como C5a do sistema complemento, leucotrieno B4, CXCL8 e o fator ativador de plaquetas (PAF), que são produzidos por células residentes ou leucócitos infiltrantes (Alfaro *et al.*, 2022).

Outro fator ocorre no tecido inflamado, aumentando o fluxo sanguíneo inicialmente na área afetada. As substâncias vasoativas liberadas por fibras nervosas nociceptoras ou células imunitárias intersticiais residentes, como os macrófagos, desempenham um papel importante. No entanto, se a resposta inflamatória aguda não se resolve de forma oportuna e progride para um estado crônico, os mecanismos tornam-se disfuncionais e a vasoconstrição predomina (Alfaro *et al.*, 2022).

Durante a inflamação, há uma regulação dinâmica da permeabilidade vascular, favorecendo o extravasamento de fluidos, proteínas e leucócitos para o tecido afetado, levando ao edema intersticial. O aumento da permeabilidade vascular também está relacionado à ativação de mediadores inflamatórios, como histamina e serotonina, que promovem a abertura das junções intercelulares das células endoteliais. Essa hiperpermeabilidade facilita o recrutamento de leucócitos, como neutrófilos e monócitos, que são essenciais para a resposta inflamatória (Guarnizo *et al.*, 2023; Mowat *et al.*, 2017).

À medida que a inflamação avança, ocorre a ativação de vias de sinalização envolvendo fatores pró-inflamatórios, como o TNF- $\alpha$ , que intensificam a resposta inflamatória e, em casos crônicos, podem promover a fibrose tecidual. Além disso, estudos recentes indicam que o endotélio vascular, além de regular a permeabilidade, também atua como uma interface ativa que modula a resposta inflamatória, liberando mediadores anti-inflamatórios, que ajudam a promover a resolução da inflamação (Theofilis *et al.*, 2021).

A resolução da inflamação depende de um delicado equilíbrio entre a amplificação da resposta inicial e a ativação de mecanismos reparadores. O processo inflamatório é guiado por uma complexa rede de sinais, nos quais os mediadores pró-inflamatórios, como as citocinas e quimiocinas, promovem o recrutamento de células imunológicas (Leuti *et al.*, 2020; Theofilis *et al.*, 2021)

Com o tempo, moléculas anti-inflamatórias, como as resolvinas e lipoxinas, entram em ação, promovendo a resolução e a reparação tecidual. Esse controle permite que a inflamação seja modulada de acordo com o contexto, prevenindo danos crônicos e promovendo o retorno à homeostase (Kanai *et al.*, 2024).

### **2.1.1 Inflamação Granulomatosa**

A inflamação granulomatosa é um padrão histológico caracterizado por uma resposta tecidual específica, frequentemente observada após lesões celulares. A extensão da inflamação associada à formação de granulomas pode variar significativamente, sendo que estes podem estar acompanhados por inflamação intensa nas estruturas granulomatosas ou, em contrapartida, manifestar-se com mínima ou nenhuma inflamação associada, sendo classificados como granulomas brandos (O'Donovan *et al.*, 2024).

Essa resposta tecidual granulomatosa pode ser desencadeada por uma diversidade de condições, incluindo infecções, doenças autoimunes, reações tóxicas, alérgicas, medicamentosas e neoplásicas (Grammatikos & Gennery, 2024). O padrão dessas reações limita o diagnóstico diferencial em contextos patológicos e clínicos, abrangendo granulomas necrosantes, não necrosantes, supurativos,

inflamação granulomatosa difusa e reações de células gigantes de corpo estranho (Wang & Liu, 2022).

Existem dois tipos bem definidos de granulomas, classificados de acordo com sua etiologia: os granulomas de células gigantes, também conhecidos como granulomas imunológicos, que resultam de uma variedade de etiologias e podem ser histologicamente categorizados como necrosantes ou não necrosantes; e os granulomas de corpo estranho, que se formam em resposta a material inerte, sem uma resposta imune adaptativa, como suturas ou talco, onde uma coleção de histiócitos incapazes de fagocitar envolve o material estranho (Wang & Liu, 2022).

Os granulomas são agregados de macrófagos modificados em células epitelióides e outras células inflamatórias que se acumulam após exposição crônica a antígenos. O gatilho subjacente pode incluir a exposição a agentes nocivos que não podem ser degradados bioquimicamente ou a disfunção imunológica. O resultado final desse processo é a liberação de diversas citocinas que estimulam as células mononucleares a se fundirem, formando células gigantes multinucleadas, cercadas por uma borda de linfócitos e fibroblastos (O'Donovan *et al.*, 2024).

A formação de granuloma ocorre quando a resposta imune, seja humoral ou celular, não consegue eliminar o material estranho agressor. Esse fenômeno é predominantemente uma resposta imune celular de hipersensibilidade tardia, que busca isolar e neutralizar agentes patogênicos que são intrinsecamente difíceis de erradicar (Perelygina *et al.*, 2021). A inflamação granulomatosa representa uma interação complexa entre macrófagos maduros, células T helper (Th) e células B, contribuindo para a formação de estruturas granulomatosas (Röszer, 2020).

O tipo de resposta imune desencadeada depende da origem das partículas estranhas, sendo que patógenos intracelulares normalmente ativam uma resposta Th1, caracterizada pela secreção de citocinas como interferon gama, interleucinas IL-2 e IL-12. Em contraste, patógenos extracelulares evocam uma resposta Th2, com a liberação de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, resultando em um feedback positivo nas células T perpetuado pelas citocinas (Sacco *et al.*, 2023; Weeratunga *et al.*, 2024)

Os macrófagos desempenham um papel crucial no processamento do agente agressor em peptídeos antigênicos simples, os quais são apresentados aos linfócitos T. Essa interação resulta na ativação dos linfócitos T, que estimulam a produção de diversas citocinas, levando à ativação de outras células T e à

conversão de histiócitos e macrófagos comuns em histiócitos epitelióides, um tipo de célula com maior potencial funcional (Röszer, 2020).

Esses macrófagos epitelióides apresentam características morfológicas e funcionais aprimoradas, contribuindo significativamente para a resposta inflamatória e a formação do granuloma. Além disso, a comunicação entre macrófagos e linfócitos T é mediada por citocinas como IL-12 e TNF- $\alpha$ , que promovem uma resposta imune adaptativa robusta (Cronan, 2022).

Os histiócitos epitelióides se agrupam para formar granulomas e têm a capacidade de se fundir, resultando na formação de células gigantes multinucleadas. Essa reação granulomatosa é frequentemente circundada por um manguito de linfócitos, plasmócitos e eosinófilos, cuja composição é influenciada pela natureza do agente causador (McCaffrey *et al.*, 2022; Perelygina *et al.*, 2021). Os histiócitos epitelióides podem induzir necrose tecidual, levando à formação de granulomas “necrosantes”, característica de infecções (Ristow & Davis, 2021).

A ativação fisiológica dos histiócitos ocorre entre 24 a 48 horas após uma lesão, mediada pela ativação do sistema complemento (C3b, C5a) e pela liberação de quimiocinas e citocinas por células T auxiliares (Th1), como TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-17 e IFN- $\gamma$ , que promovem, recrutam e direcionam macrófagos ao local da lesão (Grammatikos & Gennery, 2024).

Histiócitos ativados podem persistir além da fase aguda, dominando a resposta inflamatória crônica e o subsequente reparo tecidual. Essa persistência sugere a existência de dois tipos de histiócitos: aqueles que equilibram a resposta inflamatória e promovem a fagocitose, e aqueles que auxiliam na cicatrização, fibrose e angiogênese (Ganesan *et al.*, 2022).

### **2.1.2 Inflamação e o Reparo Tecidual**

O reparo de feridas é um dos processos biológicos mais complexos que ocorrem durante a vida humana, envolvendo uma orquestração intrincada de múltiplas vias moleculares e celulares. Após uma lesão, uma série de respostas biológicas é imediatamente ativada e sincronizada para promover a cura (Kolimi *et al.*, 2022).

Este processo frequentemente resulta na formação de uma massa de tecido fibrótico não funcional, conhecida como cicatriz. Em contraste, os tecidos fetais lesionados podem ser totalmente recriados sem fibrose, em um fenômeno que se assemelha à regeneração (Wilkinson & Hardman, 2020). Organismos, como algumas espécies de salamandras e zebrafish, mantêm a capacidade de regenerar tecidos ao longo da vida adulta, oferecendo insights valiosos sobre os mecanismos de reparo e regeneração que poderiam ser aplicados na medicina regenerativa (Kolimi *et al.*, 2022; Martin, 2020).

Os processos de regeneração e reparo tecidual constituem uma sequência complexa de eventos moleculares e celulares que se desencadeiam após uma lesão tecidual, visando restaurar o tecido danificado. Este processo é tradicionalmente dividido em fases de hemostasia, inflamação, proliferação e maturação, nas quais diversas células, incluindo plaquetas, neutrófilos, monócitos/macrófagos, linfócitos, fibroblastos e células epidérmicas, desempenham papéis cruciais (M. Li *et al.*, 2021).

Durante a fase inflamatória, a ativação de mediadores solúveis, como quimiocinas e citocinas, juntamente com fatores de crescimento, é fundamental para a coordenação da resposta celular, promovendo a formação de tecido de granulação e a deposição de colágeno (Wang *et al.*, 2023). Além disso, a dinâmica da matriz extracelular e as interações entre células sanguíneas e parenquimatosas são essenciais para a integridade e eficácia do processo de cicatrização, evidenciando a complexidade e a plasticidade envolvidas na reparação tecidual (Baron *et al.*, 2020).

No contexto da cicatrização de feridas, a inflamação é reconhecida como a primeira etapa fundamental do processo e pode ser subdividida em três fases: a fase inflamatória, que envolve a hemostasia; a fase proliferativa, caracterizada pela formação de novo tecido; e a fase de maturação, que abrange a remodelação tecidual (Martin, 2020).

A resposta celular na fase inflamatória é marcada pelo influxo de leucócitos para a área da ferida. Este processo inicia-se rapidamente e está associado aos principais sinais de inflamação, como edema e eritema na região lesionada. Geralmente, a resposta celular se estabelece nas primeiras 24 horas após a lesão e pode se estender por até dois dias. Nas primeiras horas, uma quantidade significativa de neutrófilos transmigra através das células endoteliais das paredes dos capilares sanguíneos, sendo ativados por citocinas pró-inflamatórias, como a IL-

$1\beta$  e o  $\text{TNF-}\alpha$ , que desempenham papéis cruciais na modulação da resposta inflamatória no local da lesão (M. Li et al., 2021; Wilkinson & Hardman, 2020)

As citocinas desempenham um papel crucial na promoção da expressão de diversas classes de moléculas de adesão, que são determinantes para a diapedese de neutrófilos, incluindo selectinas e integrinas. Essas células inflamatórias são fundamentais no processo de cicatrização de feridas, contribuindo para a liberação de enzimas lisossomais e espécies reativas de oxigênio, além de facilitar a limpeza de fragmentos celulares e a degradação de matrizes extracelulares (Carvalho *et al.*, 2021).

Na fase proliferativa, o objetivo primordial é reduzir a área do tecido lesionado por meio de contração e fibroplasia, estabelecendo uma barreira epitelial funcional que ativa os queratinócitos. Essa etapa é essencial para o fechamento da lesão, englobando processos como angiogênese, fibroplasia e reepitelização (Carvalho *et al.*, 2021). Quando ocorre uma lesão tecidual, o processo de reparo é moderado pela atividade das células inflamatórias nas bordas da lesão, como os queratinócitos, além da ação de uma variedade de citocinas e fatores de crescimento que influenciam a migração, proliferação e diferenciação celular local (J. Yin et al., 2023).

A terceira fase da cicatrização, conhecida como fase de remodelação, inicia-se aproximadamente duas a três semanas após a lesão e pode perdurar por um ano ou mais. Esta fase é caracterizada pelo amadurecimento dos componentes teciduais e por profundas alterações na matriz extracelular, culminando na resolução da inflamação inicial (L. Zhang et al., 2022). Durante a remodelação, ocorre uma reorganização, degradação e ressíntese da matriz extracelular, onde o tecido de granulação é gradualmente transformado em uma estrutura mais funcional (Baron *et al.*, 2020).

A complexidade do processo de reparo implica que, na maioria das lesões, o resultado é um tecido funcional, em grande parte composto pela ação de células especializadas, principalmente fibroblastos, e uma matriz extracelular que, inicialmente desorganizada, se reorganiza em colágeno. Um reparo bem-sucedido da pele requer uma regulação molecular precisa ao longo de todo o processo de cicatrização (Schilrreff & Alexiev, 2022).

## 2.2 NOCICEPÇÃO E DOR

Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP) conceitua a dor como “uma experiência sensorial e emocional desagradável associada a dano tecidual real ou potencial, ou descrita em termos de tal dano.”; conceitua também nocicepção como “o processo neural de codificação de estímulos nocivos” (IASP, 1994).

Tradicionalmente, a dor foi compreendida a partir de uma perspectiva restrita, focando no processamento nociceptivo. A definição padrão de dor ressalta sua natureza subjetiva, que implica uma experiência consciente e pessoal. Este campo de estudo gerou um vasto conhecimento sobre a transdução, transmissão e processamento de sinais nociceptivos na medula espinhal, tanto em contextos de dor aguda quanto crônica (S. Liu & Kelliher, 2022).

A experiência dolorosa resulta, assim, da inter-relação entre a interpretação das qualidades sensoriais e os componentes afetivos, cognitivos e comportamentais, além das reações fisiológicas que se manifestam em resposta à estimulação ou disfunção do sistema nociceptivo (Marchand, 2021). A interpretação do fenômeno da dor é individualizada; cada indivíduo atribui significados idiossincráticos à experiência sensorial, influenciado por seu estado mental e pelo valor simbólico que a dor representa. Os comportamentos resultantes são determinados pelo significado da dor e não pela natureza ou intensidade do estímulo original (S. Liu & Kelliher, 2022).

A nocicepção representa o primeiro passo na sequência de eventos que levam à experiência dolorosa, sendo um fenômeno sensitivo-doloroso que transforma estímulos ambientais, sejam físicos ou químicos, em potenciais de ação nas fibras nervosas periféricas, que são então transmitidos ao Sistema Nervoso Central (Guo *et al.*, 2022). Estímulos nocivos induzem alterações na atividade de várias estruturas supraespinhais, desencadeando respostas antinociceptivas endógenas (Guo *et al.*, 2022; Woolf, 2022)

Os reflexos nociceptivos e a percepção da dor estão intrinsecamente ligados, uma vez que a ativação de nociceptores e de vias nociceptivas pode resultar na sensação de dor. No entanto, há evidências que sugerem que os nociceptores podem ser ativados mesmo na ausência de percepção dolorosa (Woolf, 2022). A eletrofisiologia dos nociceptores e das vias nociceptivas apoia essa ideia, uma vez



que estudos demonstram que muitos nociceptores periféricos podem ser ativados por estímulos que estão abaixo do limiar da percepção dolorosa, e uma proporção significativa de neurônios nociceptivos centrais responde de forma convergente a estímulos não nociceptivos (Fisher & Clarkson, 2024).

Ao ocorrerem lesões, os receptores nociceptivos experimentam modificações estruturais e funcionais ao longo do tempo, resultando em dor prolongada. Essas alterações são frequentemente acompanhadas pela liberação de substâncias algio gênicas nos tecidos, como prostaglandinas, bradicinina e citocinas, que amplificam a resposta à dor (Sirucek *et al.*, 2023).

A sensibilização dos neurônios periféricos leva à hiperalgesia termomecânica primária, onde estímulos normalmente não dolorosos se tornam dolorosos, enquanto a sensibilização dos neurônios centrais provoca hiperalgesia mecânica secundária, que resulta em aumento da sensibilidade a estímulos mecânicos em áreas adjacentes à lesão (Ziegler *et al.*, 2022).

Este fenômeno de sensibilização central está associado à neuroplasticidade, onde a reestruturação sináptica e a modulação da excitabilidade neuronal contribuem para a persistência da dor, mesmo na ausência de estímulos nocivos (Woolf, 2022). Assim, a dor crônica emerge não apenas como uma resposta a lesões agudas, mas também como um distúrbio complexo que envolve interações dinâmicas entre os sistemas periférico e central (Coghill, 2020; Eltrabily *et al.*, 2021).

### **2.2.1 Mecanismos Neurais da Nocicepção**

A nocicepção é o processo pelo qual estímulos térmicos, mecânicos ou químicos intensos são detectados por uma subpopulação especializada de fibras nervosas periféricas, conhecidas como nociceptores (Liu *et al.*, 2021). Sob condições fisiológicas normais, a informação sensorial é captada pelas estruturas do Sistema Nervoso Periférico (SNP) e transmitida para as unidades do Sistema Nervoso Central (SNC), onde ocorre a decodificação e interpretação dos sinais nociceptivos (Fiore *et al.*, 2023).

Os corpos celulares dos nociceptores estão localizados nos gânglios da raiz dorsal (DRG) e no gânglio trigeminal, que inervam as áreas faciais; cada nociceptor

possui um ramo axonal periférico que inerva seu órgão-alvo e um ramo central que projeta para a medula espinhal (Bellocchi *et al.*, 2022). Além disso, mecanismos modulatórios podem sensibilizar ou suprimir a nocicepção em diferentes estágios de processamento, refletindo uma integração complexa entre os tecidos periféricos e o SNC (Sawicki *et al.*, 2021).

Existem duas classes principais de nociceptores, que desempenham papéis distintos na percepção da dor. A primeira classe é composta por aferentes mielinizados de diâmetro médio, conhecidos como fibras A $\delta$ , que mediam a dor “primeira”, caracterizada por sua agudeza, localização precisa e rapidez na transmissão. Estas fibras A $\delta$  diferem das fibras A $\beta$ , que, apesar de também serem mielinizadas, possuem um diâmetro maior e são responsáveis pela condução de estímulos mecânicos inócuos, como toques leves (Bellocchi *et al.*, 2022). A segunda classe é constituída por fibras “C”, que são não mielínicas e de pequeno diâmetro, transmitindo a dor mal localizada, conhecida como “segunda” ou dor lenta. A dor transmitida por estas fibras é geralmente difusa e de início mais tardio (Donnelly *et al.*, 2020).

A transdução nociceptiva é um componente essencial da via nociceptiva, que abrange os processos de transdução, transmissão, modulação e percepção da dor. Este fenômeno ocorre quando a intensidade dos estímulos atinge o limiar nocivo de detecção dos nociceptores. Esses receptores possuem propriedades biofísicas e moleculares que lhes permitem detectar seletivamente e responder a estímulos potencialmente lesivos, como calor excessivo, pressão intensa ou substâncias químicas nocivas (Malafiglia *et al.*, 2022).

À medida que se ascende no neuroeixo, observa-se um aumento significativo na redundância anatômica das vias sensitivas, acompanhado de uma redução na especificidade das respostas. A ação dos neurotransmissores excitatórios liberados na medula espinhal pelos aferentes primários nociceptivos é modulada por sistemas neuronais excitatórios e inibitórios presentes em várias regiões do sistema nervoso, incluindo áreas corticais e subcorticais que desempenham papéis cruciais na percepção da dor (Salvador *et al.*, 2021).

A transdução e a geração das sensações de dor são processos complexos que envolvem uma variedade de moléculas, células e circuitos neurais em múltiplos níveis, desde a periferia até a medula espinhal e o cérebro. As interações dinâmicas

entre células residentes na pele e terminações nervosas sensoriais têm um impacto profundo na forma como percebemos tanto o toque quanto a dor. Estas interações são mediadas por mediadores inflamatórios e sinais celulares que modulam a excitabilidade das fibras nociceptivas (Chen *et al.*, 2020; Salvador *et al.*, 2021)

Os interneurônios espinhais e as influências excitadoras e inibidoras descendentes colaboram para refinar a transmissão da dor no sistema nervoso central, permitindo uma integração mais eficiente das informações nociceptivas. Esse complexo sistema de regulação é fundamental para a percepção adequada da dor e para a adaptação a estímulos nocivos (Bellocchi *et al.*, 2022).

A atividade das células sensoriais primárias e de ordem superior, tanto na periferia quanto no sistema nervoso central (SNC), é amplamente regulada por um equilíbrio delicado entre eventos excitatórios e inibitórios. Este equilíbrio envolve a ativação de canais iônicos acoplados à membrana, receptores acoplados a proteína G, receptores de citocinas, bem como tirosinas quinases e outros tipos de receptores (Malafovia *et al.*, 2022).

Após uma inflamação periférica, ocorre uma hiperatividade nos neurônios sensoriais primários, que resulta em um aumento da liberação de neurotransmissores, como o glutamato, e de neuromoduladores, incluindo substância P, peptídeo relacionado ao gene da calcitonina e fator neurotrófico derivado do cérebro. Essa liberação intensifica a hiperatividade de neurônios pós-sinápticos nociceptivos na medula espinhal, levando à chamada sensibilização central (Malafovia *et al.*, 2022; Salvador *et al.*, 2021).

Os terminais nervosos periféricos dos nociceptores contêm receptores e canais iônicos que são sensíveis a mediadores moleculares liberados durante a inflamação. Quando ativados, esses nociceptores transduzem potenciais de ação para os corpos celulares localizados nos gânglios da raiz dorsal. Em seguida, esses sinais são transmitidos à medula espinhal e ao cérebro, onde são processados, contribuindo para a percepção da dor (Donnelly *et al.*, 2020).

Os subtipos de neurônios nociceptores inervam diferentes camadas epiteliais, como as da pele, pulmão e trato gastrointestinal, estabelecendo uma interface crítica com os estímulos ambientais (Chu *et al.*, 2020). Os nociceptores de fibra C, que são neurônios não mielinizados e possuem condução lenta, são particularmente sensíveis a estímulos térmicos e químicos nocivos, mediando a percepção da dor

crônica e a sensação de queimadura (Fiore *et al.*, 2023). Em contraste, os nociceptores de fibras A $\beta$  e A $\delta$  são mielinizados, o que lhes permite conduzir impulsos nervosos com mais rapidez. Esses neurônios estão associados à sensibilidade mecânica e à dor aguda, sendo fundamentais na resposta a lesões súbitas e à proteção do organismo (Chu *et al.*, 2020).

Estudos recentes demonstraram que os nociceptores são altamente diversos em termos de expressão molecular, possuindo diferentes padrões de canais iônicos, receptores de fatores de crescimento, receptores acoplados a proteína G e neuropeptídeos. Essa diversidade funcional permite que uma única célula nociceptora responda a múltiplos tipos de estímulos sensoriais, mediando respostas distintas e, por vezes, complexas (Salvador *et al.*, 2021).

A exploração dessas diferenças nos perfis de expressão molecular abre novas possibilidades para a modulação da dor, indicando que direcionar processos e moléculas específicas pode levar a avanços significativos nos tratamentos para condições dolorosas (Sawicki *et al.*, 2021).

### **2.2.2 Interação entre Inflamação, nocicepção e dor**

As atividades dos neurônios nociceptores são moduladas por células imunes que, ao liberarem mediadores químicos, aumentam a sensibilidade à dor. Por sua vez, os nociceptores também liberam neuropeptídeos e neurotransmissores, como a substância P e o fator neurotrófico derivado do cérebro (BDNF), que atuam sobre células imunes inatas e adaptativas, influenciando suas funções (Coaccioli *et al.*, 2024).

Essa interação complexa permite que a sinalização neural não apenas promova a percepção da dor, mas também defina padrões de resposta imunológica, contribuindo para o desenvolvimento de doenças inflamatórias, tanto localizadas quanto sistêmicas (Bellocchi *et al.*, 2022; Coaccioli *et al.*, 2024).

Está bem estabelecido que os mediadores inflamatórios liberados localmente após lesões teciduais podem estimular diretamente e causar sensibilização dos nociceptores localizados nas fibras nervosas dos neurônios aferentes primários em tecidos periféricos (Kavelaars & Heijnen, 2021). Entre esses mediadores

inflamatórios, destacam-se substâncias clássicas como bradicinina, prostaglandinas, íons  $H^+$ , ATP e fator de crescimento nervoso, além de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas (Fiore *et al.*, 2023).

Pesquisas mais recentes também têm explorado mediadores emergentes, como peptídeos e outras moléculas sinalizadoras, que desempenham papéis cruciais na modulação da dor (Kuner & Kuner, 2021). Assim, a inflamação aguda está intimamente ligada ao desenvolvimento da dor aguda, reforçando a interdependência entre as respostas imunológicas e a nocicepção (Salvador *et al.*, 2021).

A dor crônica, como a dor inflamatória ou neuropática, representa uma condição complexa que não apenas compromete significativamente a qualidade de vida dos indivíduos, mas também impõe um considerável custo econômico à sociedade (Raja *et al.*, 2020). Os mecanismos subjacentes à dor patológica são intrincados e caracterizados por alterações neuronais tanto periféricas quanto centrais, além da ativação neuroimune, que modula a iniciação e manutenção da dor crônica (Kavelaars & Heijnen, 2021).

As células gliais incluindo micróglia, astrócitos e oligodendrócitos, localizadas no sistema nervoso central (SNC) desempenham um papel crítico na modulação da inflamação após lesões nervosas, assim como as células de Schwann no sistema nervoso periférico (Donnelly *et al.*, 2020).

Dada a capacidade do sistema nervoso de propagar sinais em milissegundos, os nociceptores estão estrategicamente posicionados para serem os primeiros a responder a patógenos e lesões nos tecidos (Mustafa *et al.*, 2023). Embora a dor seja essencial para induzir mudanças comportamentais que levam à evitação de estímulos nocivos, há um reconhecimento crescente de que a sensação de dor está intimamente ligada às interações moleculares e celulares entre os sistemas nervoso e imunológico (Fisher & Clarkson, 2024).

A dor é, portanto, uma das características cardinais da inflamação (Salvador *et al.*, 2021). Os nociceptores constituem um subconjunto especializado de neurônios sensoriais que mediam a dor e inervam densamente os tecidos periféricos, incluindo pele, articulações, vias respiratórias e trato gastrointestinal. Existem vários subconjuntos de nociceptores, cada um com a capacidade de

responder a estímulos nocivos mecânicos, químicos ou térmicos, desempenhando papéis fundamentais na percepção e na modulação da dor (Coaccioli *et al.*, 2024).

## 2.3 BIOPROSPECÇÃO DE PLANTAS MEDICINAIS

Atualmente, o Brasil é reconhecido como o país mais biodiverso do mundo, abrigando aproximadamente 103.870 espécies de animais e 43.020 espécies de plantas conhecidas, o que representa cerca de 70% das espécies catalogadas globalmente. O país é classificado como megadiverso e é lar de dois hotspots de biodiversidade, seis biomas terrestres e três grandes ecossistemas marinhos (Reis *et al.*, 2023; IUCN, 2024). Apesar de ter entre 350.000 e 550.000 espécies estimadas, a pesquisa sobre as potencialidades terapêuticas das plantas ainda está em desenvolvimento (Palhares *et al.*, 2021).

As plantas medicinais, que têm sido utilizadas há milênios para fins terapêuticos, continuam a ser um campo promissor para a pesquisa científica. Com o avanço da química orgânica, tornou-se possível o isolamento de substâncias puras, como a digoxina e a morfina, a partir de plantas. Essa tradição popular, transmitida de geração em geração, encontra respaldo em diversas farmacopeias ao redor do mundo (Lima *et al.*, 2023).

As práticas de medicina tradicional baseadas no uso de recursos naturais são de grande relevância nas comunidades mais isoladas, muitas vezes representando as únicas opções terapêuticas acessíveis. Essas práticas estão fortemente ancoradas no conhecimento etnobotânico e na utilização sustentável da biodiversidade local. De fato, estudos recentes mostram que muitas dessas plantas, utilizadas por gerações, possuem compostos bioativos com potencial farmacológico significativo, reforçando a importância da pesquisa científica para validar sua eficácia e segurança (Reis *et al.*, 2023).

A diversidade da flora brasileira e o conhecimento etnobotânico acumulado ao longo das gerações demandam a identificação de inúmeras plantas com potencial terapêutico, que podem ser empregadas tanto na profilaxia quanto no tratamento de diversas condições de saúde (Guo *et al.*, 2023). Esse panorama ressalta a necessidade de levantamentos sistemáticos da vegetação medicinal, associando o

manejo de espécies de interesse comercial aos variados ecossistemas do país (Zhou *et al.*, 2021).

A maior parte das informações sobre as espécies medicinais da caatinga é oriunda de levantamentos etnobotânicos, os quais evidenciam a relação intrínseca entre as comunidades locais e as plantas utilizadas na terapêutica. A etnobotânica, enquanto campo de estudo, emprega diversas metodologias para aprofundar o conhecimento sobre a utilização da biodiversidade, incorporando saberes locais e aplicando estratégias para a seleção de espécies com potencial bioprospectivo (Pedroso *et al.*, 2021).

A medicina tradicional desempenha um papel fundamental no manejo de doenças crônicas e debilitantes, incluindo o câncer, que frequentemente requer intervenções terapêuticas complexas. A crescente industrialização da sociedade tem impulsionado o interesse no desenvolvimento de medicamentos quimioterapêuticos a partir de plantas, com fontes valiosas de compostos bioativos (Guo *et al.*, 2023).

No entanto, o uso tradicional de diversas plantas medicinais, fundamentado em conhecimentos populares e na crença de que produtos naturais apresentam menos riscos de reações adversas, resultou em uma escassez de plantas devidamente avaliadas por meio de estudos pré-clínicos e clínicos que confirmem sua eficácia e segurança (Palhares *et al.*, 2021). Há necessidade de um enfoque mais rigoroso na pesquisa etnofarmacológica, para que se possa validar as práticas tradicionais e garantir a segurança dos tratamentos propostos (Reis *et al.*, 2023).

A biogeografia desempenha um papel crucial na determinação da abundância e disponibilidade de plantas medicinais, influenciando diretamente seu uso pelas comunidades locais (Reis *et al.*, 2023). As práticas populares de utilização dessas plantas emergem como alternativas viáveis para o tratamento de doenças e manutenção da saúde em muitas comunidades, ao mesmo tempo em que refletem aspectos significativos da cultura local, sendo transmitidas de geração em geração (Zhou *et al.*, 2021).

Essa relação entre biodiversidade e saberes tradicionais destaca a importância de estudos etnobotânicos, que não apenas documentam o uso das plantas, mas também promovem a conservação do conhecimento cultural e da biodiversidade (Cavalcante & Scudeller, 2022).

### 2.3.1 *Ctenodon martii* (Benth.) D.B.O.S. Cardoso, P.L.R. Moraes & H.C. Lima

A espécie em questão pertence ao gênero *Ctenodon*, da família Leguminosae também conhecida como Fabaceae, subfamília Faboideae, conhecida popularmente como tripa de galinha, planta nativa do Nordeste Brasileiro, principalmente encontrada no bioma tropical sazonalmente seco (Cardoso, Moraes & Lima, 2020).

Este gênero foi inicialmente descrito detalhadamente na obra *Flora Brasiliensis* de Martius e Spix em 1859, com a catalogação de 24 espécies. Em 1938, uma divisão taxonômica do gênero foi proposta, criando *Eu-aeschynomene* e *Ochopodium*. Revisado em 1955 renomeou *Eu-aeschynomene* para *Aeschynomene*, abrangendo aproximadamente 350 espécies, amplamente distribuídas em regiões tropicais e áreas de clima temperado quente (Cardoso, Moraes & Lima 2020).

Com o avanço das novas tecnologias, a classificação da espécie passou por uma revisão significativa. Estudos sistemáticos baseados em análises filogenéticas moleculares indicaram uma mudança na classificação do gênero, anteriormente denominada *Aeschynomene*, para o gênero *Ctenodon*. Os resultados dessas análises restabeleceram corretamente o gênero da espécie como *Ctenodon martii*, refletindo sua posição filogenética de forma mais precisa. (Domingues *et al.*, 2022; Cardoso, Moraes & Lima 2020).

Pertencente à família Leguminosae e subfamília Faboideae, é uma planta das mais diversas dentro das Angiospermas, com aproximadamente 727 gêneros e 19.325 espécies reconhecidas globalmente, o que a torna a terceira maior família de plantas com flores. No Brasil, é considerada a maior família, compreendendo cerca de 2.100 espécies distribuídas em 188 gêneros, dos quais 31 são endêmicos. Esta família está presente em todos os biomas brasileiros, reforçando sua ampla adaptabilidade ecológica (Choi, 2024; Domingues *et al.*, 2022). A ocorrência da família das Leguminosae no Brasil é bastante significativa, em termos econômicos, as sementes, legumes, folhas, raízes e flores de muitas de suas espécies são fontes de alimentos ricos em proteínas para homens e animais em quase todas as partes do mundo (Usman *et al.*, 2022).

O gênero *Ctenodon*, é um arbusto de aproximadamente 1,5 m de altura, com caule rígido, cilíndrico, bem ramificado, inerme e tomentoso. Possui estipulações duplas, estreitamente triangulares, e filotaxia alterna e dística. Folhas compostas entre 15 a 17, imparipinadas, alternadas de formato oblongo, ápice obtuso, margem



inteira e base assimétrica. Faces, adaxial e abaxial glabras, e o pecíolo é curto, com comprimento aproximadamente 10 vezes menor que o da ráquis, sendo eglandular. A inflorescência é axilar, em pseudorraços. Os botões são obovados, e as flores são grandes, estipitadas e monóicas. O cálice é campanulado e bilabiado, com cinco lacínios triangulares. A corola é papilionácea, unguiculadas, estandarte, de formato orbicular, reflexo e dorsalmente piloso, apresenta coloração amarelada. O androceu é monadelfo, com 10 estames, enquanto o gineceu é composto por um único ovário súpero, pedicelado e pluriovulado (Cardoso, Moraes & Lima, 2020).

**Imagem 1** – Exsicata (Nº 2293328) *Aeschynomene martii*. Coleta com a colaboração do Centro de Pesquisa do Cacau, Itabuna, Bahia e patrocinado pelo Botanical Garden Herbarium (Cardoso, Moraes & Lima, 2020).



Estudos fitoquímicos da família Leguminosae demonstraram a presença de compostos alcaloides na casca; isoflavona, triterpenos e alguns diterpenos (Ishaq *et al.*, 2022). Entre esses compostos, os diterpenos e seus derivados isolados têm sido associados a atividades protetoras contra a penetração de cercárias de *Schistosoma mansoni*, além de demonstrar propriedades anti-inflamatórias, como evidenciado em estudos que analisaram o edema de pata induzido por carragenina (Dutra *et al.*, 2018).

A vasta biodiversidade do Brasil faz das práticas tradicionais de uso de plantas medicinais uma alternativa crucial para muitas comunidades no tratamento de doenças e na manutenção da saúde, refletindo um conhecimento cultural transmitido ao longo das gerações (Costa Ferreira *et al.*, 2021). Tais práticas são essenciais para a promoção da saúde, especialmente em áreas remotas onde o acesso a medicamentos convencionais é limitado, e sua valorização contribui para a conservação da biodiversidade local (Leite *et al.*, 2021).

A *Ctenodon martii* é uma espécie pouco explorada do ponto de vista medicinal, e atualmente, não há registros na literatura que comprovem atividades terapêuticas específicas atribuídas a essa espécie ou ao seu gênero. No entanto, estudos envolvendo sua família Leguminosae (Fabaceae), já demonstraram diversas propriedades bioativas. Estudos com as frações do extrato *Lupinus albus* mostrou um efeito protetor contra hiperglicemia em ratos diabéticos que sofrem de diabetes mellitus tipo 1, apresentando também aumentou nos níveis de glutathione enquanto reduziu os níveis de peroxidação lipídica (Ishaq *et al.*, 2022).

Estudo com extratos etanólico de espécies de *Senna Mill* (Fabaceae), observou correlação forte para as variáveis fenóis totais e atividade antioxidante, muito forte antifúngica e moderada para atividade antioxidante (Neves *et al.*, 2022). *Pterodon emarginatus* (sucupira-branca) possui propriedades antioxidantes, antibacterianas, anestésicas, além de fortalecer capilares e proteger fibras de colágeno. Com potencial angiogênico, essas atividades biológicas contribuem para uma cicatrização mais eficiente (Valentim *et al.*, 2023). Os efeitos anti-inflamatórios isolados da oleorresina de *Pterodon emarginatus* podem representar uma abordagem terapêutica promissora para os sintomas da COVID-19 e pós-COVID, ao reduzir mediadores inflamatórios como IL-6, COX-2, fosfolipase A2 e INF- $\gamma$  (Oliveira *et al.*, 2021).

Visto a relevância dessa planta, destaca-se o papel crucial dos produtos naturais como fontes para o desenvolvimento de novos fármacos. Esses compostos muitas vezes atuam como protótipos, apresentando atividades semelhantes aos compostos originais, e reforçam sua importância em pesquisas farmacológicas (Vaou *et al.*, 2021). Além disso, as plantas medicinais desempenham uma função central na medicina moderna, fornecendo compostos bioativos com estruturas químicas frequentemente impossíveis de replicar sinteticamente. Esses compostos podem ser modificados para aumentar sua eficácia ou reduzir a toxicidade, ampliando seu potencial terapêutico (Bordon *et al.*, 2020).

O uso tradicional de plantas medicinais, frequentemente respaldado pelo conhecimento popular e pela percepção de que produtos naturais são isentos de reações adversas, resultou na escassez de estudos científicos rigorosos que avaliem a eficácia e segurança dessas plantas. Consequentemente, muitas espécies ainda não foram submetidas a investigações pré-clínicas e clínicas adequadas, o que limita seu uso terapêutico em larga escala e impede a confirmação de suas propriedades medicinais (Süntar, 2020).

O desconhecimento acerca dos potenciais efeitos colaterais e da toxicidade de plantas medicinais amplamente utilizadas pela população representa um risco significativo para a saúde. No Brasil, muitas espécies da flora nativa são consumidas sem comprovação científica rigorosa de suas propriedades farmacológicas, sendo seu uso propagado principalmente por meio de tradições populares ou comerciantes locais (Junior *et al.*, 2022).

Sabe-se que diversos fitoterápicos contêm compostos bioativos que podem induzir reações adversas, seja pela ação direta de seus componentes químicos, seja pela presença de contaminantes ou adulterantes. Isso reforça a necessidade de um controle de qualidade rigoroso em todas as etapas de produção, desde o cultivo e coleta até a extração e formulação final do medicamento (Süntar, 2020).

A toxicidade de uma espécie vegetal pode ser influenciada por uma variedade de fatores, tanto relacionados às características da planta quanto às condições do indivíduo (Anywar *et al.*, 2021). No que diz respeito aos fatores botânicos, aspectos como armazenamento inadequado do material vegetal, dosagem utilizada, métodos de administração, interações entre diferentes plantas medicinais consumidas simultaneamente e contaminação por toxinas fúngicas,

pesticidas e metais pesados são determinantes na toxicidade das plantas (Chahardehi *et al.*, 2020; Pliego *et al.*, 2022)

A toxicidade associada ao uso de plantas medicinais representa um desafio significativo para a saúde pública, com efeitos adversos frequentemente decorrentes de fitomedicamentos, possíveis adulterações e reações adversas provocadas por interações sinérgicas com outros medicamentos (Gonçalves *et al.*, 2022). As investigações sobre a segurança do uso de fitoterápicos e plantas medicinais no Brasil ainda são limitadas, assim como a fiscalização da comercialização realizada por órgãos oficiais em mercados públicos, feiras livres e lojas de produtos naturais (Junior *et al.*, 2022; Silva *et al.*, 2021).

Além disso, a avaliação e a identificação de espécies vegetais potencialmente tóxicas podem ser desafiadoras. Entre os fatores que complicam essa identificação estão a falta de relato por parte do paciente sobre o consumo ou contato com determinadas plantas, a escassez de dados sobre o potencial tóxico das espécies e a ausência de profissionais qualificados para a identificação precisa das plantas nos locais de atendimento (Gonçalves *et al.*, 2022; Silva *et al.*, 2021).

Desta forma, a análise deve ser baseada na maior quantidade possível de dados, sobretudo naquelas obtidas nos exames clínicos. As investigações toxicológicas e os dados epidemiológicos também podem auxiliar na identificação de intoxicações ou no reconhecimento de casos de uso inadequado de espécies vegetais.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar as atividades anti-inflamatória, antinociceptiva, cicatrizante, sedativa e o potencial toxicológico “*in vivo*” do extrato etanólico, frações e subfrações do caule/casca, de *Ctenodon martii* coletada na região da Floresta Nacional Contendas do Sincorá (FLONA).

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

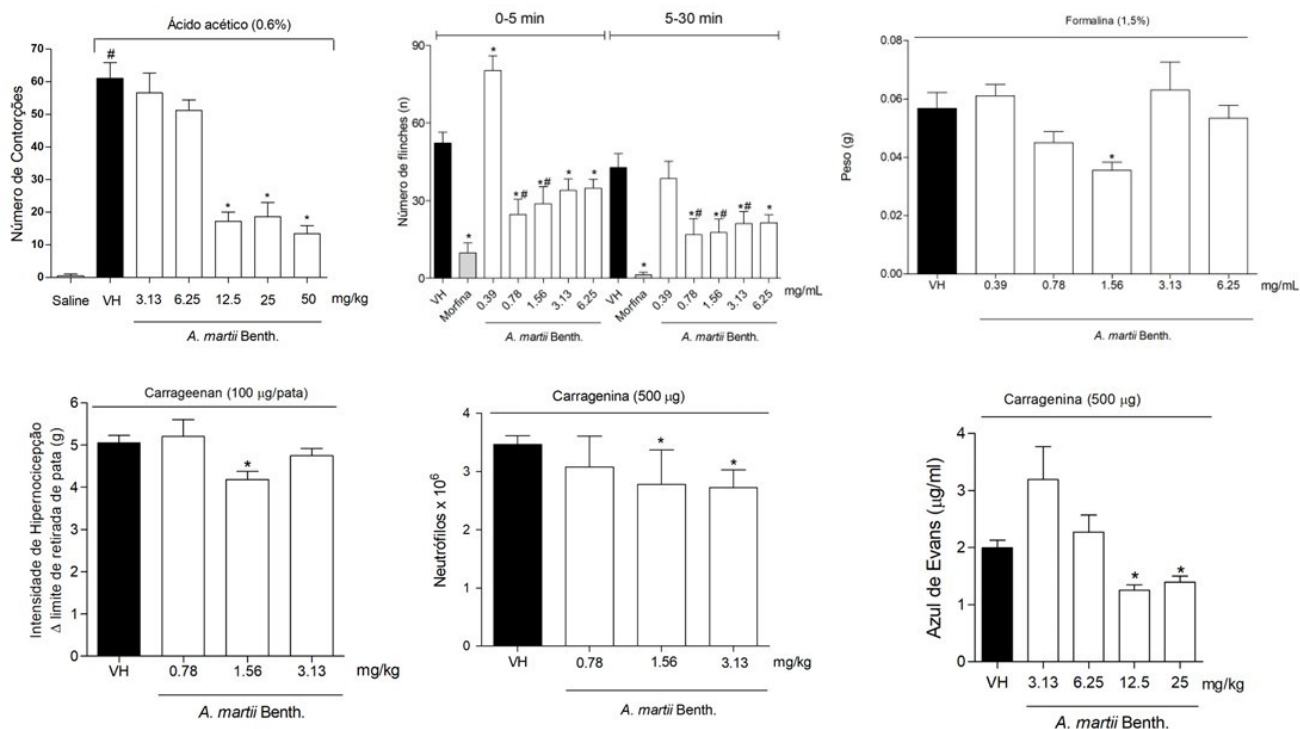
- a) Investigar a composição química presentes no extrato do caule/casca de *Ctenodon martii*;
- b) Examinar os possíveis mecanismos de ação anti-inflamatórios e antinociceptivo no extrato do caule/casca de *Ctenodon martii*;
- c) Verificar a atividade anti-inflamatória do extrato etanólico do caule/casca de *Ctenodon martii* em modelo experimental de granuloma;
- d) Verificar a atividade cicatrizante do extrato etanólico do caule/casca de *Ctenodon martii* em modelos experimentais de feridas.
- e) Avaliar a possível atividade sedativa com interferência locomotora do extrato etanólico do caule/casca de *Ctenodon martii* em modelo de Labirinto em Cruz Elevado.
- f) Testar o potencial toxicológico agudo do extrato etanólico do caule/casca de *Ctenodon martii*.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1. DADOS PRÉVIO SOBRE PROPRIEDADES BIOATIVAS DE *Ctenodon martii*

Estudos do grupo de pesquisa com *Aeschynomene martii* (Figura 1) demonstraram que o extrato etanólico apresentou atividade significativa em comparação ao controle veículo ( $p < 0,05$ ). Houve redução nas contorções abdominais nas doses de 12,5, 25 e 50 mg/kg; no teste de formalina apresentou redução dos “flinches” na 1ª Fase: nas doses de 0,78, 1,56, 3,13 e 6,25 mg/kg, e na 2ª Fase: nas doses de 0,78, 1,56, 3,13 e 6,25 mg/kg. Houve atividade antiedematogênica na dose de 1,56 mg/kg. A hiperalgesia mecânica reduziu na dose de 1,56 mg/kg. Sobre atividade anti-inflamatória, observou redução no recrutamento de neutrófilos nas doses de 1,56 e 3,13 mg/kg, e no extravasamento peritoneal nas doses de 12,5 e 25 mg/kg (Oliveira; Cruz & Yatsuda, 2016).

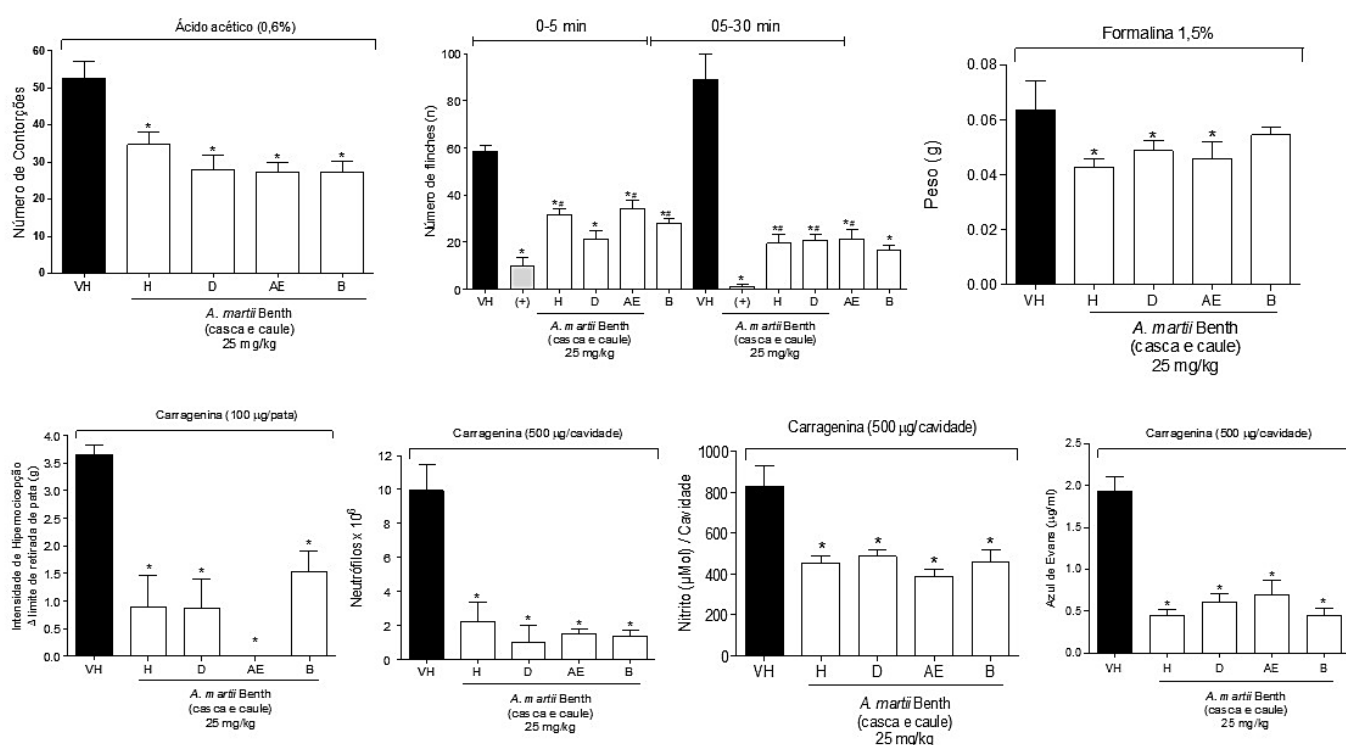
#### AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA DO EXTRATO ETANÓLICO DO CAULE DE *Aeschynomene martii* BENTH (TRIPA DE GALINHA)



**Figura 1** – Prancha com resultados anteriores sobre os efeitos anti-inflamatórios e antinociceptivo do extrato etanólico de *Aeschynomene martii* (Oliveira; Cruz & Yatsuda, 2016).

Em continuidade, estudos com as frações de *Aeschynomene martii* (Figura 2) na dose 25 mg/kg apresentou atividade significativa em comparação ao controle veículo ( $p < 0,05$ ) nos seguintes testes. Atividade antinociceptiva foi apresentada em todas as frações no teste de contorção abdominal induzido por ácido acético 0,6%; assim como redução do número de “flinches” na 1ª fase e 2ª fase de todas as frações. Houve atividade antiedematogênica nas frações de hexano, diclorometano e acetato de etila, no *Von Frey* eletrônico por injeção intraplantar de carragenina, todas as frações foram capazes de reduzir a hipernocicepção. Na atividade anti-inflamatória no teste de migração de neutrófilos, avaliação na formação de óxido nítrico e permeabilidade vascular por azul de Evans todas as frações mostraram potencial anti-inflamatório (Morbeck; Cruz & Yatsuda, 2018).

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA, ANTINOCICEPTIVA, ANTIOXIDANTE E TOXICOLÓGICA DO EXTRATO ETANÓLICO E DAS FRAÇÕES DO CAULE E CASCA DA *Aeschynomene martii* BENTH**



**Figura 2** – Efeitos antinociceptivo e anti-inflamatórios das frações de Hexano (HEX), Diclorometano (DIC), Acetato de Etila (A.E) e Butanol (BUT) de *Aeschynomene martii* em modelos experimentais (Morbeck; Cruz & Yatsuda, 2018).

Com base na análise dos resultados químicos, biológicos obtidos com o extrato bruto, frações de diclorometano descritos, na Figura 1 e Figura 2, e fundamentados pela revisão de literatura, foi dado continuidade ao fracionamento de diclorometano para a obtenção de subfrações e sub-subfrações, utilizando uma dose teste padrão de 25 mg/kg nos bioensaios.

Considerando que a purificação de substâncias naturais nem sempre resulta em uma redução da dose necessária para alcançar a atividade biológica desejada (Caesar & Cech, 2019). Estudos corroboram que fatores como perda de sinergia, alterações de biodisponibilidade e a especificidade de ação podem influenciar a relação dose-resposta mesmo em compostos isolados (Moffett *et al.*, 2022).

Esta relação pode ser explicada por fatores como a perda de interações sinérgicas presentes no extrato bruto, mudanças na biodisponibilidade e a especificidade de ação do composto isolado. Embora compostos purificados ofereçam maior precisão no estudo dos mecanismos de ação, extratos complexos contêm uma combinação de compostos que trabalham de forma sinérgica para intensificar o efeito biológico (Caesar & Cech, 2019; Moffett *et al.*, 2022).

A atividade de misturas de compostos naturais frequentemente supera a soma dos efeitos individuais, sugerindo que as interações entre moléculas podem amplificar a eficácia e, portanto, permitir o uso de doses menores no estado bruto (Gutierrez *et al.*, 2024). No entanto, ao isolar um único componente, esses efeitos colaborativos podem ser perdidos, exigindo doses mais altas do composto purificado para alcançar o mesmo efeito observado no extrato bruto (Caesar & Cech, 2019; Roell *et al.*, 2017). Além disso, a purificação pode alterar propriedades físico-químicas do composto, como solubilidade e estabilidade, impactando sua atividade biológica (Moffett *et al.*, 2022).

Outro aspecto é que nem todos os compostos presentes no extrato contribuem diretamente para a atividade principal; alguns atuam como adjuvantes, aumentando a eficácia ou reduzindo efeitos adversos. Quando eliminados no processo de purificação, a eficácia global pode ser reduzida, mesmo com maior pureza do componente ativo principal (Caesar & Cech, 2019; Gutierrez *et al.*, 2024).



## 4.2. COLETA E IDENTIFICAÇÃO DA *Ctenodon martii*

Para o desenvolvimento desta pesquisa, foi escolhida a espécie vegetal *Ctenodon martii*, popularmente conhecida como “Tripa de Galinha”. Essa escolha se baseia na ampla ocorrência da planta na região do semiárido baiano, especialmente na Floresta Nacional Contendas do Sincorá (FLONA), e no interesse da comunidade local em compreender suas possíveis aplicações medicinais, dada sua abundância. Além disso, a ausência de estudos biológicos detalhados sobre a espécie reforça a relevância desta investigação.

A reclassificação taxonômica da espécie também contribui para a importância deste estudo. Estudos sistemáticos moleculares indicaram mudança na classificação do gênero anteriormente escrito *Aeschynomene* para o gênero *Ctenodon*, após resultados das análises filogenéticas moleculares da linhagem sendo restabelecido corretamente o gênero da espécie *Ctenodon martii* (Cardoso *et al.*, 2020; Domingues *et al.*, 2022).

Para o início da pesquisa, foram realizadas coletas da planta com o objetivo de obter o material vegetal necessário. A coleta foi realizada com o devido consentimento do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA), que forneceu o Registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico (Nº 12292-1) (ANEXO C) e a Autorização para atividade com finalidade científica (Nº 13258-1) (ANEXO D).

A espécie foi devidamente fotografada, sua localização foi registrada (S 13° 55' 03" e W 041° 06' 87.1"), e o material foi catalogado. As exsicatas foram depositadas no Herbário da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB), campus de Vitória da Conquista, sob a coordenação do Prof. Avaldo de Oliveira S. Filho. Os números de vouchers registrados para as exsicatas depositadas são 4921 a 4926.

**Imagem 2** – Planta *Ctenodon martii* em seu *habitat*, na Floresta Nacional Contendas do Sincorá (FLONA), Contendas do Sincorá- BA.



**Fonte:** Fotografia da espécie vegetal no FLONA, registro da autora.

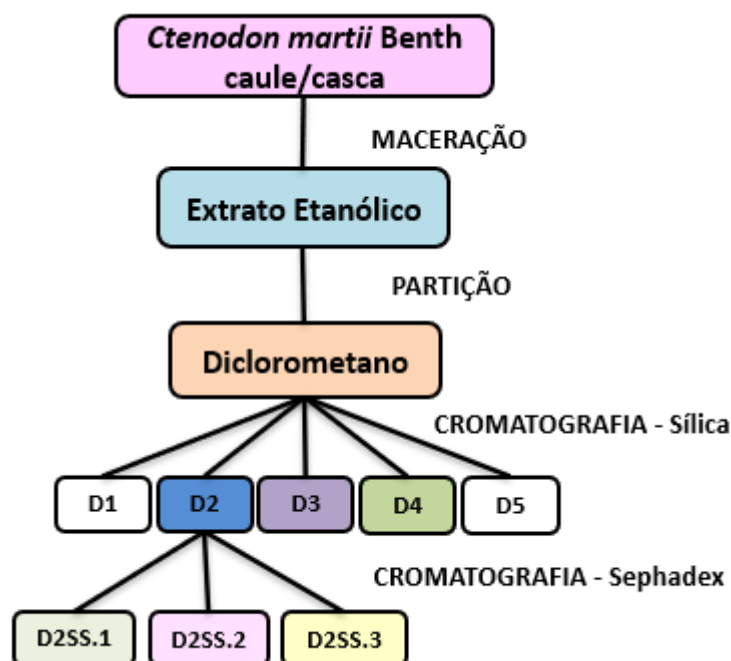
### 4.3. ANÁLISE FITOQUÍMICA

#### 4.3.1. Preparo do Extrato Etanólico, Frações e Subfrações Orgânicas

O extrato etanólico de *Ctenodon martii* foi preparado a partir do caule/casca da planta, partes que, devido à morfologia do subarbusto ereto, cilíndrico e rígido apresentam dificuldades para serem separadas de forma individualizada. Em virtude dessa característica estrutural, ambas as partes foram processadas em conjunto formando extrato a base do (caule/casca).

Para o processamento do material vegetal, as partes da planta caule/casca foram primeiramente secas à sombra, trituradas e submetidas à maceração com etanol PA, sob agitação esporádica, durante um período de 72 horas. Após a maceração, o material foi filtrado e concentrado em evaporador rotativo a vácuo, com controle de pressão e temperatura, para eliminação do etanol. A secagem final deu-se em estufa a 40°C, obtendo o extrato bruto etanólico. Para o particionamento o extrato etanólico foi solubilizado em etanol:água na proporção de 1:1, dissolvido com solventes de polaridade crescente (hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol), obtendo a fração de diclorometano. Os resultados dos bioensaios e análise química da fração de diclorometano (Morbeck *et al.*, 2018) foram determinantes para seu fracionamento por cromatografia em coluna, utilizando sílica gel 60 (70-230 mesh, Merck) como fase estacionária e sistemas de eluentes em gradiente crescente de polaridade como fase móvel (Celeghini *et al.*, 2001; Duarte *et al.*, 2008; Yatsuda *et al.*, 2005).

Os compostos presentes nas subfrações de diclorometano foram analisados por cromatografia em camada delgada (CCD) através das placas de sílica, e posteriormente por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM). Com base nos padrões cromatográficos e nas análises químicas, as subfrações foram agrupadas em cinco categorias, denominadas D1, D2, D3, D4 e D5. Entre estas, a subfração D2 destacou-se por apresentar os melhores indicadores de atividade biológica, conforme os resultados preliminares de análises químicas e bioensaios. Dada sua relevância, a subfração D2 foi escolhida para um novo subfracionamento, realizado por cromatografia em coluna utilizando Sephadex LH-20 da Sigma como fase estacionária empregada. Os componentes gerados nesse processo foram analisados por CCD em placas de sílica e por CG-EM, resultando no agrupamento de seis amostras finais (D2SS.1, D2SS.2, D2SS.3, D2SS.4, D2SS.5 e D2SS.6.), após comparação com o bando de dados do cromatógrafo, sendo possível a identificação dos compostos presentes nas amostras:



**Fluxograma 1:** Preparação extrato etanólico por maceração em etanol PA, fração por partição, subfrações de diclorometano por cromatografia de sílica gel e sub-subfração de D2 por cromatografia de sephadex, do caule/casca da *Ctenodon martii*.

#### 4.3.2. Reações de Caracterização dos Metabólitos Secundários

As análises fitoquímicas foram conduzidas para identificar qualitativamente diferentes classes de metabólitos secundários presentes nas frações de *Ctenodon martii*, como polifenóis, taninos, saponinas, flavonoides, ácidos fenólicos, esteroides e alcaloides (Brossi, 1988; Costa, 2001; Rego, 2012; Wagner; Bladt, 2001). A metodologia empregou técnicas de Cromatografia em Camada Delgada (CCD) utilizando diferentes sistemas de eluição e reagentes reveladores (Anexo A), permitindo uma identificação eficiente das subfrações. Os procedimentos específicos para detecção de metabólitos secundários seguem abaixo:

Para identificar os polifenóis, foi empregada a fase móvel composta por acetato de étila, ácido fórmico, ácido acético e água na proporção de 100:11:11:27. As placas cromatográficas em coluna, após o processo de eluição, foram tratadas com uma solução revelada preparada a partir de uma mistura 1:1 de ferrocianeto de potássio a 1% (m/v) e cloreto de ferro III a 2% (m/v). Posteriormente, as placas

foram observadas, onde o surgimento de manchas azuladas indicou qualitativamente a presença de polifenóis na amostra

A detecção de taninos foi realizada utilizando uma fase móvel composta por acetato de étila, ácido fórmico, ácido acético e água, na proporção de 10:11:11:27. Após a eluição, as placas cromatográficas foram tratadas com uma solução metanólica de cloreto férrico a 2% como revelador. A análise sob luz visível permitiu a identificação qualitativa dos taninos, sendo que a coloração azul indicou a presença de taninos hidrolisáveis ou gálicos, enquanto a coloração verde evidenciou a presença de taninos condensados ou catequínicos.

A detecção de saponinas foi conduzida utilizando uma fase móvel composta por clorofórmio e metanol, na proporção de 9:1, sendo o processo de eluição repetido duas vezes para garantir maior eficiência. Após a separação cromatográfica, as placas foram tratadas com ácido sulfúrico concentrado em etanol a 5% (v/v) como revelado. Posteriormente, as placas foram submetidas a aquecimento em estufa a 110 °C por 5 minutos. A análise sob luz visível revelou manchas de coloração roxa-berinjela, apresentando qualitativamente a presença de saponinas nas amostras apresentadas.

Para a análise de flavonoides e ácidos fenólicos, utilizou-se como fase móvel uma mistura de acetato de étila e hexano, na proporção de 7:1. A placa de sílica foi pulverizada com uma solução de cloreto de alumínio em etanol a 1% (m/v) como reagente revelado. A visualização das manchas foi realizada sob luz ultravioleta (BIOTEC®), com comprimento de onda de 366 nm. Sob esta condição, os flavonoides se destacaram como manchas verdes fluorescentes, enquanto os ácidos fenólicos foram evidenciados como manchas azuis fluorescentes, permitindo a identificação qualitativa dessas classes de composições nas amostras observadas.

Para a análise de esteroides, utilizou-se como fase móvel uma mistura de hexano e acetato de étila, na proporção de 8:2. A placa cromatográfica foi pulverizada com o reagente de Liebermann-Burchard, seguido de aquecimento a 110°C por 5 minutos. O desenvolvimento de manchas de coloração roxa sob luz visível indicou a presença de esteroides nas amostras testadas, confirmando sua presença através dessa ocorrência específica.

Para a detecção de alcalóides, utiliza-se como fase móvel uma mistura de acetato de étila, metanol e água, na proporção de 4:1:2. Após a aplicação da

amostra, a placa foi pulverizada com o reagente de Wagner. O desenvolvimento de manchas de coloração castanho-avermelhada, observadas sob luz visível, indicou a presença de alcalóides, permitindo sua identificação qualitativa nas frações observadas.

#### **4.3.3. Análise por cromatografia acoplada a espectrometria de massa (CG-EM) das subfrações**

Após obtenção das amostras fracionadas em diclorometano do caule/casca de *Ctenodon martii*, foram realizadas as análises por CG-EM, em aparelho QP2010SE (GC2010 Plus), usando coluna capilar de sílica fundida Rtx - 5MS (30 m; 0,25 mm de diâmetro interno; filme de 0,25  $\mu$ m) e hélio como gás de arraste. Antes da análise por cromatografia gasosa, as amostras foram submetidas ao processo de derivatização por sililação, uma técnica química empregada para modificar compostos, alterando propriedades como solubilidade, pontos de fusão e ebulição. Esta etapa utiliza reagentes de derivatização para converter substâncias polares e não voláteis em compostos voláteis e quimicamente resultantes, facilitando a detecção e análise cromatográfica. Para esta reação foram pesados 3 mg da amostra, onde foram diluídos em 60  $\mu$ L de piridina. A esta solução foi adicionada 100  $\mu$ L da mistura reacional de N,O-Bis (trimetilsilil) trifluoroacetamida (BSTFA) contendo 1% vol de trimetilclorosilano (TMCS) (Sigma-Aldrich®). Essa mistura foi aquecida a 70 °C por 30 minutos e 1  $\mu$ L da mistura foi injetado no CG-EM (CRUZ, 2013; Sjöström, E.; Alen, 1999). A temperatura do injetor foi 290 °C com temperatura inicial de 80 °C por 5 min, aumentando de 80 °C a 285 °C na razão de 4 °C/min. A temperatura final permaneceu em 285 °C por 40 minutos. A temperatura do detector foi de 290 °C e a temperatura na interface do sistema CG-EM foi de 290 °C. O detector de massas operou com ionização por impacto de elétrons (70 V) e varredura de massas entre o intervalo de 30 a 600 massa carga. A identificação dos compostos foi realizada por meio da comparação dos espectros de massas das amostras, com aqueles existentes no banco de dados do aparelho (NIST 08, FFNSC1.3 e WILEY8). As análises fitoquímicas foram baseadas nas metodologias de (Celeghini *et al.*, 2001; Vilegas *et al.*, 1997; Yatsuda *et al.*, 2005).

#### **4.4. BIOENSAIO**

##### **4.4.1. Animais**

Para todos os experimentos seguintes, foram utilizados camundongos machos *Balb-C* (20-30 g) e ratos machos e fêmeas *Wistar* (200-250 g), mantidos no biotério do Instituto Multidisciplinar de Saúde da Universidade Federal UFBA-IMS, aclimatados a  $23 \pm 2$  °C com umidade relativa de 30 a 70%. Os animais foram mantidos em caixas de polipropileno contendo maravalha na base da caixa, sendo permitido livre acesso à comida (Socil NeoVia®) e água. Todos os animais utilizados foram climatizados no laboratório pelo menos uma hora antes dos testes, realizados na fase clara do ciclo. A intensidade dos estímulos utilizados foram os mínimos necessários para demonstrar de forma consistente o efeito dos tratamentos. Ao final de cada experimento, os animais foram eutanasiados seguindo o protocolo para anestésicos injetáveis combinados com dose, Xilazina 10 mg/Kg e quetamina 90 mg/Kg em via intraperitoneal e decapitação por guilhotina.

Para realização dos experimentos em modelo animal, o projeto foi aprovado sem restrições no Comitê de Ética de Experimentação Animal da Universidade Federal da Bahia, Campus Anísio Teixeira, Protocolo 075/2019 (Anexo B).

##### **4.4.2. Teste de Contorções Abdominais Induzidas por Ácido Acético**

O efeito antinociceptivo foi avaliado pelo teste de contorção abdominal induzida por ácido acético. Foram utilizados grupos experimentais com 06 camundongos (*Balb-C*), tratados por via subcutânea (s.c.) com veículo (etanol 10%, v/v), as subfrações de diclorometano (D1, D2, D3, D4 e D5) e as sub-subfração D2 (D2SS.1, D2SS.2 e D2SS.3) na dose de (25 mg/kg, s.c). Após 30 minutos, os animais foram colocados em caixas separadas e receberam uma injeção de ácido acético 0,6% (Sigma-Aldrich®), pela via intraperitoneal (i.p.) (0,1 mL/10g). As contorções da parede abdominal, seguidas de contorções do tronco e extensão dos membros posteriores produzidas foram contadas durante 20 minutos como indicativo de nocicepção (Koster *et al.*, 1959; Vacher *et al.*, 1964).

Os resultados obtidos neste teste, aliados às análises fitoquímicas, direcionaram a seleção das subfrações para as bioensaios subsequentes, seguindo os princípios éticos dos 3R's. Esses princípios promovem a redução do número de animais utilizados, o refinamento dos métodos para minimizar o sofrimento e a substituição por alternativas sempre que possível, garantindo uma pesquisa mais ética e sustentável.

#### **4.4.3. Nocicepção Induzida Pela Injeção Intraplantar de Formalina**

O comportamento de nocicepção induzido por formalina foram avaliados em camundongos (*Balb-C*) grupos com seis animais. Os primeiros cinco minutos determinam resposta à dor de origem neurogênica e dos 5-30 minutos, determinam resposta à dor de origem inflamatória (Meizlish et al., 2021). Os grupos foram tratados pela via subcutânea com veículo (VH) etanol a 10%, morfina (5 mg/kg respeitando 10 ml/kg), as subfrações de diclorometano (D2, D3 e D4) e as sub-subfração D2 (D2SS.1, D2SS.2 e D2SS.3), na dose de (25 mg/kg, s.c). Após 30 minutos foi administrada uma solução de formalina na concentração de 1,0% (formaldeído) por via intraplantar (20 µL/ pata) na pata posterior direita dos animais. Foi quantificado número de *flinches*, sacudir da pata, mordidas e lambidas durante um período de 30 minutos, como indicadores de nocicepção (Cano et al., 2017; Tjølsen et al., 1992).

#### **4.4.4. Avaliação da Hipernocicepção – Teste de pressão crescente na pata**

O *Von Frey* filamentos (Frey, 1896) é um método para determinar nocicepção mecânica. Os animais foram colocados em caixas de acrílico, cujo assoalho é uma rede de malha constituída de arame não maleável, durante 30 min antes do experimento para adaptação ao ambiente. O teste consiste em produzir uma pressão na pata do animal com um transdutor de força de mão adaptado com uma ponta (0,8 mm<sup>2</sup> diâmetro da ponta, eletrônica de *Von Frey*, Insight Equipamentos©, Brasil). O estímulo foi automaticamente interrompido, quando o animal retirava a



pata estimulada e/ou apresentava uma resposta caracterizada como sacudida (*flinches*), e a intensidade foi registrada. O intervalo entre dois ensaios consecutivos na mesma pata foi de pelo menos 1 min, totalizando seis ensaios de cada animal. A força máxima aplicada foi de 50 g. Foram utilizados, grupos experimentais de 06 camundongos (*Balb-c*), pré-tratados com o veículo (etanol 10%, v/v), as subfrações de diclorometano (D2, D3 e D4) e as sub-subfração D2 (D2SS.1, D2SS.2 e D2SS.3) na dose de (25 mg/kg, s.c); após 30 min, foi injetado carragenina (Cg) (100 µg/pata, i.pl.) na superfície ventral da pata traseira direita dos animais e depois de três horas foram tomadas novas medições. A intensidade de hipernocicepção constituiu em quantificar a variação na pressão ( $\Delta$  de reação em gramas) obtida subtraindo-se o valor observado antes do procedimento experimental (0 horas) do valor de pressão obtido após a administração do estímulo que variaram de acordo com o tratamento (dia 1).

#### **4.4.4.1. Edema de Pata**

Ao final do teste de hipernocicepção por pressão crescente na pata (4.4.4), os animais foram eutanasiados por anestesia profunda, sendo removida cuidadosamente as patas traseiras direita e esquerda na região do tarso, pesadas em balança analítica e calculada a diferença entre o volume deslocado das patas expresso em gramas, das subfrações de diclorometano (D2, D3 e D4) e sub-subfração D2 (D2SS.1, D2SS.2 e D2SS.3) na dose de (25 mg/kg, s.c).

As amostras de tecido do coxim plantar da pata direita dos animais foram coletadas pertencentes aos grupos pré-tratados com as subfrações de diclorometano (D2, D3 e D4) e com o veículo (etanol 10%, v/v). Após a coleta, os tecidos foram armazenados imediatamente no freezer a -70°C, preservando sua integridade para os testes subsequentes de expressão gênica e garantindo a confiabilidade dos resultados na etapa de quantificação.

#### 4.4.5. Expressão de Genes Inflamatórios

Para quantificar a expressão dos genes inflamatórios TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-17, o tecido foi coletado do coxim da pata dos animais após a realização dos testes de Von Frey (4.4.4) e do Edema de Pata (4.4.4.1), que são usados para avaliar a dor e a resposta inflamatória em modelos experimentais. Os grupos experimentais consistiram de animais tratados com as subfrações de diclorometano D2, D3 e D4 (25 mg/kg), veículo (etanol 10%) e o grupo controle com solução salina 0,9%.

O ácido ribonucleico (RNA) total das amostras de tecido da pata foi extraído utilizando 1 mL do reagente TRIzol™ (Thermo Fisher Scientific) conforme instruções do fabricante. A homogeneização do tecido foi realizada com o sistema TissueRuptor (Qiagen, EUA) para garantir a eficiência na ruptura das células e obtenção de RNA de alta qualidade. Para preservar a integridade do RNA, todos os materiais do tecido foram mantidos em gelo durante todo o processo de limpeza. Durante a purificação, o RNA foi tratado com o reagente TURBO DNA-free™ (Thermo Fisher Scientific) para a eliminação de contaminantes de DNA, conforme recomendações do fabricante. A concentração e a pureza do RNA extraído foram avaliadas por espectrofotometria, utilizando o equipamento NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific), com as leituras de absorção nos comprimentos de onda de 260 nm e 280 nm (A260/A280) e 260 nm e 230 nm (A260/A230), sendo aceitas amostras com razão A260/A280 entre 1,8 e 2,1. As amostras de boa qualidade foram armazenadas a -80 °C até a realização da transcrição reversa. A síntese do cDNA foi realizada a partir de 2  $\mu$ g de RNA total, utilizando o kit High-Capacity RNA-to-cDNA™ (Thermo Fisher Scientific), seguindo as instruções do fabricante. O cDNA resultante foi armazenado a -80 °C até a realização da PCR em tempo real (qPCR). A quantificação dos níveis de expressão dos genes inflamatórios TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-17, bem como do gene normalizador beta-actina (ACTB), foi realizada utilizando o sistema PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific), a partir de amostras de cDNA na concentração de 100 ng/ $\mu$ L. O método de qPCR permite a quantificação precisa da expressão gênica, garantindo uma análise robusta das alterações nos níveis de expressão dos genes alvo nas condições experimentais.

A utilização do gene beta-actina (ACTB) como normalizador de genes na expressão de genes inflamatórios, como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-17, é justificada por sua estabilidade em diferentes condições experimentais e tipos celulares. Estudos

demonstraram que a actina beta mantém uma expressão relativamente constante, mesmo em resposta a estímulos inflamatórios, o que se torna ideal para normalizar dados em experimentos de qPCR (Song et al., 2022).

Os procedimentos de PCR em tempo real foram realizados em duplicata, conforme instruções do fabricante, utilizando o sistema StepOne Plus (Applied Biosystems, EUA) para a termociclagem. O protocolo de amplificação incluiu: um ciclo inicial a 50°C por 2 minutos, seguido por um ciclo de desnaturação a 95°C por 10 minutos, e 40 ciclos de amplificação com desnaturação a 95°C por 15 segundos e anelamento/alongamento a 60°C por 1 minuto. Após os ciclos de amplificação, foi realizada uma curva de fusão (desnaturação) com as seguintes condições: 15 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C e 15 segundos a 95°C. Todas as respostas seguiram o mesmo ritmo de amplificação e termociclagem. As sequências dos primers utilizados para os genes alvos na análise de PCR em tempo real foram obtidas a partir da literatura e as regiões de anelamento dos primers foram testadas por meio da ferramenta BLAST do NCBI, garantindo a especificidade e a eficiência da ocorrência (Tabela 1).

A análise dos resultados de Ct (Cycle Threshold) obtidos pelo termociclador foi realizada utilizando o método comparativo  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , conforme descrito por Livak e Schmittgen (2001). Este método permite calcular a expressão relativa (fold change) dos genes de interesse em relação a um grupo de controle, normalizando os valores obtidos pelo gene de referência beta-actina (ACTB). Inicialmente, foi calculado a diferença entre os valores de Ct dos genes alvo e do gene de referência ( $\Delta Ct$ ), e, em seguida, a diferença entre os valores  $\Delta Ct$  dos grupos experimental e controle ( $\Delta\Delta Ct$ ). A utilização do método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , é particularmente relevante em estudos de expressão gênica inflamatória, pois facilita a comparação direta entre diferentes grupos de tratamento, evidenciando os efeitos de intervenções terapêuticas ou condições experimentais (Livak & Schmittgen, 2001).

**Tabela 1.** Sequência dos primers utilizados na qPCR.

<b>Genes</b>	<b>Sequências</b>	<b>Referências</b>
<b><i>TNF- <math>\alpha</math></i></b>	<i>Forward:</i> CATCTTCTCAAAATTCGAGTGACAA <i>Reverse:</i> TGGGAGTAGACAAGGTACAACCC	(Sun et al., 2016)
<b><i>IL-6</i></b>	<i>Forward:</i> TGATGCTGGTGACAACCACG <i>Reverse:</i> CAGAATTGCCATTGCACAACCTC	(Sun et al., 2016)
<b><i>IL-17</i></b>	<i>Forward:</i> ATCCCTCAAAGCTCAGCGTGTC <i>Reverse:</i> GGGTCTTCATTGCGGTGGAGAG	(Hui et al., 2019)
<b><i>ACTB</i></b>	<i>Forward:</i> TGTCCACCTTCCAGCAGATGT <i>Reverse:</i> GCTCAGTAACAGTCCGCCTAGAA	(Newsome et al., 2015)

#### 4.4.6. Recrutamento de Neutrófilos para a Cavidade Peritoneal

A avaliação do recrutamento de neutrófilos foi realizada em grupos de até seis camundongos (Balb/c), tratados com o veículo (etanol 10%, v/v), subfrações de diclorometano (D2, D3 e D4) e sub-subfrações de D2 (D2SS.1, D2SS.2 e D2SS.3), na dose de 25 mg/kg, por via subcutânea (sc). Após o tratamento, os animais receberam por via intraperitoneal (ip) a injeção do agente inflamatório carragenina (500  $\mu$ g/200  $\mu$ L, ajustado para 20 g de peso corporal). O grupo de controle negativo foi tratado apenas com solução salina a 0,9%. Após 4 horas, os animais foram eutanasiados, e a lavagem peritoneal foi realizada utilizando fosfato-salino (PBS) suplementado com ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA). A contagem total de células na lavagem peritoneal foi realizada utilizando uma câmara de Neubauer. Para a contagem diferencial de células, esfregaços foram preparados em citocentrífuga, corados com kit panóptico, seguido da leitura de lâminas em microscópio óptico, sob objetivo de 1000x de aumento (imersão em óleo), conforme metodologia adaptada de Nunes e colaboradores, 2009.

Além disso, uma alíquota de lavagem peritoneal dos grupos tratados com as subfrações D2, D3 e D4 foi separada para posterior quantificação de níveis indiretos de óxido nítrico (NO) e dos níveis séricos de citocinas inflamatórias por ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA). Essa abordagem metodológica incluiu a avaliação integrada da resposta inflamatória celular e humoral, contribuindo para a caracterização dos efeitos das frações testadas.

#### **4.4.6.1. Quantificação de Citocinas por ELISA**

Para a quantificação dos níveis de citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\alpha$ , foi utilizado o protocolo previamente descrito por ALVES e colaboradores (2009). As alíquotas de amostras testadas foram separadas no decorrer do teste de recrutamento de neutrófilos (4.4.6) das subfrações D2, D3 e D4 na dose de (25 mg/kg), e o veículo (etanol 10%, v/v, s.c.), onde foram armazenadas em freezer - 70°C até a quantificação. As citocinas foram dosadas pelo lavado peritoneal coletado com PBS e EDTA através do ensaio de ELISA, conforme protocolo do fabricante (R&D Systems®, Minneapolis, Estados Unidos da América). Os resultados foram expressos em pg/mL.

#### **4.4.6.2. Avaliação da Produção do Óxido Nítrico (NO) por Determinação dos Níveis de Nitrito**

Os níveis indiretos de óxido nítrico (NO) foram mensurados pelos níveis de nitrito (NO $_2^-$ ), sendo subproduto do metabolismo de NO. O procedimento foi realizado através da reação de Griess (Green et al., 1982). Cada uma das amostras do lavado peritoneal (50 $\mu$ L), provenientes dos mesmos grupos do teste de recrutamento de neutrófilos (4.4.6), reagiu com 50  $\mu$ L de solução de 0,1% de naftiletilenodiamina e com 50  $\mu$ L de solução de 1% de sulfanilamida. No procedimento, ocorre a formação de um composto azo estável de coloração púrpura em que a sua absorbância foi mensurada por espectrofotometricamente em 540 nm, após 10 minutos. Uma curva padrão de nitrito de sódio (1,65 a 100  $\mu$ Mol) foi construída para quantificação dos níveis de nitrito nas amostras, os quais foram expressos em  $\mu$ Mol. A análise de regressão linear foi usada para calcular as concentrações de nitrito nas amostras em relação à curva padrão de nitrito de sódio. Os níveis de nitrito das amostras foram expressos em, NO $_2^-$   $\mu$ Mol e foram analisados estatisticamente.

#### 4.4.7. Avaliação da Permeabilidade Vascular

A permeabilidade vascular foi analisada pelo teste de azul de Evans (Thurston et al., 2000). Quinze minutos antes da administração das subfrações de diclorometano D2, D3 e D4 (25 mg/kg, s.c.), do veículo (etanol a 10%) e da Salina 0,9%, o corante azul de Evans (50 mg/kg) foi diluído em 50 µL de solução salina sendo injetado por via venosa no plexo ocular dos camundongos (*Balb-C*). Apenas nas subfrações e veículo foram administradas por via subcutânea 30 minutos antes do estímulo inflamatório (injeção i.p de Cg, 500 µg/cavidade). Os camundongos foram sacrificados 3 h após a administração de Cg e a cavidade peritoneal foi lavada com 3 mL de PBS. O conteúdo do azul de Evans (o extravasamento de proteína plasmática) foi calculado usando uma curva padrão do corante e a absorbância de cada amostra foi mensurada a 620 nm por meio de um espectrofotômetro (Genesys®, Thermo Scientific, Waltham, MA, EUA).

#### 4.4.8. Avaliação de resposta inflamatória crônica

A escolha das doses utilizadas nos testes de inflamação crônica com o extrato etanólico de *Ctenodon martii* foi fundamentada na necessidade de exploração de respostas biológicas em um amplo espectro de concentrações, considerando a natureza distinta dos processos inflamatórios agudos. Já nos modelos crônicos, como granuloma induzido, ferida excisional e queimadura, foram doses testadas escalonadas entre (6,25; 12,5; 25; 50; 100 e 200 mg/kg), permitindo a avaliação dos efeitos dose-dependentes em processos mais complexos, como a cicatrização e a resolução inflamatória, que exigem períodos prolongados de intervenção (Patil et al., 2019).

A literatura científica sustenta que doses mais elevadas são frequentemente permitidas para estimular efeitos regenerativos em tecidos severamente lesionados e para mediadores imunológicos modulares em fases tardias da inflamação. Por outro lado, doses menores são úteis para avaliar a toxicidade e efeitos subótimos, importantes para a segurança e para a identificação de possíveis faixas terapêuticas de aplicação futura. Além disso, o perfil químico complexo do extrato etanólico

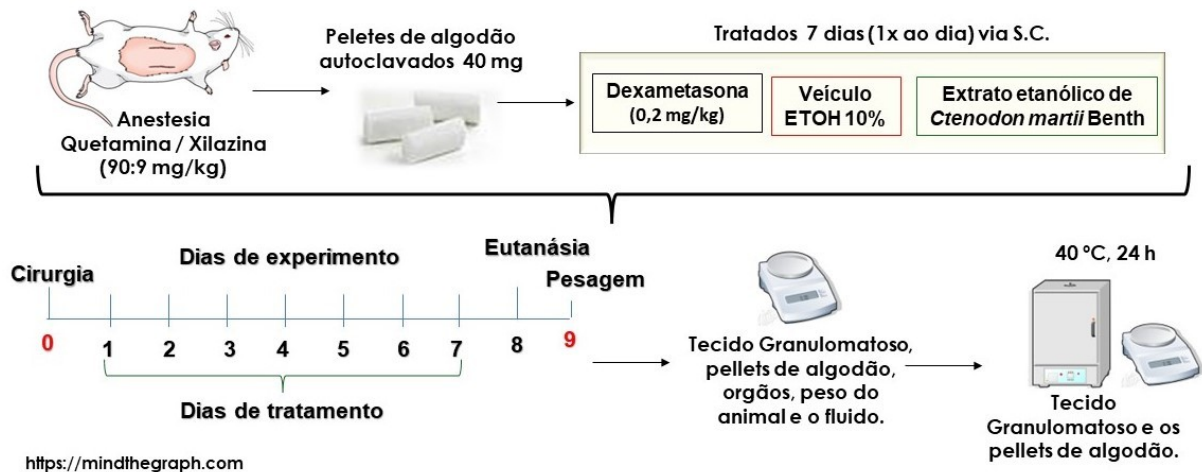
requer uma abordagem de dose escalonada, essencial para identificar efeitos sinérgicos entre os compostos bioativos presentes no extrato (Chung *et al.*, 2010; Patil *et al.*, 2019).

A aplicação dessas doses também segue as diretrizes condicionais para estudos pré-clínicos em crônico, que recomendam ajustes de dosagem com base na severidade do modelo experimental e na biodisponibilidade do composto. Essa abordagem garante uma investigação robusta dos efeitos terapêuticos e minimiza os riscos associados a doses moderadas, maximizando a segurança e a eficácia dos compostos testados. Essa estratégia metodológica é amplamente utilizada em protocolos modernos para modelos de investigação inflamatória, como evidenciado por estudos que demonstram a relevância de doses crescentes na análise de respostas teciduais mediadas por citocinas e outras moléculas bioativas, promovendo uma compreensão detalhada do potencial anti-inflamatório do extrato em diversos contextos experimentais (Saadullah *et al.*, 2022; Waller *et al.*, 2021).

#### **4.4.8.1. Crescimento de Tecido Granulomatoso**

O efeito do extrato etanólico na fase crônica ou proliferativa de inflamação foi avaliada no modelo do crescimento de tecido granulomatoso induzido pelo implante s.c. de pelete de algodão estéreis em ratos *Wistar* macho. Dois peletes de algodão autoclavados pesando 40 mg cada, foram implantados um de cada lado da parte dorsal do animal, através de uma pequena incisão nos ratos anestesiados com uma combinação de quetamina 90 mg/kg e xilazina 9 mg/kg (Gonçalves *et al.*, 2013; Bars; Gozariu; Cadden, 2001; Swingle; Shideman, 1972).

Cada grupos (n = 6) foram administrados o extrato bruto nas doses (50, 25, 12,5 e 6,25 mg/kg) ou dexametasona (0,2 mg/kg) ou veículo (etanol 10% - 10ml/kg) 1x por dia, durante 7 dias a partir do dia da inserção do pelete. No oitavo dia, os animais foram eutanasiados por anestesia profunda com quetamina e xilazina. Os pellets de algodão com o tecido fibrovascular foram removidos, secos a 40°C por 24 horas e sua massa determinada (Figura 3).



**Figura 3** – Esquema da realização e tratamento das feridas excisionais. **Fonte:** Autor.

Os resultados foram expressos como a diferença entre a massa inicial e final do algodão seco como medida da formação de granuloma. O peso dos animais foi expresso por meio da diferença da pesagem do dia inicial menos o peso do dia final. O peso dos órgãos timo e baço foram expressos por 100 g de peso corporal final. O efeito antiproliferativo da dose testada foi comparada com o controle. Com ajuda de uma seringa, foi coletado o fluido presente no local do implante (exsudado), que foi pesado em gramas (g) (Grainger, 2013).

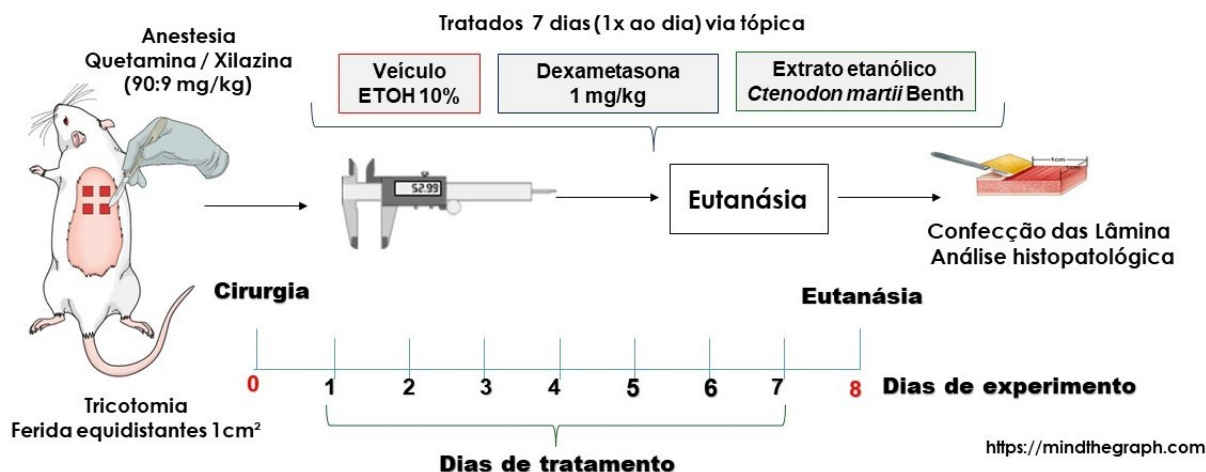
$$\text{Massa Corporal (MC)} = \frac{\text{Peso órgão}}{\text{Peso do animal final}} * 100$$

#### 4.4.8.2. Modelo Experimental de Ferida Excisional

Para a realização do modelo experimental de ferida excisional, foram utilizados ratos *Wistar* machos. A indução anestésica dos animais foi obtida com a injeção intramuscular de quetamina/xilazina (90:9 mg/kg), seguida da tricotomia dorsal por tração manual com uma lâmina de aço inoxidável. A pele foi limpa com etanol 70% (v/v), após isto, quatro feridas equidistantes com área de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> cada uma, foram geradas por excisão, compressão e



elevação da pele do dorso do animal com a pinça estéril, utilizando uma tesoura para o corte feito até o tecido subcutâneo. Logo após, as feridas foram lavadas com soro fisiológico, tendo suas medidas tomadas com a ajuda de um paquímetro digital (Western® PRO). Finalizadas as cirurgias, os animais foram dispostos individualmente em caixas plásticas, com livre acesso à água e alimentação padrão.



**Figura 4** – Esquema da realização e tratamento das feridas excisionais. **Fonte:** Autor.

Na avaliação diária, as feridas foram tratadas pela via tópica com o extrato etanólico de *C. martii* nas doses (12,5, 25, 50 e 100 mg/kg), veículo (etanol 10%) e dexametasona (0,2 mg/kg). As aplicações foram repetidas diariamente, sempre no mesmo horário durante sete dias. No oitavo dia, os animais foram eutanasiados por decapitação em guilhotina e as feridas foram medidas e removidas para a análise histológica.

Diariamente, os ferimentos foram medidos com a ajuda de um paquímetro, para cálculo das áreas e os resultados foram expressos em cm<sup>2</sup>. As feridas foram classificadas em quatro graus de acordo com as aparências locais e sistêmicas. Grau I – Não apresentam secreção, ulceração, inchaço, e vermelhidão em torno da ferida; Grau II – Apresenta pouca secreção, cicatriz pouco lisada, inchaço e ligeiramente avermelhado em torno da ferida; Grau III – Apresenta nível de secreção médio, cicatriz em parte lisadas, inchaço e vermelhidão em torno da ferida; Grau IV – Secreção maciça, cicatriz totalmente lisada, com inchaço e vermelho óbvio ao redor da ferida com manifestações infecciosas sistêmicas (Apêndice A).

#### 4.4.8.3. Avaliação histológica

Para a avaliação histológica, os ratos foram eutanasiados por decapitação em guilhotina e as feridas foram removidas, identificadas individualmente, fixadas em solução de formaldeído 10%. Os fragmentos foram desidratados em etanol a concentrações crescentes (água destilada; 70% v/v; 80% v/v; 90% v/v; 100% v/v). O material desidratado foi clarificado em xilol e banhado duas vezes em parafina, antes de ser definitivamente incluído. O material emblocado seguiu para confecção das lâminas em cortes histológicos de 6 µm corados com hematoxilina-eosina (HE).

A análise semiquantitativa dos cortes histológicos foi realizada em microscópio óptico (NIKON® H550S), cuja imagens 08 fotos por feridas, foram capturadas por câmera Samsung de alta resolução e digitalizada através do Software Infinity Analyzy®, (Media Cybernetics- LP). Os dados obtidos pela técnica de HE foram classificados de acordo com a intensidade em que foram encontrados e transformados em variáveis quantitativas mediante atribuição de índice para o achado histológico.

Foram avaliadas as presenças de exsudato, hemorragia, colagenização, queratinização e reepitelização, seguindo o protocolo adaptado (Gomes *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2006; Tresvenzol *et al.*, 2013) conforme, Quadro 1.

**Quadro 1** – Protocolo de análise semiquantitativa de cortes histológicos de feridas excisionais em dorso de ratos *Wistar*.

<b>Critério avaliado</b>	<b>Ausente</b>	<b>Discreta</b>	<b>Moderada</b>	<b>Acentuada</b>
<b>Exsudato</b>	0	1	2	3
<b>Hemorragia</b>	0	1	2	3
<b>Colagenização</b>	0	1	2	3
<b>Queratinização</b>	0	1	2	3

**Fonte:** Adaptado de (Gomes *et al.*, 2006; Santos *et al.*, 2006a; Tresvenzol *et al.*, 2013a).

A intensidade dos achados de HE foi analisada segundo os seguintes critérios:

**Exsudato** – foi considerado ausente quando não se evidenciava no corte histológico; discreto quando eram visualizados pouca quantidade, de forma isolada no contexto; moderado quando eram visualizados maior quantidade; e acentuado, quando evidenciados com grande frequência, dispostos em todo o contexto.

**Hemorragia** – foi considerada ausente quando não se evidenciava foco hemorrágico no corte histológico; discreta quando eram visualizados poucos vasos rompidos esparsamente situados, de forma isolada no contexto; moderada quando eram visualizados uma maior quantidade de vasos rompidos no contexto; e acentuada quando evidenciados com grande frequência, dispostos em todo o contexto.

**Colagenização** – classificou-se como ausente quando não havia fibras colágenas depositadas; discreta quando a deposição de fibras colágenas era em pequena quantidade, caracterizadas por fibras depositadas em meio aos fibroblastos proliferados; moderada quando a deposição de colágeno formava feixes de fibras eosinofílicas, espessas, intercaladas com áreas de tecido conjuntivo frouxo e fibroblastos proliferados; e acentuada quando havia grande deposição de fibras colágenas, constituindo feixes de fibras eosinofílicas espessas, compactamente arranjadas em meio a fibroblastos proliferados e sem áreas de tecido conjuntivo frouxo.

**Queratinização** – classificou-se como ausente quando não havia queratina visualizada no campo óptico; discreta quando aparecia de forma incompleta ou parcial, entre espaços representada; moderada quando aparecia de forma incompleta ou parcial, apresentando maior espessura; e acentuada quando visualizado de forma total ou completa.

Para a avaliação semiquantitativa da reepitelização, classificou-se como ausente quando não havia epitélio visualizado no campo óptico; parcial quando aparecia de forma incompleta; completa quando visualizada de forma total sobre o tecido conjuntivo (Santos *et al.*, 2006).

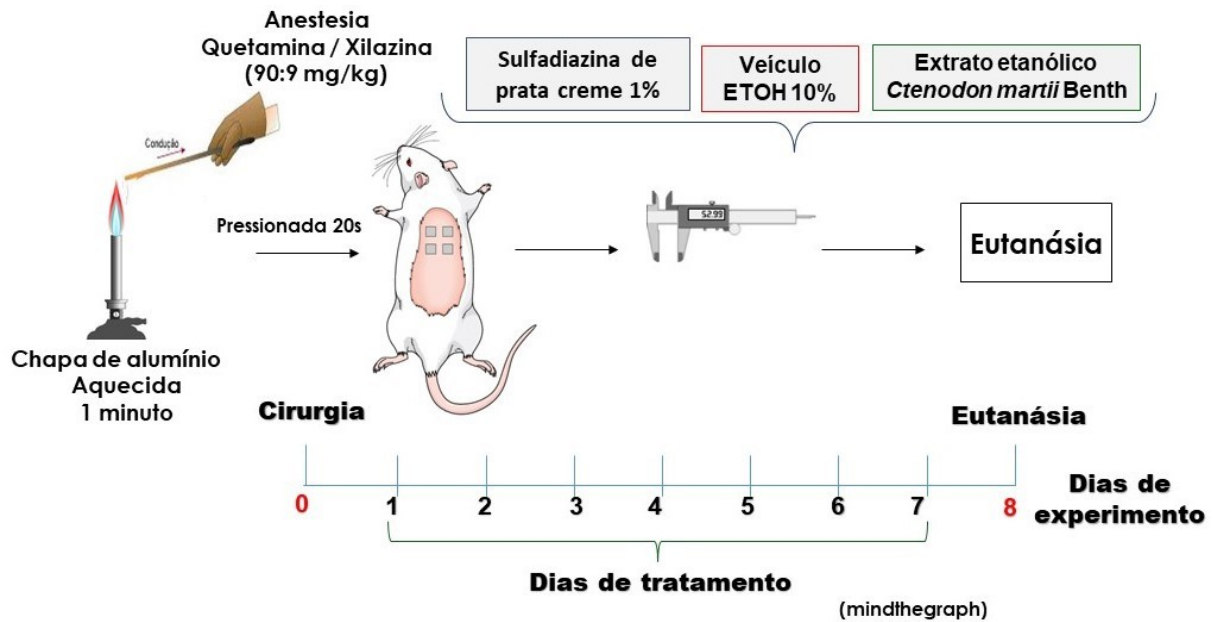
Na análise quantitativa, foram quantificados fibroblastos, fibrócitos, vasos sanguíneos, neutrófilos, macrófagos e linfócitos utilizando um sistema digitalizador e analisador de imagens. A área total dos campos microscópicos foi observada em

microscópio óptico (NIKON® H550S), cuja imagens 12 fotos por feridas foram capturadas por câmera Samsung de alta resolução e digitalizada através do Software Ifinity Analyzy®, (Media Cybernetics- LP). Após selecionada a resolução desejada, as imagens foram armazenadas para quantificação. Cada campo digitalizado foi quantificado por três avaliadores independentemente, sendo avaliados doze campos microscópicos aleatórios por lâmina, sem conhecimento prévio dos respectivos tratamentos.

#### 4.4.8.4 Modelo Experimental de Ferida por Queimadura

Para a realização do modelo experimental de ferida por queimadura, foram utilizados ratos *Wistar* machos. A indução anestésica dos animais foi obtida com a injeção intramuscular de quetamina/xilazina (90:9 mg/kg), seguida da tricotomia dorsal por tração manual com uma lâmina de aço inoxidável. A pele foi limpa com etanol 70% (v/v), após isto, quatro feridas equidistantes com área de aproximadamente 1 cm<sup>2</sup> cada uma, foram geradas por compressão com chapa de alumínio aquecida em bico de Bunsen por 1 minuto, pressionada na pele do dorso do animal por 20 segundos. Logo após, suas medidas foram tomadas com a ajuda de um paquímetro digital (Western® PRO). (Figura 3). Os animais foram dispostos individualmente em caixas plásticas previamente autoclavadas, com livre acesso à água e alimentação padrão. Procedimento adaptado de (Campelo *et al.*, 2011).

Na avaliação diária, as feridas foram tratadas pela via tópica com o extrato etanólico de *Ctenodon martii* nas doses (12,5, 25, 50, 100 e 200 mg/kg), veículo (etanol 10%) e sulfadiazina de prata creme 1%. As aplicações das matérias foram realizadas diariamente, no mesmo local, por sete dias consecutivos. No oitavo dia, os animais foram submetidos à eutanásia por decapitação utilizando guilhotina. Após o procedimento, a área das feridas foi mensurada para avaliar o efeito das intervenções no processo de cicatrização. Contudo, devido à ausência de diferença estatisticamente significativa na redução da área das feridas entre os grupos experimentais, optou-se por não realizar a análise histológica dos tecidos. Essa decisão visa concentrar os esforços analíticos em parâmetros relevantes para a compreensão dos efeitos terapêuticos.

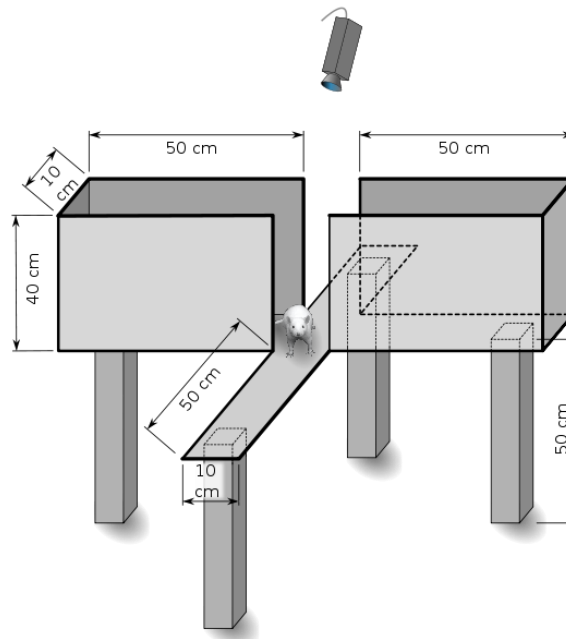


**Figura 4** – Esquema da realização e tratamento das feridas por queimaduras. **Fonte:** Autor.

#### 4.4.9 Labirinto em Cruz Elevado

O teste comportamental do Labirinto em Cruz Elevado (LCE) foi realizado na fase clara do ciclo dos ratos machos (*Wistar*). No momento do teste todos os animais foram colocados no centro do labirinto com a cabeça voltada para um dos braços aberto. Foi iniciado em conjunto o sistema de rastreamento de vídeo com gravação cronômetrado por 5 minutos, a câmera de vídeo ficou conectada ao computador, sendo controlado por um dispositivo remoto. Após 30 minutos da administração dos tratamentos veículo (etanol 10% s.c.) ou extrato etanólico *C. martii* (25, 50 e 100 mg/kg s.c.) ou 20 minutos da administração do controle midazolam (1,0 mg/Kg i.p.) diluído em soro fisiológico (NaCl 0,9%) no volume de 0,1 mL/100 g de peso corporal do animal (via i.p.), realizou-se o teste durante período de 5 min. O número de entradas (uma entrada é definida quando o centro do corpo do animal entra em um dos braços) e o tempo gasto nos braços são gravados (OBS Studio©) e essas medidas serviram como índice de ansiedade. Os animais circularam livremente sobre o labirinto por 5 min. Após cada rodada de teste o labirinto é limpo álcool 70% para retirar odores. Os efeitos ansiolítico são definidos como um aumento na proporção de entradas nos braços abertos e o tempo gasto nos braços abertos relativo ao total de tempo gasto em ambos os braços. O número total de entradas nos braços fechados foi utilizada como medida da atividade locomotora.

O labirinto em cruz elevado utilizado para o teste tem sua configuração em forma de um (+) e compreende dois braços abertos (50 x 10 x 1,0 cm) em frente a si e perpendiculares a dois braços fechados (50 x 10 x 40 cm) com um centro de plataforma (10 x 10 cm). Os braços abertos têm uma pequena parede (1,0 cm) para diminuir o número de quedas, enquanto os braços fechados tem uma parede (40 cm) de altura. Todo o aparelho fica 50 cm acima do piso dentro de um tanque vazio circular (100 cm diâmetro por 35 cm de altura) para proteger os ratos que caem ou tentativa de fuga durante o experimento, Figura 4 (Pinto *et al.*, 2012).



**Figura 5:** Descrição das medidas do labirinto em cruz elevado.

Os resultados avaliam as variações etológicas, além das diferenças dos efeitos do tratamento entre os grupos nas seguintes medidas: tempo de braço aberto (TBA) e tempo de braço fechado (TBF), número de entradas no braço aberto (EBA) e braço fechado (EBF).

Aplicando a fórmula abaixo sobre cada razão:

$$\% \text{ Entrada nos Braços X} = \frac{\text{EBX}}{(\text{EBX} + \text{EBY})} \times 100$$

$$\% \text{ Tempo nos Braços X} = \frac{\text{TBX}}{(\text{TBX} + \text{TBY})} \times 100$$

#### 4.4.10 Determinação da Toxicidade Aguda e Teste de Letalidade (DL<sub>50</sub>)

A implementação do ensaio toxicológico pré-clínico agudo com o extrato etanólico de *Ctenodon martii*, nas doses de 5 mg/kg, 50 mg/kg, 300 mg/kg e 2000 mg/kg, baseia-se em metodologias internacionalmente reconhecidas, como o procedimento de fixação de dose (FDP), o método de classe tóxica aguda (ATC) e o procedimento up-and-down (UDP), que têm como objetivo maximizar a obtenção de dados toxicológicos com o uso reduzido de animais. Essas abordagens são aprovadas por órgãos reguladores, como a OCDE (Diretrizes 420 e 425) (Kleinstreuer *et al.*, 2018), e são reconhecidas por sua capacidade de gerar dados confiáveis sobre toxicidade aguda, ao mesmo tempo que seguem princípios de ética no uso de experimentação, como refinamento e redução. Além disso, a inclusão de uma ampla faixa de doses permite observar efeitos dose-dependentes e determinar limites seguros para o uso do extrato, essencial para a caracterização inicial de seu perfil toxicológico. Essas práticas alinham-se às diretrizes modernas de testes toxicológicos (Erhirhie *et al.*, 2018; OCDE, 2002; Strickland *et al.*, 2023).

Para este teste foram utilizados ratos *Wistar* machos e fêmeas, divididos em 12 grupos experimentais, contendo três animais cada. Os seis primeiros grupos foram de machos, sendo que quatro grupos foram tratados com uma única dose do extrato etanólico nas doses de 5, 50, 300 e 2000 mg/kg (s.c.), respectivamente, o quinto grupo recebeu o veículo (etanol 10%, v/v, s.c.) e o sexto grupo Controle (-) negativo não recebeu nenhum tipo de tratamento. Os outros seis grupos experimentais foram formados com fêmeas que receberam o mesmo tratamento seguindo a mesma ordenação.

Neste experimento foram realizados dois procedimentos simultâneos, a determinação da dose letal mediana (DL<sub>50</sub>) e o “*Screening Hipocrático*” (Litchfield; Wilcoxon, 1949; Malone; Robichaud, 1962), adaptada por Campbell e Richte (1967). O “*Screening Hipocrático*” fez uma triagem comportamental (Apêndice B), que permite avaliar se uma determinada substância modifica a atividade do SNC ou periférico por meio de registro de alguns sinais ou alterações de comportamento apresentados pelos animais (Malone; Robichaud, 1983).

Após os tratamentos, os animais foram observados por um período de 24 h. Foram feitas as observações das unidades experimentais no tempo de 30 minutos,

1, 2, 4, 8, 12 e 24 horas, com o objetivo de quantificar os efeitos do extrato em diferentes doses sobre os parâmetros: a) estado de consciência e disposição; b) coordenação motora; c) tônus muscular; d) reflexos (auricular); e) atividade do SNC; f) atividade do Sistema Nervoso Autônomo.

#### **4.4.10.1 Análises dos parâmetros bioquímicos e hematológicos**

Transcorridas as 24 horas de observação, os animais foram eutanasiados por decapitação em guilhotina e foram realizadas a coleta das amostras de sangue através de sangria do plexo braquial. O sangue foi coletado em tubos (devidamente identificados) com anticoagulante (EDTA) para realização de exames hematológicos e bioquímicos.

Nestes testes foram analisados: a série vermelha (eritrograma) por contagem de hemácias, determinação do hematócrito, da hemoglobina, do volume corpuscular médio (VCM), da hemoglobina corpuscular média (HCM), da concentração hemoglobínica média (CHCM) e contagem das plaquetas, avaliados utilizando o analisador celular The Sysmex®, modelo 21N, bem como a série branca (leucograma), avaliada através da contagem global de leucócitos, utilizando o mesmo aparelho, e a contagem diferencial de leucócitos, quantificado por esfregaços sanguíneos corados e analisados em microscópio (OPTON®) para confirmação de contagem diferencial de células. Na análise bioquímica foram dosados os níveis de creatinina, albumina e das enzimas TGO e TGP (Carvalho *et al.*, 2015; Valadares, 2006).



#### 4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software *GraphPad Prism®* versão 5.00 (*GraphPad®*, La Jolla, CA92037, EUA). Os valores foram considerados estatisticamente significativos quando apresentaram ( $p < 0,05$ ).

As variáveis foram avaliadas quanto à distribuição normal e à homogeneidade de variância por meio do teste de Shapiro-Wilk. Para dados com distribuição normal e variância uniforme, foi aplicado o teste ANOVA (One-Way), seguido pelo teste de Bonferroni ou pelo teste de Dunnett. Para dados com distribuição não normal, utilizou-se o teste de Kruskal-Wallis, seguido por comparações múltiplas pelo teste de Dunn."

## 5 RESULTADOS

### 5.1 ANÁLISE QUÍMICA DA PLANTA *Ctenodon martii*

#### 5.1.1 Rendimento do Extrato etanólico, frações e subfrações

Todas as amostras do caule/casca de *C. martii* apresentaram seu rendimento em porcentagem conforme a (Tabela 2). O extrato etanólico, obteve seu rendimento em relação ao peso de 1000 g da amostra do caule/casca macerados. As frações obtiveram seu rendimento em relação ao peso 34,06 g do extrato etanólico particionado. As subfrações obtiveram seu rendimento em relação ao peso seco 28,29 g da fração de diclorometano, fracionadas em cromatografia de colunas seca. Já as D2 sub-subfração obtiveram seu rendimento em relação ao peso 5,0 g da subfração (D2) fracionadas em cromatografia em coluna Sephadex.

Observa-se que a fração de diclorometano possui o maior rendimento além de ter apresentado melhores resultados nos bioensaios e parâmetros químicos descrito no trabalho de Morbeck (2018), levando a ser escolhida para dar continuidade aos estudos (Morbeck; Cruz & Yatsuda, 2018).

**Tabela 2** – Rendimentos do extrato etanólico, frações e subfrações de diclorometano, do caule/casca de *Ctenodon martii*.

Rendimento do extrato/fração e subfrações do caule/casca de <i>Ctenodon martii</i>		
Método de extração	Extratos/Fração	Rendimento (%)
Maceração em Etanol PA	Extrato etanólico	5,73
Partição em Solvente	Fração de diclorometano	40,92
Cromatografia em coluna Sílica	Subfração de diclorometano (D1)	8,93
	Subfração de diclorometano (D2)	20,28
	Subfração de diclorometano (D3)	21,45
	Subfração de diclorometano (D4)	21,00
	Subfração de diclorometano (D5)	17,63
Cromatografia em coluna Sephadex	D2 Sub-Subfração (D2SS.1)	12,76
	D2 Sub-Subfração (D2SS.2)	40,28
	D2 Sub-Subfração (D2SS.3)	25,54

Rendimentos das amostras com base na metodologia de maceração, partição e cromatografia em coluna. **Fonte:** Dados da pesquisa.

### 5.1.2 Análise Fitoquímica em CCD

A análise fitoquímica possibilita a identificação dos principais grupos de metabólitos secundários que possam estar relacionados com as atividades biológicas. A utilização de reveladores específicos permite avaliar a presença destes grupos através do estudo dos perfis fitoquímicos nas placas de CCD. Os dados sobre as amostras etanólicas e fração de diclorometano foram descrito no trabalho de (Morbeck; Cruz & Yatsuda, 2018). Observa-se reação positiva na presença de todos metabólitos secundários testados na subfração de diclorometano (D2).

**Tabela 3** – Cromatografia de Camada Delgada com os perfis fitoquímicos, do extrato etanólico, frações e subfrações de *Ctenodon martii*.

<i>Ctenodon martii</i>		Perfis Fitoquímicos				
Extrato/fração	Polifenóis	Taninos	Saponinas	Flavonoides	Alcaloides	Esteroides
Extrato etanólico	+	+	+	+	+	+
Diclorometano	+	+	+	+	+	+
Subfração (D1)	+	-	+	+	-	+
Subfração (D2)	+	+	+	+	+	+
Subfração (D3)	+	+	+	+	-	+
Subfração (D4)	+	-	+	+	+	-
Subfração (D5)	+	-	-	+	+	-

As amostras foram preparadas na concentração de 10 mg/mL em solvente apropriado e aplicadas com volume de 10 µL em bandas de 7 mm em lâmina de alumínio sílica gel. A placa foi eluída com sistema de solvente apropriado em cuba de vidro. Depois de eluída e seca observou-se em câmara de ultravioleta e/ou revelador de interesse. (+) reação positiva, indicando a presença do grupo de metabólitos secundários; (-) reação negativa, indicando a ausência do grupo de metabólitos secundários. **Fonte:** Dados da pesquisa.

### 5.1.3 Análise CG-EM das amostras fracionadas de diclorometano do caule/casca de *Ctenodon martii*

As substâncias foram identificadas pela técnica de CG-EM por comparação dos padrões de fragmentação obtidos (tempo de retenção e fragmentação iônica) de padrões autênticos ou em comparação com espectros presentes na espectroteca utilizada no equipamento. Algumas dessas substâncias foram classificadas como Não Identificados (NI), indicando baixa similaridade na fragmentação da substância analisada frente ao registro da biblioteca. Ao analisar as subfrações de diclorometano (D1, D2, D3, D4 e D5), foi observado um total de 81 picos cromatográficos, sendo 39 identificadas e 42 não identificadas (Tabela 4).

**Tabela 4** – Substâncias identificadas por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa, das subfrações de diclorometano de *Ctenodon martii*.

Tempo de Retenção (tR)	SUBSTÂNCIAS	Percentual de área presente nas subfrações de diclorometano de <i>Ctenodon martii</i>				
		%A-D1	%A-D2	%A-D3	%A-D4	%A-D5
6.979	Ácido propanoico	0,69	-	-	-	1,03
7.452	Ácido acético	-	-	-	-	0,74
13.308	Ácido benzoico	0,22	0,40	0,94	-	-
14.900	Glicerol	43,10	14,61	18,91	79,26	48,78
25.280	Ácido arabinônico	-	0,18	-	-	0,66
28.645	Ácido azelaico	-	0,22	-	-	1,46
28.797	Arabitol	-	-	-	-	0,63
29.311	Ácido vanílico	-	0,29	1,62	-	-
29.856	D-ribofuranose	-	-	-	-	0,52
30.327	Ácido D- ribonico	-	-	-	-	0,43
30.815	Ácido protocatecuico	-	-	-	1,80	0,74
30.920	D-Fructose	-	-	-	-	3,18
32.814	Ácido siríngico	-	0,20	-	-	0,61
33.379	D-galactose	-	-	-	2,81	-
34.048	Sorbitol	-	-	0,86	-	2,69
34.289	D-glucopiranosido	-	-	-	-	2,70
35.416	Glicopirranose	-	-	-	-	1,79
38.623	Linoleato de etila	1,01	-	-	-	-
38.741	Ácido hexadecanoico	0,73	-	-	-	-
39.137	Ácido octadecanoico	0,58	-	-	-	-
39.321	Ácido Oleico	0,37	-	-	-	-
47.341	Hexadecanoato de hidroxipropila	0,40	0,36	1,15	-	-
47.625	Docosonoato de etila	0,72	-	-	-	-
49.169	Ácido docosanoico	0,35	-	-	-	1,94
50.129	Ácidos hidroxicinâmicos	-	3,01	5,06	-	-
50.461	Oleato de 2,3-dihidroxipropila	-	-	2,99	-	-
50.501	Esteróide	8,19	6,80	2,97	12,01	-
50.956	Tetracosanoato de etila	1,01	-	0,90	-	-
51.460	Flavona	-	34,72	7,21	-	-
51.595	Terpeno	18,71	14,63	25,27	-	-
53.160	Ácido benzenoacético	-	0,25	1,01	-	-
54.300	Ácido beénico	2,36	-	1,76	-	-
54.534	Piridoxila	0,38	1,16	-	1,71	-
55.491	Fumarilacetoacético	-	-	1,01	-	-
56.930	Ácido tricosenóico	0,36	-	-	-	-
60.281	Benzeno	0,43	-	-	-	-
61.082	$\beta$ -sitosterol	0,22	-	3,34	-	-
62.637	Isolongifolol	0,27	1,34	-	-	-
71.572	Retinol	0,34	-	-	-	-
% Compostos Identificados		80,44	78,17	75,00	97,59	67,90
% Compostos Não identificados		19,66	21,83	25,00	2,41	32,10

**Legenda:** (tR) tempo de retenção, (NI) composto não identificada, ( - ) composto não detectado na amostra e (%A-D1, %A-D2, %A-D3, %A-D4 e %A-D5) percentual de área da subfração de diclorometano. **Fonte:** Dados da pesquisa.

Ao analisar as sub-subfrações D2SS.1, D2SS.2 e D2SS.3 foi observada um total de 32 substâncias, sendo 11 identificadas e 21 não identificadas (Tabela 5).

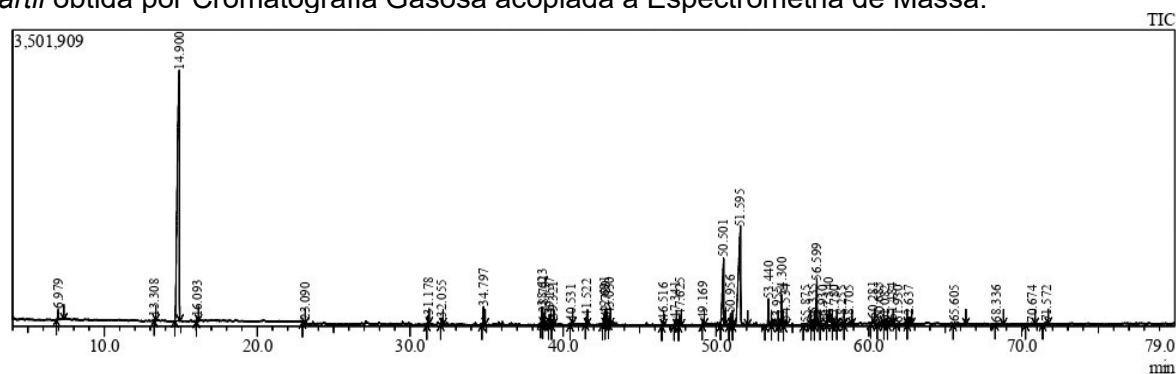
**Tabela 5** – Substâncias identificadas por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa, das sub-subfrações D2 de *Ctenodon martii*.

Tempo de Retenção (tR)	SUBSTÂNCIAS	Percentual de área presente nas sub-subfrações D2 da <i>Ctenodon martii</i>		
		%A-D2SS.1	%A-D2SS.2	%A-D2SS.3
13.186	Ácido benzoico	-	-	1,09
14.567	Glicerol	0,48	0,36	0,76
18.283	Ácido málico	-	0,31	-
28.581	Ácido Azelaico	-	-	1,77
35.968	ácido hexadecanoico	1,41	0,49	0,92
50.116	ácidos hidroxicinâmicos	4,87	12,49	11,02
50.508	Esteróide	12,32	2,26	0,97
51.759	Flavona	55,70	35,54	31,60
51.993	Terpeno	1,22	7,56	4,16
54.530	Piridoxina	-	-	3,79
62.132	Ácido isopropilmálico	1,43	-	-
% Compostos Identificados		<b>77,43</b>	<b>59,01</b>	<b>56,08</b>
% Compostos Não identificados		<b>22,57</b>	<b>40,99</b>	<b>43,92</b>

**Legenda:** (tR) tempo de retenção, (NI) composto não identificada, ( - ) composto não detectado na amostra e (%A-D2SS.1, %A-D2SS.2 e %A-D2SS.3) percentual de área da sub-subfração (D2) de diclorometano. **Fonte:** Dados da pesquisa.

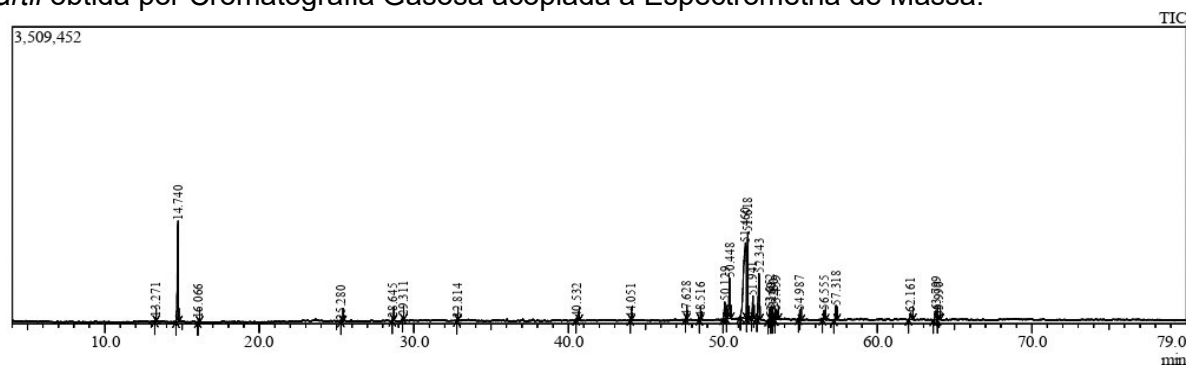
Nas figuras 6, 7, 8, 9 e 10 apresentamos os cromatogramas obtidos por CG-EM das subfrações (D1, D2, D3, D4 e D5) de diclorometano de *C. martii*.

**Figura 6:** Cromatograma da Subfração de diclorometano – D1 de caule/casca de *Ctenodon martii* obtida por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa.



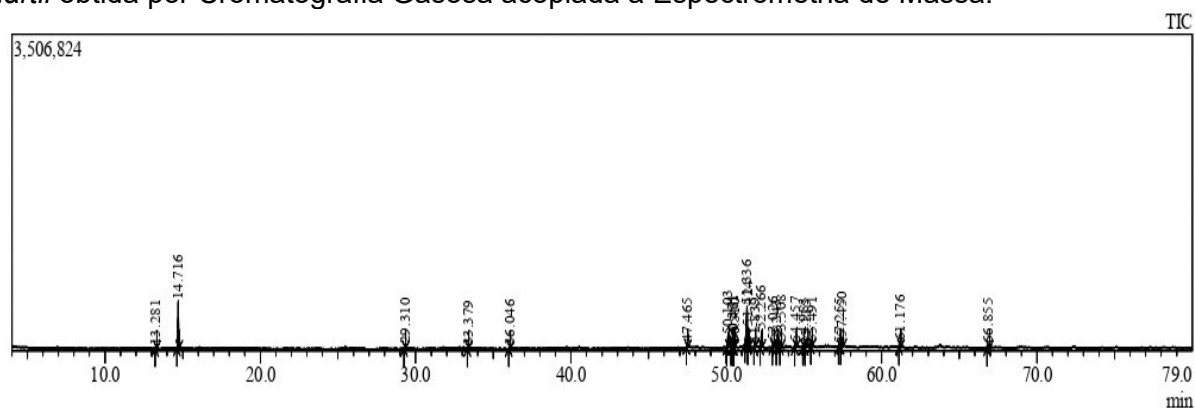
**Fonte:** Dados da pesquisa.

**Figura 7:** Cromatograma da Subfração de diclorometano – D2 de caule/casca de *Ctenodon martii* obtida por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa.



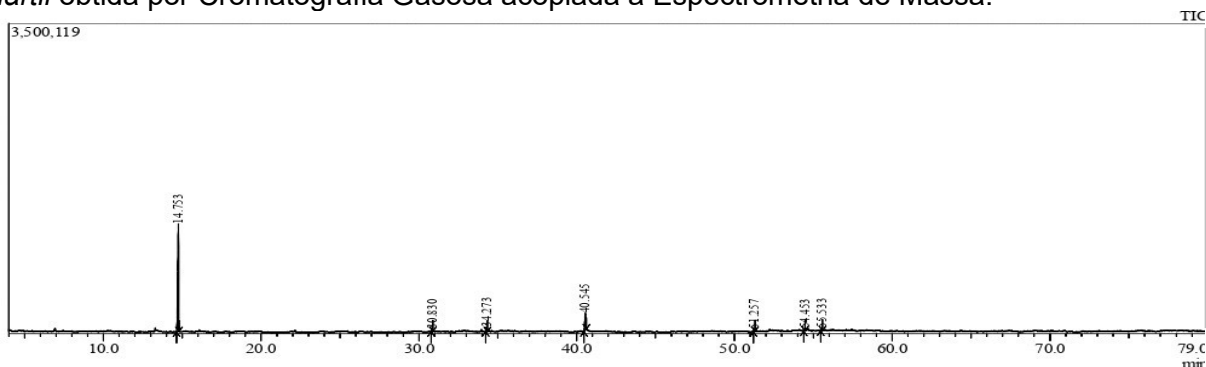
Fonte: Dados da pesquisa.

**Figura 8:** Cromatograma da Subfração de diclorometano – D3 de caule/casca de *Ctenodon martii* obtida por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa.



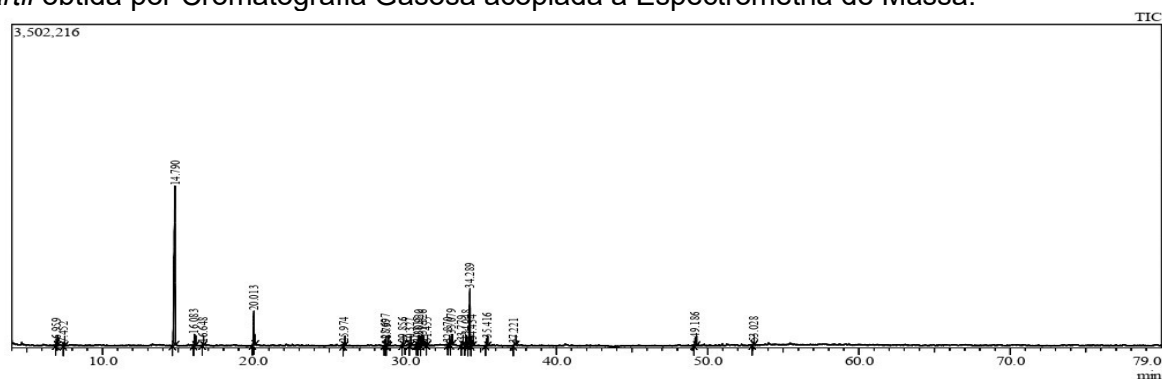
Fonte: Dados da pesquisa.

**Figura 9:** Cromatograma da Subfração de diclorometano – D4 de caule/casca de *Ctenodon martii* obtida por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa.



Fonte: Dados da pesquisa.

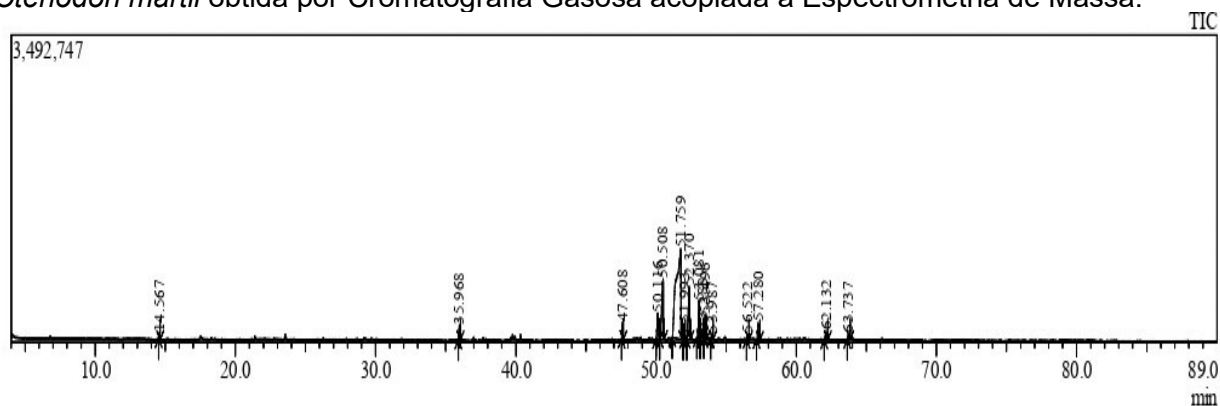
**Figura 10:** Cromatograma da Subfração de diclorometano – D5 de caule/casca de *Ctenodon martii* obtida por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa.



Fonte: Dados da pesquisa.

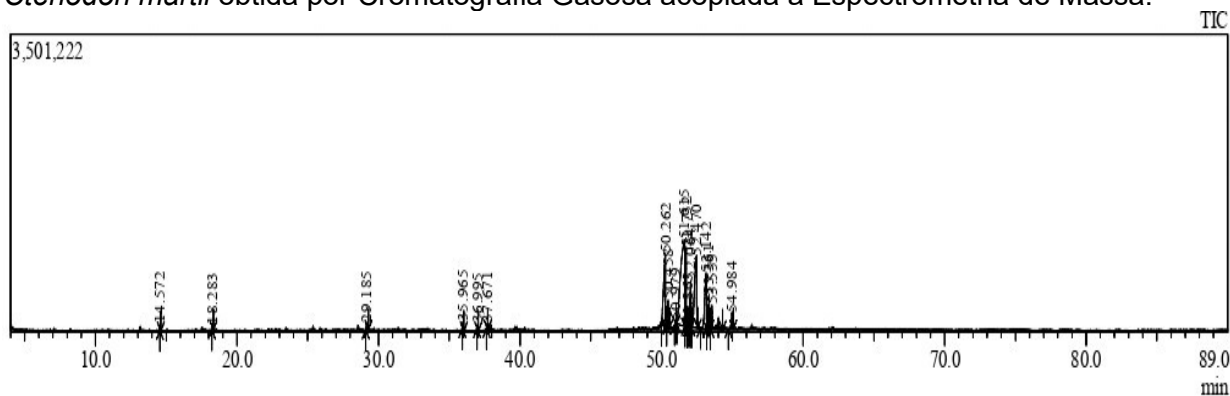
Nas figuras 11, 12 e 13 apresentamos os cromatogramas obtidos por CG-EM das sub-subfrações D2SS.1, D2SS.2 e D2SS.3 de *Ctenodon martii*.

**Figura 11:** Cromatograma da sub-subfração de diclorometano D2 (D2SS.1) de caule/casca de *Ctenodon martii* obtida por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa.



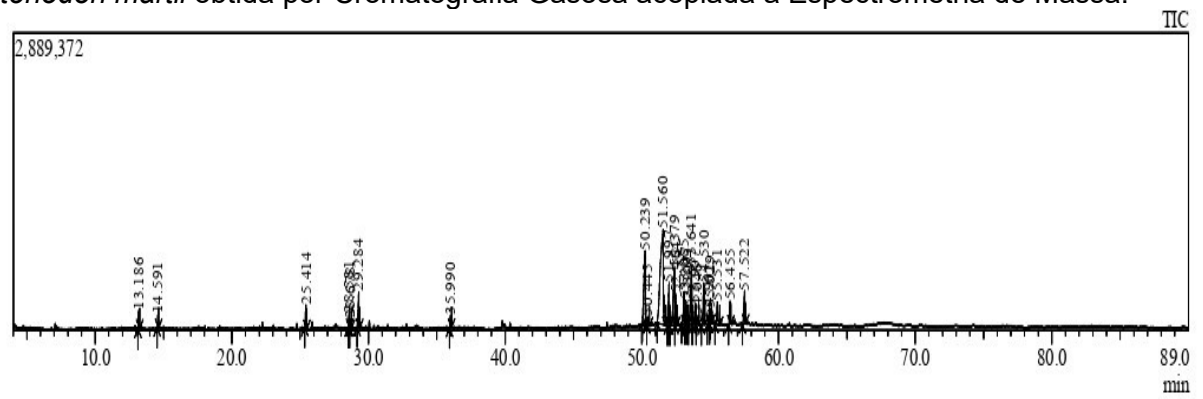
Fonte: Dados da pesquisa.

**Figura 12:** Cromatograma da sub-subfração de diclorometano D2 (D2SS.2) de caule/casca de *Ctenodon martii* obtida por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa.



Fonte: Dados da pesquisa.

**Figura 13:** Cromatograma da sub-subfração de diclorometano D2 (D2SS.3) de caule/casca de *Ctenodon martii* obtida por Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa.



Fonte: Dados da pesquisa.

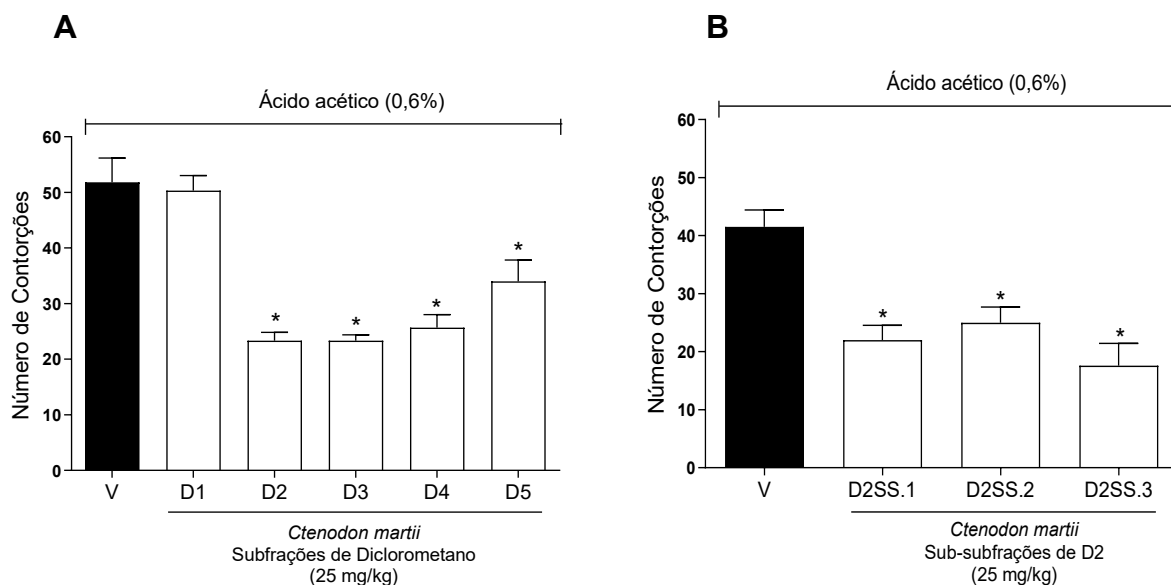


## 5.2 BIOENSAIOS

### 5.2.1 Avaliação da Atividade Antinociceptiva

#### 5.2.1.1 Contorção Abdominal Induzida por Ácido Acético

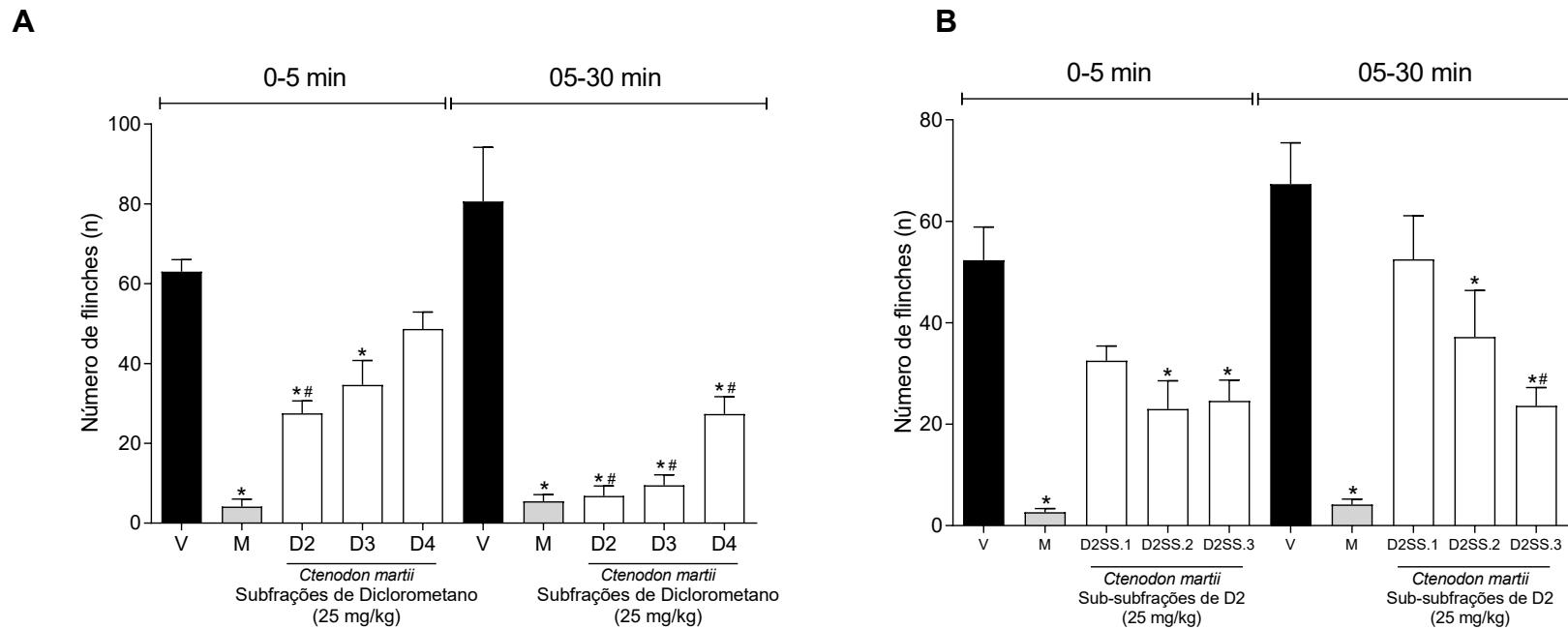
Para avaliar o efeito antinociceptivo sob nocicepção visceral foram realizados ensaios de contorção abdominal induzida por ácido acético. Após o resultado das análises fitoquímicas foram testadas as subfrações (D1, D2, D3, D4 e D5) e sub-subfração D2 (D2SS.1, D2SS.2 e D2SS.3) na dose de 25 mg/Kg do caule/casca de *C. martii*. Os resultados mostraram que D2, D3, D4, D5, D2SS.1, D2SS.2 e D2SS.3 promoveram redução significativa ( $p < 0,05$ ) no número de episódios de contorção abdominal em comparação ao controle negativo, grupo tratado com o veículo (etanol 10%, v/v), como demonstrado na Figura 14 A e B.



**Figura 14 (A e B)** – Efeito das subfrações de diclorometano e sub-subfrações de D2 do caule/casca de *Ctenodon martii* no teste de contorção abdominal induzida por ácido acético (0,6%) em camundongos. Os animais foram pré-tratados, de acordo com os grupos, com as (A) subfrações do extrato e (B) sub-subfrações de D2 na dose (25 mg/Kg, s.c.) e o veículo (V, etanol 10%, v/v). Os resultados são apresentados como médias  $\pm$  E.P.M. da contorção em camundongos ( $n = 6$ ). A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni. As variações diferem respectivamente de forma significativa onde: (\*)  $p < 0,05$ , quando comparado os grupos tratados com as subfrações de diclorometano e sub-subfrações de D2 ao veículo.

### 5.2.1.2. Nociceção Induzida Pela Injeção Intraplantar de Formalina 1,0%

Para avaliar a nociceção neurogênica e inflamatória foram testadas as subfrações (D2, D3 e D4) e sub-subfrações de D2 (D2SS.1, D2SS.2 e D2SS.3) na dose de 25 mg/Kg do caule/casca de *C. martii*. No teste da formalina, os resultados podem ser avaliados em duas fases diferentes, 1º fase, nociceção neurogênica (0-5 min) e 2º fase, nociceção inflamatória (5-30 min).



**Figura 15 (A e B)** – Efeito das subfrações de diclorometano e sub-subfrações de D2 do caule/casca de *Ctenodon martii* na resposta à nociceção induzida pela injeção intraplantar de formalina 1,0 % em camundongos. Os animais foram pré-tratados, de acordo com os grupos, com as (A) subfrações de diclorometano (25 mg/Kg, s.c.) e (B) sub-subfrações de D2 (25 mg/Kg, s.c.), veículo (V, etanol 10%, v/v) e morfina (M, 5 mg/kg respeitando 10ml/kg). Os resultados são apresentados como média  $\pm$  E.P.M. (n = 6) do número de *flinches*, sacudidas e lambidas da pata injetada por um período de 30 min. A análise estatística foi realizada por meio do ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. \*  $p < 0,05$  quando comparado os grupos tratados com as subfrações de diclorometano e sub-subfrações de D2 ao veículo. #  $p > 0,05$ , quando comparado à morfina com o grupo tratado com as subfrações e sub-subfrações.

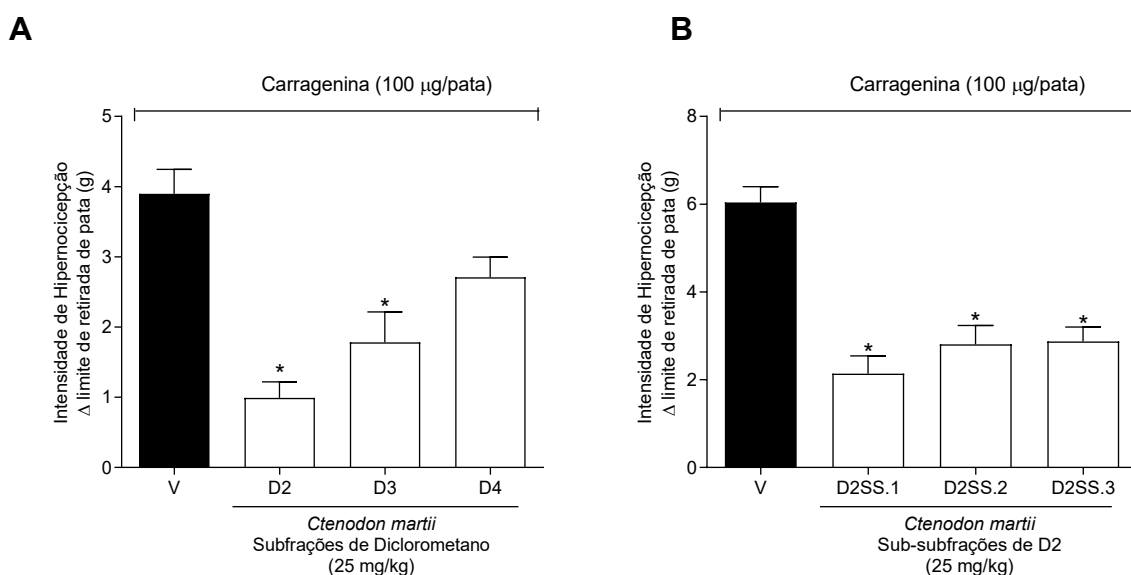
Na primeira fase, as subfrações D2 e D3, sub-subfrações D2SS.2 e D2SS.3 e o controle positivo morfina promoveram uma redução significativa no número de “*flinches*” induzidas pela formalina quando comparadas ao grupo tratado com veículo ( $p < 0,05$ ). Quando comparadas ao grupo morfina, somente a subfração D2 não apresentou diferença estatística ( $p < 0,05$ ), supondo que essa fração possui ação igual ou semelhante à morfina, um potente analgésico opioide na redução da dor de origem neurogênica.

Já na segunda fase, as subfrações D2, D3 e D4, sub-subfrações D2SS.2 D2SS.3 e o controle positivo morfina promoveram uma redução significativa no número de “*flinches*” induzidas pela formalina quando comparadas ao grupo veículo ( $p < 0,05$ ). Quando comparadas ao grupo morfina, somente a as subfrações D2, D3, D4 e D2SS.3 não apresentaram diferença estatística ( $p > 0,05$ ), supondo que essas subfrações possuem ação igual ou semelhante ao potente analgésico opioide.

Considerando o fato de que a primeira fase do teste de formalina resulta essencialmente, da estimulação direta dos nociceptores e a segunda fase do teste envolve um período de sensibilização durante o qual ocorrem os fenômenos inflamatórios com liberação de citocinas, os resultados sugerem que o efeito antinociceptivo das subfrações D2 e D3 e sub-subfrações D2SS.2 D2SS.3 são mediados, em parte, por compostos com propriedades anti-inflamatórias e antinociceptivas presente nestas frações.

### 5.2.1.3 Teste de Von Frey - Hipernociceção

Foi avaliado o efeito antinociceptivo sobre o mecanismo de nociceção mecânica induzida por Carragenina (Cg), por meio do teste de Von Frey. As subfrações (D2, D3 e D4) e sub-subfrações D2 (D2SS.1, D2SS.2 e D2SS.3) na dose de (25 mg/Kg) do caule/casca de *C. martii*, foram administradas 30 min antes da injeção intraplantar de Cg. As subfrações D2 e D3 e sub-subfrações D2SS.1, D2SS.2 e D2SS.3, reduziram significativamente a intensidade de hipernociceção dos animais quando comparada com o grupo veículo ( $p < 0,05$ ), conforme apresentado na Figura 16 (A e B).

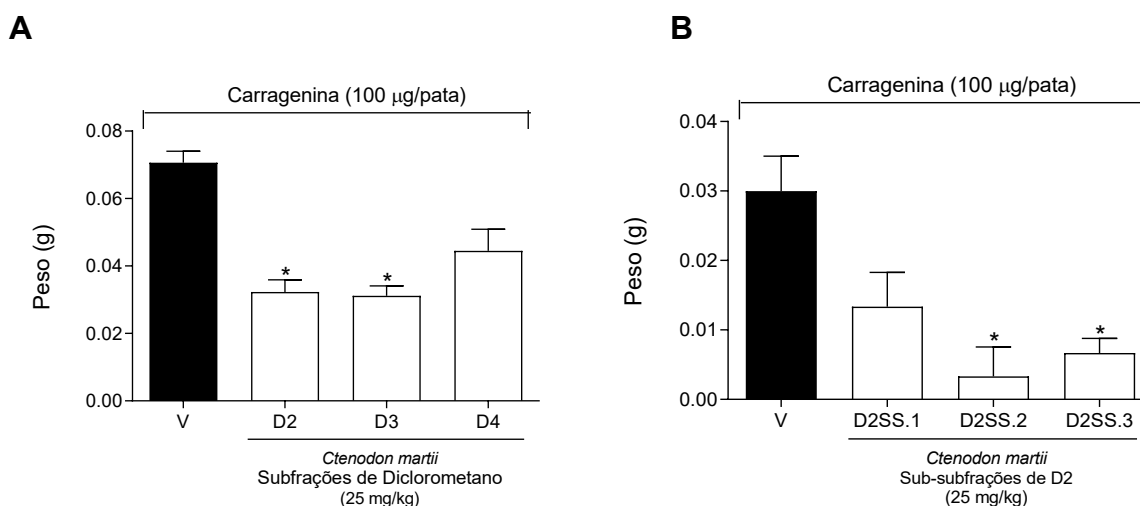


**Figura 16 (A e B)** – Efeito das subfrações de diclorometano e sub-subfrações de D2 do caule/casca de *Ctenodon martii* na inibição da nociceção mecânica pelo teste de Von Frey. Os camundongos foram tratados com as (A) subfrações de diclorometano (25 mg/Kg, s.c.) e (B) sub- subfrações de D2 (25 mg/Kg, s.c.) e o veículo (V, etanol 10%, v/v), 30 minutos antes da injeção i.pl. de (Cg, 100 µg/pata). As respostas hipernociceptivas foram avaliadas 3 h após estímulo. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  E.P.M. ( $n = 6$ ). A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. \*  $p < 0,05$  quando comparado os grupos tratados com as subfrações de diclorometano e sub-subfrações de D2 ao veículo.

## 5.2.2 Avaliação da Atividade Anti-inflamatória

### 5.2.2.1 Edema de pata

Para avaliar Hipernocicepção foram removidas e pesadas as patas traseiras de cada animal em uma balança analítica após o teste Von Frey. Para determinar a formação de edema, o peso da pata que recebeu carragenina foi diminuído do peso da pata que não recebeu. Os resultados foram expressos em gramas (Figura 17 – A e B). As subfrações D2 e D3 e sub-subfrações de D2 (D2SS.2 e D2SS.3) do caule/casca de *C. martii* (25 mg/kg), demonstraram uma redução na formação do edema quando comparado ao grupo controle que recebeu o tratamento de carragenina com o veículo ( $p < 0,05$ ).



**Figura 17 (A e B)** – Efeito das subfrações e sub-subfrações D2 de diclorometano do caule/casca de *Ctenodon martii* no edema de pata induzido por carragenina 100 µg/pata. Os camundongos foram tratados com as (A) subfrações de diclorometano (25 mg/Kg, s.c.) e (B) sub-subfrações de D2 (25 mg/Kg, s.c.) e o veículo (V, etanol 10%, v/v), 30 minutos antes da injeção i.pl. de (Cg, 100 µg/pata). Após a mensuração da resposta hipernociceptivas, os animais ( $n = 6$ ) foram eutanasiados e as patas retiradas e pesadas, e o edema da pata calculado pela diferença entre as duas patas em gramas. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  E.P.M. A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. \*  $p < 0,05$  quando comparado os grupos tratados com as subfrações de diclorometano e sub-subfrações de D2 ao veículo.

## 5.2.2.2 Quantificação de citocinas por qPCR

### 5.2.2.2.1 Expressão de genes inflamatórios (TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-17)

A expressão dos genes que codificam as citocinas inflamatórias foi quantificada por PCR em tempo real (qPCR) a partir da amostra da pata removida no experimento de Von Frey.

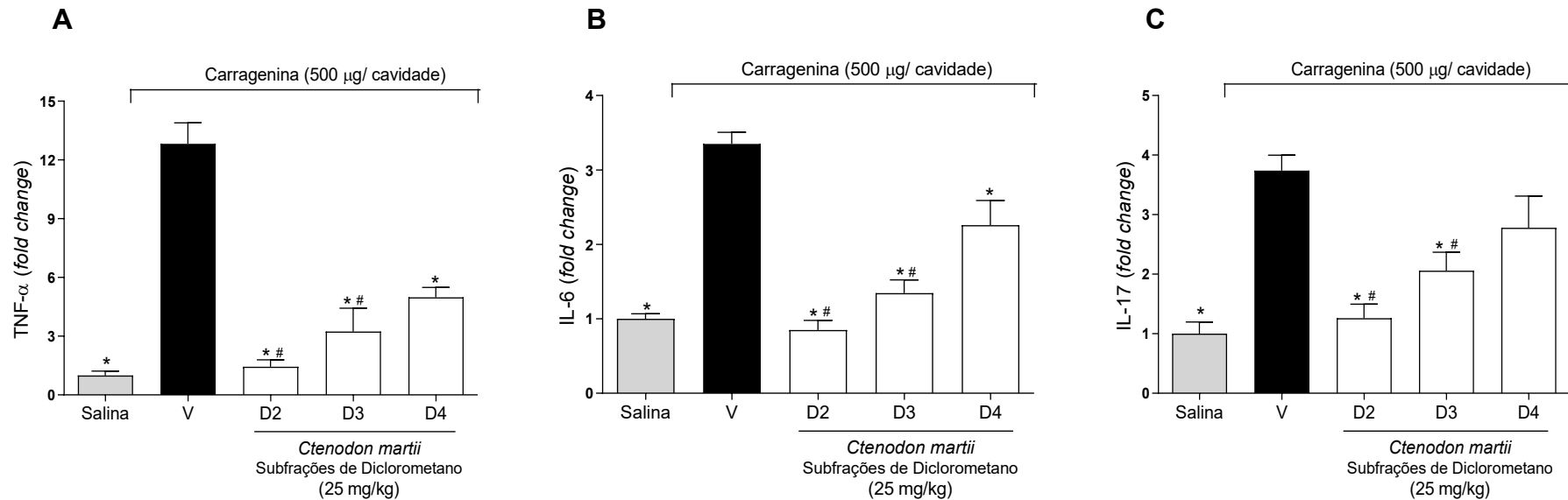
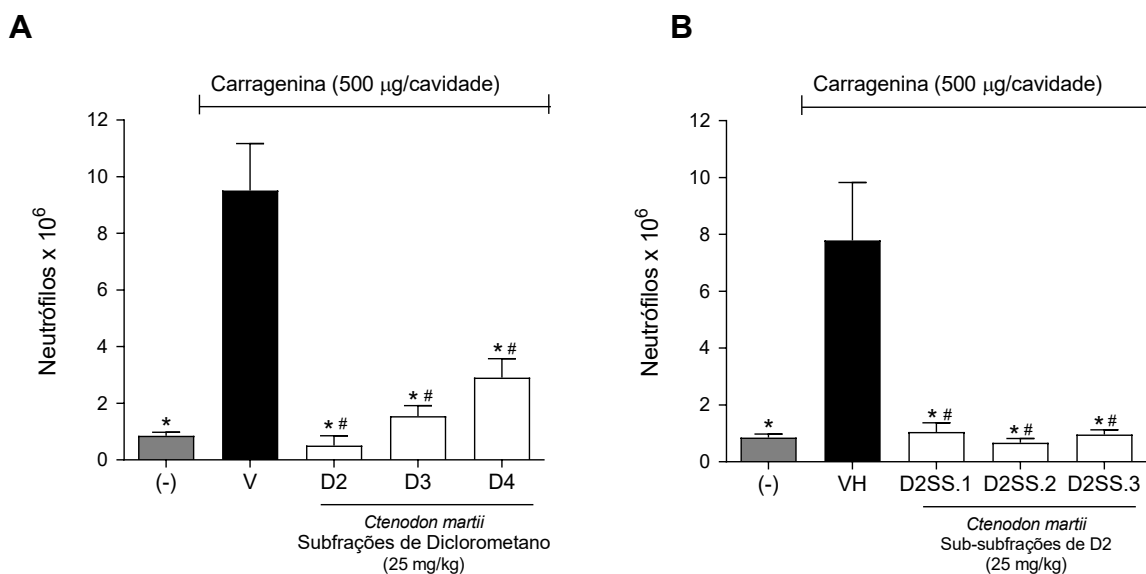


Figura 18 – Efeito das subfrações de diclorometano do caule/casca de *Ctenodon martii* na inibição da expressão gênica de genes inflamatórios (A-C). Os animais (n =6) foram pré-tratados com as subfrações 25 mg/kg (s.c.) e o veículo (V, etanol 10%, v/v) (s.c.), 30 minutos antes da injeção de carragenina (Cg, 100  $\mu$ g/pata, i.pl.). O grupo salina 0,9% não recebeu Cg. O RNA total foi extraído das patas dos camundongos utilizando-se o reagente de lise *TRIzol*, conforme protocolo do fabricante. O cDNA foi sintetizado a partir de 2  $\mu$ g do RNA total por meio do kit de transcrição reversa *High-Capacity RNA-to-cDNA*. O sistema *SYBR Green Mastermix* foi utilizado no PCR *real-time*. Os resultados de expressão gênica foram obtidos a partir das médias de *cycle threshold* de cada gene. As análises estatísticas foram realizadas por meio do teste Kruskal Wallis, seguido do pós-teste de Dunn's. \* p < 0,05 difere estatisticamente do grupo controle veículo, # p > 0,05 semelhante ao grupo Salina sem administração da carragenina. Legenda: (A) TNF- $\alpha$ , (B) IL-6, (C) IL-17.

Na expressão do gene TNF- $\alpha$  (Figura 18 - A) todos os grupos tratados com as subfrações de diclorometano (D2, D3 e D4) apresentaram redução significativa em comparação ao grupo veículo ( $p < 0,05$ ), e não houve diferença estatística ( $p > 0,05$ ) das subfrações (D2 e D3) em comparação com o grupo salina 0,9%, observando redução da expressão do gene TNF- $\alpha$  em resposta ao tratamento na indução do processo inflamatório. Sobre o gene IL-6 (Figura 18 - B) todos os grupos tratados com as subfrações de diclorometano (D2, D3 e D4) apresentaram redução significativa em comparação ao grupo tratado com o veículo ( $p < 0,05$ ), e não houve diferença estatística ( $p > 0,05$ ) das subfrações (D2 e D3) em comparação com o grupo salina 0,9%, observando redução da expressão do gene IL-6 em resposta ao tratamento na indução do processo inflamatório. Já o gene IL-17 (Figura 18 - C) apenas os grupos (D2 e D3) tratados com as subfrações de diclorometano apresentaram redução significativa em comparação ao grupo tratado com o veículo, e não houve diferença estatística ( $p > 0,05$ ) das subfrações (D2 e D3) em comparação com o grupo salina 0,9%, observando redução da expressão do gene IL-17 em resposta ao tratamento na indução do processo inflamatório.

### 5.2.2.3 Recrutamento de Neutrófilos para a Cavidade Peritoneal

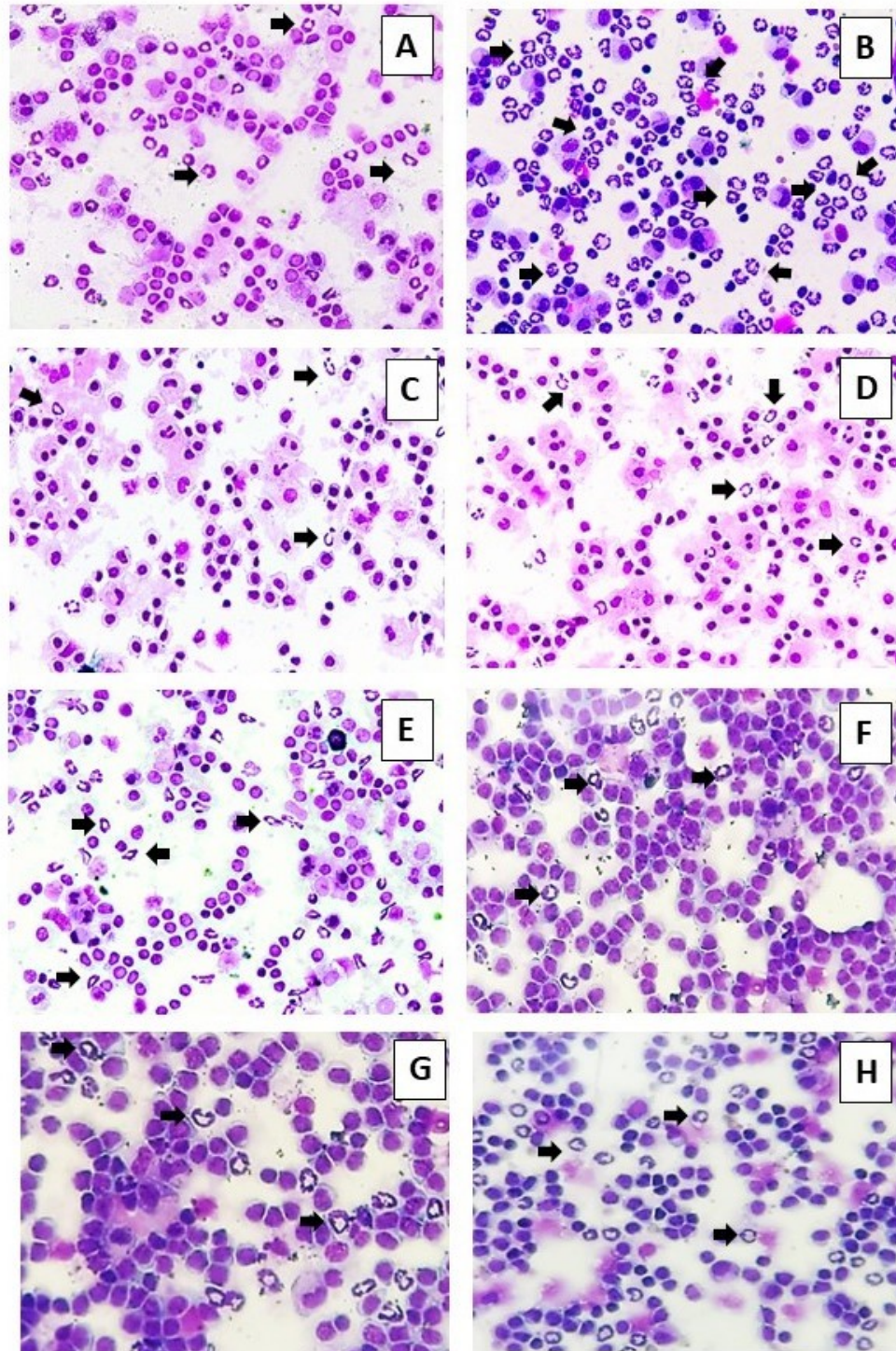
Para avaliar o efeito anti-inflamatório das subfrações de diclorometano obtidos do caule/casca de *C. martii*, foi realizado o teste de recrutamento de neutrófilo para cavidade peritoneal. Diferente do teste anterior, este avalia o potencial das subfrações em reduzir a migração de neutrófilos induzida pela administração da Cg. Todos os grupos tratados com as subfrações (D2, D3 e D4) e sub- subfrações (D2SS.1, D2SS.2 e D2SS.3), demonstraram redução significativa na migração de neutrófilos no líquido peritoneal em comparação ao grupo veículo ( $p < 0,05$ ). Observa-se que não houve diferença estatística entre as subfrações (D2, D3 e D4) e sub- subfrações (D2SS.1, D2SS.2 e D2SS.3) testadas em relação ao grupo salina 0,9% (-) o qual não recebeu o estímulo inflamatório (Cg) ( $p > 0,05$ ), mostrando que as subfrações, possuem potente atividade anti-inflamatória atuando na redução da migração de neutrófilos no processo inflamatório (Figura 19 – A e B).



**Figura 19 (A e B)** - Efeito das subfrações de diclorometano e sub-subfrações de D2 do caule/casca da *Ctenodon martii* sobre a migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal induzida por carragenina (Cg). Grupos de camundongos ( $n = 6$ ) foram pré-tratados por via subcutânea com administração das (A) subfrações de diclorometano (25 mg/Kg, s.c.) e (B) sub- subfrações de D2 na dose (25 mg/Kg, s.c.) e o veículo (V, etanol 10%, v/v), 30 min antes da Cg (500 µg/cavidade) induzir a peritonite. O grupo salina (-) não recebeu a Cg. A migração de neutrófilos foi avaliada após 4 h à administração de Cg. Cada valor representa a média  $\pm$  E.P.M. A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. \*  $p < 0,05$  quando comparado o grupo tratado com as subfrações de diclorometano e sub-subfrações de D2 ao grupo veículo. #  $p > 0,05$ , quando comparado o grupo tratado com as subfrações de diclorometano e sub-subfrações de D2 ao grupo controle (-) salina.



Os neutrófilos desempenham um papel relevante na gênese da nocicepção inflamatória induzida por carragenina ao serem fontes ou mediadores de citocinas hipernociceptivas de ação direta (Soehnlein et al., 2017). Mediante os resultados encontrados (Figura 19 – A e B), foram feitas fotomicrografia dos grupos testados.



Fotomicrografia representativa da contagem de neutrófilos, teste migração. A área total dos campos microscópicos foi observada em microscópio óptico, cuja imagem capturada por câmera de alta resolução e digitalizada através do Software Ifinity Analyzy® (aumento de 40x). Legenda: (A) Salina 0,9%, (B) veículo (etanol 10%, v/v); Subfração: (C) D2; (D) D3; (E) D4; Sub-subfração: (F) D2SS.1; (G) D2SS.2; (H) D2SS.3; (→) Neutrófilos.

### 5.2.2.4 Ensaio para Quantificação de Citocinas

#### 5.2.2.4.1 Quantificação de citocinas por ELISA

A administração de carragenina elevou a produção da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$  e IL-1 $\alpha$  no exsudato peritoneal dos camundongos. Os grupos tratados com as subfrações D2, D3 e D4 (25 mg/kg) apresentaram redução na quantificação de citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$  quando comparado ao grupo veículo ( $p < 0,05$ ) (Figura 21 - A). Na produção da citocina IL-1 $\alpha$  no exsudato peritoneal, observou-se diferença estatística nas subfrações D2 e D3, com redução da concentração em relação ao grupo veículo ( $p < 0,05$ ). Por outro lado, a subfração D4 não apresentou diferença estatística em relação ao controle veículo (Figura 20 - B).

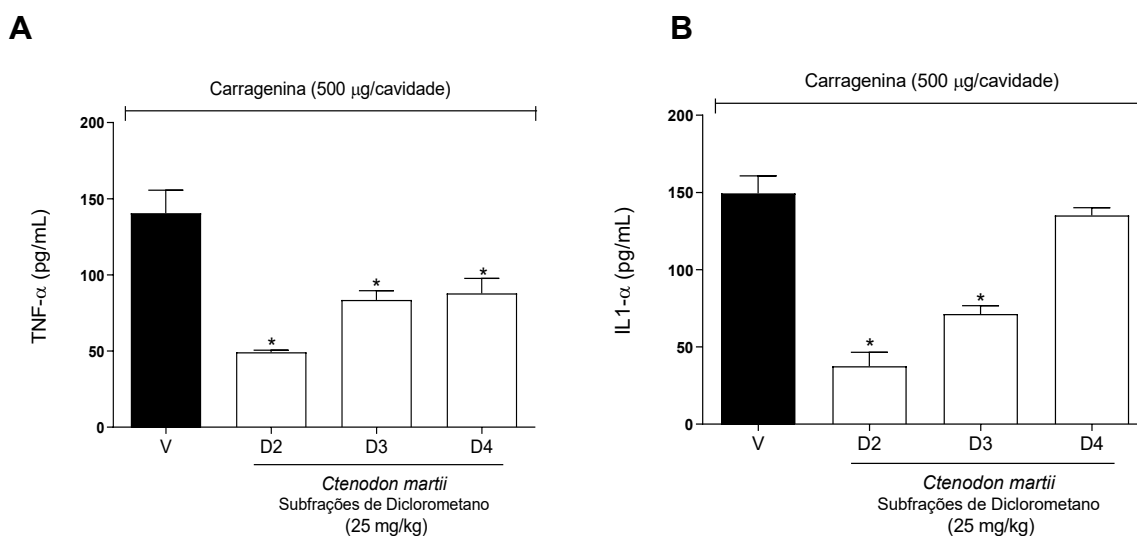


Figura 20 - Efeito das subfrações de diclorometano do caule/casca da *Ctenodon martii* sobre a produção de citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\alpha$  induzida por carragenina (Cg). Grupos de camundongos ( $n = 6$ ) foram pré-tratados por via subcutânea com administração das subfrações (25 mg/kg) ou veículo (V, etanol 10%, v/v, s.c.), antes da Cg (500 µg/cavidade) induzir a inflamação. As concentrações de citocinas foram determinadas por ELISA. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  D.P. de seis animais em cada grupo. A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. \* $p < 0,05$  quando comparado os grupos tratados com as subfrações de diclorometano com o veículo. Legenda: (A) TNF- $\alpha$ , (B) IL-1 $\alpha$ .

### 5.2.2.5 Avaliação da Produção do Óxido Nítrico (NO)

A produção do NO foi avaliada indiretamente pela quantificação da concentração de nitrito no lavado peritoneal dos camundongos removidos no teste de recrutamento de neutrófilos. O alto nível de NO produzido por macrófagos, neutrófilos e células ativadas pode também lesar células saudáveis vizinhas, sendo este mecanismo responsável pela maioria de processos inflamatórios e autoimunes. Todos os grupos tratados com as subfrações de diclorometano (D2, D3 e D4) na dose de 25 mg/kg apresentaram redução significativa em comparação ao grupo tratado com o veículo ( $p < 0,05$ ). Observa-se que não houve diferença estatística entre as subfrações testadas (D2, D3 e D4) em relação ao grupo salina 0,9% (-) que não recebeu o estímulo inflamatório (Cg) ( $p > 0,05$ ). As frações ativas do extrato podem levar à inibição da síntese de nitrito mediada por células imunes como os neutrófilos e macrófagos, reduzindo assim os estímulos inflamatórios presentes (Figura 21).

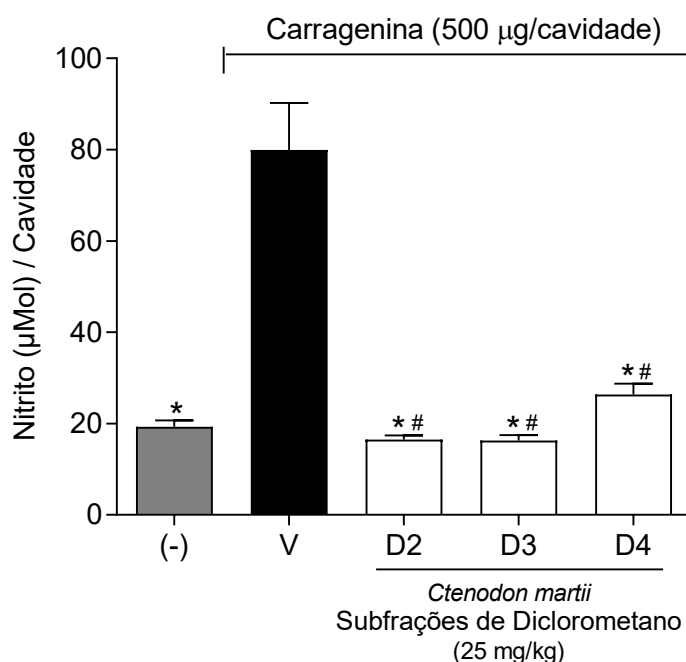


Figura 21 – Efeito das subfrações de diclorometano do caule/casca de *Ctenodon martii* sobre a produção de nitrito induzida por carragenina (Cg). Grupos de camundongos ( $n = 6$ ) foram pré-tratados por via subcutânea com administração das subfrações (25 mg/kg) ou veículo (V, etanol 10%, v/v, s.c.), 30 min antes da Cg (500 µg/cavidade) induzir a peritonite. O grupo salina (-) não recebeu a Cg. Cada valor representa a média  $\pm$  E.P.M. A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. \*  $p < 0,05$  quando comparado o grupo tratado com as subfrações de diclorometano ao grupo veículo. #  $p > 0,05$ , quando comparado o grupo tratado com as subfrações de diclorometano ao grupo controle (-) salina.

### 5.2.2.6 Avaliação da Permeabilidade Vascular

Foram realizados ensaios para avaliar a atividade das subfrações de diclorometano obtidos do caule/casca de *C. martii* no processo inflamatório, tendo como modelo utilizado o teste com o corante azul de Evans, no qual se avalia o extravasamento vascular por meio do aumento da permeabilidade induzido por Cg. As subfrações de diclorometano (D2, D3 e D4) demonstraram uma significativa redução do extravasamento do corante azul de Evans no líquido peritoneal em comparação ao grupo veículo ( $p < 0,05$ ). Observa-se que não houve diferença estatística entre as subfrações (D2, D3 e D4) testadas em relação ao grupo salina 0,9% (-) o qual não recebeu o estímulo inflamatório (Cg) ( $p > 0,05$ ), mostrando que as subfrações, possuem atividade anti-inflamatória atuando na redução da permeabilidade vascular no processo inflamatório (Figura 22).

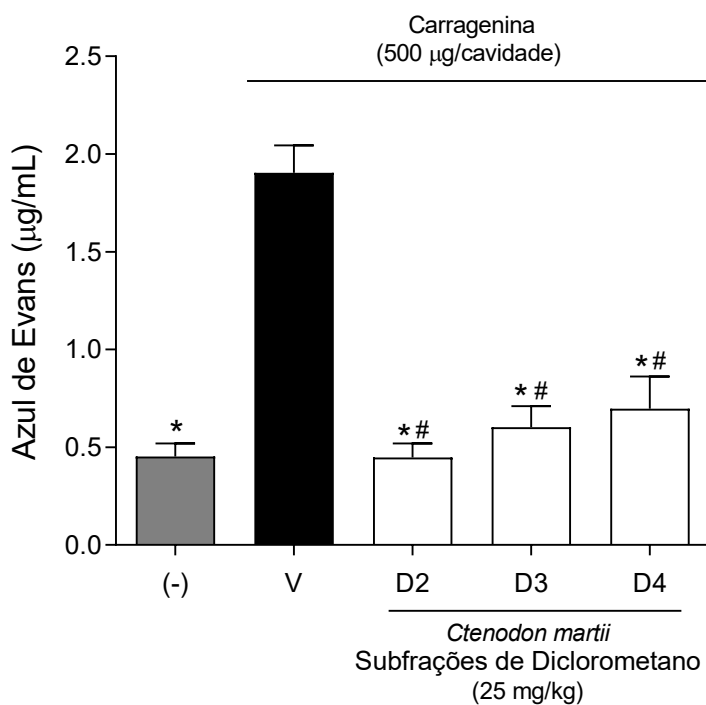


Figura 22 – Efeito das subfrações de diclorometano do caule/casca de *Ctenodon martii* na permeabilidade vascular no teste de azul de Evans. Os animais foram pré-tratados por administração das subfrações de diclorometano (25 mg/kg, s.c.) ou veículo (V, etanol 10%, v/v, s.c.), 30 min antes da injeção de Cg (500 mg/cavidade, i.p.). O grupo salina (-) 0,9% não recebeu a (Cg). O aumento da permeabilidade vascular foi avaliado após 3 h. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  E.P.M. da concentração de corante azul de Evans ( $n = 6$ ). A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. \*  $p < 0,05$  quando comparado o grupo tratado com as subfrações de diclorometano ao veículo. #  $p > 0,05$  quando comparado as subfrações de diclorometano ao grupo controle (-) salina.

### 5.2.3 Avaliação da Atividade Anti-inflamatória em modelo crônico

#### 5.2.3.1 Modelo granulomatoso

A avaliação do crescimento de tecido granulomatoso em volta de um corpo estranho imunologicamente inerte foi realizada em ratos tratados durante 7 dias após a realização da cirurgia de implante do pelete. Os animais foram tratados com o extrato etanólico de *C. martii* nas doses de 50, 25, 12,5 e 6,25 mg/kg e os resultados foram comparados com os grupos veículo (etanol 10%) e dexametasona (0,2 mg/kg), respectivamente, conforme apresentado nas Figuras 23.

Foi observado que o tratamento com o fármaco padrão glicocorticoide dexametasona (0,2 mg/kg) reduziu significativamente a massa corporal dos ratos ( $p < 0,05$ ), enquanto o tratamento prolongado com o extrato etanólico nas concentrações 50, 25, 12,5 e 6,25 mg/Kg não alterou a massa corporal dos animais quando comparado com o grupo veículo ( $p > 0,05$ ) (Figura 23 – A).

O efeito do tratamento prolongado com dexametasona (0,2 mg/kg) e os extratos etanólicos 25 e 12,5 mg/kg reduziram o peso do baço em relação ao grupo veículo e não apresentaram diferença estatística comparado com o grupo dexametasona ( $p > 0,05$ ), de acordo com a (Figura 23 – B).

Em relação ao timo não houve alteração de peso entre os grupos tratamento com o extrato etanólico (50, 25, 12,5 e 6,25 mg/kg) e os controles dexametasona (0,2 mg/kg) e veículo ( $p > 0,05$ ) (Figura 23 – C).

Na avaliação do peso de tecido granulomatoso formado, o efeito do tratamento prolongado com dexametasona (0,2 mg/kg) e os extratos etanólicos (50 e 25 mg/kg) reduziram o peso do granuloma em relação ao grupo veículo ( $p < 0,05$ ), e não apresentaram diferença estatística quando comparado com o grupo dexametasona ( $p > 0,05$ ), de acordo com a (Figura 23 – D).

Na formação de exsudato sobre a indução do granuloma, o efeito do tratamento prolongado com dexametasona (0,2 mg/kg) e os extratos etanólicos (50, 25 e 12,5 mg/kg) reduziram a quantidade de exsudato formada em relação ao grupo veículo ( $p < 0,05$ ), e não apresentaram diferença estatística comparado com o grupo dexametasona ( $p > 0,05$ ), de acordo com a (Figura 23 – E).

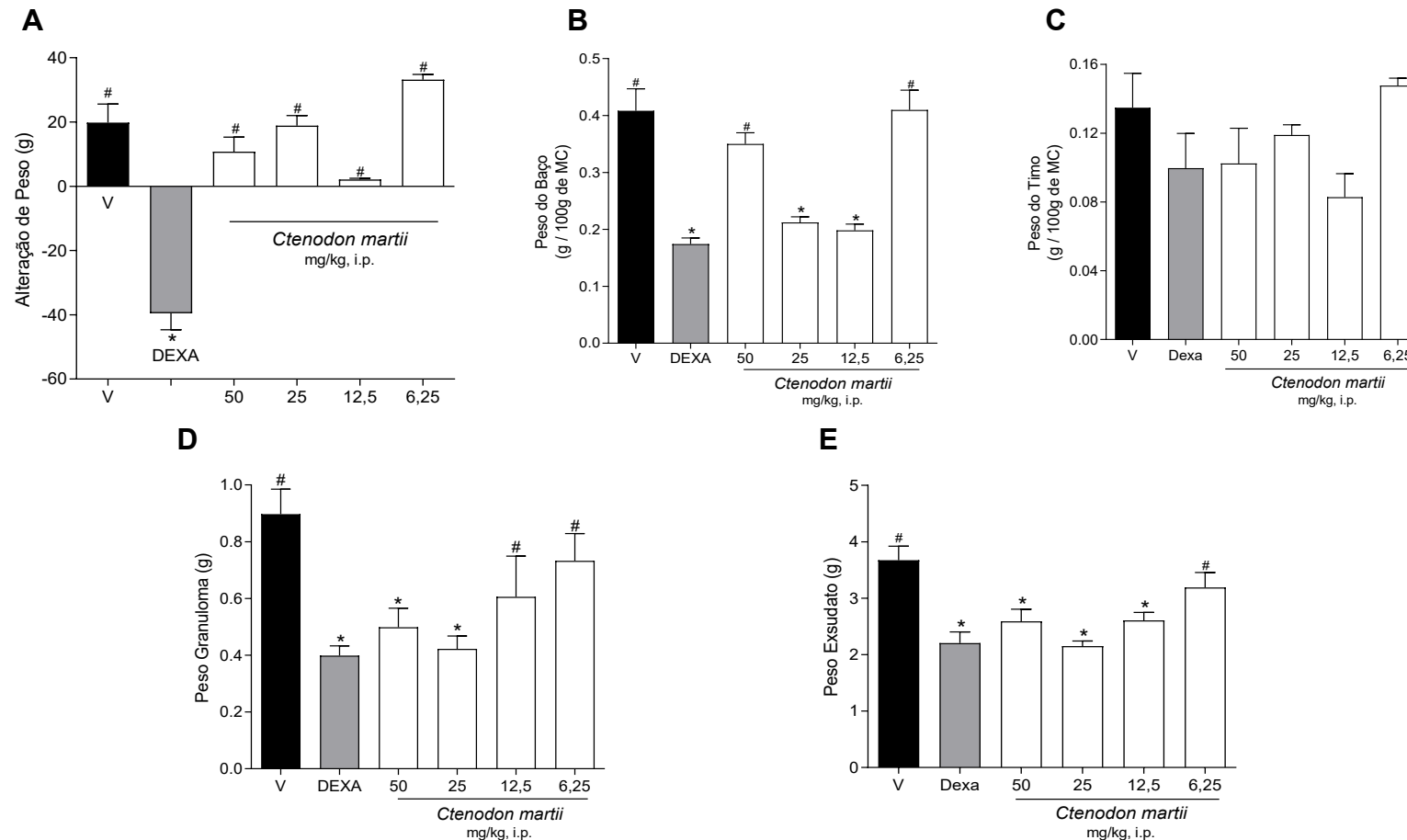
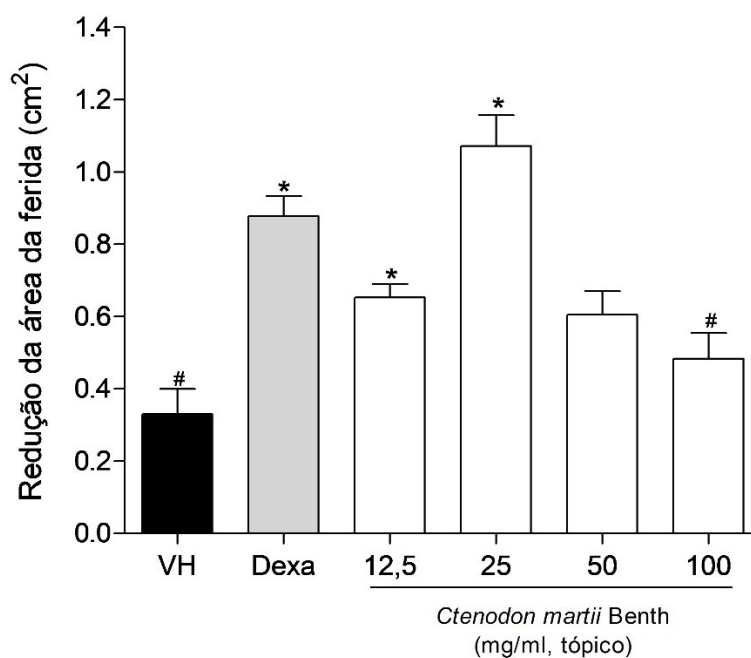


Figura 23: Avaliação do crescimento de tecido granulomatoso após tratamento prolongado com extrato etanólico do caule/casca de *Ctenodon martii* e dexametasona. Os animais foram tratados por administração subcutânea do extrato etanólico do caule/casca de *Ctenodon martii* nas doses 25, 50, 15,5 e 6,25 mg/kg, dexametasona (0,2 mg/kg) e veículo (V, etanol 10%, v/v), uma vez por dia, durante 7 dias consecutivos a partir do dia da inserção do pelete estéril de algodão. No oitavo dia, os animais foram anestesiados e eutanasiados. Os peletes de algodão com o tecido fibrovascular foram removidos, secos a 40 °C por 24 horas e sua massa determinada. Os resultados são apresentados como média  $\pm$  D.P. (n =6) do peso do pelete (g). \* p < 0,05 quando comparado ao grupo tratado com veículo. # p < 0,05 quando comparado ao grupo dexametasona. A análise estatística foi realizada por meio do teste Kruskal Wallis, seguido pelo teste comparação múltipla de Dunn's. Legenda: (A) Alteração de peso (g), (B) Peso do baço (g), (C) Peso do timo (g), (D) Peso granuloma, (E) Peso do exsudato.

### 5.2.3.2 Cicatrização de ferida excisional

O modelo experimental de ferida excisional permitiu avaliar o potencial cicatrizante dos extratos testados na redução da área da ferida em comparação com o controle (Figura 24). O tratamento durante 7 dias nas concentrações de 50 e 100 mg/mL não apresentaram redução da área de contração da ferida comparado ao grupo veículo ( $p < 0,05$ ). As concentrações de 12,5 e 25 mg/mL do extrato reduziram a área da ferida em relação ao controle negativo veículo e não apresentaram diferença entre o controle positivo dexametasona ( $p < 0,05$ ). O controle positivo dexametasona apresentou diferença estatística com os grupos veículo e 100 mg/kg. Mediante aos resultados apresentados foram feitas as análises histopatológicas dos grupos controles e as concentrações do extrato 12,5 e 25 mg/mL.



**Figura 24** – Cicatrização de ferida excisional tratado com extrato etanólico do caule/casca *Ctenodon martii* e dexametasona. Os animais receberam tratamento diário, uma vez ao dia, durante sete dias, com administração tópica de veículo (V, etanol 10%), ou dexametasona 1 mg/kg (Dexa), ou extrato etanólico do caule/casca *Ctenodon martii* (12,5, 25, 50 e 100 mg/mL). As feridas foram diariamente mensuradas com um paquímetro até o período estabelecido. Os resultados representam a diferença entre o dia da cirurgia e o último dia de experimento. Os resultados são expressos como média  $\pm$  D.P. de seis animais por grupo. A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA One-Way, seguida do teste de Dunnett. \*  $p < 0,05$  em comparação com o grupo tratado com veículo (etanol 10%). #  $p < 0,05$  em comparação com o grupo tratado com dexametasona.



### 5.2.3.2.1 Análise semiquantitativa corte histológico de feridas excisionais

Os resultados das análises semiquantitativas das feridas excisionais, em ratos machos dos grupos controle e tratados com extrato etanólico de *Ctenodon martii* 12,5 e 25 mg/mL estão descritos na Tabela 6. Diferença estatística foram observadas nas variáveis hemorragia, exsudado, colagenização e queratinização comparando os grupos controle com dexametasona e o grupo tratado com veículo ( $p < 0,05$ ). Houve redução da hemorragia, exsudado e queratinização, e aumento da colagenização entre o veículo e a concentração 12,5 mg/mL ( $p < 0,05$ ), não havendo diferença quanto a reepitelização. Na concentração de 25 mg/mL, hemorragia, exsudado e queratinização reduziram e colagenização e reepitelização aumentaram em relação ao veículo ( $p < 0,05$ ). Comparando com o grupo dexametasona, a concentração de 12,5 mg/mL reduziu hemorragia, exsudato e queratinização ( $p < 0,05$ ), e não diferenciou em colagenização e reepitelização ( $p > 0,05$ ). Comparando com o grupo dexametasona, a concentração de 25 mg/mL reduziu hemorragia, exsudato e queratinização ( $p < 0,05$ ), e aumentou a colagenização e reepitelização ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 6** – Avaliação semiquantitativa das feridas excisionais tratadas com Extrato etanólico do caule/casca de *Ctenodon martii* e dexametasona frente aos parâmetros hemorragia, exsudado, colagenização, reepitelização e queratinização.

VÁRIÁVEL	Grupos de ratos <i>Wistar</i> Machos			
	Veículo (Etanol 10%)	DEXA (1mg/g)	Extrato etanólico do caule/casca de <i>Ctenodon martii</i>	
			12,5 mg/mL	25 mg/mL
Hemorragia	5,83 ± 0,75	3,00 ± 0,89*	1,50 ± 0,83**	0,83 ± 0,75**
Exsudato	6,83 ± 0,75	4,33 ± 0,51*	1,83 ± 0,75**	1,33 ± 0,51**
Colagenização	3,83 ± 0,75	5,66 ± 1,21*	5,33 ± 0,51*	8,00 ± 0,89**
Reepitelização	2,83 ± 0,40	4,00 ± 0,89	3,66 ± 0,81	7,33 ± 0,81**
Queratinização	8,66 ± 0,51	5,66 ± 0,51*	3,66 ± 0,51**	3,33 ± 0,81**

Os animais receberam tratamento diário, uma vez ao dia, durante sete dias, com administração tópica em cada ferida do veículo (etanol 10%), ou Dexametasona 1mg/g, ou extrato etanólico caule/casca de *Ctenodon martii* 12,5 e 25 mg/ml. Os dados obtidos pela técnica de hematoxilina-eosina foram classificados de acordo com a intensidade em que foram encontrados e transformados em variáveis quantitativas mediante atribuição de índice para o achado histológico. Foram atribuídos os escores: Ausente = 0; Discreta = 1; Moderada = 2; Acentuada = 3. Os valores dos grupos (Veículo, DEXA e Extrato etanólico) representam a Média ± D.P. ANOVA One-Way, seguida do teste de múltipla comparação de Bonferroni. Sendo que (\*)  $p < 0,05$  representa a diferença entre o veículo e os outros grupos. (\*\*)  $p < 0,05$  representa a diferença entre Dexametasona e os outros grupos.

**Fonte:** Dados da pesquisa.



### 5.2.3.2.2 Análise Histopatológica de Feridas Excisionais

Os resultados das análises quantitativas das variáveis sobre contagem de células e vasos sanguíneos em ratos machos dos grupos controle e tratados com extrato etanólico do caule/casca de *C. martii* nas doses de 12,5 e 25 mg/mL estão descritos na Tabela 7. Na avaliação quantitativa histológica foram observadas diferenças estatísticas significantes na redução da contagem de neutrófilos, macrófagos e fibroblastos nas feridas tratadas com extrato etanólico nas doses de 12,5 e 25 mg/mL, quando comparadas com os grupos controle positivo dexametasona e negativo veículo ( $p < 0,05$ ). Os linfócitos aumentaram com o tratamento com a dexametasona e a concentração de 25 mg/mL do extrato etanólico em relação ao veículo ( $p < 0,05$ ), e não diferiram entre dexametasona e extrato ( $p > 0,05$ ). No entanto, a concentração de 12,5 mg/mL apresentou quantidade de linfócitos semelhantes ao grupo veículo ( $p > 0,05$ ). Já a quantidade de vasos sanguíneos aumentou nos grupos 12,5 e 25 mg/mL do extrato etanólico e dexametasona em relação ao veículo ( $p < 0,05$ ) apresentando diferença entre a concentração de 25 mg/mL com a dexametasona ( $p < 0,05$ ). As duas concentrações do extrato e a dexametasona apresentaram aumento de fibrócitos em relação ao controle veículo ( $p < 0,05$ ), sem diferença estatística entre eles ( $p > 0,05$ ).

**Tabela 7** – Análises histopatológicas sobre a quantidade de neutrófilos, macrófagos, linfócitos, fibroblastos, fibrócitos e vasos sanguíneos em feridas por corte em ratos machos tratados com Extrato etanólico do caule/casca de *Ctenodon martii* nas doses de 12,5 e 25 mg/ml.

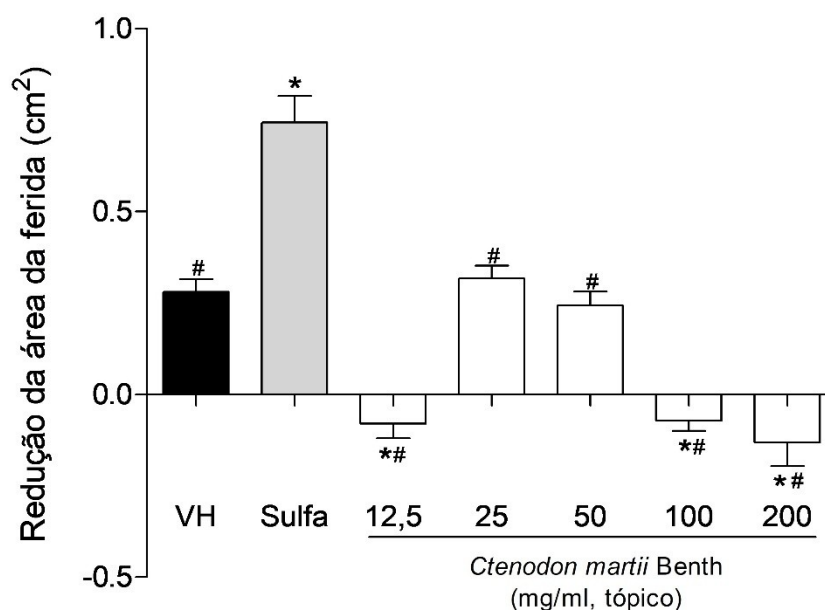
VÁRIAVEL	Grupos de ratos <i>Wistar</i> Machos			
	Veículo (Etanol 10%)	DEXA (1mg/g)	Extrato etanólico do caule/casca de <i>Ctenodon martii</i>	
			12,5 mg/ml	25 mg/ml
Neutrófilos	148,4 ± 17,41	95,79 ± 11,20*	56,83 ± 13,35*#	24,21 ± 5,44*#
Macrófagos	118,3 ± 15,75	67,00 ± 8,49*	48,58 ± 5,89*#	34,58 ± 4,36*#
Linfócitos	38,54 ± 3,23	60,13 ± 8,80*	33,33 ± 4,14#	56,83 ± 11,15*
Fibroblastos	171,5 ± 15,65	100,8 ± 6,88*	65,75 ± 3,93*#	49,13 ± 5,11*#
Fibrócitos	23,50 ± 2,60	32,71 ± 2,98*	41,96 ± 4,50*#	67,25 ± 5,67*#
Vasos Sanguíneos	3,83 ± 0,95	7,91 ± 1,64*	6,79 ± 1,16*	14,88 ± 1,67*#

Os animais receberam tratamento diário, uma vez ao dia, durante sete dias, com administração tópica em cada ferida do veículo (etanol 10%), ou Dexametasona 1mg/g, ou extrato etanólico caule/casca de *Ctenodon martii* 12,5 e 25 mg/ml. Os valores dos grupos (veículo, DEXA e extrato) representam a Média ± D.P. ANOVA One-Way, seguida do teste de múltipla comparação de Bonferroni. Sendo que (\*) representa a diferença entre o veículo e os outros grupos  $p < 0,05$ . (#) representa a diferença entre Dexametasona e os outros grupos  $p < 0,05$ .

**Fonte:** Dados da pesquisa.

### 5.2.3.3 Cicatrização de ferida por queimadura

No modelo experimental de ferida gerada por queimadura, foram avaliadas as feridas tratadas com o extrato etanólico do caule/casca de *C. martii* nas concentrações de 12,5, 25, 50, 100 e 200 mg/mL. Os grupos tratados com extrato etanólico nas concentrações de 12,5, 100 e 200 mg/mL houve crescimento da área da ferida apresentando menos eficaz em comparação aos grupos controles veículo e sulfa ( $p < 0,05$ ). Os grupos tratamentos nas concentrações de 25 e 50 mg/mL não reduziu o crescimento da área final da ferida quando comparado ao grupo controle ( $p > 0,05$ ). O controle positivo Sulfa apresentou maior redução da área da ferida mostrando diferença estatística para todos os grupos ( $p > 0,05$ ). Desta forma, a análise histopatológica não foi realizada uma vez que não houve diferença entre o controle veículo e a redução da área de ferida (Figura 25).



**Figura 25** – Modelo experimental de ferida gerada por queimadura tratado com extrato etanólico do caule/casca *Ctenodon martii* e sulfadiazina. Os animais receberam tratamento diário, uma vez ao dia, durante sete dias, com administração tópica de veículo (V, etanol 10%), ou sulfadiazina de prata 1% (Sulfa), ou extrato etanólico do caule/casca *Ctenodon martii* (12,5, 25, 50, 100 e 200 mg/mL). As feridas foram diariamente mensuradas com um paquímetro até o período estabelecido. Os resultados representam a diferença entre o dia da cirurgia e o último dia de experimento. Os resultados são expressos como média  $\pm$  D.P. de seis animais por grupo. A análise estatística foi realizada por meio do teste ANOVA One-Way, seguida do teste de Dunnet. \*  $p < 0,05$  em comparação com o grupo tratado com veículo.

## 5.2.4 Avaliação Locomotora e Sedativa por Labirinto em Cruz Elevado

### 5.2.4.1 Análise quantitativa de entrada nos braços

Os efeitos do tipo ansiolítico e/ ou sedativos são definidos como um aumento na proporção do número de entradas nos braços abertos e o tempo gasto nos braços abertos, relativo à porcentagem total de tempo e entrada gasto em ambos os braços. O número total de entradas nos braços fechados foi utilizado também como uma medida da atividade locomotora (Figura 26 – A, B, C e D).

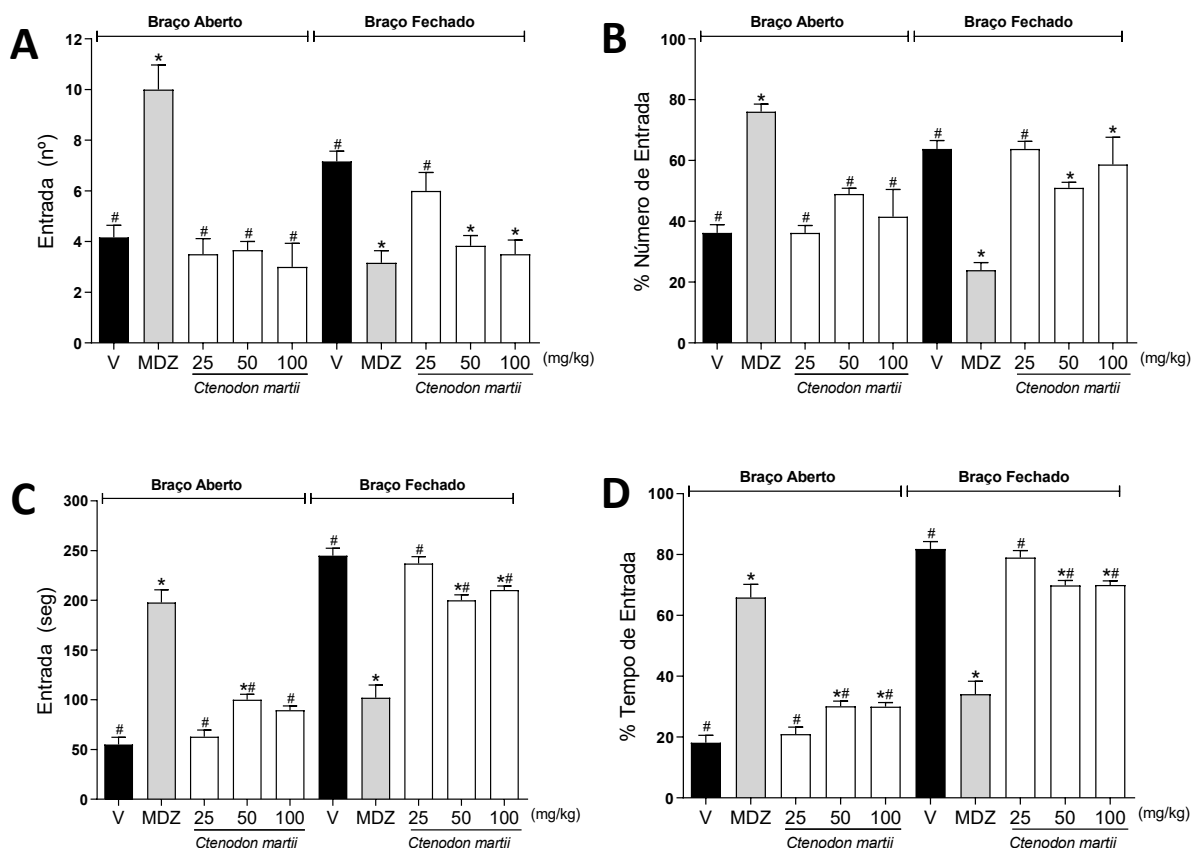


Figura 26: O efeito da administração subcutânea do extrato etanólico do caule/casca de *Ctenodon martii* nas doses (25, 50 e 100 mg/kg s.c.), midazolam (MDZ, 1,0 mg/kg i.p.) e veículo (V, etanol 10%, v/v s.c.) em ratos machos *Wistar* submetidos ao labirinto em cruz elevado por 5 minutos. Os valores dos grupos (V, MDZ e Extrato) representam a Média  $\pm$  D.P. ANOVA One-Way, seguida do teste de múltipla comparação de Bonferroni. Sendo que (\*) representa a diferença entre o veículo e os outros grupos ( $p < 0,05$ ). (#) representa a diferença entre Midazolam e os outros grupos  $p < 0,05$ . Legenda: (A) nº Entrada braço aberto e fechado, (B) % Número de entrada braço aberto e fechado, (C) Tempo segundos de entrada braço aberto e fechado, (D) % Tempo de entrada braço aberto e fechado.

Os resultados na Figura 26 – A demonstram o número de entrada nos braços aberto e fechado, onde o grupo MDZ teve maior número de entradas no braço aberto e menor no braço fechado ( $p < 0,05$ ). No braço aberto, não houve diferença

estatística entre o grupo V e todas as doses do extrato etanólico testada, mas houve diferença entre todas as doses do extrato e o grupo MDZ ( $p < 0,05$ ). No braço fechado, houve diferença estatística entre V e as doses do extrato 50 e 100 mg/kg, e entre MDZ e 25 mg/kg do extrato ( $p < 0,05$ ).

Os resultados na Figura 26 – B, demonstram o número de entrada nos braços aberto e fechado, onde o grupo MDZ teve maior porcentagem de entradas no braço aberto e menor no braço fechado ( $p < 0,05$ ). No braço aberto, não houve diferença estatística entre o grupo V e todas as doses do extrato etanólico testada ( $p > 0,05$ ), mas houve entre todas as doses do extrato e o grupo MDZ ( $p < 0,05$ ). No braço fechado, houve diferença estatística entre V e as doses do extrato 50 e 100 mg/kg, e entre MDZ e o extrato 25 mg/kg ( $p < 0,05$ ).

Os resultados na Figura 26 – C, demonstram o tempo em segundos de entrada nos braços aberto e fechado, onde o grupo MDZ teve maior porcentagem de entradas no braço aberto e menor porcentagem no braço fechado em relação ao grupo V ( $p < 0,05$ ). No braço aberto, houve diferença estatística entre o grupo V e a dose 50 mg/kg do extrato etanólico ( $p < 0,05$ ). Também houve redução do tempo de entrada entre todas as doses do extrato 25, 50 e 100 mg/kg comparado com o grupo MDZ no braço aberto e fechado ( $p < 0,05$ ). No braço fechado, houve redução do tempo de entrada entre V e as doses do extrato 50 e 100 mg/kg ( $p < 0,05$ ).

Os resultados na Figura 26 – D demonstram a porcentagem de tempo de entrada nos braços aberto e fechado, onde o grupo MDZ teve maior porcentagem de entradas no braço aberto e menor no braço fechado ( $p < 0,05$ ). No braço aberto, houve maior porcentagem de tempo de entrada entre o grupo V e as doses de 50 e 100 mg/kg do extrato etanólico, e redução entre todas as doses do extrato (25, 50 e 100 mg/kg) comparado com o grupo MDZ ( $p < 0,05$ ). No braço fechado, houve redução da porcentagem entre V e as doses do extrato 50 e 100 mg/kg, e entre MDZ e todas as doses do extrato testadas (25, 50 e 100 mg/kg) ( $p < 0,05$ ).

#### **5.2.4.2 Análise Etológica**

Os resultados observados (Tabela 8) apontam diferença estatística entre as variáveis etológicas de I - Exploração das extremidades dos braços aberto, II - Espreitamento a cabeça sai do braço fechado, III - Movimento descendente de cabeça, IV - Postura de alongamento, V - Eventos de autolimpeza e VI - Episódio de congelamento, VII- Ocorrência em Urinar, VIII – Ocorrência em Defecar e IX – Queda do labirinto.

O extrato etanólico na dose de 25mg/kg houve redução em relação ao grupo veículo nas variáveis II, III e V ( $p < 0,05$ ), e diferenças estatísticas de redução ou aumento em comparação ao grupo MDZ nas variáveis I, III e IV ( $p < 0,05$ ).

O extrato etanólico na dose de 50 mg/kg mostrou redução em relação ao grupo veículo nas variáveis III e V ( $p < 0,05$ ), e diferenças estatísticas de redução ou aumento em comparação ao grupo MDZ nas variáveis I, II, III, IV, V e VI ( $p < 0,05$ ).

E o extrato etanólico na dose de 100 mg/kg mostrou diferenças estatísticas de redução ou aumento em relação ao grupo veículo nas variáveis I, II e V, e em comparação ao grupo MDZ nas variáveis I, III, IV e VI ( $p < 0,05$ ).

Nas variáveis analisadas VII - Ocorrência em urinar, VIII - Ocorrência em defecação e IX - Queda do labirinto não houveram diferenças estatísticas na comparação entre os grupos Veículo, MDZ e extrato nas diferentes doses testadas ( $p < 0,05$ ).

**Tabela 8** – Análises dos parâmetros etológicos sobre o comportamento de ratos machos tratados com extrato etanólico do caule/casca de *Ctenodon martii* nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg.

Variáveis etológicas enumeradas de I à IX. Os valores dos grupos (veículo, midazolam e extrato) representam a Média  $\pm$  D.P. ANOVA

VARIÁVEL ETOLÓGICA	Grupos de ratos <i>Wistar</i> Machos				
	Veículo (Etanol 10%)	Midazolam (1,0 mg/kg)	Extrato etanólico do caule/casca de <i>Ctenodon martii</i>		
			25 mg/Kg	50 mg/Kg	100 mg/Kg
Quantidade (n°)					
I - Exploração das extremidades dos braços aberto	4,16 $\pm$ 3,43 <sup>#</sup>	46,33 $\pm$ 4,76*	5,16 $\pm$ 1,16 <sup>#</sup>	8,00 $\pm$ 1,78 <sup>#</sup>	36,33 $\pm$ 4,76 <sup>#</sup>
II - Espreitamento a cabeça sai do braço fechado	10,83 $\pm$ 3,12 <sup>#</sup>	3,33 $\pm$ 1,21*	6,66 $\pm$ 1,21*	8,00 $\pm$ 2,28 <sup>#</sup>	5,00 $\pm$ 1,41*
III - Movimento descendente de cabeça	16,50 $\pm$ 1,04 <sup>#</sup>	6,83 $\pm$ 1,60*	12,17 $\pm$ 1,16 <sup>#</sup>	11,33 $\pm$ 2,33 <sup>#</sup>	15,83 $\pm$ 3,65 <sup>#</sup>
IV - Postura de alongamento	14,17 $\pm$ 1,72 <sup>#</sup>	22,33 $\pm$ 2,80*	12,83 $\pm$ 2,31 <sup>#</sup>	9,50 $\pm$ 2,42 <sup>#</sup>	15,80 $\pm$ 3,70 <sup>#</sup>
V - Eventos de autolimpeza	13,67 $\pm$ 2,06 <sup>#</sup>	7,33 $\pm$ 1,21*	9,00 $\pm$ 1,41*	10,33 $\pm$ 1,63 <sup>#</sup>	6,50 $\pm$ 1,64*
VI - Episódio de congelamento	2,66 $\pm$ 1,03 <sup>#</sup>	6,83 $\pm$ 0,75*	2,66 $\pm$ 0,81 <sup>#</sup>	3,33 $\pm$ 1,03 <sup>#</sup>	3,16 $\pm$ 0,98 <sup>#</sup>
VII - Ocorrência em urinar	1,66 $\pm$ 0,51	1,16 $\pm$ 0,40	1,50 $\pm$ 0,54	1,33 $\pm$ 0,51	1,16 $\pm$ 0,40
VIII - Ocorrência em defecação	1,00 $\pm$ 0,00	0,83 $\pm$ 0,40	1,00 $\pm$ 0,00	1,00 $\pm$ 0,00	1,00 $\pm$ 0,00
IX - Queda do labirinto	0,33 $\pm$ 0,51	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00

One-Way, seguida do teste de múltipla comparação de Bonferroni. Sendo que (\*) representa a diferença entre o veículo e os outros grupos  $p < 0,05$ . (#) representa a diferença entre Midazolam e os outros grupos  $p < 0,05$ . **Fonte:** Dados da pesquisa.

## 5.2.5 Avaliação Toxicológica Aguda e Teste de Letalidade (DL<sub>50</sub>)

### 5.2.5.1 Triagem farmacológica comportamental e toxicidade aguda

A avaliação da toxicidade aguda foi realizada utilizando o modelo animal de toxicidade DL<sub>50</sub> pela administração subcutânea, em dose única, do extrato etanólico do caule/casca *C. martii* nas doses de 5, 50, 300 e 2000 mg/Kg, e do veículo (etanol 10%). Os animais pertencentes ao grupo controle não receberam nenhum tipo de tratamento.

A observação comportamental ocorreu durante os 30 minutos, 1, 2, 4, 8, 12 e 24 horas, após a administração das doses. Não foram observados nenhum sinal de toxicidade de acordo avaliação do “*Screening Hipocrático*” (Apêndice B), mostrando-se efeito inócuos para a toxicidade em machos e fêmeas. Nenhum óbito foi apresentado nos grupos tratados entre machos e fêmeas (Tabela 9).

**Tabela 9** – Toxicidade aguda comparativa obtida de ratos *Wistar* machos e fêmeas, tratados com o extrato etanólico do caule/casca *Ctenodon martii* de acordo com o número de óbitos e os sintomas de toxicidade apresentados.

Sexo	Grupos	Morte / número de animais no grupo	Sintoma de toxicidade
<b>Machos</b>	Controle	00/06	Nenhum
	Veículo	00/06	Nenhum
	<i>C. martii</i> 5 mg/Kg	00/06	Nenhum
	<i>C. martii</i> 50 mg/Kg	00/06	Nenhum
	<i>C. martii</i> 300 mg/Kg	00/06	Nenhum
	<i>C. martii</i> 2000 mg/Kg	00/06	Nenhum
<b>Fêmeas</b>	Controle	00/06	Nenhum
	Veículo	00/06	Nenhum
	<i>C. martii</i> 5 mg/Kg	00/06	Nenhum
	<i>C. martii</i> 50 mg/Kg	00/06	Nenhum
	<i>C. martii</i> 300 mg/Kg	00/06	Nenhum
	<i>C. martii</i> 2000 mg/Kg	00/06	Nenhum

Toxicidade aguda comparativa obtida de ratos *Wistar* machos e fêmeas, tratados de forma aguda por via subcutânea com o veículo (etanol 10%, v/v,  $n = 06$ ) e com o extrato etanólico do caule/casca de *Ctenodon martii* nas doses de 5 mg/kg ( $n = 06$ ), 50 mg/kg ( $n = 06$ ), 300 mg/kg ( $n = 06$ ) e 2000 mg/kg ( $n = 06$ ) de acordo com o número de óbitos. Os grupos Controle ( $n = 06$ ) não receberam nenhum tipo de tratamento. Os sintomas de toxicidade foram avaliados de acordo com o “*Screening Hipocrático*”, foram observados os parâmetros: estado de consciência e disposição; coordenação motora; tônus musculares; reflexos; atividade do Sistema Nervoso Central; e atividade do Sistema Nervoso Autônomo. Fonte: Dados da pesquisa.

### 5.2.5.2 Análise dos parâmetros hematológicos e bioquímicos

Os resultados das análises dos parâmetros hematológicos do sangue obtidos dos animais submetidos ao experimento estão representados por sexo nas Tabelas 10 e 11. Entre os animais dos grupos controle e veículo (etanol 10%) não foram observadas alterações significativas, tanto para machos quanto para fêmeas ( $p > 0,05$ ). No grupo de machos (Tabela 10), tratados com as diferentes doses do extrato etanólico do caule/casca de *C. martii* (5, 50, 300 e 2000 mg/kg), foi observado uma discreta redução na quantidade de CHCM (hemoglobina corpuscular média) na dose de 300 mg/kg e redução de hemácias e plaquetas nas doses de 2000 mg/kg em comparação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ). No grupo de fêmeas (Tabela 11), tratados com as mesmas doses do extrato etanólico do que os machos, foi observado uma pequena redução na quantidade da RDW-CV (Amplitude de Distribuição dos Eritrócitos medido como Coeficiente de Variação) nas doses de 5 e 50 mg/kg do extrato em comparação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ).

Os resultados das análises de alguns parâmetros bioquímicos do sangue obtido dos animais submetidos ao experimento estão representados nas Tabelas 12 e 13. Entre os animais dos grupos controle e veículo (etanol 10%) não foram observadas alterações significativas, tanto para machos quanto para fêmeas ( $p > 0,05$ ). No grupo de machos, tratados com as diferentes doses do extrato etanólico do caule/casca de *C. martii*, foi observado uma discreta redução nos níveis de Albumina na dose de 2000 mg/kg em comparação ao grupo controle ( $p < 0,05$ ).



**Tabela 10** - Efeito da administração subcutânea com dose única do extrato etanólico do caule/casca de *Ctenodon martii* sobre alguns parâmetros hematológicos de ratos *Wistar* machos.

Parâmetros hematológicos (Unid.)	Controle	Veículo (Etanol 10%)	Grupos de ratos <i>Wistar</i> Machos			
			Extrato etanólico do caule/casca de <i>Ctenodon martii</i>			
			5 mg/Kg	50 mg/Kg	300 mg/Kg	2000 mg/Kg
Hemácias ( $10^6/\text{mm}^3$ )	8,66 ± 0,54	8,31 ± 0,28	8,09 ± 0,50	8,06 ± 0,34	7,91 ± 0,60	7,83 ± 0,37*
Hemoglobina (g/dL)	15,68 ± 0,79	14,62 ± 0,29	14,74 ± 1,02	14,42 ± 1,22	14,46 ± 1,13	14,32 ± 0,71
Plaquetas ( $10^3/\text{mm}^3$ )	1024 ± 170,0	871,0 ± 131,8	882,2 ± 76,31	867,6 ± 31,11	854,4 ± 82,35	742,8 ± 84,69*
Hematócrito (%)	46,98 ± 0,98	46,42 ± 1,03	44,62 ± 1,51	44,56 ± 1,65	44,54 ± 1,66	44,76 ± 1,60
VCM (fl)	56,78 ± 1,05	56,32 ± 1,34	56,90 ± 1,42	55,24 ± 0,75	58,44 ± 0,90	57,12 ± 1,16
HCM (Pg)	18,10 ± 0,58	17,58 ± 0,56	17,82 ± 0,54	17,62 ± 1,35	17,90 ± 0,45	18,28 ± 0,67
CHCM (g/dL)	31,90 ± 0,68	31,20 ± 0,42	31,34 ± 0,66	30,94 ± 1,14	30,66 ± 0,48*	31,96 ± 0,70
RDW-SD (fL)	31,68 ± 1,31	30,92 ± 0,97	31,46 ± 0,72	30,34 ± 0,70	32,76 ± 1,30	31,16 ± 0,57
RDW-CV (%)	14,76 ± 1,15	13,96 ± 0,29	14,04 ± 0,45	14,26 ± 0,62	15,06 ± 0,59	14,00 ± 0,30
Leucócitos ( $10^3/\text{mm}^3$ )	12,56 ± 3,09	15,18 ± 2,19	12,08 ± 3,57	15,98 ± 1,04	14,26 ± 2,51	15,18 ± 1,82
Linfócitos (%)	63,58 ± 8,06	63,38 ± 8,45	71,44 ± 2,07	63,02 ± 7,00	70,78 ± 4,06	68,28 ± 2,78
Neutrófilos (%)	25,20 ± 7,72	26,20 ± 4,55	20,80 ± 2,58	23,00 ± 3,67	21,00 ± 4,63	18,20 ± 4,55
Monócitos (%)	4,80 ± 0,83	3,40 ± 1,14	3,60 ± 1,14	3,60 ± 1,14	4,40 ± 1,14	3,20 ± 1,30
Eosinófilos (%)	1,60 ± 1,14	1,40 ± 1,14	2,00 ± 1,00	1,80 ± 1,48	0,80 ± 0,83	1,20 ± 0,83

Parâmetros hematológicos obtidos do soro de ratos *Wistar* machos, tratados de forma aguda por via subcutânea com veículo (n= 06) e com extrato etanólico do caule/casca de *Ctenodon martii* nas doses 5 mg/kg (n= 06), 50 mg/kg (n= 06), 300 mg/kg (n= 06), 2000 mg/kg (n= 06). O grupo Controle (n= 06) não recebeu nenhum tipo de tratamento. Os valores representam a Média ± DP. VCM (volume corpuscular médio); HCM (hemoglobina corpuscular média); CHCM (hemoglobina corpuscular média); RDW-CV (Amplitude de Distribuição dos Eritrócitos medido como Coeficiente de Variação) e RDW-SD (o mesmo sendo medido como Desvio Padrão). One-Way ANOVA seguido do pós-teste Dunnett's em comparação com o controle. \*Representa a diferença entre o grupo tratado e o grupo controle p < 0,05.

**Fonte:** Dados da pesquisa.

**Tabela 11** - Efeito da administração subcutânea com dose única do extrato etanólico do caule/casca de *Ctenodon martii* sobre alguns parâmetros hematológicos de ratos *Wistar* fêmeas.

Parâmetros hematológicos (Unid.)	Controle	Veículo (Etanol 10%)	Grupos de ratos <i>Wistar</i> Fêmeas			
			Extrato etanólico do caule/casca de <i>Ctenodon martii</i>			
			5 mg/Kg	50 mg/Kg	300 mg/Kg	2000 mg/Kg
Hemácias ( $10^6/\text{mm}^3$ )	8,01 $\pm$ 0,54	8,24 $\pm$ 0,33	7,49 $\pm$ 0,48	7,59 $\pm$ 0,47	7,47 $\pm$ 0,38	7,63 $\pm$ 0,24
Hemoglobina (g/dL)	14,56 $\pm$ 0,47	14,44 $\pm$ 0,45	13,64 $\pm$ 0,74	13,68 $\pm$ 0,66	13,66 $\pm$ 0,99	14,24 $\pm$ 0,19
Plaquetas ( $10^3/\text{mm}^3$ )	977,4 $\pm$ 128,0	876,8 $\pm$ 53,22	930,2 $\pm$ 74,40	891,0 $\pm$ 120,8	911,0 $\pm$ 129,4	961,6 $\pm$ 159,0
Hematócrito (%)	45,50 $\pm$ 2,74	45,88 $\pm$ 1,56	43,12 $\pm$ 2,23	42,60 $\pm$ 0,68	43,18 $\pm$ 1,45	43,48 $\pm$ 0,32
VCM (fl)	56,82 $\pm$ 1,14	55,70 $\pm$ 1,08	58,22 $\pm$ 1,03	56,86 $\pm$ 0,97	57,12 $\pm$ 1,06	57,00 $\pm$ 1,85
HCM (Pg)	18,20 $\pm$ 0,89	17,54 $\pm$ 0,58	18,62 $\pm$ 0,79	17,98 $\pm$ 0,52	17,92 $\pm$ 0,68	18,66 $\pm$ 0,48
CHCM (g/dL)	33,04 $\pm$ 1,11	31,50 $\pm$ 0,51	32,02 $\pm$ 0,85	31,62 $\pm$ 0,54	31,38 $\pm$ 0,76	32,76 $\pm$ 0,51
RDW-SD (fL)	29,58 $\pm$ 1,23	28,76 $\pm$ 0,55	28,46 $\pm$ 0,58	28,50 $\pm$ 0,55	29,74 $\pm$ 0,85	29,78 $\pm$ 0,37
RDW-CV (%)	12,78 $\pm$ 1,05	12,54 $\pm$ 0,64	11,50 $\pm$ 0,64*	11,50 $\pm$ 0,41*	12,56 $\pm$ 0,66	12,96 $\pm$ 0,80
Leucócitos ( $10^3/\text{mm}^3$ )	13,00 $\pm$ 3,11	13,64 $\pm$ 0,90	7,64 $\pm$ 3,16	12,00 $\pm$ 4,85	8,52 $\pm$ 4,84	8,72 $\pm$ 1,02
Linfócitos (%)	71,80 $\pm$ 8,75	69,60 $\pm$ 4,61	74,00 $\pm$ 3,67	71,80 $\pm$ 4,32	75,20 $\pm$ 3,56	73,60 $\pm$ 4,39
Neutrófilos (%)	24,80 $\pm$ 2,38	25,80 $\pm$ 4,08	20,80 $\pm$ 5,67	23,80 $\pm$ 5,26	18,80 $\pm$ 4,71	22,60 $\pm$ 6,80
Monócitos (%)	4,60 $\pm$ 2,58	3,60 $\pm$ 0,89	2,40 $\pm$ 1,14	3,20 $\pm$ 1,30	3,20 $\pm$ 2,16	2,20 $\pm$ 1,30
Eosinófilos (%)	2,20 $\pm$ 1,30	1,00 $\pm$ 0,70	0,80 $\pm$ 0,83	1,20 $\pm$ 0,83	0,80 $\pm$ 0,83	1,20 $\pm$ 0,83

Parâmetros hematológicos obtidos do soro de ratos *Wistar* fêmeas, tratados de forma aguda por via subcutânea com veículo (n= 06) e com extrato etanólico do caule/casca de *Ctenodon martii* nas doses 5 mg/kg (n= 06), 50 mg/kg (n= 06), 300 mg/kg (n= 06), 2000 mg/kg (n= 06). O grupo Controle (n= 06) não recebeu nenhum tipo de tratamento. Os valores representam a Média  $\pm$  DP. VCM (volume corpuscular médio); HCM (hemoglobina corpuscular média); CHCM (hemoglobina corpuscular média); RDW-CV (Amplitude de Distribuição dos Eritrócitos medido como Coeficiente de Variação) e RDW-SD (o mesmo sendo medido como Desvio Padrão). One-Way ANOVA seguido do pós-teste Dunnett's em comparação com o controle. \*Representa a diferença entre o grupo tratado e o grupo controle p < 0,05.

**Fonte:** Dados da pesquisa.

**Tabela 12-** Efeito da administração subcutânea com dose única do extrato etanólico do caule/casca de *Ctenodon martii* sobre alguns parâmetros bioquímicos de ratos *Wistar* machos.

Parâmetros (Unidade)	Controle	Veículo (Etanol 10%)	Grupos de ratos <i>Wistar</i> Machos			
			Extrato etanólico do caule/casca de <i>Ctenodon martii</i>			
			5 mg/Kg	50 mg/Kg	300mg/Kg	2000mg/Kg
Creatinina (mg/dL)	0,73 ± 0,03	0,69 ± 0,05	0,67 ± 0,03	0,71 ± 0,04	0,68 ± 0,05	0,76 ± 0,07
Albumina (mg/dL)	3,59 ± 0,21	3,40 ± 0,37	3,32 ± 0,20	3,34 ± 0,13	3,46 ± 0,25	3,24 ± 0,27*
AST - TGO (U/L)	4,17 ± 0,16	4,08 ± 0,30	4,01 ± 0,43	3,83 ± 0,57	3,77 ± 0,12	4,22 ± 0,44
ALT - TGP (U/L)	2,93 ± 0,09	2,77 ± 0,62	2,63 ± 0,18	2,60 ± 0,43	2,56 ± 0,15	3,02 ± 0,30

Alguns parâmetros bioquímicos obtidos do soro de ratos *Wistar* machos, tratados de forma aguda por via subcutânea com veículo (n= 05) e com extrato etanólico do caule/casca de *Ctenodon martii* nas doses 5 mg/kg (n= 05), 50 mg/kg (n= 05), 300 mg/kg (n= 05), 2000 mg/kg (n= 05). O grupo Controle (n = 05) não recebeu nenhum tipo de tratamento. Os valores dos grupos (controle, veículo e tratados) representam a Média ± D.P1 ANOVA One-Way, seguida do teste de Dunnet. \*Representa a diferença entre o grupo tratado e o grupo controle p < 0,05. TGO: Transaminase Glutâmico Oxalacética; TGP: Transaminase Glutâmico Pirúvica.

Fonte: Dados da pesquisa.

**Tabela 13-** Efeito da administração subcutânea com dose única do extrato etanólico do caule/casca de *Ctenodon martii* sobre alguns parâmetros bioquímicos de ratas *Wistar* fêmeas.

Parâmetros (Unidade)	Controle	Veículo (Etanol 10%)	Grupos de ratos <i>Wistar</i> Fêmeas			
			Extrato etanólico do caule/casca de <i>Ctenodon martii</i>			
			5 mg/Kg	50 mg/Kg	300mg/Kg	2000mg/Kg
Creatinina (mg/dL)	0,49 ± 0,11	0,51 ± 0,07	0,44 ± 0,05	0,55 ± 0,08	0,42 ± 0,08	0,58 ± 0,04
Albumina (mg/dL)	3,22 ± 0,29	3,46 ± 0,30	3,14 ± 0,37	3,01 ± 0,14	3,56 ± 0,12	2,99 ± 0,14
AST - TGO (U/L)	4,41 ± 0,18	4,32 ± 0,70	4,35 ± 0,33	4,28 ± 0,36	4,72 ± 0,34	4,62 ± 0,28
ALT - TGP (U/L)	3,16 ± 0,12	3,31 ± 0,29	3,36 ± 0,42	3,32 ± 0,33	3,52 ± 0,29	3,37 ± 0,26

Alguns parâmetros bioquímicos obtidos do soro de ratas *Wistar* fêmeas, tratados de forma aguda por via subcutânea com veículo (n= 06) e com extrato etanólico do caule/casca de *Ctenodon martii* nas doses 5 mg/kg (n= 5), 50 mg/kg (n= 5), 300 mg/kg (n= 5), 2000 mg/kg (n= 5). O grupo Controle (n = 05) não recebeu nenhum tipo de tratamento. Os valores dos grupos (controle, veículo e tratados) representam a Média ± D.P1 ANOVA One-Way, seguida do teste de Dunnet. \*Representa a diferença entre o grupo tratado e o grupo controle p < 0,05. TGO: Transaminase Glutâmico Oxalacética; TGP: Transaminase Glutâmico Pirúvica.

Fonte: Dados da pesquisa.

## 6. DISCUSSÃO

Os produtos naturais são utilizados pela humanidade desde tempos imemoriais. A busca por alívio e cura de doenças pela ingestão de ervas e folhas talvez tenha sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais (Ferreira *et al.*, 2020). Assim, as plantas medicinais possuem recursos essenciais para formulação de novos medicamentos, sendo fonte valiosa para produtos fitoterápicos voltados aos cuidados em saúde e/ou terapia de doenças (Guo *et al.*, 2023).

Seus metabólitos secundários podem apresentar atividade biológica de ação farmacológica única e com alto valor agregado. No entanto, o desenvolvimento de plantas medicinais é limitado por recursos naturais e por uma compreensão pouco clara dos mecanismos subjacentes aos compostos ativos, tornando assim a utilização e exploração de metabólitos secundários mais desafiador (Zhaogao *et al.*, 2023).

O interesse na pesquisa por plantas medicinais está aumentando em todo o mundo, com pesquisas voltadas a biossíntese e metabolismo molecular, métodos de estudo da atividade biológica e seus efeitos farmacológicos, avançando tanto na investigação básica como no desenvolvimento de aplicações clínicas (Zhaogao *et al.*, 2023). Contudo, os mecanismos de ação relacionados ao uso tradicional de fitoterápicos como agentes imunomoduladores ainda permanecem relativamente desconhecidos, além da segurança e eficácia (Khumalo *et al.*, 2023).

Globalmente, a maioria dos medicamentos podem ser atribuídos a substâncias naturais. Mais de 60% dos medicamentos comercializados são derivados de produtos naturais, que podem ser utilizados em mais de 50% dos tratamentos clínicos (Chopra; Dhingra, 2021). Entre estes, os produtos naturais de origem vegetal são uma das fontes mais importantes, representando aproximadamente 25% (Sirirungruang *et al.*, 2022).

Neste contexto, a avaliação do potencial da atividade biológica de *Ctenodon martii* do semiárido da Bahia, é de grande interesse científico, ambiental, tecnológico e econômico. Para tanto, foram realizados estudos do extrato etanólico, frações e subfrações preparados a partir do caule/casca da espécie, após coletada na Floresta

Nacional Contendas do Sincorá, objetivando novas fontes para a prevenção e tratamento de doenças.

As classes de metabólitos secundários foram investigadas a partir das análises fitoquímicas com a aplicação de testes analíticos padrões que detectaram as presenças de polifenóis, flavonoides, saponinas, taninos, esteroides e alcaloides do extrato etanólico, fração de diclorometano e sua subfração (D2), da *C. martii*. Em continuidade, as prospecções fitoquímicas e análises por CG-EM, identificaram substâncias pertencentes aos ácidos graxos, terpenos, flavonas, esteroides e ácidos hidroxicinâmicos.

Vários lipídios são importantes reguladores da imunidade e da inflamação, a reação entre ácido graxo e glicerol dá origem ao lipídio. Os ácidos graxos têm sido abordados em estudos como uma causa provável para incidência de patologias inflamatórias, uma vez que os eicosanoides sintetizados a partir deles são agentes pró-inflamatórios (Li *et al.*, 2024).

Por outro lado, estudos mostraram que os precursores de eicosanoides têm atividades anti-inflamatórias e antinociceptivas (Cerqueira, 2017; Neves *et al.*, 2022), assim como usado no tratamento de artrite reumatoide (Asif, 2014), na asma caracterizada pela inflamação crônica das vias aéreas (Sewell *et al.*, 2015), no câncer com efeitos anti-proliferativos (Stephenson *et al.*, 2013; Xia *et al.*, 2006), nos processos inflamatórios da obesidade (Simopoulos, 2010) e na síndrome de resposta inflamatória sistêmica por sepse (Seki *et al.*, 2010).

O glicerol foi identificado em quantidades expressivas pelo CG-EM nas subfrações de diclorometano (Tabela 4). Estudo revela que a presença do glicerol frequentemente usado em extratos de imunoterapia com alérgenos, não está associado ao aumento de reações locais, dor ou eritema (Coop *et al.*, 2019).

Os esteróis vegetais, ou fitoesteróis, tem estruturas químicas semelhantes ao colesterol (CHOL) encontrado em lipídios animais e desempenham uma função celular semelhante ao CHOL no corpo humano (Li *et al.*, 2024). Apresentando várias funções fisiológicas de efeitos benéficos sobre variáveis não lipídicas (Nattagh-Eshtivani *et al.*, 2022; R. Zhang *et al.*, 2022), como marcadores de estresse inflamatório e oxidativo, parâmetros de coagulação e função endotelial (Li *et al.*, 2024; Sinaga *et al.*, 2013; Vilahur *et al.*, 2019).

Outros estudos torna os esteróis uma alternativa atraente para intervenções voltado a diversas doenças por observar, atividade antioxidante (Seki *et al.*, 2010), antibacterianas (Copetti, 2016; Pan *et al.*, 2009), inibe a oxidação e a inflamação na lesão hepática (Yin *et al.*, 2018), possui atividades antimetastática avaliada *in vitro* (Debele *et al.*, 2017), tem atividade anti-inflamatória (Vilahur *et al.*, 2019), reduz inflamação pulmonar crônica (Yuk *et al.*, 2007) e das vias aéreas induzida pela ovoalbumina (Mahajan; Mehta, 2011), além de demonstrar atividade analgésica (Yadav *et al.*, 2022).

Além das classes de esteroides inibir os efeitos oxidativos celulares pela sua interação com ácidos graxos (Xu *et al.*, 2011), possuir potente atividade antioxidante, ter efeitos protetores contra sintomas psicóticos induzidos por cetamina e nas alterações comportamentais, bioquímicas e histopatológicas (Yadav *et al.*, 2018) e inibir respostas imunes inatas induzidas por lipopolissacarídeos (LPS) em modelos *in vivo* (Antwi *et al.*, 2017).

Um outro importante metabolito secundário observado em *C. martii* são as flavonas. Muitos flavonoides apresentam inúmeras propriedades farmacológicas, entre elas atividade anti-inflamatória devido a inibição das enzimas envolvidas no metabolismo final do ácido araquidônico (Nagem, 2002).

Algumas subclasse de flavonóides, podem atuar como um potente agente anticancerígeno ao inibir o crescimento de células cancerosas e/ou levar à apoptose por modulação de funções mitocondriais reguladas por espécies reativas de oxigênio (Li *et al.*, 2017; Pan *et al.*, 2007). Muitos resultados experimentais mostraram que as flavonas modulam as vias de transdução de sinal na carcinogênese ao controlar a progressão do ciclo celular, o estresse oxidativo, a angiogênese e as metástases, juntamente com algumas vias moleculares que, em última análise, previnem a progressão da doença (Khan *et al.*, 2021).

Os flavonóides são potenciais agentes antibacterianos contra *Escherichia coli* (Fang *et al.*, 2016). Os mecanismos antibacterianos como inibição da síntese de ácidos nucleicos, do metabolismo energético, da ligação e formação de biofilme, alteração da permeabilidade da membrana, leva atenuação da patogenicidade (Xie *et al.*, 2014). Atua inibindo a produção de NO induzida por LPS modulando a expressão de iNOS através da supressão da atividade de NF- $\kappa$ B (Kang *et al.*, 2013), e de enzimas reguladoras ou fatores de transcrição importantes para controlar

mediadores envolvidos na inflamação (Maleki *et al.*, 2019). Além de apresentar atividade anti-inflamatória pela redução na síntese e ativação de NF- $\kappa$ B induzido por LPS, consequentemente explicado pela baixa produção das citocinas inflamatórias TNF- $\alpha$  e IL-1 $\alpha$ , no mesmo estudo (Molčanová *et al.*, 2022).

Os terpenos são a maior classe de metabólitos secundários derivados de plantas e são classificados com base no número de unidades de isopreno em sua estrutura (Carvalho *et al.*, 2019). Com variação estrutural significativa, incluindo hidrocarbonetos lineares ou esqueletos carbocíclicos. (Ninkuu *et al.*, 2021). Sua diversidade estrutural é rica devido ao grande número de combinações possíveis (Ninkuu *et al.*, 2021; Rodríguez; Johnson, 2023). Os medicamentos derivados de terpenos mais populares incluem o diterpeno anticâncer paclitaxel e o sesquiterpeno antimalárico artemisinina (Rodríguez; Johnson, 2023).

As propriedades anti-inflamatórias dos terpenos frente a uma infecção viral, foram demonstradas através da inibição significativa das citocinas IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-8 (Chatow *et al.*, 2024). Na doença inflamatória os terpenos modularam os níveis de citocina pró-inflamatória interleucina 8 (IL-8) e suprime a ativação NF- $\kappa$ B sendo este fator de transcrição pró-inflamatório (Rodríguez; Johnson, 2023). Sobre atividade antiartrítica apresenta modulação de mediadores inflamatórios importantes para a fisiopatologia da artrite, como IL-6, IL-17, TNF- $\alpha$ , NF- $\kappa$ B e COX-2 (Carvalho *et al.*, 2019).

Estudos relataram a eficácia dos terpenos no controle e tratamento de diversas doenças utilizando modelos animais, apresentando atividade promissora no tratamento do câncer (Huang *et al.*, 2012), dor neuropática (Lv *et al.*, 2017; Piccinelli *et al.*, 2015) e doenças de origem inflamatória (Dutra *et al.*, 2012; Quintão *et al.*, 2014).

Os compostos fenólicos são substâncias amplamente distribuídas na natureza. Caracterizam-se por terem um anel benzênico, um grupamento carboxílico e um ou mais grupos hidroxila e/ou metoxila na molécula, conferindo propriedades antioxidantes para os alimentos (Silva *et al.*, 2010). Esta classe de compostos apresenta uma grande diversidade e divide-se em flavonoides e não-flavonoides. Entre os não-flavonoides destacam-se os ácidos hidroxicinâmicos (AH), sendo potentes antioxidantes, capazes de influenciar positivamente o processo inflamatório (Lee, 2015; Silva *et al.*, 2010).

Os fenóis (AH) estão associados principalmente por suas propriedades antioxidantes (Pandey *et al.*, 2024), podendo proteger os principais componentes celulares dos danos reativos dos radicais livres, o que se deve principalmente à sua propriedade de ativar enzimas antioxidantes diminuindo o estresse oxidativo e a inflamação (Huang *et al.*, 2023). Também pode inibir ou isolar espécies reativas de oxigênio e transferir elétrons para radicais livres, evitando assim danos celulares (W. Liu *et al.*, 2023).

Podendo modular a produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$  e interleucina-6 (IL-6) (Chlif *et al.*, 2022), os ácidos hidroxicinâmicos apresenta propriedades anti-inflamatórias, analgésicas e antipiréticas, por inibir atividade de enzimas da ciclo-oxigenase (COX) e a lipoxigenase (LOX), estando envolvidas na síntese de mediadores inflamatórios, como as prostaglandinas E2 (PGE2) (Chlif *et al.*, 2022; Mazumder *et al.*, 2022). Inibe a ativação do fator nuclear kappa B (NF- $\kappa$ B) reduzindo processos inflamatórios crônico (Huang *et al.*, 2023), tem reduzindo grandes quantidades de mediadores pró-inflamatórios, que aumentam a (PGE2) (Arruda *et al.*, 2022; W. Liu *et al.*, 2023).

Assim os metabólitos secundários *C. martii*, podem desempenhar uma infinidade de funções para dar ao organismo vantagens evolutiva em sua sobrevivência. Nos resultados das prospecções fitoquímicas através do CG-EM os compostos não identificados, podem ser considerados também como promissores, uma vez que a significância que serão percorridos abaixo podem estar atrelados a sua atividade. Desta forma, técnicas futuramente poderão ser empregadas, visando à identificação desses grupos funcionais.

Após os resultados fitoquímicos de *C. martii*, o presente estudo buscou avaliar a atividade farmacológica antinociceptiva, anti-inflamatória, cicatrizante, ansiolítica e/ou sedativo e o potencial toxicológico.

No primeiro modelo experimental de nocicepção, contorções abdominais induzidas por ácido acético avalia o potencial analgésico por meio dos efeitos no sistema nervoso central e periférico (Collier *et al.*, 1968), observando redução na atividade motora, devido aos reflexos provocado pela dor visceral (Barbosa *et al.*, 2023; Bars *et al.*, 2001). Os resultados (Figura 14), demonstraram que (D2, D3, D4, D5, D2SS.1, D2SS.2 e D2SS.3) foram capazes de reduzir a resposta nociceptiva



comportamental induzida pelo ácido acético ( $p < 0,05$ ), em comparação ao controle negativo.

O ácido acético, causa sensibilização das terminações sensoriais aferentes periféricas como resposta à liberação de citocinas pró-inflamatórias dos mastócitos e macrófagos, abertura de canais iônicos dependente da interação de vários neurotransmissores e neuromoduladores que determinam a nocicepção, o que faz esse modelo sensível às substâncias analgésicas de ação central e/ou periférica (Barbosa *et al.*, 2023; Peraza *et al.*, 2007).

A excitabilidade neuronal é alterada em resposta do ácido acético (ALVES, 2016). Alguns estudos com plantas medicinais da família Leguminosae, corroboram com nossos resultados sugerindo ação analgésica periférica e central pela interação direta dos prótons, que despolarizam neurônios sensoriais diretamente pela ativação de um canal não seletivo catiônico cutâneo, visceral e/ou fibras C aferentes periféricas (Barbosa *et al.*, 2022; Gaudio *et al.*, 2023).

A nocicepção é resultante na liberação mediadores inflamatórios pela ativação de macrófagos peritoneais, como as PGE2 e PGF2 $\alpha$  (Carrazzoni *et al.*, 2018), citocinas TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-8/CXCL8, que sensibiliza e estimular os neurônios aferentes primários resultando no aumento da liberação dos neurotransmissores excitatórios tais como o aspartato e o glutamato no fluido cérebro espinhal (Aragão *et al.*, 2017; Entire *et al.*, 2016), acrescido pela atividade dos mastócitos liberando interleucinas como, IL-4, IL-13, IL-9 e diversos mediadores (Carrazzoni *et al.*, 2018).

Assim, os mecanismos de efeitos analgésicos pode ser induzido pela diminuição da produção de prostaglandinas responsáveis pela dor (Barbosa *et al.*, 2022, 2023). Estudos destacam a ação de classes de terpenos na modulação da dor neuropática (Lv *et al.*, 2017; Piccinelli *et al.*, 2015). Em resposta antinociceptiva os terpenos podem está relacionada de forma direta ou indireta, à redução na liberação de mediadores pró-inflamatórios, conforme evidenciado por análises de expressão gênica e ensaios de ELISA. Esses processos podem atuar estimulando terminações nociceptivas ou promovendo uma modulação central na transmissão do estímulo doloroso (Barbosa *et al.*, 2022; Pandey *et al.*, 2024).

O modelo de injeção intraplantar de formalina induz uma resposta de dor bifásica sendo amplamente utilizado para avaliar os efeitos de compostos analgésicos (Carrazzoni *et al.*, 2018). A primeira fase (0-5 min após formalina)

neurogênica é geralmente atribuída a um efeito direto do estímulo sobre os neurônios nociceptivos primários que refletem dor periférica aguda, devido à ativação direta de nociceptores. A segunda fase (5-30 min após a formalina) os estímulo inflamatório são contínuo havendo sensibilização nociceptiva central, envolve o desenvolvimento subsequente de inflamação, que é associada a liberação de mediadores inflamatórios, como histamina, prostaglandinas, serotonina e bradicinina e citocinas (Carrazzoni *et al.*, 2018; Namara *et al.*, 2007).

Os resultados (Figura 15 – A e B) indica que na Fase I neurogênica (D2, D3, D2SS.2, D2SS.3 e Morfina), assim como na Fase II inflamatória (D2, D3, D4, D2SS.2, D2SS.3 e Morfina) promoveram uma redução significativa no número de “flinches” induzidas pela formalina quando comparadas ao grupo tratado com veículo ( $p < 0,05$ ), sugerindo que *C. martii* pode atuar de maneira central e periférica.

Na fase neurogênica, a nocicepção ocorre devido à sensibilização direta de nociceptores aferentes primários de fibra C (Borsook *et al.*, 2013). Ao excitar os neurônios sensoriais a formalina ativa diretamente os receptores de potencial transitório (TRPA1), que estão envolvidos na hiperalgesia durante a inflamação (López-Cano *et al.*, 2017). A ativação do TRPA1 evocada pela formalina, impulsiona a sensibilização do SNC que está subjacente à Fase II (Ping *et al.*, 2018). Portanto, os antagonistas desses canais destacam-se como potenciais terapêuticas analgésicas (Nucci-Martins *et al.*, 2016).

A fase inflamatória gera lesão tecidual causada pela formalina, que resulta na ação de mediadores inflamatórios, ou até certo ponto, pela sensibilização central dos neurônios (Bridi *et al.*, 2018). Evidências mostraram que as células da gliais na medula espinhal sensibilizam à dor inflamatória através da liberação de neuromoduladores pró-inflamatórias como (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6). A protease intracelular caspase-6 (CASP6) é expresso especificamente nos terminais axonais da fibra C, no corno dorsal superficial da medula espinhal, a qual induziu liberação acentuada de TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 na indução e manutenção da sensibilização central à dor (Berta *et al.*, 2014; Yin *et al.*, 2016). Mediante os resultados apresentados na inibição da expressão de citocinas pró-inflamatórias no ELISA (Figura 20) e qPCR (Figura 18), podemos inferir que *C. martii* pode atuar na via CASP6 / TNF- $\alpha$  e, assim, reduz os níveis de citocinas inflamatórias na medula espinhal.

Quando comparadas ao grupo morfina na Fase I (D2) e Fase II (D2, D3, D4 e D2SS.3), não apresentaram diferença estatística ( $p < 0,05$ ). Supondo ação igual ou semelhante a morfina, um analgésico opioide de ação central que em sua cascata de eventos levam ao fechamento de canais de cálcio voltagem dependente, redução na produção de monofosfato de adenosina cíclico (AMPs) e estímulo ao efluxo de potássio resultando em hiperpolarização celular, o efeito final é a redução da excitabilidade neuronal, e redução da neurotransmissão de impulsos nociceptivos (King'uyu *et al.*, 2023; Lemonica, 2008).

No teste de formalina é possível entender a atuação de drogas de primeira fase com ação central como a morfina, que inibe a nocicepção em ambas as fases igualmente. De fato, a existência dessas duas fases leva à possibilidade do estudo de diferentes fármacos analgésicos, incluindo AINEs, para decifrar o mecanismo de ação da droga ao longo do neuroeixo doloroso. Assim, os medicamentos de ação central inibem ambas as fases igualmente, enquanto os medicamentos de ação periférica inibem a segunda fase (Basbaum *et al.*, 2010; López-Cano *et al.*, 2017).

Outro possível mecanismo de ação do extrato de *C. martii* pode ser a inibição da sensibilização ou da ativação dos nociceptores. A hipernocicepção inflamatória resulta principalmente da sensibilização dos neurônios aferentes induzida pela liberação de mediadores como PGs e aminas simpatomiméticas que sensibilizam os neurônios nociceptivos periféricos (Buckle, 2015).

A aplicação de um estímulo mecânico nocivo pode ser progressiva onde as respostas produzidas são em relação à intensidade e/ou duração do estímulo, desde reflexos. Desta forma o estímulo é interrompido assim que uma resposta é obtida (Zumbusch *et al.*, 2024). O tipo de estímulo mecânico usado na investigação de hipernocicepção foi o *von Frey*, o qual avaliar a sensibilidade tecidual pela carragenina ao estímulo mecânico (Silva *et al.*, 2013). Os limiares nociceptivos são avaliadas exercendo-se uma pressão linearmente crescente no centro da planta da pata do animal até a produção de uma resposta caracterizada como retirada e sacudida (*flinches*).

A administração do agentes flogísticos local (carragenina) produzirá reação inflamatória local caracterizada pela formação de edema, o qual se constitui como um sinal cardinal inflamatório (Agnel; Shobana, 2012). Esse tipo de inflamação é considerado bifásico, a fase inicial é devida à liberação de histamina, leucotrienos,

cininas e ciclooxigenases na primeira hora, causando vasodilatação e aumento da permeabilidade vascular, a fase tardia está associada à produção de bradicinina, prostaglandinas, e a migração de células inflamatórias (Gupta *et al.*, 2015).

O modelo experimental em questão, baseia em testes mecânicos que permite a avaliação do aumento da sensibilidade do nociceptor a estímulos inócuos (alodinia) ou nocivos (hiperalgesia) (Baliki; Apkarian, 2015; Zumbusch *et al.*, 2024). Através da alodinia mecânica à sensibilidade tecidual, apresentou redução significativa da intensidade de hipernocicepção em (D2, D3, D2SS.1, D2SS.2 e D2SS.3) quando comparada com o grupo veículo ( $p < 0,05$ ), conforme (Figura 16 - A e B). Estes dados, podem estar associados com a ação anti-inflamatória, atribuídas a células imunes locais ou em migração cujo equilíbrio regula a resposta inflamatória, por serem fonte relevante de citocinas ou mediadores hipernociceptivos de ação direta, como prostaglandinas (Basbaum *et al.*, 2010; Johnson *et al.*, 2020).

A presença de flavonoides nas frações de *C. martii* pode explicar, em parte, a redução da hipernocicepção observada em estudos. Esses compostos possuem a capacidade de modular a resposta inflamatória por meio da inibição de enzimas essenciais no metabolismo do ácido araquidônico, como a ciclooxigenase (COX) e a lipoxigenase (LOX), responsáveis pela produção de prostaglandinas e leucotrienos. Essa ação reduz significativamente os mediadores inflamatórios, atenuando a resposta inflamatória e, conseqüentemente, a hipernocicepção (Mukhopadhyay *et al.*, 2023; Xie *et al.*, 2014).

Os estímulos inflamatórios ou lesões teciduais ativam cascatas de citocinas pró-inflamatórias, que culminam na produção de mediadores finais, como prostanoídes e aminas simpáticas, responsáveis pela amplificação da dor inflamatória. Esses mediadores interagem diretamente com nociceptores, modulando canais dependentes de voltagem e causando os limiares de ativação, resultando em hipernocicepção (Johnson *et al.*, 2020; Yamaguchi *et al.*, 2022).

A eficácia dos compostos bioativos presentes em *C. martii* foi evidenciada pela redução do edema de pata nos grupos tratados (D2, D3, D2SS.2 e D2SS.3), proporcionando uma potente ação antiedematosa. Essa resposta está associada à redução da liberação de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$  e IL-1 $\alpha$ , conforme demonstrado em ensaios de expressão gênica e ELISA (Salgado *et al.*, 2021).

Citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-6 e IL-17 desempenham um papel crucial na iniciação e amplificação da resposta inflamatória, regulando a intensidade e persistência da inflamação. Assim, a modulação da atividade dessas citocinas pelas frações de *C. martii* não apenas atenua o processo inflamatório local, mas também contribui para o equilíbrio entre mediadores pró e anti-inflamatórios, destacando um potencial terapêutico com efeitos tanto anti-inflamatórios quanto antinociceptivo (Isobe *et al.*, 2023; Mehrzadi *et al.*, 2021).

Na análise da expressão gênica de citocinas inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , IL-6 e IL-17, realizada por qPCR, os grupos tratados (D2, D3 e D4) apresentaram uma redução significativa na expressão dos genes que codificam essas citocinas (Figura 18 – A, B e C). Complementarmente, no ensaio de quantificação de citocinas por ELISA, observamos que os mesmos grupos (D2, D3 e D4) suprimiram a produção de TNF- $\alpha$ , enquanto D2 e D3 também inibiram o aumento da produção de IL-1 $\alpha$  em comparação ao grupo controle (Figura 20 – A e B). Esses resultados indicam que os compostos bioativos presentes em *C. martii* podem modular a expressão e/ou a atividade das citocinas pró-inflamatórias, desempenhando um papel importante na regulação da resposta inflamatória.

As respostas inflamatórias são amplificadas pelas citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-6 e IL-17, que desempenham funções cruciais nesse processo (Hussein *et al.*, 2013). Elas estimulam a produção de mediadores inflamatórios adicionais, ativam células imunes e influenciam a modulação da permeabilidade vascular. As interações dessas citocinas são complexas e sinérgicas, resultando na amplificação da resposta inflamatória e na intensificação da dor (Mizokami *et al.*, 2016). Portanto, a redução observada na expressão e produção dessas citocinas nos grupos tratados sugere que *C. martii* atua modulando de maneira eficaz as cascatas inflamatórias, prevenindo a progressão do processo inflamatório e da hipernocicepção associada.

O TNF- $\alpha$  e IL-1 $\alpha$  desempenham papéis essenciais na inflamação aguda, com suas atividades biológicas mediadas por receptores específicos que desencadeiam cascatas de sinalização intracelular, como a ativação de NF- $\kappa$ B, MAPKs e caspases. Esses processos induzem também a produção de outras citocinas inflamatórias, como IL-6 e IL-17, além de estimular células endoteliais e células imunes (Hussein *et al.*, 2013; Sen'kova *et al.*, 2023). A IL-6, por sua vez, exerce um papel fundamental

na indução de proteínas de fase aguda, na diferenciação de células B e T, e na ativação de células imunes. Seu mecanismo de ação envolve a ligação ao receptor IL-6R, que aciona uma cascata de sinalização mediada por JAK e STAT3, resultando na expressão de genes relacionados à resposta inflamatória e à imunidade adaptativa (Giraldez *et al.*, 2021; Macarie *et al.*, 2023).

Além disso, a IL-17, produzida predominantemente pelas células T helper 17 (Th17), desempenha um papel crítico na amplificação da resposta inflamatória. Ela estimula a produção de citocinas pró-inflamatórias adicionais, como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  e IL-6, e promove a migração de neutrófilos para os locais de inflamação. A IL-17 também participa da ativação de células endoteliais e induz fatores de crescimento e quimiocinas que recrutam mais células imunes, exacerbando ainda mais a resposta inflamatória (Mills, 2023; Miossec; Kolls, 2012).

Com base nesses mecanismos, a redução observada na expressão e produção dessas citocinas inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-6 e IL-17) nos grupos tratados com *C. martii* sugere que os compostos bioativos presentes na planta podem atenuar significativamente como cascatas de sinalização inflamatória.

Esses resultados sustentam a hipótese de que a *C. martii* desempenha um papel significativo na prevenção da síntese de prostaglandinas e/ou na modulação de mecanismos periféricos responsáveis pela produção e liberação de mediadores inflamatórios que afetam a permeabilidade vascular. A formação de edema na pata, observada nos grupos tratados, ocorre devido a uma interação sinérgica entre esses mediadores, que promovem o aumento da permeabilidade vascular e do fluxo sanguíneo, resultando em acúmulo de líquido nos tecidos (Haydinger *et al.*, 2023).

Ao modular as citocinas inflamatórias e reduzir a ativação das células endoteliais, além de interferir na migração de células imunes, o *C. martii* pode contribuir para o controle da inflamação aguda e da hipernocicepção associada, reforçando assim o seu potencial terapêutico no manejo de processos inflamatórios e da dor.

Um dos mecanismos imunológicos é chave responsável pelo dano tecidual e pela nocicepção inflamatória é a migração de neutrófilos, que ocorre em resposta a estímulos como a carragenina. Este processo pode ser dividido em três fases: a fase inicial, mediada por histamina e serotonina, a fase secundária, mediada por cininas, e a fase final, que envolve a produção local de prostaglandinas e tromboxanos

derivados do ácido araquidônico, mediada pela ação das enzimas cicloxigenase. A modulação desses mediadores inflamatórios por *C. martii* pode interferir diretamente na redução da migração de neutrófilos, atenuando os danos teciduais e a intensificação da dor associada à inflamação (Margraf *et al.*, 2022).

Após um estímulo inflamatório, as células residentes liberam citocinas que ativam as células endoteliais, induzindo a expressão de moléculas de adesão para recrutar leucócitos aos focos inflamatórios (Arruda *et al.*, 2022). Os neutrófilos, primeira linha de defesa, são responsáveis pela resposta inflamatória inicial, envolvendo migração celular, exsudação de plasma e produção de mediadores como IL-1, IL-6 e TNF- $\alpha$  (Capucetti *et al.*, 2020).

O recrutamento de neutrófilos para a inflamação local é um processo complexo de adesão e transmigração, mediado por alterações endoteliais causadas por mediadores inflamados como histamina, leucotrienos e citocinas. A ativação das células endoteliais também ocorre pela detecção de padrões patogênicos, que regulam a expressão de P-selectina e E-selectina. Essas moléculas facilitam a adesão e o rolamento dos neutrófilos na superfície endotelial (Zhang *et al.*, 2023). Quando P-selectina e E-selectina estão presentes na superfície endotelial, elas se ligam a ligantes glicosilados, como ICAM-1, permitindo a ancoragem dos neutrófilos e sua subsequente migração ao longo do vaso (Chen *et al.*, 2023).

Uma vez no tecido inflamado, os neutrófilos realizam suas funções efetoras, como fagocitose de patógenos e liberação de mediadores inflamatórios, contribuindo para a resolução e o reparo tecidual. Esses mecanismos são altamente regulados e essenciais para uma resposta imunológica eficaz contra infecções e lesões (Capucetti *et al.*, 2020).

O presente estudo demonstrou uma redução significativa na migração de neutrófilos para a cavidade peritoneal após 4 horas da indução com carragenina em todas as subfrações testadas de *C. martii* (Figura 19 – A e B). Esse efeito pode ser atribuído, em grande parte, à supressão da liberação das citocinas pró-inflamatórias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$  e IL-6, que desempenham um papel essencial no recrutamento de neutrófilos ao local inflamatório, atuando como mediadores quimiotáticos (Yamaguchi *et al.*, 2022).

O recrutamento de neutrófilos pode estar diretamente associado à presença de substâncias bioativas, como as flavonas, que interferem em vias importantes na

resposta inflamatória (Al-Khayri *et al.*, 2022). Um dos principais mecanismos envolve a prevenção da enzima fosfolipase A2, responsável pela conversão do ácido araquidônico em prostaglandinas, modulando, assim, a expressão da (iNOS) óxido nítrico sintase, através da supressão de NF-kB (Guo *et al.*, 2024). Essa modulação também resulta em uma alteração no perfil de macrófagos, mudando-os de M1 para M2, o que consequentemente reduz a liberação das citocinas pró-inflamatórias e influencia a ativação da via da COX-2 (López *et al.*, 2020).

A interação entre os neutrófilos recrutados para a inflamação local e as células residentes, junto com seus mediadores inflamados e a matriz extracelular, pode gerar uma cascata de produção de mediadores adicionais, como enzimas degradantes, metaloproteases e espécies reativas de toxicidade (ROS). Estes, por sua vez, têm o potencial de amplificar ainda mais a resposta inflamatória, resultando em danos ao tecido circundante (Morris *et al.*, 2022).

Durante a resposta inflamatória, os neutrófilos e macrófagos desempenham um papel central na produção de óxido nítrico (NO), que é gerado pela ativação da (iNOS) isoforma induzível. A iNOS converte L-arginina em NO, um mediador essencial que, em níveis elevados, contribui para a formação de radicais livres, como peróxido de hidrogênio, superóxido e hidroxila (Lundberg & Weitzberg, 2022). Esses radicais, por sua vez, causam danos teciduais, induzindo estresse oxidativo e promovendo a peroxidação lipídica nas membranas celulares, afetando DNA e proteínas, o que resulta em morte celular e disfunção (Drehmer *et al.*, 2022).

A produção de NO e seus derivados é regulada pela expressão de diferentes isoformas do óxido nítrico sintase (NOS), uma família de enzimas que convertem L-arginina em L-citrulina, gerando NO. As isoformas de NOS são categorizadas em constitutivas (cNOS), como a endotelial (eNOS), que dependem de cálcio e calmodulina para a sinalização celular, e induzíveis (iNOS), que são ativadas em resposta a citocinas inflamatórias e são principalmente expressas por macrófagos e outros leucócitos (Du *et al.*, 2023).

Em particular, a ativação de macrófagos e neutrófilos durante um intenso resultado na produção de NO, que não gera apenas radicais livres, mas também metabólitos obtidos como o nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ) e o nitrato ( $\text{NO}_3^-$ ), os quais têm sido usados como marcadores da presença de processos inflamatórios no organismo (Du *et al.*, 2023). O aumento dos níveis de nitrito no sangue reflete a ativação do



sistema imunológico, evidenciando a intensidade da resposta inflamatória (Chen *et al.*, 2024; Dietrich *et al.*, 2015).

A reação de Griess (Hoysrijan; Sirikulajorn, 2023), foi empregada neste estudo para avaliar os níveis de óxido nítrico. Os resultados mostraram uma redução nos níveis de nitrito (Figura 21), o que sugere que as substâncias testadas (D2, D3 e D4) podem ter inibido a atividade da isoforma induzível do óxido nítrico sintase (iNOS), responsável pela síntese de NO em macrófagos e neutrófilos (Zhong *et al.*, 2018). Além disso, essas substâncias podem ter limitação na liberação de mediadores citotóxicos, que são produzidas por células imunes ativadas em resposta ao estresse oxidativo e à geração de intermediários reativos da oxigênio (Handzlik *et al.*, 2020).

Durante a inflamação, o NO exerce um papel crucial na regulação da permeabilidade vascular (Drehmer *et al.*, 2022). Produzido pelas células endoteliais, atua promovendo vasodilatação, o que aumenta permeabilidade dos vasos. Esse efeito também influencia a expressão e atividade das proteínas de adesão nas junções oclusivas do endotélio vascular, facilitando a abertura dessas junções. Como resultado, ocorre uma maior passagem de moléculas e células do sangue para o tecido extravascular, o que é essencial para a migração eficaz das células do sistema imunológico para o foco da inflamação (Chen *et al.*, 2024).

Durante a inflamação aguda, fenômenos exsudativos, como vasodilatação, aumento da permeabilidade vascular e migração celular, são desencadeados em resposta à lesão (Margraf *et al.*, 2022). A alteração da permeabilidade endotelial, característica desse processo, está frequentemente associada à desregulação da adesão celular nas junções endoteliais, causada pela interferência de fatores físico-químicos e pela liberação de mediadores solúveis por células inflamatórias, tanto residentes quanto circulantes. Esses mediadores se ligam a receptores específicos nas células endoteliais, facilitando a alteração das propriedades da barreira vascular (Margraf *et al.*, 2022; Parisien *et al.*, 2022).

No modelo experimental de peritonite causada por carragenina, as alterações causadas pela inflamação resultam na vasodilatação dos capilares da membrana, facilitando o extravasamento do corante azul de Evans para os tecidos, o que é um indicativo do aumento da permeabilidade vascular. A observação nesse evento (Figura 22) sugere que em (D2, D3 e D4), a redução no recrutamento de neutrófilos

para a atualidade peritoneal pode ter contribuído para a diminuição da produção de NO, levando, conseqüentemente, à redução na permeabilidade vascular e não extravasamento de líquidos e mediadores inflamatórios (Burn *et al.*, 2021).

A interação entre neutrófilos e o óxido nítrico (NO) é crucial para a regulação da resposta inflamatória, garantindo a eliminação eficaz do agente agressor enquanto minimiza o risco de danos excessivos às tecidos (Cervera *et al.*, 2022). No presente estudo, os resultados observados em (D2, D3 e D4) indicam que a redução no recrutamento de neutrófilos para a cavidade peritoneal pode ter contribuído para a diminuição na produção de NO, o que, por sua vez, levou à redução da permeabilidade vascular. Isso sugere que a modulação do recrutamento celular, em particular dos neutrófilos, pode ter um impacto direto na regulação da permeabilidade dos vasos, uma vez que a produção de NO é um mediador fundamental nesse processo (Palmieri *et al.*, 2020).

Além disso, compostos bioativos presentes em *Ctenodon martii* apresentam potencial para influenciar esse processo inflamatório. Estudos descobriram que as flavonas, por exemplo, podem modular a produção de NO e exibir efeitos benéficos em condições associadas ao estresse oxidativo (Cuong *et al.*, 2024). Além disso, essas substâncias podem níveis regulares de expressão de enzimas inflamatórias como iNOS e COX-2, inibindo a vasodilatação e conseqüentemente reduzindo os danos associados à inflamação (Maleki *et al.*, 2019).

Os terpenos, por sua vez, atuam de maneira complementar aos níveis modulares de citocinas pró-inflamatórias (IL-8, IL-6, TNF- $\alpha$ ), inibindo a produção de mediadores como o NO e suprimindo a ativação da via de NF- $\kappa$ B, um fator de transcrição crucial para o controle da resposta inflamatória (Rodríguez & Johnson, 2023). Assim, a combinação dessas substâncias bioativas parece atuar de forma sinérgica, regulando de maneira eficaz os mediadores inflamatórios e a resposta vascular, com implicações para o controle da inflamação e da lesão tecidual.

As interações entre citocinas pró-inflamatórias como TNF- $\alpha$ , IL-1 $\alpha$ , IL-6 e IL-17 são fundamentais para a evolução da resposta inflamatória. A compreensão de como *Ctenodon martii* pode modular essas citocinas oferece uma oportunidade valiosa para o desenvolvimento de terapias direcionadas a doenças inflamatórias, sejam elas agudas, crônicas ou autoimunes. Essas terapias podem ser

particularmente eficazes na regulação do ambiente inflamatório, minimizando os danos aos tecidos e promovendo a resolução do processo inflamatório.

Em casos de inflamação persistente, o sistema imunológico tende a permanecer ativado, resultando na produção contínua dessas citocinas pró-inflamatórias e no recrutamento de células imunes para o local da inflamação. Esse processo, quando prolongado, pode levar a danos teciduais significativos e à progressão de doenças, como observado em modelos de inflamação crônica (Kuner & Kuner, 2021).

Esse aumento nas citocinas pró-inflamatórias favorecendo o recrutamento de células imunes, a ativação de células endoteliais e induz mudanças na expressão gênica, perpetuando o ciclo inflamatório (Suzuki, 2019). Por outro lado, como citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 e TGF- $\beta$ , que desempenham um papel crucial na modulação e resolução da inflamação, podem estar presentes em níveis reduzidos, contribuindo para a cronicidade da resposta (Alagbe *et al.*, 2022). Além das citocinas, outros mediadores, como quimiocinas e espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, intensificam esse processo inflamatório causado, desempenhando papéis essenciais na perpetuação e agravamento da lesão tecidual (Kamali *et al.*, 2021). Entender como *C. martii* pode interferir nesses mecanismos inflamatórios é crucial para a busca de soluções terapêuticas mais eficazes e específicas.

A formação de granulomas é um evento significativo que pode ocorrer na inflamação crônica, caracterizando uma resposta do sistema imunológico a estímulos persistentes, como agentes infecciosos ou corpos estranhos insolúveis que o organismo não consegue eliminar. Esse processo resulta na aglomeração de células imunes, como macrófagos, linfócitos e células epitelioides, rodeadas por uma cápsula de tecido conjuntivo, uma estrutura que visa isolar e conter o agente irritante (Minton, 2016; Pagán; Ramakrishnan, 2018).

O modelo granulomatoso começa com o recrutamento de neutrófilos, que contém espécies reativas de oxigênio para combater o agente invasor. Nos dias seguintes, macrófagos e monócitos se juntam ao processo, liberando citocinas como TNF- $\alpha$  e IL-1, que são fundamentais para a regulação da formação do granuloma, e induzem a expressão de COX-2, contribuindo para o controle da inflamação (Klapproth *et al.*, 2023). Esse processo é dinâmico, pois os macrófagos também desempenham um papel crucial ao atrair fibroblastos para o local da lesão,

promovendo a produção de colágeno e a formação da cápsula fibrosa ao redor do implante (Pagán; Ramakrishnan, 2018). Em contraste, o equilíbrio entre a resposta Th1, que favorece a formação do granuloma, e as células reguladoras, como os macrófagos M2, pode direcionar a resolução do processo inflamatório. A liberação de IL-10 e IL-13 pelas células M2 pode auxiliar na dissolução do granuloma e promover a cicatrização do tecido danificado (Cruz *et al.*, 2016).

A formação e evolução do granuloma estão intrinsecamente ligadas à dinâmica entre os macrófagos M1 e M2. Os macrófagos M1, pró-inflamatórios, desempenham papel crucial na fase inicial, ativados por citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6, contribuindo para a resposta imune e inflamatória. Por sua vez, os macrófagos M2, anti-inflamatórios, predominam na fase tardia, mediando a resolução da inflamação e reparação tecidual através de citocinas como IL-4, IL-13 e IL-10 (Klapproth *et al.*, 2023; Minton, 2016). Essa interação entre os subtipos de macrófagos reflete diferentes estágios da resposta inflamatória e imune, essenciais para a formação e função do granuloma (Pagán; Ramakrishnan, 2018).

Portanto, nas doses de 50 e 25 mg/kg, o extrato etanólico de *Ctenodon martii* afeta significativamente o peso do granuloma quando comparado ao grupo controle (VH), com efeitos semelhantes às observações no grupo tratado com dexametasona, embora sem diferença estatística entre esses grupos. Essa redução na formação da cápsula granulomatosa está associada à diminuição da atividade pró-inflamatória nas doses testadas, o que pode ser explicada pela modulação na expressão de citocinas pró-inflamatórias, conforme evidenciado por testes anteriores (Petersen; Smith, 2013). A presença de compostos bioativos como flavonas e terpenos no extrato de *C. martii* parece influenciar diretamente esses processos, alterando potencialmente o equilíbrio entre a formação do granuloma e sua resolução. Essa modulação pode envolver a regulação de citocinas-chave, como TNF- $\alpha$  e IL-6, fundamentais na resposta inflamatória, contribuindo para uma resposta mais equilibrada e controlada.

O peso úmido dos implantes indica a quantidade de fluidos e infiltrado celular durante a inflamação, enquanto o peso seco representa principalmente as células que migraram para o foco inflamatório, após a perda da porção líquida do transudado durante a dessecação. O delta entre o peso úmido e o peso seco é uma

medida crucial para avaliar a permeabilidade vascular e o edema (Bailey *et al.*, 1982; Misra *et al.*, 2018; Nandal *et al.*, 2009).

A formação de exsudato foi significativamente reduzida nas doses de (50, 25 e 12,5 mg/kg) em comparação com o grupo controle (VH), e não houve diferença significativa em comparação com o grupo tratado com dexametasona. Sugerindo ação inibidora do extrato, tanto na permeabilidade dos vasos ao redor do implante quanto no tamanho do granuloma, corroborando com os resultados dos experimentos anti-inflamatórios e antiedematogênicos previamente descritos.

O processo inflamatório desencadeia uma série de mudanças complexas, tanto quantitativas quanto qualitativas (Leuti *et al.*, 2020), nos efeitos das células mesenquimais multipotentes da medula óssea, assim como na composição da subpopulação de linfócitos tímicos e esplênicos. Essas alterações podem resultar em modificações significativas na estrutura e função dos órgãos linfoides, como o timo e o baço, influenciando diretamente a resposta imunológica do organismo (Ding *et al.*, 2021). Essa interação dinâmica entre a inflamação e os componentes do sistema imunológico desempenha um papel crucial na regulação fina da resposta inflamatória e na adaptação do organismo a diferentes condições fisiopatológicas (Rice *et al.*, 2017).

Portanto, não foi observada diferença estatisticamente significativa no peso do timo entre os grupos tratados com todas as doses do extrato etanólico e os grupos controle (VH) e dexametasona. Na análise do peso do baço, foi notado uma redução significativa nas doses de 25 mg/kg e 12,5 mg/kg em comparação com o grupo controle (VH). Entretanto, não houve diferença estatisticamente significativa nessas doses quando comparadas ao grupo tratado com dexametasona. Isso sugere uma possível semelhança com os corticosteroides, que apresenta atividade antiproliferativa e/ou imunossupressora (Islam *et al.*, 2023; Li *et al.*, 2017).

A dexametasona, é um glicocorticoide sintético, conhecida por sua capacidade de suprimir a resposta inflamatória e imunológica do organismo, o que pode resultar na redução do tamanho do baço (Islam *et al.*, 2023; Madamsetty *et al.*, 2022). Ocorrendo devido à sua capacidade de diminuir a produção e a liberação de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6, além de inibir a migração e a atividade de células inflamatórias, como macrófagos e linfócitos, para os tecidos inflamados, incluindo o baço (Gabbia *et al.*, 2018; Madamsetty *et al.*, 2022). Essa

ação supressora da resposta imune e inflamatória resulta na redução do tamanho do baço, um órgão diretamente envolvido na resposta imunológica e na produção de anticorpos (Islam *et al.*, 2023).

Neste estudo, também foi avaliada a variação de peso corporal dos animais, considerando os efeitos metabólicos da dexametasona. Essa substância influencia vias metabólicas como gliconeogênese, lipólise e captação de glicose, principalmente através da ativação do receptor de glicocorticoides. Esses efeitos podem contribuir para a perda de peso observada em indivíduos tratados com dexametasona (Patel *et al.*, 2014; Salehidoost; Korbonits, 2022). Não foram observadas diferenças estatísticas entre todas as doses do extrato etanólico testadas em comparação com o grupo controle (VH), embora tenha havido uma diferença significativa em relação ao grupo tratado com dexametasona.

Estudos anteriores relataram alterações metabólicas em modelos experimentais com roedores submetidos à administração de glicocorticoides (Islam *et al.*, 2023), incluindo perda de massa muscular, redução do peso corporal em ratos e mudanças nos perfis proteico e lipídico, especialmente após o tratamento com dexametasona (Food Safety Commission of Japan, 2018; Li *et al.*, 2017). Portanto, sugere-se que o tratamento com *C. martii* possa ter efeitos anti-inflamatórios sem causar distúrbios metabólicos significativos.

Considerando os resultados apresentados dos extratos de *C. martii*, foi avaliado um outro modelo de inflamação crônica, através da atividade cicatrizante. Uma vez que a cicatrização desempenha um papel fundamental na resolução da inflamação e na restauração da integridade dos tecidos após uma lesão ou infecção (Martin, 2020).

A cicatrização de feridas é um processo complexo, iniciando com a fase de inflamação que visa controlar hemorragias, prevenir infecções e iniciar a cicatrização. Durante essa etapa, citocinas como TNF- $\alpha$ , IL-1 e IL-6 promovem a migração de células inflamatórias e aumentam a permeabilidade vascular (Han; Ceilley, 2017). Neutrófilos são os primeiros a chegar à lesão, realizando fagocitose de microrganismos e detritos celulares, enquanto os macrófagos também desempenham papel crucial ao fagocitar patógenos e liberar mediadores inflamatórios para estimular a migração de outras células imunes (Baron *et al.*, 2020; P.-H. Wang *et al.*, 2018).

Na fase de proliferação, ocorre a formação de tecido de granulação, angiogênese e proliferação celular. Citocinas como o Fator de Crescimento Transformador beta (TGF- $\beta$ ), Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas (PDGF) e Fator de Crescimento Epidérmico (EGF) são essenciais nesse processo, estimulando a proliferação de fibroblastos, a formação de colágeno e a angiogênese para promover a reparação do tecido (Han; Ceilley, 2017; Martin, 2020).

Na fase final de remodelação, o tecido de granulação é substituído por tecido cicatricial mais maduro e resistente (Takeo *et al.*, 2015). Durante essa fase, os fibroblastos produzem colágeno para fortalecer a ferida e os macrófagos promovem a remoção de células apoptóticas e a reorganização do tecido. Essas células imunes desempenham papéis essenciais em cada etapa da cicatrização de feridas, garantindo uma resposta inflamatória adequada, proliferação celular e formação de novo tecido para uma cicatrização eficaz (Baron *et al.*, 2020; Martin, 2020).

A avaliação das feridas excisionais, resultaram em uma redução significativa da área das feridas do extrato etanólico nas doses (12,5 e 25 mg/ml), já quando comparados ao controle e dexametasona as doses não diferiram estatisticamente. Diante desses achados e pela diferença estatística entre os controles, verso extrato, foram conduzidos estudos histopatológicos e semiquantitativos para investigar a eficácia do extrato na promoção e aceleração do processo de cicatrização.

Após sete dias de tratamento, a análise histopatológica (Tabela 7) revelou uma redução no processo inflamatório nas doses (12,5 e 25 mg/ml), ao evidenciar uma menor presença de neutrófilos e macrófagos quando comparadas aos grupos controle (VH) e dexametasona, corroborando com os resultados semiquantitativos (Tabela 6).

A redução na presença de neutrófilos e macrófagos em feridas por excisão aponta para a oportunidade de aprimorar a cicatrização através de uma regulação mais precisa da resposta inflamatória. Este fenômeno não apenas sugere uma estratégia potencial para mitigar os danos teciduais associados a uma inflamação exacerbada, mas também preserva o papel fundamental dos neutrófilos na defesa inicial contra agentes patogênicos (Martin, 2020). Ao permitir que os macrófagos continuem desempenhando suas funções na remoção de detritos celulares e na modulação da proliferação celular, resulta em um ambiente mais favorável à cicatrização (Sorg *et al.*, 2017).

A redução na secreção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1 e TNF- $\alpha$ , indica uma mudança para uma fase regenerativa, promovendo a reparação, reepitelização e colagenização do tecido danificado. Essas descobertas ressaltam a importância de controlar a inflamação e preservar os aspectos benéficos da resposta imunológica para uma cicatrização eficaz (Baron *et al.*, 2020). Durante a fase de proliferação e reepitelização, os queratinócitos desempenham um papel fundamental ao liberar citocinas que estimulam a ativação de queratinócitos adjacentes, contribuindo para o fechamento da ferida (Han; Ceilley, 2017).

A citocina IL-6, proveniente de macrófagos, fibroblastos e queratinócitos, influencia a formação de tecido de granulação, reepitelização e angiogênese (Martin, 2020). Por outro lado, o TNF- $\alpha$ , produzido por diversos tipos celulares, como queratinócitos, macrófagos e mastócitos, desempenha um papel na redução da produção de tecido de granulação e na organização das fibras de colágeno. O aumento excessivo na produção de citocinas pró-inflamatórias, como IL-1, TNF- $\alpha$  e IL-6, pode levar a uma inflamação prejudicial e atrasar a cicatrização (Han; Ceilley, 2017; Takeo *et al.*, 2015). Os dados anteriores indicam que *C. martii* reduz a produção dessas citocinas, o que explicaria em parte a atividade cicatricial da espécie estudada.

Na fase final da cicatrização de feridas, chamada de fase de maturação ou remodelação, ocorre uma diminuição nos neutrófilos e macrófagos, substituídos por linfócitos. A atividade dos fibroblastos diminui, enquanto os fibrócitos aumentam, promovendo a formação de uma matriz de colágeno mais organizada (Sorg *et al.*, 2017). Além disso, observa-se uma maior vascularização do tecido cicatricial, com o desenvolvimento de uma rede vascular que fornece nutrientes e oxigênio às células em crescimento. Essas mudanças são essenciais para o completo fechamento da ferida, resultando na restauração da integridade tecidual (Baron *et al.*, 2020; Han; Ceilley, 2017), corroborando com os resultados apresentados na histopatologia discutidos acima.

Na avaliação da cicatrização de feridas por queimadura, os grupos tratados com doses (12,5, 100 e 200 mg/ml) mostraram-se menos eficazes em reduzir a área da ferida em comparação com os grupos controle. Já os tratamentos com doses (25 e 50 mg/ml) não diferiram estatisticamente do controle (VH) apenas do controle



Sulfa. Devido à falta de variação significativa na redução da área da ferida entre os tratamentos, a análise histopatológica não foi realizada.

A eficácia do tratamento com extratos vegetais, como o de *Ctenodon martii*, pode ser amplamente influenciada por fatores como o tipo de formulação utilizada, as propriedades de liberação das substâncias ativas, a absorção pela pele e a capacidade de retenção de umidade, entre outros aspectos (Dua *et al.*, 2016; Kumar *et al.*, 2022). A seleção adequada da formulação e do modelo experimental é essencial para otimizar a resposta terapêutica, especialmente no que diz respeito às propriedades anti-inflamatórias da planta, como evidenciado em testes prévios (Baron *et al.*, 2020).

Nesse contexto, o teste do labirinto em cruz (LCE) se destacou como uma ferramenta avançada para mensurar comportamentos ansiogênicos e avaliar a atividade locomotora, podendo também fornecer informações sobre potenciais efeitos sedativos dos compostos em estudo, ampliando a compreensão dos mecanismos terapêuticos e do impacto da planta na modulação do comportamento (Hilton *et al.*, 2023). A combinação de diferentes abordagens experimentais contribui para uma avaliação mais abrangente dos efeitos biológicos do extrato terapêuticos.

O teste baseia-se na aversão natural dos ratos por áreas abertas e elevadas, bem como no seu comportamento exploratório espontâneo natural em novos ambientes. O aparelho consiste em braços abertos e braços fechados, cruzados no meio perpendicularmente entre si, e uma área central. Os ratos têm acesso a todos os braços e podem mover-se livremente entre eles. O número de entradas nos braços abertos e o tempo gasto nos braços abertos são usados como índices de ansiedade induzida pelo espaço aberto em ratos. Já o número de vezes que o animal atravessa as linhas divisórias do labirinto, assim como o tempo que ele permanece em movimento dentro da estrutura, avaliam a atividade locomotora (Casarrubea *et al.*, 2015; Pinto *et al.*, 2012).

Os resultados observados (Figura 26 - A à D), mostraram que o grupo controle positivo Midazolam (MDZ), os animais apresentaram maior entrada em número (nº), tempo (seg) e porcentagem (%) nos braços abertos, em comparação aos grupos veículo (VH) e extratos etanólico nas doses 25, 50 e 100 mg/kg. Quando comparado ao grupo controle negativo (VH), houve diferença estatística na entrada referente tempo (seg) na dose 50 mg/kg e (%) de tempo nas doses 50 e 100 mg/kg.

Os resultados, sugerem que o Midazolam induziu um comportamento de exploração mais acentuado nos braços abertos do labirinto em comparação com o veículo e todas as doses do extrato os quais não alteraram o comportamento natural.

Esse comportamento pode ser interpretado como uma resposta ansiolítica ao Midazolam, já que os animais se sentiram mais à vontade para explorar áreas abertas, podendo ser refletido por uma redução na ansiedade (Schrader *et al.*, 2018). Estudos abordam animais avaliados diante do ambiente desconhecido somado a tendência natural de esquiva em relação às regiões abertas, mostra clara preferência pelos braços fechados e apenas roedores com um nível de ansiedade reduzido aumentam a sua atividade nos braços abertos (Biedermann *et al.*, 2017; Casarrubea *et al.*, 2015).

Os efeitos ansiolíticos dos benzodiazepínicos estão relacionados à supressão secundária dos sistemas serotoninérgico e/ou não adrenérgico e outros sistemas excitatórios (Kuang *et al.*, 2017). Os agentes ansiolíticos aumentam a frequência de entradas e também o tempo de permanência nos braços abertos do LCE. Os compostos ansiolíticos não apenas diminuem a fobia natural dos animais aos braços abertos, mas também aumenta a exploração no teste do labirinto em cruz elevado (Edinoff *et al.*, 2021; Schrader *et al.*, 2018).

Em relação ao braço fechado (Figura 26 - A e B), o grupo controle (MDZ) apresentou diferença, com menor número (nº) e porcentagem (%) de entrada, quando comparado ao controle (VH) e extrato etanólico na dose 25 mg/kg. Analisando (Figura 26 – C e D), o grupo controle (MDZ) apresentou menor tempo (seg) e porcentagem (%) de entrada no braço fechado em comparação aos grupos veículo (VH) e extratos etanólico nas doses 25, 50 e 100 mg/kg. Esses resultados corroboram com a análise anterior, demonstrando que o Midazolam induz um comportamento de exploração mais pronunciado nos braços abertos em comparação com o tempo em segundos e a porcentagem de entrada nos braços fechados. Estudos mostram que os roedores tendem naturalmente a passar mais tempo nos braços fechados (Hilton *et al.*, 2023), o que é consistente com os resultados observados nos grupos controle (VH) e em todas as doses testadas do extrato etanólico.

Ainda se observa uma menor entrada nos braços fechados em termos de número e porcentagem no grupo (MDZ), devido à maior presença em tempo e

exploração nos braços abertos. Em relação a esses parâmetros, nos grupos (VH) e no extrato etanólico na dose de 25 mg/kg, os animais mostraram uma maior entrada nos braços fechados em comparação com o grupo (MDZ), enquanto nas doses de extrato etanólico de 50 e 100 mg/kg não houve diferença estatística em relação ao grupo (MDZ). Os resultados com um maior e um menor número de entradas nos grupos tratados com extrato etanólico em comparação com o grupo (MDZ) não alteraram o comportamento natural esperado dos roedores, como evidenciado pelo tempo de permanência e/ou pelo aumento no número de entradas nos braços fechados.

O teste do labirinto em cruz elevado é construído com base em um paradigma de conflito entre aproximação e esquiva, que considera as preferências tigmotáticas dos roedores por espaços que sejam familiares, protegidos e fechados, em contraposição à sua motivação para investigar espaços desconhecidos, expostos ou abertos (Hazim *et al.*, 2014). O comportamento dos animais diante desse ambiente desconhecido, aliado à sua inclinação natural para evitar áreas abertas, é em parte resultado do mecanismo de tigmotaxia, que é a tendência dos animais a manter contato físico total ou parcial com superfícies sólidas, como as paredes verticais dos braços fechados. Esses padrões comportamentais indicam uma resposta típica, resultando em uma redução na exploração e em uma aversão aos braços abertos (Hilton *et al.*, 2023; Schrader *et al.*, 2018).

A análise etológica do teste do labirinto em cruz elevado investiga diversas variáveis comportamentais, proporcionando uma avaliação abrangente do nível de excitabilidade do sistema nervoso central (SNC) do animal em estudo. Essa avaliação está fortemente relacionada à atividade locomotora observada durante o teste (Seibenhener; Wooten, 2015). Um aumento no estado de alerta geralmente está associado a uma maior atividade locomotora, enquanto uma redução nessa atividade sugere um efeito sedativo. Essa associação entre comportamento exploratório e nível de excitabilidade do SNC foi documentada em estudos anteriores (Gamberini *et al.*, 2015), destacando a importância na caracterização dos efeitos de diferentes intervenções farmacológicas ou ambientais no sistema nervoso central dos animais (Hilton *et al.*, 2023; Seibenhener; Wooten, 2015).

Os resultados da Tabela 8 indicam que os animais tratados com diferentes doses do extrato etanólico (25, 50 e 100 mg/kg) apresentaram diferenças

estatisticamente significativas em relação ao grupo tratado com midazolam (MDZ) em diversos comportamentos observados no teste, especificamente a diminuição da exploração das extremidades dos braços abertos, na postura de alongamento e na ocorrência de episódios de congelamento. Além disso, foi notado um aumento significativo na atividade relacionada ao movimento descendente da cabeça, nas doses de 25, 50 e 100 mg/kg do extrato etanólico. O espreitamento (cabeça saindo do braço fechado) e eventos de autolimpeza nos grupos que receberam, especialmente notável na dose de 50 mg/kg mostraram aumento na atividade, em comparação com o grupo tratado com midazolam. Quanto aos parâmetros relacionados à ocorrência de urinar, defecar e queda do labirinto, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos controle (MDZ e VH) e em todas as doses do extrato etanólico, indicando que os comportamentos não foram alterados de forma diferencial entre os grupos tratados.

A atividade ansiolítica do midazolam no teste do labirinto em cruz elevado pode estar associada a uma melhora na atividade locomotora. A redução dos comportamentos ansiosos induzidos pelo midazolam resulta em uma maior disposição do animal para se locomover e explorar o ambiente, o que leva a uma atividade locomotora mais pronunciada (Seibenhener; Wooten, 2015). No entanto, é importante destacar que o aumento na atividade locomotora não necessariamente reflete um efeito estimulante direto do midazolam, mas sim uma consequência da redução da ansiedade e do aumento da confiança do animal em explorar ambientes desconhecidos (Jovita-Farias *et al.*, 2023).

Ao analisar os resultados significativos destacados acima do extrato etanólico de *C. martii*, a presença de comportamentos como movimento descendente da cabeça, espreitamento e eventos de autolimpeza, sugere que a atividade locomotora dos animais foi mantida. Esses comportamentos indicam uma exploração ativa do ambiente pelos animais, demonstrando curiosidade e engajamento com o labirinto (Casarrubea *et al.*, 2015). Embora a redução na ansiedade possa influenciar alguns aspectos do comportamento, como a exploração dos braços abertos do labirinto, a observação desses comportamentos ativos indica que os animais continuam se movimentando e investigando ativamente o ambiente, o que sugere uma atividade locomotora preservada (Costa *et al.*, 2014; Schrader *et al.*, 2018).

Os resultados obtidos têm uma significância farmacológica importante para o extrato etanólico de *C. martii* testado. Ao não demonstrar atividade ansiolítica nem reduzir a atividade locomotora dos animais no teste do labirinto em cruz elevado, revela um perfil comportamental distinto em comparação com o midazolam, um conhecido ansiolítico. Essa distinção sugere que o extrato pode não atuar nos mesmos alvos neurofarmacológicos que o midazolam, ou pode possuir diferentes mecanismos de ação em relação à modulação da ansiedade e da atividade locomotora. Essas informações são valiosas na compreensão dos efeitos comportamentais e farmacológicos do extrato testado e podem orientar pesquisas futuras para elucidar seu mecanismo de ação e potencial terapêutico.

Constatada a relevância farmacológica da espécie *C. martii*, se fez necessário a medida do potencial tóxico. O uso indiscriminado de plantas sem compreensão de sua composição fitoquímica, propriedades farmacológicas e, especialmente, toxicológicas é uma preocupação significativa para a saúde. Portanto, determinar uma concentração segura e não letal para o uso terapêutico é uma etapa crucial neste processo (Farzaei *et al.*, 2020).

O estudo da toxicidade aguda investiga os efeitos que ocorrem após a administração de um agente químico em doses únicas ou múltiplas ao longo de 24 horas. Seu objetivo é avaliar os sintomas imediatos após a exposição a um composto, bem como a relação entre a dose administrada e o efeito letal, expresso pelo parâmetro conhecido como dose letal 50% (DL50). Este teste visa padronizar a potência biológica de extratos, utilizando um parâmetro estatístico que indica a probabilidade de uma dose causar efeito letal em metade da população dos animais submetidos ao estudo (Carvalho *et al.*, 2015; Dorandeu; Lallement, 2003).

Foram realizados experimentos de toxicidade aguda, empregando modelo animal de toxicidade (Tabela 9) por administração subcutânea em uma única dose do extrato etanólico da *C. martii* nas concentrações (5, 50, 300 e 2000 mg/kg), além do veículo (etanol a 10%, v/v). O grupo controle não recebeu nenhum tratamento. No entanto, não foi possível calcular a DL50 para os animais testados, uma vez que nenhum deles apresentou óbito com os tratamentos administrados.

Estudos que abordaram o teste de DL50 com espécies da família Leguminosae não revelaram toxicidade aguda nem mortalidade nos animais testados. A análise da toxicidade dessas espécies demonstrou segurança, pois não

foram observadas alterações comportamentais nos animais e não ocorreram óbitos, tornando inviável a determinação da taxa de (Ateba *et al.*, 2014; Campos *et al.*, 2018; Vieira *et al.*, 2012; Yazbek *et al.*, 2016) . Não foram encontrados estudos clínicos envolvendo espécies *Ctenodon martii* ou o gênero *Ctenodon*.

Neste estudo, a análise dos parâmetros hematológicos revela-se essencial para avaliar o impacto do extrato sobre as células sanguíneas e tecidos formadores de sangue. O hemograma, é uma ferramenta crucial nos estudos de toxicidade, sendo altamente sensível para detectar alterações no sistema hematopoiético induzidas por substâncias tóxicas (Agu *et al.*, 2017).

A contagem de eritrócitos, concentração de hemoglobina e volume corpuscular médio (VCM) são indicadores importantes para diagnosticar e classificar várias doenças, permitindo uma compreensão abrangente dos efeitos diretos do extrato no sistema sanguíneo e a identificação de potenciais riscos à saúde. Essa análise permite detectar alterações nos glóbulos vermelhos, glóbulos brancos e plaquetas, que podem ser causadas pela exposição a agentes tóxicos (Ajeigbe *et al.*, 2013; Lee *et al.*, 2014). A toxicidade hematológica induzida por substâncias químicas pode indicar a presença de leucopenia (diminuição do número de leucócitos), trombocitopenia (diminuição do número de plaquetas) e anemia (diminuição do número de hemácias) (Agu *et al.*, 2017).

Ressaltando a importância da avaliação abrangente da série plaquetária para detectar precocemente possíveis efeitos adversos sobre a hematopoiese. As alterações têm implicações diretas na capacidade de coagulação, afetando a resposta a lesões e hemorragias. Portanto, compreender profundamente tanto os leucócitos quanto as plaquetas são essenciais para uma avaliação precisa do estado hematológico e dos efeitos potenciais de agentes terapêuticos ou tóxicos (Arunsi *et al.*, 2020).

Algumas substâncias têm impactos significativos no funcionamento fisiológico e podem desencadear complicações patológicas. A trombocitopenia, caracterizada pela redução no número de plaquetas, essenciais na coagulação sanguínea, pode resultar em um maior risco de sangramentos e hemorragias, interferindo diretamente na capacidade do organismo de conter e reparar lesões (Arunsi *et al.*, 2020). Por outro lado, a anemia, que se manifesta pela diminuição na quantidade de hemácias ou de hemoglobina, compromete o transporte de oxigênio para os tecidos do corpo,

afetando a função celular e o metabolismo energético (Jorum; Piero, 2016; Iyare; Obaji, 2014).

Após examinar os parâmetros hematológicos mencionados na (Tabela 10), houve reduções significativas apenas no número de hemácias e plaquetas nos machos tratados com a dose de 2000 mg/kg, em comparação com o grupo controle. Já nos grupos de fêmeas da (Tabela 11), não foram observadas diferenças estatisticamente significantes nos parâmetros hematológicos em relação ao grupo controle. Ao término do tratamento agudo, os machos e as fêmeas, em comparação aos grupos controle e veículo não revelaram alterações significativas, e os valores encontrados também não divergiram dos valores de referência estabelecidos na literatura (Arunsi *et al.*, 2020; Lindstrom *et al.*, 2015; Stokol *et al.*, 2021).

Mesmo com redução no número de hemácias e plaquetas (Tabela 10), a análise não atesta a presença de anemia nos animais machos estudados, uma vez que os valores de hematócrito e concentração de hemoglobina permaneceram dentro dos intervalos pré-estabelecidos. A avaliação da anemia requer uma análise detalhada dos parâmetros hematológicos, como o valor globular e o tamanho das hemácias (Kebede *et al.*, 2016; Stokol *et al.*, 2021). Além disso, não foi observada redução nos níveis de VCM, HCM, CHCM e RDW, que refletem a integridade das células vermelhas do sangue, sugerindo que os tratamentos não afetaram sua contagem (Alebachew *et al.*, 2015; Lindstrom *et al.*, 2015; Stokol *et al.*, 2021).

Os leucócitos, incluindo granulócitos, podem ser subdivididos em neutrófilos, eosinófilos, basófilos, monócitos e linfócitos, sendo esses desempenham um papel central na resposta inflamatória e defesa do hospedeiro. Os resultados obtidos ao avaliar essas células, mostrou que não houve alterações significativas nas contagens das células brancas do sangue em comparação ao grupo controle, apontando um mecanismo de defesa do organismo (Jorum; Piero, 2016).

Uma análise adicional significativa diz respeito aos resultados do teste de granuloma, os quais revelaram uma diminuição no peso do baço. Essa observação sugere que o extrato da planta *C. martii* pode exibir uma atividade comparável à dos corticosteroides na modulação do sistema imunológico, atuando como imunossupressor. Essa propriedade potencial pode ser atribuída à capacidade do extrato de regular a resposta imunológica, influenciando a produção e atividade de células do sistema hematopoiético. Esta interação complexa pode explicar a discreta

redução no número de hemácias e plaquetas observada nos experimentos, destacando a importância de compreender os efeitos imunomoduladores de compostos vegetais em diferentes sistemas do corpo.

Os parâmetros bioquímicos desempenham um papel crucial ao fornecer indicadores sobre os processos adaptativos do organismo, permitindo a interpretação do funcionamento de órgãos como fígado, rins, pâncreas, osso e músculos (Rehman *et al.*, 2017). Neste experimento, foram avaliados vários parâmetros bioquímicos (Tabela 12 e 13) em ratos machos e fêmeas, incluindo os níveis de creatinina, albumina, TGO e TGP.

A lesão hepática induzida por drogas tem um impacto significativo na saúde do paciente e na pesquisa de novos tratamentos. As transaminases, conhecidas como TGP e TGO, são marcadores cruciais da função hepática e úteis na detecção de possíveis efeitos tóxicos de medicamentos (Francis *et al.*, 2018). Elevações desses biomarcadores no sangue podem indicar danos nas células do fígado e vazamento dessas enzimas. Ao compararmos os níveis de TGP e TGO com os intervalos de referência estabelecidos em estudos anteriores (Elhamalawy *et al.*, 2022; González *et al.*, 2018) e com o grupo controle, tanto em machos quanto em fêmeas o extrato testado não causou alterações significativas nesses parâmetros.

A dosagem da creatinina sérica e da ureia sanguínea é comumente utilizada como uma abordagem diagnóstica para avaliar a função renal. No contexto deste estudo, a creatinina foi escolhida como marcador renal devido à sua estabilidade nos rins, já que não é reabsorvida nos túbulos renais como a ureia (Rehman *et al.*, 2017). A elevação nos níveis plasmáticos de creatinina pode indicar sobrecarga renal, insuficiência renal aguda ou aumento no catabolismo proteico (Elhamalawy *et al.*, 2022; Hassanen *et al.*, 2022). No entanto, neste experimento, não foram observadas alterações significativas nos níveis de creatinina em machos e fêmeas em comparação com o grupo controle, sugerindo uma possível ausência de danos renais induzidos pelo tratamento experimental.

A dosagem de albumina é um importante marcador de diversas condições de saúde, especialmente relacionadas à função hepática e ao bem-estar geral do organismo (Jaballi *et al.*, 2017). A albumina, uma proteína produzida pelo fígado, desempenha múltiplas funções, incluindo o transporte de substâncias no sangue, a manutenção da pressão osmótica e a regulação do equilíbrio ácido-base. O uso de



certas substâncias pode aumentar a síntese de proteínas no fígado, incluindo a albumina, como parte de um efeito terapêutico ou colateral (Hassanen *et al.*, 2022; Yao *et al.*, 2021).

Os resultados da dosagem de albumina (Tabela 12) mostraram uma diferença estatisticamente significativa apenas no grupo de machos tratados com a dose de 2000 mg/kg, em comparação com o grupo controle. No entanto, no grupo de fêmeas (Tabela 13), não foram observadas diferenças estatísticas em nenhum dos parâmetros bioquímicos testados. É crucial ressaltar que um aumento nos níveis de albumina nem sempre indica uma condição patológica (Elhamalawy *et al.*, 2022). Portanto, quando os níveis de TGO e TGP estão dentro da faixa normal, um aumento nos níveis de albumina no sangue geralmente não é um sinal direto de lesão renal, outros fatores devem ser considerados (Burki *et al.*, 2021; Yao *et al.*, 2021).

É essencial considerar uma abordagem abrangente ao investigar novos compostos, particularmente aqueles com o potencial de afetar o sistema nervoso central. A realização de estudos adicionais é necessária para avaliar seus efeitos neurofisiológicos e comportamentais, bem como as possíveis interações com neurotransmissores e receptores, que podem alterar a resposta biológica de maneiras complexas. A compreensão dos mecanismos moleculares subjacentes, aliada à avaliação da segurança e eficácia terapêutica, é de suma importância para garantir que os compostos investigados não ofereçam apenas benefícios clínicos, mas também apresentem um perfil de risco minimizado. Esses estudos aprofundam a compreensão sobre os impactos de substâncias inéditas no sistema nervoso, fornecendo *insights* que permitem a identificação precoce de efeitos potenciais adversos, além de contribuir para o desenvolvimento de terapias mais seguras, eficazes e direcionadas.

## 7. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos ao longo deste estudo evidenciam a relevância biológica e terapêutica de *Ctenodon martii*, uma planta nativa da Floresta Nacional Contendas do Sincorá. A análise química revelou a presença de metabólitos bioativos, fundamentando as atividades farmacológicas investigadas. Demonstrou-se que o extrato etanólico, suas frações e subfrações apresentam notáveis atividades anti-inflamatória, antinociceptiva em modelo agudo e cicatrizante, com mecanismos de ação que agem significativamente para o tratamento de condições inflamatórias e regenerativas. A atividade anti-inflamatória foi comprovada em modelos experimentais de granuloma, reforçando o potencial terapêutico do extrato em contextos de inflamação crônica. Além disso, os testes indicaram que o extrato não possui atividades ansiolítica e sedativas não comprometendo a atividade locomotora. A capacidade cicatrizante foi evidenciada em modelos de feridas, destacando sua aplicabilidade no estímulo à regeneração tecidual. Por outro lado, os testes toxicológicos revelaram um perfil de segurança promissor em modelos agudos, ampliando a visão do extrato de estudos para subseqüentes. Esses resultados não são apenas avançados para o avanço do conhecimento sobre a biodiversidade brasileira, mas também reforçam a importância da conservação e valorização dos recursos naturais. Ao demonstrar propriedades farmacológicas seguras e eficazes, *Ctenodon martii* surge como uma fonte potencial de compostos bioativos para o desenvolvimento de terapias inovadoras, especialmente em abordagens anti-inflamatórias, analgésicas e cicatrizantes.

## REFERÊNCIAS

- Agatonovic-Kustrin, S., Kustrin, E., & Morton, D. W. (2018). Phenolic acids contribution to antioxidant activities and comparative assessment of phenolic content in mango pulp and peel. *South African Journal of Botany*, 116, 158–163. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2018.03.013>
- Agatonovic-Kustrin, S., Morton, D. W., Mizaton, H. H., & Zakaria, H. (2018). The relationship between major polyphenolic acids and stigmasterol to antioxidant activity in different extracts of *Myrmecodia platytyrea*. *South African Journal of Botany*, 115, 94–99. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.12.011>
- Agnel Arul John, N., & Shobana, G. (2012). Anti-inflammatory activity of *Talinum fruticosum* L. on formalin induced paw edema in albino rats. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, 2(1), 123–127.
- Agu, K., Okolie, N., Eze, I., Anionye, J., & Falodun, A. (2017). Phytochemical analysis, toxicity profile, and hemomodulatory properties of *Annona muricata* (Soursop). *The Egyptian Journal of Haematology*, 42(1), 36. <https://doi.org/10.4103/1110-1067.206431>
- Ajeigbe, K., Enitan, S., Omotoso, D., & Oladokun, O. (2013). Acute effects of aqueous leaf extract of *Aspilia Africana* C.D. adams on some haematological parameters in rats. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 10(5). <https://doi.org/10.4314/ajtcam.v10i5.4>
- Al-Khayri, J. M., Sahana, G. R., Nagella, P., Joseph, B. V., Alessa, F. M., & Al-Mssallem, M. Q. (2022). Flavonoids as Potential Anti-Inflammatory Molecules: A Review. *Molecules*, 27(9), 2901. <https://doi.org/10.3390/molecules27092901>
- Alagbe, A. E., Domingos, I. F., Adekile, A. D., Blotta, M. H. S. L., & Santos, M. N. N. (2022). Anti-inflammatory cytokines in sickle cell disease. *Molecular Biology Reports*, 49(3), 2433–2442. <https://doi.org/10.1007/s11033-021-07009-1>
- Alebachew, M., Kinfu, Y., Makonnen, E., Bekuretsion, Y., Urga, K., & Afework, M. (2015). Toxicological evaluation of methanol leaves extract of *Vernonia bipontini* Vatke in blood, liver and kidney tissues of mice. *African Health Sciences*, 14(4), 1012. <https://doi.org/10.4314/ahs.v14i4.33>
- Alfaro, S., Acuña, V., Ceriani, R., Cavieres, M. F., Weinstein-Opppenheimer, C. R., & Campos-Estrada, C. (2022). Involvement of Inflammation and Its Resolution in Disease and Therapeutics. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(18), 10719. <https://doi.org/10.3390/ijms231810719>
- Alves, C. F.; Alves, V. B.; De Assis, I. P.; Clemente-Napimoga, J. T.; Uber-Bucek, E.; Dal-Secco, D.; Cunha, F. Q.; Rehder, V. L.; Napimoga, M. H. (2009). Anti-inflammatory activity and possible mechanism of extract from *Mikania laevigata* in carrageenan-induced peritonitis. *Journal Pharm Pharmacol*, 61(8), 1097–1104.
- Alves, A. F. (2016). Milonina, alcaloide de *cissampelos sympodialis*

EICHL.(Menispermaceae) inibe inflamação aguda mediada por mastócito. *Centro de ciências da saúde, programa de pós-graduação em produtos naturais e sintéticos bioativos*, 107f.

- Antwi, A. O., Obiri, D. D., Osafo, N., Forkuo, A. D., & Essel, L. B. (2017). Stigmasterol inhibits lipopolysaccharide-induced innate immune responses in murine models. *International Immunopharmacology*, 53, 105–113. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2017.10.018>
- Anywar, G., Kakudidi, E., Byamukama, R., Mukonzo, J., Schubert, A., Oryem-Origa, H., & Jassoy, C. (2021). A Review of the Toxicity and Phytochemistry of Medicinal Plant Species Used by Herbalists in Treating People Living With HIV/AIDS in Uganda. *Frontiers in Pharmacology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.615147>
- Aragão, D. P., da Silva Souza, B., de Brito, T. V., de Araújo Bastos Santana, L., de Paiva Silva, R. M., de Oliveira, A. P., da Cunha Pereira, A. C. T., Ferreira, G. P., dos Reis Barbosa, A. L., & de Oliveira, J. S. (2017). The anti-inflammatory and antinociceptive activity of albumins from *Crotalaria retusa* seeds. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 93, 536–542. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.06.078>
- Arruda, H. S., Araújo, M. V. L., & Marostica Junior, M. R. (2022). Underexploited Brazilian Cerrado fruits as sources of phenolic compounds for diseases management: A review. *Food Chemistry: Molecular Sciences*, 5, 100148. <https://doi.org/10.1016/j.fochms.2022.100148>
- Arunsi, U. O., Chinyere, G. C., Ngwogu, K. O., Ngwogu, A. C., Atasie, O. C., Oti, U. A., Akujuobi, J. K., Udeogu, C., & Ibe, C. (2020). Evaluation of the biochemical, haematological and histopathological parameters of female Wistar rats fed with aqueous and ethanol extracts of *Aspilia africana* leaves. *Journal of Herbmed Pharmacology*, 9(3), 257–267. <https://doi.org/10.34172/jhp.2020.33>
- Asif, M. (2014). Role of Omega-3 Polyunsaturated fatty acids in Inflammation and rheumatoid arthritis disorders. *International Journal of Applied Sciences and Biotechnology*, 2(1). <https://doi.org/10.3126/ijasbt.v2i1.9783>
- Ateba, S. B., Simo, R. V., Mbanya, J. C., Krenn, L., & Njamen, D. (2014). Safety profile and gender specific differences of a methanol extract of *Eriosema laurentii* (Leguminosae) in acute and subchronic (28 days) oral toxicity studies in Wistar rats. *Food and Chemical Toxicology*, 65, 27–32. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.12.016>
- Bailey, P. J., Sturm, A., & Lopez-Ramos, B. (1982). A biochemical study of the cotton pellet granuloma in the rat. *Biochemical Pharmacology*, 31(7), 1213–1218. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(82\)90006-5](https://doi.org/10.1016/0006-2952(82)90006-5)
- Baliki, M. N., & Apkarian, A. V. (2015). Nociception, Pain, Negative Moods, and Behavior Selection. *Neuron*, 87(3), 474–491. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2015.06.005>
- Barbosa, A. G. R., da Silva, L. Y. S., Pessoa, R. T., Neto, L. J. de L., da Costa, R. H.

- S., Martins, A. O. P. B. B., de Oliveira, M. R. C., da Silva, C. P., Coutinho, H. D. M., Quintans, L. J., & de Menezes, I. R. A. (2023). Screening of the action mechanisms involved in the antinociceptive effect of isopulegol and its complex in cyclodextrin using acute nociception models in mice. *Carbohydrate Polymer Technologies and Applications*, 6, 100383. <https://doi.org/10.1016/j.carpta.2023.100383>
- Barbosa, A. G. R., Tintino, C. D. M. O., Pessoa, R. T., de Lacerda Neto, L. J., Martins, A. O. B. P. B., de Oliveira, M. R. C., Coutinho, H. D. M., Cruz-Martins, N., Quintans Junior, L. J., Wilairatana, P., & de Menezes, I. R. A. (2022). Anti-inflammatory and antinociceptive effect of *Hyptis martiusii* BENTH leaves essential oil. *Biotechnology Reports*, 35, e00756. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2022.e00756>
- Baron, J. M., Glatz, M., & Proksch, E. (2020). Optimal Support of Wound Healing: New Insights. *Dermatology*, 236(6), 593–600. <https://doi.org/10.1159/000505291>
- Basbaum, A. I., Bautista, D. M., Scherrer, G., & Julius, D. (2010). Cellular and Molecular Mechanisms of Pain. *Cell*, 139(2), 267–284. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.09.028>
- Bellocchi, C., Carandina, A., Montinaro, B., Targetti, E., Furlan, L., Rodrigues, G. D., Tobaldini, E., & Montano, N. (2022). The Interplay between Autonomic Nervous System and Inflammation across Systemic Autoimmune Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(5), 2449. <https://doi.org/10.3390/ijms23052449>
- Berta, T., Park, C.-K., Xu, Z.-Z., Xie, R.-G., Liu, T., Lü, N., Liu, Y.-C., & Ji, R.-R. (2014). Extracellular caspase-6 drives murine inflammatory pain via microglial TNF- $\alpha$  secretion. *Journal of Clinical Investigation*, 124(3), 1173–1186. <https://doi.org/10.1172/JCI72230>
- Bordon, K. de C. F., Cologna, C. T., Fornari-Baldo, E. C., Pinheiro-Júnior, E. L., Cerni, F. A., Amorim, F. G., Anjolette, F. A. P., Cordeiro, F. A., Wiesel, G. A., Cardoso, I. A., Ferreira, I. G., Oliveira, I. S. de, Boldrini-França, J., Pucca, M. B., Baldo, M. A., & Arantes, E. C. (2020). From Animal Poisons and Venoms to Medicines: Achievements, Challenges and Perspectives in Drug Discovery. *Frontiers in Pharmacology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.01132>
- Borsook, D., Edwards, R., Elman, I., Becerra, L., & Levine, J. (2013). Pain and analgesia: The value of salience circuits. *Progress in Neurobiology*, 104, 93–105. <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2013.02.003>
- Brasil, D. O. da U. (2006). *Decreto n. 5.813, de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências*. Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF. [https://doi.org///bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2006/prt971\\_22\\_06\\_2006.html](https://doi.org///bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2006/prt971_22_06_2006.html)
- Bridi, H., Dischkaln Stolz, E., Maikon Corrêa de Barros, F., Elingson da Silva Costa, B., Guerini, L., Maris Kuze Rates, S., & Lino von Poser, G. (2018).

- Antinociceptive Activity of Phloroglucinol Derivatives Isolated from Southern Brazilian *Hypericum* Species. *Chemistry & Biodiversity*, 6(2), 01–22. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201800266>
- Brossi, A. (1988). The Alkaloids: Chemistry and Physiology. *Academic Press Inc*, 32, 454.
- Buckle, J. (2015). Pain and Inflammation Clinical Aromatherapy. *Third Edition*, 117, 195–222. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-7020-5440-2.00010-3>
- Burki, S., Burki, Z. G., Asghar, M. A., Ali, I., & Zafar, S. (2021). Phytochemical, acute toxicity and renal protective appraisal of *Ajuga parviflora* hydromethanolic leaf extract against CCl<sub>4</sub> induced renal injury in rats. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 21(1), 198. <https://doi.org/10.1186/s12906-021-03360-9>
- Burn, G. L., Foti, A., Marsman, G., Patel, D. F., & Zychlinsky, A. (2021). The Neutrophil. *Immunity*, 54(7), 1377–1391. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.06.006>
- Caesar, L. K., & Cech, N. B. (2019). Synergy and antagonism in natural product extracts: when 1 + 1 does not equal 2. *Natural Product Reports*, 36(6), 869–888. <https://doi.org/10.1039/C9NP00011A>
- Cai, H.-Y., Fu, X.-X., Jiang, H., & Han, S. (2021). Adjusting vascular permeability, leukocyte infiltration, and microglial cell activation to rescue dopaminergic neurons in rodent models of Parkinson's disease. *npj Parkinson's Disease*, 7(1), 91. <https://doi.org/10.1038/s41531-021-00233-3>
- CAMPBELL, D. E. S.; RICHTER, R. W. (1967). Determination of the acute toxicity and of the median LD<sub>50</sub> dose. *Acta Pharmacol Toxicol*, 25(1), 345–363.
- Campelo, A. P. B. S., Campelo, M. W. S., Britto, G. A. de C., Ayala, A. P., Guimarães, S. B., & Vasconcelos, P. R. L. de. (2011). An optimized animal model for partial and total skin thickness burns studies. *Acta Cirurgica Brasileira*, 26(suppl 1), 38–42. <https://doi.org/10.1590/S0102-86502011000700008>
- Campos, J. K. L., Araújo, T. F. da S., Brito, T. G. da S., Silva, A. P. S. da, Cunha, R. X. da, Martins, M. B., Silva, N. H. da, Santos, B. S. dos, Silva, C. A. da, & Lima, V. L. de M. (2018). *Indigofera suffruticosa* Mill. (Anil): Plant Profile, Phytochemistry, and Pharmacology Review. *Advances in Pharmacological Sciences*, 1–6. <https://doi.org/10.1155/2018/8168526>
- Cano, M. L., Dueñas, V. F., Llebaria, A., & Ciruela, F. (2017). Formalin Murine Model of Pain. *BIO-PROTOCOL*, 7(23). <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2628>
- Capucetti, A., Albano, F., & Bonecchi, R. (2020). Multiple Roles for Chemokines in Neutrophil Biology. *Frontiers in Immunology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.01259>
- Cardoso, D. B. O. S., Moraes, P. L. R. de, & Lima, H. C. de; (2020). Uma filogenia molecular da leguminosa papilionóide pantropical *Aeschynomene* apóia o

- restabelecimento do gênero ecológica e morfologicamente coerente *Ctenodon*. *Neodiversidade*, 13, 1–38.  
<https://doi.org/powwo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:77215957-1>
- Cardoso, D., Mattos, C., Filardi, F., Delgado-Salinas, A., Lavin, M., Moraes, P., Tapia-Pastrana, F., & Lima, H. (2020). A molecular phylogeny of the pantropical papilionoid legume *Aeschynomene* supports reinstating the ecologically and morphologically coherent genus *Ctenodon*. *Neodiversity*, 13(1), 1–38.  
<https://doi.org/10.13102/neod.131.1>
- Carvalho, A. M. S., Heimfarth, L., Santos, K. A., Guimarães, A. G., Picot, L., Almeida, J. R. G. S., Quintans, J. S. S., & Quintans-Júnior, L. J. (2019). Terpenes as possible drugs for the mitigation of arthritic symptoms – A systematic review. *Phytomedicine*, 57, 137–147. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2018.10.028>
- Carvalho, C. de, Akisue, G., Santos, M. R. da S., & Corrêa, É. F. de O. (2015). SCREENING HIPOCRÁTICO DE RATOS TRATADOS COM EXTRATO HIDROETANÓLICO DE *Solanum auriculatum* AITON. *Revista Panorâmica*, 18, 15–25.
- Carvalho, M. T. B., Araújo-Filho, H. G., Barreto, A. S., Quintans-Júnior, L. J., Quintans, J. S. S., & Barreto, R. S. S. (2021). Wound healing properties of flavonoids: A systematic review highlighting the mechanisms of action. *Phytomedicine*, 90, 153636. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2021.153636>
- Casarrubea, M., Faulisi, F., Sorbera, F., & Crescimanno, G. (2015). The effects of different basal levels of anxiety on the behavioral shift analyzed in the central platform of the elevated plus maze. *Behavioural Brain Research*, 281, 55–61. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.12.021>
- Cavalcante, F. S., & Scudeller, V. V. (2022). A etnobotânica e sua relação com a sustentabilidade ambiental. *Revista Valore*, 7. <https://doi.org/10.22408/rev7020221065e-7050>
- Celeghini, R. M. S., Vilegas, J. H. Y., & Lancas, F. M. (2001). Extraction and quantitative HPLC analysis of coumarin in hydroalcoholic extracts of *Mikania glomerata* Spreng (“guaco”) leaves. *Journal of Brazilian Chemical Society*, 12, 706–709.
- Cerqueira, S. R. P. (2017). OS ÁCIDOS GORDOS ÔMEGA-3 E OS SEUS EFEITOS ANTI-INFLAMATÓRIOS. *Tese de Doutorado*, 83.
- Cervera, A. H., Soehnlein, O., & Kenne, E. (2022). Neutrophils in chronic inflammatory diseases. *Cellular & Molecular Immunology*, 19(2), 177–191. <https://doi.org/10.1038/s41423-021-00832-3>
- Chahardehi, A., Arsad Modarresi, H., & Lim, V. (2020). Zebrafish as a Successful Animal Model for Screening Toxicity of Medicinal Plants. *Plants*, 9(10), 1345. <https://doi.org/10.3390/plants9101345>
- Chatow, L., Nudel, A., Eyal, N., Lupo, T., Ramirez, S., Zelinger, E., Nesher, I., &

- Boxer, R. (2024). Terpenes and cannabidiol against human corona and influenza viruses—Anti-inflammatory and antiviral in vitro evaluation. *Biotechnology Reports*, 41, e00829. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2024.e00829>
- Chen, O., Donnelly, C. R., & Ji, R.-R. (2020). Regulation of pain by neuro-immune interactions between macrophages and nociceptor sensory neurons. *Current Opinion in Neurobiology*, 62, 17–25. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2019.11.006>
- Chen, W.-H., Chen, C.-H., Hsu, M.-C., Chang, R.-W., Wang, C.-H., & Lee, T.-S. (2024). Advances in the molecular mechanisms of statins in regulating endothelial nitric oxide bioavailability: Interlocking biology between eNOS activity and L-arginine metabolism. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 171, 116192. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2024.116192>
- Chen, X., Yuan, S., Mi, L., Long, Y., & He, H. (2023). Pannexin1: insight into inflammatory conditions and its potential involvement in multiple organ dysfunction syndrome. *Frontiers in Immunology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1217366>
- Chlif, N., Bouymajane, A., Oulad El Majdoub, Y., Diouri, M., Rhazi Filali, F., Bentayeb, A., Altemimi, A. B., Mondello, L., & Cacciola, F. (2022). Phenolic compounds, in vivo anti-inflammatory, analgesic and antipyretic activities of the aqueous extracts from fresh and dry aerial parts of *Brocchia cinerea* (Vis.). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 213, 114695. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2022.114695>
- Choi, I.-S. (2024). Characterization of the plastid and mitochondrial genomes of *Aeschynomene indica* (Fabaceae). *Journal of Asia-Pacific Biodiversity*. <https://doi.org/10.1016/j.japb.2024.05.001>
- Chopra, B., & Dhingra, A. K. (2021). Natural products: A lead for drug discovery and development. *Phytotherapy Research*, 35(9), 4660–4702. <https://doi.org/10.1002/ptr.7099>
- Chu, C., Artis, D., & Chiu, I. M. (2020). Neuro-immune Interactions in the Tissues. *Immunity*, 52(3), 464–474. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2020.02.017>
- Chung, H.-J., Lee, H.-S., Shin, J.-S., Lee, S.-H., Park, B.-M., Youn, Y.-S., & Lee, S. K. (2010). Modulation of acute and chronic inflammatory processes by a traditional medicine preparation GCSB-5 both in vitro and in vivo animal models. *Journal of Ethnopharmacology*, 130(3), 450–459. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2010.05.020>
- Coaccioli, S., Sarzi-Puttini, P., Fornasari, D. M. M., Schweiger, V., Zis, P., Viswanath, O., & Varrassi, G. (2024). Immune Competence and Pain: A Narrative Review. *Current Pain and Headache Reports*. <https://doi.org/10.1007/s11916-024-01282-y>
- Coghill, R. C. (2020). The Distributed Nociceptive System: A Framework for Understanding Pain. *Trends in Neurosciences*, 43(10), 780–794. <https://doi.org/10.1016/j.tins.2020.07.004>



- Collier, H. O. J., Dinneen, L. C., Johnson, C. A., & Schneider, C. (1968). THE abdominal constriction response and its suppression by analgesic drugs in the mouse. *British Journal of Pharmacology and Chemotherapy*, 32(2), 295–310. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1968.tb00973.x>
- Coop, C. A., Barker, K., Dickson, S., Baker, T., & Waibel, K. (2019). The Glycerin Associated Pain (GAP) study. *Annals of Allergy, Asthma & Immunology*, 122(2), 205–207. <https://doi.org/10.1016/J.ANAI.2018.11.011>
- Copetti, D. (2016). ESTUDO DA CASCA DA RAIZ DA ESPÉCIE *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek, MODIFICAÇÕES ESTRUTURAIS DO COMPOSTO  $\beta$ -SITOSTEROL E ANÁLISES DAS ATIVIDADES ANTIMICROBIANAS. *Dissertação (Mestrado) - PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA*, 95.
- Costa, A. A., Morato, S., Roque, A. C., & Tinós, R. (2014). A computational model for exploratory activity of rats with different anxiety levels in elevated plus-maze. *Journal of Neuroscience Methods*, 236, 44–50. <https://doi.org/10.1016/j.jneumeth.2014.08.006>
- Costa, A. F. (2001). Farmacognosia: farmacognosia experimental. *Fundação Calouste Gulbenkian*, 992.
- Costa Ferreira, E., Anselmo, M. da G. V., Guerra, N. M., Marques de Lucena, C., Felix, C. do M. P., Bussmann, R. W., Paniagua-Zambrana, N. Y., & Paiva de Lucena, R. F. (2021). Local Knowledge and Use of Medicinal Plants in a Rural Community in the Agreste of Paraíba, Northeast Brazil. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, (1)–16. <https://doi.org/10.1155/2021/9944357>
- Cronan, M. R. (2022). In the Thick of It: Formation of the Tuberculous Granuloma and Its Effects on Host and Therapeutic Responses. *Frontiers in Immunology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.820134>
- Cruz, F. F., Horta, L. F. B., Maia, L. de A., Lopes-Pacheco, M., Silva, A. B. da, Morales, M. M., Gonçalves-de-Albuquerque, C. F., Takiya, C. M., de Castro-Faria-Neto, H. C., & Rocco, P. R. M. (2016). Dasatinib Reduces Lung Inflammation and Fibrosis in Acute Experimental Silicosis. *PLOS ONE*, 11(1), e0147005. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0147005>
- CRUZ, M. P. (2013). Isolamento e identificação de compostos bioativos de *Mimosa hostilis* Benth. *Tese (Doutorado) – Instituto de Química. Universidade Federal da Bahia*, 207f.
- Cuong, D. V., Hanh, T. T. H., Cuong, N. X., Huong, P. T. M., Huong, N. T., & Quang, T. H. (2024). Caffeoylquinic acid esters, lignans and flavones from *Yua thomsonii* with cytotoxic and nitric oxide inhibitory activities. *Natural Product Research*, 1–10. <https://doi.org/10.1080/14786419.2024.2344198>
- Debele, T. A., Mekuria, S. L., & Tsai, H.-C. (2017). Synthesis and characterization of redox-sensitive heparin- $\beta$ -sitosterol micelles: Their application as carriers for the pharmaceutical agent, doxorubicin, and investigation of their antimetastatic

- activities in vitro. *Materials Science and Engineering: C*, 75, 1326–1338. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.03.052>
- Del Gaudio, M. P., Kraus, S. I., Melzer, T. M., Bustos, P. S., & Ortega, M. G. (2023). Antinociceptive effect and identification of berberine alkaloid in *Berberis ruscifolia* extracts. *Journal of Ethnopharmacology*, 305, 116066. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.116066>
- Dietrich, S. J., Fass, M. I., Jacobo, P. V., Sobarzo, C. M. A., Lustig, L., & Theas, M. S. (2015). Inhibition of NOS-NO system prevents autoimmune orchitis development in rats: Relevance of NO released by testicular macrophages in germ cell apoptosis and testosterone secretion. *PLoS ONE*, 10(6), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0128709>
- Ding, D., Mou, D., Zhao, L., Jiang, X., Che, L., Fang, Z., Xu, S., Lin, Y., Zhuo, Y., Li, J., Huang, C., Zou, Y., Li, L., Wu, D., & Feng, B. (2021). Maternal organic selenium supplementation alleviates LPS induced inflammation, autophagy and ER stress in the thymus and spleen of offspring piglets by improving the expression of selenoproteins. *Food & Function*, 12(22), 11214–11228. <https://doi.org/10.1039/D1FO01653A>
- Domingues, H. A., Antunes, L. L. C., Rossi, M. L., Martinelli, A. P., & da Luz, C. F. P. (2022). An update to the palynotaxonomy of the Brazilian species of *Aeschynomene sensu stricto* and the recently circumscribed genus *Ctenodon* (Leguminosae – Papilionoideae – Dalbergieae). *Grana*, 61(5), 321–348. <https://doi.org/10.1080/00173134.2022.2126727>
- Donnelly, C. R., Andriessen, A. S., Chen, G., Wang, K., Jiang, C., Maixner, W., & Ji, R.-R. (2020). Central Nervous System Targets: Glial Cell Mechanisms in Chronic Pain. *Neurotherapeutics*, 17(3), 846–860. <https://doi.org/10.1007/s13311-020-00905-7>
- Dorandeu, F., & Lallement, G. (2003). [Are acute toxicity testing and the three Rs rule reconcilable? Example of the lethal dose 50 determination]. *Annales pharmaceutiques francaises*, 61(6), 399–411. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14639192>
- Drehmer, D., Mesquita Luiz, J. P., Hernandez, C. A. S., Alves-Filho, J. C., Hussell, T., Townsend, P. A., & Moncada, S. (2022). Nitric oxide favours tumour-promoting inflammation through mitochondria-dependent and -independent actions on macrophages. *Redox Biology*, 54, 102350. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2022.102350>
- Du, J., Filipović, M. R., Wagner, B. A., & Buettner, G. R. (2023). Ascorbate mediates the non-enzymatic reduction of nitrite to nitric oxide. *Advances in Redox Research*, 9, 100079. <https://doi.org/10.1016/j.arres.2023.100079>
- Dua, K., Malipeddi, V. R., Madan, J., Gupta, G., Chakravarthi, S., Awasthi, R., Kikuchi, I. S., & De Jesus Andreoli Pinto, T. (2016). Norfloxacin and metronidazole topical formulations for effective treatment of bacterial infections and burn wounds. *Interventional Medicine and Applied Science*, 8(2), 68–76.

<https://doi.org/10.1556/1646.8.2016.2.4>

- Duarte, J. C., Cruz, M. P., S. Filho, A. O., Silva, F. G., Santos, H. C. R., Silva, N. R. A., Marques, L. M., & Yatsuda, R. (2008). Estudo etnofarmacológico e etnobotânico das plantas medicinais na região do semi-árido da Bahia. *In: XX Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil e X International Congress o Ethnopharmacology, São Paulo.*, 248.
- Dutra, R. C., Leite, M. N., & Barbosa, N. R. (2018). Quantification of phenolic constituents and antioxidant activity of *Pterodon emarginatus* vogel seeds. *International Journal of Molecular Sciences*, 9(4), 606–614. <https://doi.org/10.3390/ijms9040606>
- Dutra, R. C., Simão da Silva, K. A. B., Bento, A. F., Marcon, R., Paszcuk, A. F., Meotti, F. C., Pianowski, L. F., & Calixto, J. B. (2012). Euphol, a tetracyclic triterpene produces antinociceptive effects in inflammatory and neuropathic pain: The involvement of cannabinoid system. *Neuropharmacology*, 63(4), 593–605. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2012.05.008>
- Edinoff, A. N., Nix, C. A., Hollier, J., Sagrera, C. E., Delacroix, B. M., Abubakar, T., Cornett, E. M., Kaye, A. M., & Kaye, A. D. (2021). Benzodiazepines: Uses, Dangers, and Clinical Considerations. *Neurology International*, 13(4), 594–607. <https://doi.org/10.3390/neurolint13040059>
- Elhamalawy, O. H., Al-Anany, F. S., & El Makawy, A. I. (2022). Thiamethoxam-induced hematological, biochemical, and genetic alterations and the ameliorated effect of *Moringa oleifera* in male mice. *Toxicology Reports*, 9, 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2021.12.012>
- Eltrabily, M. G., Martínez-Lorenzana, G., González-Hernández, A., & Condés-Lara, M. (2021). Cortical Modulation of Nociception. *Neuroscience*, 458, 256–270. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2021.01.001>
- Erhirhie, E. O., Ihekwereme, C. P., & Ilodigwe, E. E. (2018). Advances in acute toxicity testing: strengths, weaknesses and regulatory acceptance. *Interdisciplinary Toxicology*, 11(1), 5–12. <https://doi.org/10.2478/intox-2018-0001>
- Eze, F. I., Uzor, P. F., Ikechukwu, P., Obi, B. C., & Osadebe, P. O. (2019). In vitro and In vivo Models for Anti-inflammation: An Evaluative Review. *INNOSC Theranostics and Pharmacological Sciences*, 2(2), 3–15. <https://doi.org/10.36922/itps.v2i2.775>
- Fang, Y., Lu, Y., Zang, X., Wu, T., Qi, X., Pan, S., & Xu, X. (2016). 3D-QSAR and docking studies of flavonoids as potent *Escherichia coli* inhibitors. *Scientific Reports*, 6(1), 23634. <https://doi.org/10.1038/srep23634>
- Farzaei, M. H., Bayrami, Z., Farzaei, F., Aneva, I., Das, S. K., Patra, J. K., Das, G., & Abdollahi, M. (2020). Poisoning by Medical Plants. *Archives of Iranian medicine*, 23(2), 117–127. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32061075>
- Ferreira, A. L. de S., Pasa, M. C., & Nunez, C. V. (2020). A etnobotânica e o uso de

- plantas medicinais na Comunidade Barreirinho, Santo Antônio de Leverger, Mato Grosso, Brasil. *Interações (Campo Grande)*, 817–830. <https://doi.org/10.20435/inter.v21i4.1924>
- Fiore, N. T., Debs, S. R., Hayes, J. P., Duffy, S. S., & Moalem-Taylor, G. (2023). Pain-resolving immune mechanisms in neuropathic pain. *Nature Reviews Neurology*. <https://doi.org/10.1038/s41582-023-00777-3>
- Fisher, R., & Clarkson, E. (2024). Medication Management of Neuropathic Pain Disorders. *Dental Clinics of North America*, 68(1), 121–131. <https://doi.org/10.1016/j.cden.2023.07.010>
- Food Safety Commission of Japan. (2018). Dexamethasone (Veterinary medicinal products). In *Food safety (Tokyo, Japan)* (Vol. 6, Número 3). <https://doi.org/10.14252/foodsafetyfscj.2018005s>
- Francis, B., Clarke, J. I., Walker, L. E., Brilliant, N., Jorgensen, A. L., Kevin Park, B., Pirmohamed, M., & Antoine, D. J. (2018). WITHDRAWN: Reference intervals for putative biomarkers of drug-induced liver injury and liver regeneration in healthy human volunteers. *Journal of Hepatology*. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2018.04.024>
- Frey, V. (1896). Abhandlungen der Königliche Sächsische. *Gesellschaft der Wissenschaften*, 23, 188.
- Gabbia, D., Pozzo, L., Zigiutto, G., Roverso, M., Sacchi, D., Dalla Pozza, A., Carrara, M., Bogialli, S., Floreani, A., Guido, M., & De Martin, S. (2018). Dexamethasone counteracts hepatic inflammation and oxidative stress in cholestatic rats via CAR activation. *PLOS ONE*, 13(9), e0204336. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204336>
- Gamberini, M. T., Rodrigues, D. S., Rodrigues, D., & Pontes, V. B. (2015). Effects of the aqueous extract of *Pimpinella anisum* L. seeds on exploratory activity and emotional behavior in rats using the open field and elevated plus maze tests. *Journal of Ethnopharmacology*, 168, 45–49. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.03.053>
- Ganesan, N., Ronsmans, S., Vanoirbeek, J., & Hoet, P. H. M. (2022). Assessment of Experimental Techniques That Facilitate Human Granuloma Formation in an In Vitro System: A Systematic Review. *Cells*, 11(5), 864. <https://doi.org/10.3390/cells11050864>
- Garros, I. D. C., Campos, A. C. L., Tâmbara, E. M., Tenório, S. B., Torres, J. M., Agulham, M. Â., Cezar, A., Araújo, F., Santis-isolan, P. M. B., Oliveira, R. M. De, Cristina, E., & Arruda, D. M. (2006). Extrato de *passiflora edulis* na cicatrização de feridas cutâneas abertas em ratos: estudo morfológico e histológico. *Acta Cirúrgica Brasileira*, 21(Suplemento 3), 55–65. <https://doi.org/10.1590/S0102-86502006000900009>
- Gatis-Carrazzoni, A. S. S. G., Mota, F. V. B., Leite, T. C. C., de Oliveira, T. B., da Silva, S. C., Bastos, I. V. A., de Souza Maia, M. B., Pereira, P. S., Neto, P. P. M.,

- de Oliveira Chagas, E. C., Silva, T. M. S., do Nascimento, M. S., & da Silva, T. G. (2018). Anti-inflammatory and antinociceptive activities of the leaf methanol extract of *Miconia minutiflora* (Bonpl.) DC. and characterization of compounds by UPLC-DAD-QTOF-MS/MS. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. <https://doi.org/10.1007/s00210-018-1561-x>
- Giraldez, M. D., Carneros, D., Garbers, C., Rose-John, S., & Bustos, M. (2021). New insights into IL-6 family cytokines in metabolism, hepatology and gastroenterology. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 18(11), 787–803. <https://doi.org/10.1038/s41575-021-00473-x>
- Gomes, C. S., Campos, A. C. L., Jorge, O., Torres, M., De, P. R. L., Tereza, A., Moreira, R., Tenório, S. B., Tâmbara, E. M., & Sakata, K. (2006). Efeito do extrato de *passiflora edulis* na cicatrização da parede abdominal de ratos: estudo morfológico e tensiométrico. *Acta Cirurgica Brasileira*, 21(Suplemento 2), 9–16.
- Gonçalves, G. M., Marinho, D. G., Almança, C. C. J., & Bruno Guimarães Marinho. (2013). Anti-nociceptive and anti-oedematogenic properties of the hydroethanolic extract of *Sidastrum micranthum* leaves in mice. *REvista Brasileira de Farmacologia*, 23, 836–843.
- Gonçalves, R. N., Noll Gonçalves, J. R. da S., Buffon, M. da C. M., Negrelle, R. R. B., & Rattmann, Y. D. (2022). Plantas medicinais na atenção primária à saúde: riscos, toxicidade e potencial para interação medicamentosa. *Revista de APS*, 25(1). <https://doi.org/10.34019/1809-8363.2022.v25.16611>
- González Delgado, M. F., González Zamora, A., Gonsebatt, M. E., Meza Mata, E., García Vargas, G. G., Calleros Rincón, E. Y., & Pérez Morales, R. (2018). Subacute intoxication with sodium nitrate induces hematological and biochemical alterations and liver injury in male Wistar rats. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 166, 48–55. <https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2018.09.060>
- GRAINGER, D. W. (2013). All charged up about implanted biomaterials. *Nature Biotechnology*, 31(6), 507–509.
- Grammatikos, A., & Gennery, A. R. (2024). Inflammatory Complications in Chronic Granulomatous Disease. *Journal of Clinical Medicine*, 13(4), 1092. <https://doi.org/10.3390/jcm13041092>
- Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S., & Tannenbaum, S. R. (1982). Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. *Analytical Biochemistry*, 126(1), 131–138. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(82\)90118-X](https://doi.org/10.1016/0003-2697(82)90118-X)
- Guarnizo, L. V. M., Monroy-Camacho, P. S., Turizo-Smith, A. D., & Rodríguez-García, J. A. (2023). The role of immune checkpoints in antitumor response: a potential antitumor immunotherapy. *Frontiers in Immunology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1298571>
- Guo, F., Du, Y., Qu, F.-H., Lin, S.-D., Chen, Z., & Zhang, S.-H. (2022). Dissecting the

- Neural Circuitry for Pain Modulation and Chronic Pain: Insights from Optogenetics. *Neuroscience Bulletin*, 38(4), 440–452.  
<https://doi.org/10.1007/s12264-022-00835-8>
- Guo, M., Lv, H., Chen, H., Dong, S., Zhang, J., Liu, W., He, L., Ma, Y., Yu, H., Chen, S., & Luo, H. (2023). Strategies on biosynthesis and production of bioactive compounds in medicinal plants. *Chinese Herbal Medicines*.  
<https://doi.org/10.1016/J.CHMED.2023.01.007>
- Guo, Q., Jin, Y., Chen, X., Ye, X., Shen, X., Lin, M., Zeng, C., Zhou, T., & Zhang, J. (2024). NF- $\kappa$ B in biology and targeted therapy: new insights and translational implications. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 9(1), 53.  
<https://doi.org/10.1038/s41392-024-01757-9>
- Gupta, A. K., Parasar, D., Sagar, A., Choudhary, V., Chopra, B. S., Garg, R., Ashish, & Khatri, N. (2015). Analgesic and Anti-Inflammatory Properties of Gelsolin in Acetic Acid Induced Writhing, Tail Immersion and Carrageenan Induced Paw Edema in Mice. *PLOS ONE*, 10(8), e0135558.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0135558>
- Gutierrez, J.-J. G., Lau, E., Dharmapalan, S., Parker, M., Chen, Y., Álvarez, M. A., & Wang, D. (2024). Multi-output prediction of dose–response curves enables drug repositioning and biomarker discovery. *npj Precision Oncology*, 8(1), 209.  
<https://doi.org/10.1038/s41698-024-00691-x>
- H Jorum, O., & M Piero, N. (2016). Haematological Effects of Dichloromethane-Methanolic Leaf Extracts of *Carissa edulis* (Forssk.) Vahl in Normal Rat Models. *Journal of Hematology & Thromboembolic Diseases*, 04(01).  
<https://doi.org/10.4172/2329-8790.1000232>
- Han, G., & Ceilley, R. (2017). Chronic Wound Healing: A Review of Current Management and Treatments. *Advances in Therapy*, 34(3), 599–610.  
<https://doi.org/10.1007/s12325-017-0478-y>
- Handzlik, A. M., Bystrzycka, W., Cieloch, A., Glodkowska-Mrowka, E., Jankowska-Steifer, E., Heropolitanska-Pliszka, E., Skrobot, A., Muchowicz, A., Ciepiela, O., Wachowska, M., & Demkow, U. (2020). Nitric oxide and peroxynitrite trigger and enhance release of neutrophil extracellular traps. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 77(15), 3059–3075. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03331-x>
- Hassanen, E. I., Hussien, A. M., Mehanna, S., Ibrahim, M. A., & Hassan, N. H. (2022). Comparative assessment on the probable mechanisms underlying the hepatorenal toxicity of commercial imidacloprid and hexaflumuron formulations in rats. *Environmental Science and Pollution Research*, 29(19), 29091–29104.  
<https://doi.org/10.1007/s11356-021-18486-z>
- Haydinger, C. D., Ferreira, L. B., Williams, K. A., & Smith, J. R. (2023). Mechanisms of macular edema. *Frontiers in Medicine*, 10.  
<https://doi.org/10.3389/fmed.2023.1128811>
- Hazim, A. I., Ramanathan, S., Parthasarathy, S., Muzaimi, M., & Mansor, S. M.

- (2014). Anxiolytic-like effects of mitragynine in the open-field and elevated plus-maze tests in rats. *The Journal of Physiological Sciences*, 64(3), 161–169. <https://doi.org/10.1007/s12576-014-0304-0>
- Hilton, J. R., Simpson, S. R., Sherman, E. R., Raby-Smith, W., Azvine, K., Arribas, M., Zou, J., Deiana, S., Hengerer, B., & Cahill, E. N. (2023). Reactivity to conditioned threat cues is distinct from exploratory drive in the elevated plus maze. *European Journal of Neuroscience*, 57(1), 54–63. <https://doi.org/10.1111/ejn.15870>
- Horner, E., Lord, J. M., & Hazeldine, J. (2023). The immune suppressive properties of damage associated molecular patterns in the setting of sterile traumatic injury. *Frontiers in Immunology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1239683>
- Hoysrijan, B., & Sirikulkajorn, A. (2023). Colorimetric and fluorogenic detection of nitrite anion in water and food based on Griess reaction of fluorene derivatives. *Journal of Food Composition and Analysis*, 117(10), 105123. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2022.105123>
- Huang, M., Lu, J.-J., Huang, M.-Q., Bao, J.-L., Chen, X.-P., & Wang, Y.-T. (2012). Terpenoids: natural products for cancer therapy. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 21(12), 1801–1818. <https://doi.org/10.1517/13543784.2012.727395>
- Huang, Y., Tao, M., Li, R., Liang, F., Xu, T., Zhong, Q., Yuan, Y., Wu, T., Pan, S., & Xu, X. (2023). Identification of key phenolic compounds for alleviating gouty inflammation in edible chrysanthemums based on spectrum-effect relationship analyses. *Food Chemistry: X*, 20, 100897. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2023.100897>
- Hui, W., Yu, D., Cao, Z., & Zhao, X. (2019). Butyrate inhibit collagen-induced arthritis via Treg/IL-10/Th17 axis. *International Immunopharmacology*, 68, 226–233. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2019.01.018>
- Hussein, S. Z., Mohd Yusoff, K., Makpol, S., & Mohd Yusof, Y. A. (2013). Gelam Honey Attenuates Carrageenan-Induced Rat Paw Inflammation via NF- $\kappa$ B Pathway. *PLoS ONE*, 8(8), e72365. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072365>
- IASP. (1994). Classification of chronic pain: descriptors of chronic pain syndromes and definitions of pain terms. *Seattle: IASP Press*, 3(2th ed), 1.
- Ishaq, A. R., El-Nashar, H. A. S., Younis, T., Mangat, M. A., Shahzadi, M., Ul Haq, A. S., & El-Shazly, M. (2022). Genus *Lupinus* ( Fabaceae ): a review of ethnobotanical, phytochemical and biological studies. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 74(12), 1700–1717. <https://doi.org/10.1093/jpp/rgac058>
- Islam, R., Sultana, N., Haque, Z., & Rafiqul Islam, M. (2023). Effect of dietary dexamethasone on the morphologic and morphometric adaptations in the lymphoid organs and mortality rate in broilers. *Veterinary Medicine and Science*, 9(4), 1656–1665. <https://doi.org/10.1002/vms3.1139>

- Isoe, N., Chuang, V. T. G., Liu, X., Enoki, Y., Taguchi, K., & Matsumoto, K. (2023). The anti-inflammatory effect of tedizolid on carrageenan-induced footpad edema rat model. *Journal of Infection and Chemotherapy*, 29(11), 1088–1090. <https://doi.org/10.1016/j.jiac.2023.07.007>
- IUCN. (2024). *List of Threatened Species*. <https://www.iucnredlist.org>.
- Iwata, M., Inoue, T., Asai, Y., Hori, K., Fujiwara, M., Matsuo, S., Tsuchida, W., & Suzuki, S. (2020). The protective role of localized nitric oxide production during inflammation may be mediated by the heme oxygenase-1/carbon monoxide pathway. *Biochemistry and Biophysics Reports*, 23, 100790. <https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2020.100790>
- Iyare, E., & Obaji, N. (2014). Effects of aqueous leaf extract of *azadirachta indica* on some haematological parameters and blood glucose level in female rats. *Nigerian Journal of Experimental and Clinical Biosciences*, 2(1), 54. <https://doi.org/10.4103/2348-0149.135731>
- Jaballi, I., Ben Saad, H., Bkhairia, I., Kammoun, I., Droguet, M., Magné, C., Boudawara, T., Kallel, C., Nasri, M., Hakim, A., & Ben Amara, I. (2017). Increasing maneb doses induces reactive oxygen species overproduction and nephrotoxicity in adult mice. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 27(5), 382–393. <https://doi.org/10.1080/15376516.2017.1300617>
- Johnson, A. M., Kleczko, E. K., & Nemenoff, R. A. (2020). *Eicosanoids in Cancer : New Roles in Immunoregulation*. 11(November), 1–11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.595498>
- Jovita-Farias, C., Follett, M. E., Dias-Junior, B. C., Serra, Y. A., Kisaki, N. D., Barros-Santos, T., de Jesus, N. M. S., Rodrigues, I. R. S., Macedo, L. E. L., Malpezzi-Marinho, E. L. A., Oliveira-Lima, A. J., Marinho, E. A. V., Rowlett, J. K., & Berro, L. F. (2023). Individual differences in the effects of midazolam on anxiety-like behavior, learning, reward, and choice behavior in male mice. *Frontiers in Psychiatry*, 14. <https://doi.org/10.3389/fpsy.2023.1122568>
- Junior, A. da S. A., Melo, E. S. de P., Gondim, J. M. da S., & Nascimento, V. A. do. (2022). Plantas medicinais e fitoterápicos regulamentados no Brasil: risco de toxicidade por metais pesados. *Research, Society and Development*, 11(1), e39111124994. <https://doi.org/10.33448/rsd-v11i1.24994>
- Juráňová, J., Franková, J., & Ulrichová, J. (2017). The role of keratinocytes in inflammation. *Journal of Applied Biomedicine*. <https://doi.org/10.1016/j.jab.2017.05.003>
- Kamali, A. N., Zian, Z., Bautista, J. M., Hamedifar, H., Hossein-Khannazer, N., Hosseinzadeh, R., Yazdani, R., & Azizi, G. (2021). The Potential Role of Pro-Inflammatory and Anti-Inflammatory Cytokines in Epilepsy Pathogenesis. *Endocrine, Metabolic & Immune Disorders - Drug Targets*, 21(10), 1760–1774. <https://doi.org/10.2174/1871530320999201116200940>
- Kanai, M., Nishino, T., Daassi, D., Kimura, A., Liao, C.-W., Javanfekr Shahri, Z.,



- Wakimoto, A., Gogoleva, N., Usui, T., Morito, N., Arita, M., Takahashi, S., & Hamada, M. (2024). MAFB in Macrophages Regulates Prostaglandin E2–Mediated Lipid Mediator Class Switch through ALOX15 in Ischemic Acute Kidney Injury. *The Journal of Immunology*.  
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.2300844>
- Kang, C.-H., Kim, M. J., Seo, M. J., Choi, Y. H., Jo, W. S., Lee, K.-T., Jeong, Y. K., & Kim, G.-Y. (2013). 5-Hydroxy-3,6,7,8,3'4'-hexamethoxyflavone inhibits nitric oxide production in lipopolysaccharide-stimulated BV2 microglia via NF-κB suppression and Nrf-2-dependent heme oxygenase-1 induction. *Food and Chemical Toxicology*, 57, 119–125. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2013.03.019>
- Kavelaars, A., & Heijnen, C. J. (2021). Immune regulation of pain: Friend and foe. *Science Translational Medicine*, 13(619).  
<https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abj7152>
- Kebede, S., Afework, M., Debella, A., Ergete, W., & Makonnen, E. (2016). Toxicological study of the butanol fractionated root extract of *Asparagus africanus* Lam., on some blood parameter and histopathology of liver and kidney in mice. *BMC Research Notes*, 9(1), 49. <https://doi.org/10.1186/s13104-016-1861-5>
- Khan, A. U., Dagur, H. S., Khan, M., Malik, N., Alam, M., & Mushtaque, M. (2021). Therapeutic role of flavonoids and flavones in cancer prevention: Current trends and future perspectives. *European Journal of Medicinal Chemistry Reports*, 3, 100010. <https://doi.org/10.1016/j.ejmcr.2021.100010>
- Khumalo, G. P., Van Wyk, B. E., Feng, Y., & Cock, I. E. (2023). Immunomodulatory and cytotoxicity properties of selected southern African medicinal plants traditionally used to treat pain and inflammation. *South African Journal of Botany*, 159, 146–154. <https://doi.org/10.1016/J.SAJB.2023.06.012>
- Kim, M. E., & Lee, J. S. (2024). Molecular Foundations of Inflammatory Diseases: Insights into Inflammation and Inflammasomes. *Current Issues in Molecular Biology*, 46(1), 469–484. <https://doi.org/10.3390/cimb46010030>
- King'uyu, D. N., Nti-Kyemereh, L., Bonin, J. L., Feustel, P. J., Tram, M., MacNamara, K. C., & Kopec, A. M. (2023). The effect of morphine on rat microglial phagocytic activity: An in vitro study of brain region-, plating density-, sex-, morphine concentration-, and receptor-dependency. *Journal of Neuroimmunology*, 384, 578204. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2023.578204>
- Klapproth, H., Huerta Arana, M., & Fabri, M. (2023). Macrophage Biology in Human Granulomatous Skin Inflammation. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(5), 4624. <https://doi.org/10.3390/ijms24054624>
- Kleinstreuer, N. C., Karmaus, A. L., Mansouri, K., Allen, D. G., Fitzpatrick, J. M., & Patlewicz, G. (2018). Predictive models for acute oral systemic toxicity: A workshop to bridge the gap from research to regulation. *Computational Toxicology*, 8, 21–24. <https://doi.org/10.1016/j.comtox.2018.08.002>

- Knethen, A. von, & Barbosa, J.-I. R. (2021). Editorial: The Roles of Checkpoint Inhibitors in Inflammatory Diseases. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.795495>
- Kolimi, P., Narala, S., Nyavanandi, D., Youssef, A. A. A., & Dudhipala, N. (2022). Innovative Treatment Strategies to Accelerate Wound Healing: Trajectory and Recent Advancements. *Cells*, 11(15), 2439. <https://doi.org/10.3390/cells11152439>
- Koster, R.; Anderson, M.; Beer, E. J. (1959). Acetic acid for analgesic screening. *Federation proceedings*, 18, 412–416.
- Kuang, H., Johnson, J. A., Mulqueen, J. M., & Bloch, M. H. (2017). The efficacy of benzodiazepines as acute anxiolytics in children: A meta-analysis. *Depression and Anxiety*, 34(10), 888–896. <https://doi.org/10.1002/da.22643>
- Kumar, M., Mahmood, S., & Mandal, U. K. (2022). An Updated Account on Formulations and Strategies for the Treatment of Burn Infection – A Review. *Current Pharmaceutical Design*, 28(18), 1480–1492. <https://doi.org/10.2174/1381612828666220519145859>
- Kuner, R., & Kuner, T. (2021). Cellular Circuits in the Brain and Their Modulation in Acute and Chronic Pain. *Physiological Reviews*, 101(1), 213–258. <https://doi.org/10.1152/physrev.00040.2019>
- Lambert, C., Zappia, J., Sanchez, C., Florin, A., Dubuc, J.-E., & Henrotin, Y. (2021). The Damage-Associated Molecular Patterns (DAMPs) as Potential Targets to Treat Osteoarthritis: Perspectives From a Review of the Literature. *Frontiers in Medicine*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmed.2020.607186>
- LE BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. W. (2001). Animal models of nociception. *Pharmacology*, 53(1), 597–652.
- Le Bars, D., Gozariu, M., & Cadden, S. (2001). Animal models of nociception. *Pharmacological Reviews*, 53(4), 597–652. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01386.x>
- Lee, M.-Y., Seo, C.-S., Kim, Y.-B., Shin, I.-S., & Shin, H.-K. (2014). Non-clinical safety assessment of Hwangryunhaedok-tang: 13-week toxicity in Crl:CD Sprague Dawley rats. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 68(3), 378–386. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2014.01.008>
- Lee, S.-G. (2015). The Cytoprotective Effects of Hydroxycinnamic Acid are Mediated by Its Antioxidant Activity. In *Coffee in Health and Disease Prevention* (p. 913–920). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-409517-5.00101-7>
- Leite, P. M., Camargos, L. M., & Castilho, R. O. (2021). Recent progress in phytotherapy: A Brazilian perspective. *European Journal of Integrative Medicine*, 41, 101270. <https://doi.org/10.1016/j.eujim.2020.101270>
- Lemonica, L. (2008). Farmacologia dos Opioides. *Prática Hospitalar*, 56(Mar-Abr),

129–135.

- Leuti, A., Fazio, D., Fava, M., Piccoli, A., Oddi, S., & Maccarrone, M. (2020). Bioactive lipids, inflammation and chronic diseases. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 159, 133–169. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2020.06.028>
- Li, D., Sun, S., & Chen, J. (2024). Research progress on classification, source, application of phytosterol esters, and their thermal oxidation stability. *Grain & Oil Science and Technology*. <https://doi.org/10.1016/J.GAOST.2023.12.003>
- Li, H., Zhang, X., & Wang, W. (2017). Anticancer activity of 5, 7-dimethoxyflavone against liver cancer cell line hepg2 involves apoptosis, ros generation and cell cycle arrest. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*, 14(4), 213–220. <https://doi.org/10.21010/ajtcam.v14i4.24>
- Li, M., Hou, Q., Zhong, L., Zhao, Y., & Fu, X. (2021). Macrophage Related Chronic Inflammation in Non-Healing Wounds. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.681710>
- Li, Y., Zheng, B., Tian, H., Xu, X., Sun, Y., Mei, Q., Lin, X., & Liu, L. (2017). Yupingfeng Powder relieves the immune suppression induced by dexamethasone in mice. *Journal of Ethnopharmacology*, 200, 117–123. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.01.054>
- Lima, R. R. O. de, Silva, F. C. da, Meneguelli, A. Z., Muniz, I. M., Mira, Á. B. de, Dantas Filho, J. V., & Schons, S. de V. (2023). Composição química, farmacologia e etnobotânica de plantas medicinais utilizadas empiricamente no estado de Rondônia, Amazônia Ocidental. *Nature and Conservation*, 15(1), 1–17. <https://doi.org/10.6008/CBPC2318-2881.2022.001.0001>
- Lindstrom, N. M., Moore, D. M., Zimmerman, K., & Smith, S. A. (2015). Hematologic Assessment in Pet Rats, Mice, Hamsters, and Gerbils. *Clinics in Laboratory Medicine*, 35(3), 629–640. <https://doi.org/10.1016/j.cl.2015.05.011>
- LITCHFIELD, J. T.; WILCOXON, F. (1949). A simplified method of evaluating dose effect experiments. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 96(2), 99–113.
- LITCHFIELD, Jr JT; WILCOXON, F. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 96(2), 99–113.
- Liu, J. A., Yu, J., & Cheung, C. W. (2021). Immune Actions on the Peripheral Nervous System in Pain. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(3), 1448. <https://doi.org/10.3390/ijms22031448>
- Liu, S., & Kelliher, L. (2022). Physiology of pain—a narrative review on the pain pathway and its application in the pain management. *Digestive Medicine Research*, 5, 56–56. <https://doi.org/10.21037/dmr-21-100>
- Liu, W., Cui, X., Zhong, Y., Ma, R., Liu, B., & Xia, Y. (2023). Phenolic metabolites as

- therapeutic in inflammation and neoplasms: Molecular pathways explaining their efficacy. *Pharmacological Research*, 193, 106812. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2023.106812>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods*, 25(4), 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- López-Cano, M., Fernández-Dueñas, V., Llebaria, A., & Ciruela, F. (2017). Formalin Murine Model of Pain. *BIO-PROTOCOL*, 7(23). <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.2628>
- López, S., Monsalve, E. M., Romero de Ávila, M. J., González-Gómez, J., Hernández de León, N., Ruiz-Marcos, F., Baladrón, V., Nueda, M. L., García-León, M. J., Screpanti, I., Felli, M. P., Laborda, J., García-Ramírez, J. J., & Díaz-Guerra, M. J. M. (2020). NOTCH3 signaling is essential for NF- $\kappa$ B activation in TLR-activated macrophages. *Scientific Reports*, 10(1), 14839. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-71810-4>
- Lundberg, J. O., & Weitzberg, E. (2022). Nitric oxide signaling in health and disease. *Cell*, 185(16), 2853–2878. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2022.06.010>
- Lv, Y., Zhang, L., Li, N., Mai, N., Zhang, Y., & Pan, S. (2017). Geraniol promotes functional recovery and attenuates neuropathic pain in rats with spinal cord injury. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 95(12), 1389–1395. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2016-0528>
- Ma, L., Yue, L., Liu, S., Xu, S., Tong, J., Sun, X., Su, L., Cui, S., Liu, F.-Y., Wan, Y., & Yi, M. (2024). A distinct neuronal ensemble of prelimbic cortex mediates spontaneous pain in rats with peripheral inflammation. *Nature Communications*, 15(1), 7922. <https://doi.org/10.1038/s41467-024-52243-3>
- Macarie, R. D., Tucureanu, M. M., Ciortan, L., Gan, A.-M., Butoi, E., & Mânduțeanu, I. (2023). Ficolin-2 amplifies inflammation in macrophage-smooth muscle cell cross-talk and increases monocyte transmigration by mechanisms involving IL-1 $\beta$  and IL-6. *Scientific Reports*, 13(1), 19431. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-46770-0>
- Madamsetty, V. S., Mohammadinejad, R., Uzielienė, I., Nabavi, N., Dehshahri, A., García-Couce, J., Tavakol, S., Moghassemi, S., Dadashzadeh, A., Makvandi, P., Pardakhty, A., Aghaei Afshar, A., & Seyfoddin, A. (2022). Dexamethasone: Insights into Pharmacological Aspects, Therapeutic Mechanisms, and Delivery Systems. *ACS Biomaterials Science & Engineering*, 8(5), 1763–1790. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.2c00026>
- Mahajan, S. G., & Mehta, A. A. (2011). Suppression of ovalbumin-induced Th2-driven airway inflammation by  $\beta$ -sitosterol in a guinea pig model of asthma. *European Journal of Pharmacology*, 650(1), 458–464. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2010.09.075>
- Malafoglia, V., Ilari, S., Vitiello, L., Tenti, M., Balzani, E., Muscoli, C., Raffaelli, W., &

- Bonci, A. (2022). The Interplay between Chronic Pain, Opioids, and the Immune System. *The Neuroscientist*, 28(6), 613–627.  
<https://doi.org/10.1177/10738584211030493>
- Maleki, S. J., Crespo, J. F., & Cabanillas, B. (2019). Anti-inflammatory effects of flavonoids. *Food Chemistry*, 299, 125124.  
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2019.125124>
- Malone, M. H.; Robichaud, R. C. (1962). A Hippocratic screen for pure or crude drug materials. *Lloydia*, 25(3), 320–332.
- Malone, M.H.; Robichaud, R. C. (1983). The pharmacological evaluation of natural products: general and specific approaches to screening ethnopharmaceuticals. *J. Ethnopharmacol*, 8(2), 1983.
- Marchand, S. (2021). Mechanisms Challenges of the Pain Phenomenon. *Frontiers in Pain Research*, 1. <https://doi.org/10.3389/fpain.2020.574370>
- Margraf, A., Lowell, C. A., & Zarbock, A. (2022). Neutrophils in acute inflammation: current concepts and translational implications. *Blood*, 139(14), 2130–2144.  
<https://doi.org/10.1182/blood.2021012295>
- Martin, R. F. (2020). Wound Healing. *Surgical Clinics of North America*, 100(4), ix–xi.  
<https://doi.org/10.1016/j.suc.2020.05.012>
- MARTIUS, C. F. P. von, & SPIX, J. B. von. (1859). Viagem pelo Brasil. In *Flora Brasiliensis* (Vol. 3, Número 7).
- Mazumder, T., Hasan, T., Ahmed, K. S., Hossain, H., Debnath, T., Jahan, E., Rahman, N., Rahman Shuvo, M. S., & Daula, A. F. M. S. U. (2022). Phenolic compounds and extracts from *Crotalaria calycina* Schrank potentially alleviate pain and inflammation through inhibition of cyclooxygenase-2: An in vivo and molecular dynamics studies. *Heliyon*, 8(12), e12368.  
<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e12368>
- McCaffrey, E. F., Donato, M., Keren, L., Chen, Z., Delmastro, A., Fitzpatrick, M. B., Gupta, S., Greenwald, N. F., Baranski, A., Graf, W., Kumar, R., Bosse, M., Fullaway, C. C., Ramdial, P. K., Forgó, E., Jojic, V., Van Valen, D., Mehra, S., Khader, S. A., ... Angelo, M. (2022). The immunoregulatory landscape of human tuberculosis granulomas. *Nature Immunology*, 23(2), 318–329.  
<https://doi.org/10.1038/s41590-021-01121-x>
- McEntire, D. M., Kirkpatrick, D. R., Dueck, N. P., Kerfeld, M. J., Smith, T. A., Nelson, T. J., Reisbig, M. D., & Agrawal, D. K. (2016). Pain transduction: a pharmacologic perspective. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, 9(8), 1069–1080. <https://doi.org/10.1080/17512433.2016.1183481>
- McNamara, C. R., Mandel-Brehm, J., Bautista, D. M., Siemens, J., Deranian, K. L., Zhao, M., Hayward, N. J., Chong, J. A., Julius, D., Moran, M. M., & Fanger, C. M. (2007). TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(33), 13525–13530.

<https://doi.org/10.1073/pnas.0705924104>

- Mehrzadi, S., Khalili, H., Fatemi, I., Malayeri, A., Siahpoosh, A., & Goudarzi, M. (2021). Zingerone Mitigates Carrageenan-Induced Inflammation Through Antioxidant and Anti-inflammatory Activities. *Inflammation*, 44(1), 186–193. <https://doi.org/10.1007/s10753-020-01320-y>
- Meizlish, M. L., Franklin, R. A., Zhou, X., & Medzhitov, R. (2021). Tissue Homeostasis and Inflammation. *Annual Review of Immunology*, 39(1), 557–581. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-061020-053734>
- Mills, K. H. G. (2023). IL-17 and IL-17-producing cells in protection versus pathology. *Nature Reviews Immunology*, 23(1), 38–54. <https://doi.org/10.1038/s41577-022-00746-9>
- Minton, K. (2016). Granuloma macrophage differentiation. *Nature Reviews Immunology*, 16(12), 719–719. <https://doi.org/10.1038/nri.2016.132>
- Miossec, P., & Kolls, J. K. (2012). Targeting IL-17 and TH17 cells in chronic inflammation. *Nature Reviews Drug Discovery*, 11(10), 763–776. <https://doi.org/10.1038/nrd3794>
- Misra, A. K., Varma, S. K., & Kumar, R. (2018). Anti-inflammatory Effect of an Extract of *Agave americana* on Experimental Animals. *Pharmacognosy research*, 10(1), 104–108. [https://doi.org/10.4103/pr.pr\\_64\\_17](https://doi.org/10.4103/pr.pr_64_17)
- Mizokami, S. S., Hohmann, M. S. N., Staurengo-Ferrari, L., Carvalho, T. T., Zarpelon, A. C., Possebom, M. I., de Souza, A. R., Veneziani, R. C. S., Arakawa, N. S., Casagrande, R., & Verri, W. A. (2016). Pimaradienoic Acid Inhibits Carrageenan-Induced Inflammatory Leukocyte Recruitment and Edema in Mice: Inhibition of Oxidative Stress, Nitric Oxide and Cytokine Production. *PLOS ONE*, 11(2), e0149656. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149656>
- Moffett, D. B., Mumtaz, M. M., Sullivan, D. W., & Whittaker, M. H. (2022). General considerations of dose-effect and dose-response relationships. In *Handbook on the Toxicology of Metals* (p. 299–317). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-823292-7.00019-X>
- Molčanová, L., Tremel, J., Brezáni, V., Maršík, P., Kurhan, S., Trávníček, Z., Uhrin, P., & Šmejkal, K. (2022). C-geranylated flavonoids from *Paulownia tomentosa* Steud. fruit as potential anti-inflammatory agents. *Journal of Ethnopharmacology*, 296, 115509. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.115509>
- Morbeck, L. L. B., Cruz, M. P., & Yatsuda, R. (2018). Avaliação da atividade anti-inflamatória, antinociceptiva, antioxidante e toxicológica do extrato etanólico e das frações do caule e casca da *Aeschynomene martii* BENTH. *Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Bahia*, 94.
- Morbeck, L. L. B., Yatsuda, R., & Cruz, M. P. (2018). Avaliação da atividade anti-inflamatória, antinociceptiva, antioxidante e toxicológica do extrato etanólico e das frações do caule e casca da *aeschynomene martii* BENTH. *Dissertação*

(Mestrado) - Universidade Federal da Bahia, 94.

- Morris, G., Gevezova, M., Sarafian, V., & Maes, M. (2022). Redox regulation of the immune response. *Cellular & Molecular Immunology*, 19(10), 1079–1101. <https://doi.org/10.1038/s41423-022-00902-0>
- Mowat, A. M., Scott, C. L., & Bain, C. C. (2017). Barrier-tissue macrophages: functional adaptation to environmental challenges. *Nature Medicine*, 23(11), 1258–1270. <https://doi.org/10.1038/nm.4430>
- Mukhopadhyay, N., Shukla, A., Makhal, P. N., & Kaki, V. R. (2023). Natural product-driven dual COX-LOX inhibitors: Overview of recent studies on the development of novel anti-inflammatory agents. *Heliyon*, 9(3), e14569. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e14569>
- Mustafa, S., Bajic, J. E., Barry, B., Evans, S., Siemens, K. R., Hutchinson, M. R., & Grace, P. M. (2023). One immune system plays many parts: The dynamic role of the immune system in chronic pain and opioid pharmacology. *Neuropharmacology*, 228, 109459. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2023.109459>
- Nagem, T. J. (2002). Efeito de flavonóides no metabolismo. *Medicina, Ribeirão Preto*, 35(abr./jun.), 127–133.
- Nandal, S., Dhir, A., Kuhad, A., Sharma, S., & Chopra, K. (2009). Curcumin potentiates the anti-inflammatory activity of cyclooxygenase inhibitors in the cotton pellet granuloma pouch model. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 31(2), 89. <https://doi.org/10.1358/mf.2009.31.2.1357705>
- Nattagh-Eshtivani, E., Barghchi, H., Pahlavani, N., Barati, M., Amiri, Y., Fadel, A., Khosravi, M., Talebi, S., Arzhang, P., Ziaei, R., & Ghavami, A. (2022). Biological and pharmacological effects and nutritional impact of phytosterols: A comprehensive review. *Phytotherapy Research*, 36(1), 299–322. <https://doi.org/10.1002/ptr.7312>
- Neves, A. M., Morais, S. M. de, Santos, H. S. dos, Ferreira, M. M., Cruz, R. C. V., Souza, E. B. de, Andrade, L. B. da S., & Fontenelle, R. O. dos S. (2022). Prospecção química, atividade antioxidante, anticolinesterásica e antifúngica de extratos etanólicos de espécies de Senna Mill. (Fabaceae). *Hoehnea*, 49. <https://doi.org/10.1590/2236-8906-111/2020>
- Newsome, B. J., Petriello, M. C., Han, S. G., Murphy, M. O., Eske, K. E., Sunkara, M., Morris, A. J., & Hennig, B. (2015). *Green tea diet decreases PCB 126-induced oxidative stress in mice by upregulating antioxidant enzymes*. 25(2), 126–135. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2013.10.003.Green>
- Nie, H., Yan, C., Zhou, W., & Li, T. (2022). Analysis of Immune and Inflammation Characteristics of Atherosclerosis from Different Sample Sources. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2022, 1–31. <https://doi.org/10.1155/2022/5491038>

- Ninkuu, V., Zhang, L., Yan, J., Fu, Z., Yang, T., & Zeng, H. (2021). Biochemistry of Terpenes and Recent Advances in Plant Protection. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(11), 5710. <https://doi.org/10.3390/ijms22115710>
- Nucci-Martins, C., Nascimento, L. F., Venzke, D., Brethanha, L. C., Sako, A. V. F., Oliveira, A. S., Brighente, I. M. C., Micke, G. A., Pizzolatti, M. G., & Santos, A. R. S. (2016). Antinociceptive effect of hydroalcoholic extract and isoflavone isolated from *Polygala molluginifolia* in mice: evidence for the involvement of opioid receptors and TRPV1 and TRPA1 channels. *Phytomedicine*, 23(5), 429–440. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2016.02.002>
- Nunes, B. S.; Renzonnet, N. S.; Dal-Secco, D.; Vieira, S. M.; Cavada, B. S.; Teixeira, E. H.; Moura, T. R.; Teixeira, C. S.; Clemente-Napimoga, J. T.; Cunha, F. Q.; Napimoga, M. H. (2009). Lectin extracted from *Canavalia grandiflora* seeds presents potential anti-inflammatory and analgesic effects. *Naunyn-Schmied Arch Pharmacol*, 379, 609–616.
- O'Donovan, C. J., Tan, L. T., Abidin, M. A. Z., Roderick, M. R., Grammatikos, A., & Bernatoniene, J. (2024). Diagnosis of Chronic Granulomatous Disease: Strengths and Challenges in the Genomic Era. *Journal of Clinical Medicine*, 13(15), 4435. <https://doi.org/10.3390/jcm13154435>
- OCDE. (2002). *Oecd Guideline For Testing Of Chemicals Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method*. OECD. <https://doi.org/10.1787/9789264070943-en>
- Oliveira, A. A., Yatsuda, R., & Cruz, M. P. (2016). AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTINOCICEPTIVA DO EXTRATO ETANÓLICO DO CAULE DE *Aeschynomene martii* BENTH (TRIPA DE GALINHA). *Dissertação de Mestrado - Universidade Federal da Bahia*, 98.
- Oliveira, L. de A. R., Silva, A. C. G. da, Thomaz, D. V., Brandão, F., Conceição, E. C. da, Valadares, M. C., Bara, M. T. F., & Silveira, D. (2021). The Potential of *Vouacapanes* from *Pterodon Emarginatus* Vogel against COVID-19 Cytokine Storm. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. <https://doi.org/10.34172/apb.2023.016>
- Pagán, A. J., & Ramakrishnan, L. (2018). The Formation and Function of Granulomas. *Annual Review of Immunology*, 36(1), 639–665. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-032712-100022>
- Palhares, R. M., Baratto, L. C., Scopel, M., Mügge, F. L. B., & Brandão, M. G. L. (2021). Medicinal Plants and Herbal Products From Brazil: How Can We Improve Quality? *Frontiers in Pharmacology*, 11. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.606623>
- Palmieri, E. M., Gonzalez-Cotto, M., Baseler, W. A., Davies, L. C., Ghesquière, B., Maio, N., Rice, C. M., Rouault, T. A., Cassel, T., Higashi, R. M., Lane, A. N., Fan, T. W.-M., Wink, D. A., & McVicar, D. W. (2020). Nitric oxide orchestrates metabolic rewiring in M1 macrophages by targeting aconitase 2 and pyruvate dehydrogenase. *Nature Communications*, 11(1), 698. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14433-7>



- Pan, M.-H., Lai, Y.-S., Lai, C.-S., Wang, Y.-J., Li, S., Lo, C.-Y., Dushenkov, S., & Ho, C.-T. (2007). 5-Hydroxy-3,6,7,8,3',4'-hexamethoxyflavone Induces Apoptosis through Reactive Oxygen Species Production, Growth Arrest and DNA Damage-Inducible Gene 153 Expression, and Caspase Activation in Human Leukemia Cells. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(13), 5081–5091. <https://doi.org/10.1021/jf070068z>
- Pan, Y., Zhang, R., Wang, Y., Zhang, C., Li, X., & Zhang, W. (2009). Estudo preliminar da atividade antibacteriana das cascas de *Erythrina velutina* Willd., Fabaceae (Leguminosae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 22(6), 776–780. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2005000200012>
- Pandey, M. M., Shukla, G., Goutam, A., Rastogi, S., & Rao, C. V. (2024). Biological potential of *Potentilla fulgens* extract on acute inflammation, nociception tolerance, oxidative stress and its phytochemical constituents. *Food Chemistry Advances*, 4, 100563. <https://doi.org/10.1016/j.focha.2023.100563>
- Parisien, M., Lima, L. V., Dagostino, C., El-Hachem, N., Drury, G. L., Grant, A. V., Huising, J., Verma, V., Meloto, C. B., Silva, J. R., Dutra, G. G. S., Markova, T., Dang, H., Tessier, P. A., Slade, G. D., Nackley, A. G., Ghasemlou, N., Mogil, J. S., Allegri, M., & Diatchenko, L. (2022). Acute inflammatory response via neutrophil activation protects against the development of chronic pain. *Science Translational Medicine*, 14(644). <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abj9954>
- Patel, R., Williams-Dautovich, J., & Cummins, C. L. (2014). Minireview: New Molecular Mediators of Glucocorticoid Receptor Activity in Metabolic Tissues. *Molecular Endocrinology*, 28(7), 999–1011. <https://doi.org/10.1210/me.2014-1062>
- Patil, K. R., Mahajan, U. B., Unger, B. S., Goyal, S. N., Belemkar, S., Surana, S. J., Ojha, S., & Patil, C. R. (2019). Animal Models of Inflammation for Screening of Anti-inflammatory Drugs: Implications for the Discovery and Development of Phytopharmaceuticals. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18), 4367. <https://doi.org/10.3390/ijms20184367>
- Pedroso, R. dos S., Andrade, G., & Pires, R. H. (2021). Plantas medicinais: uma abordagem sobre o uso seguro e racional. *Physis: Revista de Saúde Coletiva*, 31(2). <https://doi.org/10.1590/s0103-73312021310218>
- Peraza, G. G., Rodrigues, S. T., Medeiros, S. H. L., & Muccillo-baisch, A. N. A. L. (2007). O Potencial Antinociceptivo dos Produtos de Origem Natural. *Vitalle - Revista de Ciências da Saúde*, 19(1), 35–44.
- Perelygina, L., Faisthalab, R., Abernathy, E., Chen, M., Hao, L., Bercovitch, L., Bayer, D. K., Noroski, L. M., Lam, M. T., Cicalese, M. P., Al-Herz, W., Nanda, A., Hajjar, J., Vanden Driessche, K., Schroven, S., Leysen, J., Rosenbach, M., Peters, P., Raedler, J., ... Sullivan, K. E. (2021). Rubella Virus Infected Macrophages and Neutrophils Define Patterns of Granulomatous Inflammation in Inborn and Acquired Errors of Immunity. *Frontiers in Immunology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.796065>

- Petersen, H. J., & Smith, A. M. (2013). The Role of the Innate Immune System in Granulomatous Disorders. *Frontiers in Immunology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2013.00120>
- Piccinelli, A. C., Santos, J. A., Konkiewitz, E. C., Oesterreich, S. A., Formagio, A. S. N., Croda, J., Ziff, E. B., & Kassuya, C. A. L. (2015). Antihyperalgesic and antidepressive actions of (R)-(+)-limonene,  $\alpha$ -phellandrene, and essential oil from *Schinus terebinthifolius* fruits in a neuropathic pain model. *Nutritional Neuroscience*, 18(5), 217–224. <https://doi.org/10.1179/1476830514Y.0000000119>
- Ping, C. P., Mohamad, T. A. S. T., Akhtar, M. N., Perimal, E. K., Akira, A., Ali, D. A. I., & Sulaiman, M. R. (2018). Antinociceptive effects of cardamomin in mice: Possible involvement of TRPV1, glutamate, and opioid receptors. *Molecules*, 23(9), 1–14. <https://doi.org/10.3390/molecules23092237>
- Pinto, W. B. V. de R., Ko, G. M., Valero-Lapchik, V. B., Ariza, C. B., & Porcionatto, M. (2012). Test elevated plus maze: applications and contributions to the study of animal disease models in neurology and psychiatry disorders. *Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório*, 1(1), 102–120.
- Pliego, A. B., Tavakoli, M., Khusro, A., Seidavi, A., Elghandour, M. M. M. Y., Salem, A. Z. M., Márquez-Molina, O., & Rene Rivas-Caceres, R. (2022). Beneficial and adverse effects of medicinal plants as feed supplements in poultry nutrition: a review. *Animal Biotechnology*, 33(2), 369–391. <https://doi.org/10.1080/10495398.2020.1798973>
- Quintão, N. L. M., Rocha, L. W., Silva, G. F., Reichert, S., Claudino, V. D., Lucinda-Silva, R. M., Malheiros, A., Souza, M. M. De, Filho, V. C., Bellé Bresolin, T. M., Machado, M. da S., Wagner, T. M., & Meyre-Silva, C. (2014). Contribution of  $\alpha$ ,  $\beta$  -Amyrenone to the Anti-Inflammatory and Antihypersensitivity Effects of *Aleurites moluccana* (L.) Willd. *BioMed Research International*, 2014, 1–11. <https://doi.org/10.1155/2014/636839>
- Raja, S. N., Carr, D. B., Cohen, M., Finnerup, N. B., Flor, H., Gibson, S., Keefe, F. J., Mogil, J. S., Ringkamp, M., Sluka, K. A., Song, X.-J., Stevens, B., Sullivan, M. D., Tutelman, P. R., Ushida, T., & Vader, K. (2020). The revised International Association for the Study of Pain definition of pain: concepts, challenges, and compromises. *Pain*, 161(9), 1976–1982. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000001939>
- Rawat, K., & Shrivastava, A. (2022). Neutrophils as emerging protagonists and targets in chronic inflammatory diseases. *Inflammation Research*, 71(12), 1477–1488. <https://doi.org/10.1007/s00011-022-01627-6>
- Rego, E. A. (2012). Avaliação da Actividade Anti-inflamatória de Plantas dos Açores. *UNIVERSIDADE DOS AÇORES DEPARTAMENTO DE CIÊNCIAS TECNOLÓGICAS E DESENVOLVIMENTO*, 101.
- Rehman, H., Aziz, A. T., Saggu, S., VanWert, A. L., Zidan, N., & Saggu, S. (2017). Additive toxic effect of deltamethrin and cadmium on hepatic, hematological, and

- immunological parameters in mice. *Toxicology and Industrial Health*, 33(6), 495–502. <https://doi.org/10.1177/0748233716684710>
- Reis, H. S., Da Paz, C. D., De Oliveira, J. G. A., & Silva, M. A. V. (2023). O conhecimento e uso tradicional de plantas medicinais nas perspectivas da etnobotânica e agroecologia: uma revisão teórica. *Observatório de la economía latinoamericana*, 21(9), 12098–12122. <https://doi.org/10.55905/oelv21n9-086>
- Reis, H. S. P., Coccozza, C. D., Monte, F. D. O., Alves, J. G., & Silva, M. A. V. (2023). Plantas medicinais da caatinga: uma revisão integrativa dos saberes etnobotânicos no semiárido nordestino. *Arquivos de Ciências da Saúde da UNIPAR*, 27(2), 874–900. <https://doi.org/10.25110/arqsaude.v27i2.2023-020>
- Ribeiro, F. A. P., Verri, W. A., & Chiu, I. M. (2017). Nociceptor Sensory Neuron–Immune Interactions in Pain and Inflammation. *Trends in Immunology*, 38(1), 5–19. <https://doi.org/10.1016/j.it.2016.10.001>
- Rice, T. C., Pugh, A. M., Caldwell, C. C., & Schneider, B. S. P. (2017). Balance Between the Proinflammatory and Anti-Inflammatory Immune Responses with Blood Transfusion in Sepsis. *Critical Care Nursing Clinics of North America*, 29(3), 331–340. <https://doi.org/10.1016/j.cnc.2017.04.003>
- Ristow, L. C., & Davis, J. M. (2021). The granuloma in cryptococcal disease. *PLOS Pathogens*, 17(3), e1009342. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009342>
- Rivera Rodríguez, R., & Johnson, J. J. (2023). Terpenes: Modulating anti-inflammatory signaling in inflammatory bowel disease. *Pharmacology & Therapeutics*, 248, 108456. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2023.108456>
- Roell, K. R., Reif, D. M., & Motsinger-Reif, A. A. (2017). An Introduction to Terminology and Methodology of Chemical Synergy—Perspectives from Across Disciplines. *Frontiers in Pharmacology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00158>
- Rood, K. M., Patel, N., DeVengencie, I. M., Quinn, J. P., Gowdy, K. M., Costantine, M. M., & Kniss, D. A. (2023). Aspirin modulates production of pro-inflammatory and pro-resolving mediators in endothelial cells. *PLOS ONE*, 18(4), e0283163. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0283163>
- Röszer, T. (2020). *What Is an M2 Macrophage? Historical Overview of the Macrophage Polarization Model. The Th1/Th2 and M1/M2 Paradigm, the Arginine Fork* (p. 3–25). [https://doi.org/10.1007/978-3-030-50480-9\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-50480-9_1)
- Rusiecka, O. M., Tournier, M., Molica, F., & Kwak, B. R. (2022). Pannexin1 channels a potential therapeutic target in inflammation. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.1020826>
- Saadullah, M., Arif, S., Hussain, L., Asif, M., & Khurshid, U. (2022). Dose Dependent Effects of Breynia cernua Against the Paraquat Induced Parkinsonism like Symptoms in Animals' Model: In Vitro , In Vivo and Mechanistic Studies. *Dose-Response*, 20(3). <https://doi.org/10.1177/15593258221125478>

- Sacco, K. A., Gazzin, A., Notarangelo, L. D., & Delmonte, O. M. (2023). Granulomatous inflammation in inborn errors of immunity. *Frontiers in Pediatrics*, 11. <https://doi.org/10.3389/fped.2023.1110115>
- Salehidoost, R., & Korbonits, M. (2022). Glucose and lipid metabolism abnormalities in Cushing's syndrome. *Journal of Neuroendocrinology*, 34(8). <https://doi.org/10.1111/jne.13143>
- Salgado, P. B., Andrade-Carrera, B., Domínguez-Villegas, V., Díaz-Garrido, N., Rodríguez-Lagunas, M. J., Badía, J., Baldomà, L., Mallandrich, M., Calpena-Campmany, A., & Garduño-Ramírez, M. L. (2021). Screening Anti-Inflammatory Effects of Flavanones Solutions. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(16), 8878. <https://doi.org/10.3390/ijms22168878>
- Salvador, A. F., de Lima, K. A., & Kipnis, J. (2021). Neuromodulation by the immune system: a focus on cytokines. *Nature Reviews Immunology*, 21(8), 526–541. <https://doi.org/10.1038/s41577-021-00508-z>
- Santos, M. F. da S., Czczeko, N. G., Afonso, P., Nassif, N., Marcondes, J., Leonardi, B., Alencar, F. De, Malafaia, O., & Marcondes, P. (2006). Avaliação do uso do extrato bruto de *Jatropha gossypifolia* L. Na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. *Acta Cirúrgica Brasileira*, 21(Suplemento 3).
- Santos, M. F. da S., Czczeko, N. G., Nassif, P. A. N., Ribas-Filho, J. M., Alencar, B. L. F. de, Malafaia, O., Ribas, C. A. P. M., Trautwein, V. M., Henriques, G. S., Maia, J. M. A., & Bittencourt, R. C. de A. (2006). Avaliação do uso do extrato bruto de *Jatropha gossypifolia* L. na cicatrização de feridas cutâneas em ratos. *Acta Cirurgica Brasileira*, 21(Suplemento 3), 2–7. <https://doi.org/10.1590/S0102-86502006000900002>
- Sawicki, C. M., Humeidan, M. L., & Sheridan, J. F. (2021). Neuroimmune Interactions in Pain and Stress: An Interdisciplinary Approach. *The Neuroscientist*, 27(2), 113–128. <https://doi.org/10.1177/1073858420914747>
- Schillrreff, P., & Alexiev, U. (2022). Chronic Inflammation in Non-Healing Skin Wounds and Promising Natural Bioactive Compounds Treatment. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(9), 4928. <https://doi.org/10.3390/ijms23094928>
- Schrader, A. J., Taylor, R. M., Lowery-Gionta, E. G., & Moore, N. L. T. (2018). Repeated elevated plus maze trials as a measure for tracking within-subjects behavioral performance in rats (*Rattus norvegicus*). *PLOS ONE*, 13(11), e0207804. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0207804>
- Seibenhener, M. L., & Wooten, M. C. (2015). Use of the Open Field Maze to Measure Locomotor and Anxiety-like Behavior in Mice. *Journal of Visualized Experiments*, 96. <https://doi.org/10.3791/52434>
- Seki, H., Sasaki, T., Ueda, T., & Arita, M. (2010). Resolvins as Regulators of the Immune System. *The Scientific World JOURNAL*, 10, 818–831. <https://doi.org/10.1100/tsw.2010.72>

- Sen'kova, A. V., Savin, I. A., Odarenko, K. V., Salomatina, O. V., Salakhutdinov, N. F., Zenkova, M. A., & Markov, A. V. (2023). Protective effect of soloxolone derivatives in carrageenan- and LPS-driven acute inflammation: Pharmacological profiling and their effects on key inflammation-related processes. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 159, 114231. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114231>
- Sewell, G. W., Marks, D. J. B., & Segal, A. W. (2015). The immunopathogenesis of Crohn's disease : a three-stage model. *Europe PMC Funders Group*, 21(5), 506–513. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2009.06.003>.The
- Silva, J. C., Raquel, S., Lima, G. De, Gonçalves, R., Júnior, D. O., & Guedes, R. (2013). Modelos experimentais para avaliação da atividade antinociceptiva de produtos naturais : uma revisão Experimental models for evaluation of antinociceptive activity of natural products : a review. *Rev. Bras. Farm*, 94(1), 18–23. <https://doi.org/10.2307/2215358>
- Silva, M. G., Furtado, M. M., Osório, A. T., Morais, I. C. P. da S., Amaral, M. P. M. do, Coêlho, A. G., & Arcanjo, D. D. R. (2021). A importância dos ensaios de toxicidade para o desenvolvimento e o registro de fitoterápicos no Brasil. *Research, Society and Development*, 10(12), e538101220137. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i12.20137>
- Silva, M. L., Cardoso, Costa, R. S., Santana, S., Gabriela, M., & Koblitiz, B. (2010). Compostos fenólicos , carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais Phenolic compounds , carotenoids and antioxidant activity in plant products. *Semina: Ciências Agrárias*, 31(3), 669–682. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=445744097017>
- Simopoulos, A. P. (2010). Genetic variants in the metabolism of omega-6 and omega-3 fatty acids: their role in the determination of nutritional requirements and chronic disease risk. *Experimental Biology and Medicine*, 235(7), 785–795. <https://doi.org/10.1258/ebm.2010.009298>
- Sinaga, S. N., Shahib, M. N., & Fatimah, S. N. (2013). Effects of phytosterol esters on LDL blood cholesterol levels and LDL receptor gene expression in liver male Wistar rats with hypercholesterolemia model. *Obesity Research & Clinical Practice*, 7, 34. <https://doi.org/10.1016/j.orcp.2013.08.088>
- Sirungruang, S., Markel, K., & Shih, P. M. (2022). Plant-based engineering for production of high-valued natural products. *Natural Product Reports*, 39(7), 1492–1509. <https://doi.org/10.1039/D2NP00017B>
- Sirucek, L., Ganley, R. P., Zeilhofer, H. U., & Schweinhardt, P. (2023). Diffuse noxious inhibitory controls and conditioned pain modulation: a shared neurobiology within the descending pain inhibitory system? *Pain*, 164(3), 463–468. <https://doi.org/10.1097/j.pain.0000000000002719>
- Sjöström, E.; Alen, R. (1999). Analytical methods in wood chemistry. *Pulping, and Papermaking*, 316. <https://doi.org/https://doi.org/10.1159/000135457>

- Soehnlein, O., Steffens, S., Hidalgo, A., & Weber, C. (2017). Neutrophils as protagonists and targets in chronic inflammation. *Nature Reviews Immunology*, 17(4), 248–261. <https://doi.org/10.1038/nri.2017.10>
- Song, J., Cho, J., Park, J., & Hwang, J. H. (2022). Identification and validation of stable reference genes for quantitative real time PCR in different minipig tissues at developmental stages. *BMC Genomics*, 23(1), 585. <https://doi.org/10.1186/s12864-022-08830-z>
- Sorg, H., Tilkorn, D. J., Hager, S., Hauser, J., & Mirastschijski, U. (2017). Skin Wound Healing: An Update on the Current Knowledge and Concepts. *European Surgical Research*, 58(1–2), 81–94. <https://doi.org/10.1159/000454919>
- Stephenson, J. A., Al-Taan, O., Arshad, A., Morgan, B., Metcalfe, M. S., & Dennison, A. R. (2013). The Multifaceted Effects of Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids on the Hallmarks of Cancer. *Journal of Lipids*, 2013, 1–13. <https://doi.org/10.1155/2013/261247>
- Stokol, T., Brandt, L. E., Shuman, M., Jeffery, D. A., Blank, B., Silvela, E., & Singh, B. (2021). Hematologic and Biochemical Reference Intervals and Urinary Test Results for Wild-caught Adult Southern Giant Pouched Rats ( *Cricetomys ansorgei* ). *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 60(6), 616–629. <https://doi.org/10.30802/AALAS-JAALAS-20-000154>
- Strickland, J., Haugabrooks, E., Allen, D. G., Balottin, L. B., Hirabayashi, Y., Kleinstreuer, N. C., Kojima, H., Nishizawa, C., Prieto, P., Ratzlaff, D. E., Jeong, J., Lee, J., Yang, Y., Lin, P., Sullivan, K., & Casey, W. (2023). International regulatory uses of acute systemic toxicity data and integration of new approach methodologies. *Critical Reviews in Toxicology*, 53(7), 385–411. <https://doi.org/10.1080/10408444.2023.2240852>
- Sun, C., Li, S., & Li, D. (2016). *Sulforaphane mitigates muscle fibrosis in mdx mice via Nrf2-mediated inhibition of TGF- $\beta$  / Smad signaling*. 28, 377–390. <https://doi.org/10.1152/japplphysiol.00721.2015>
- Süntar, I. (2020). Importance of ethnopharmacological studies in drug discovery: role of medicinal plants. *Phytochemistry Reviews*, 19(5), 1199–1209. <https://doi.org/10.1007/s11101-019-09629-9>
- Suzuki, K. (2019). Chronic Inflammation as an Immunological Abnormality and Effectiveness of Exercise. *Biomolecules*, 9(6), 223. <https://doi.org/10.3390/biom9060223>
- SWINGLE, K. F., & SHIDEMAN, F. E. (1972). Phases of the inflammatory response to subcutaneous implantation of a cotton pellet and their modification by certain antiinflammatory agents. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1(183), 226–234.
- Takeo, M., Lee, W., & Ito, M. (2015). Wound Healing and Skin Regeneration. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*, 5(1), a023267–a023267. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a023267>

- Theofilis, P., Sagris, M., Oikonomou, E., Antonopoulos, A. S., Siasos, G., Tsioufis, C., & Tousoulis, D. (2021). Inflammatory Mechanisms Contributing to Endothelial Dysfunction. *Biomedicines*, 9(7), 781. <https://doi.org/10.3390/biomedicines9070781>
- Thurston, G., Rudge, J. S., Ioffe, E., Zhou, H., Ross, L., Croll, S. D., Glazer, N., Holash, J., McDonald, D. M., & Yancopoulos, G. D. (2000). Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage. *Nature Medicine*, 6(4), 460–463. <https://doi.org/10.1038/74725>
- Tjølsen, A., Berge, O.-G., Hunskaar, S., Rosland, J. H., & Hole, K. (1992). The formalin test: an evaluation of the method. *Pain*, 51(1), 5–17. [https://doi.org/10.1016/0304-3959\(92\)90003-T](https://doi.org/10.1016/0304-3959(92)90003-T)
- TRESVENZOL, L. M. F., PARENTE, L. M. L. ., LINO JÚNIOR, R. S. ., FIUZA, T. S. ., BARA, M. T. F. ., CUNHA, L. C. ., LAXOR, L. P. ., & ; MIGUEL, M.P. 1 ; PAULA, J. R. (2013). Avaliação da toxicidade aguda e da atividade cicatrizante dos extratos etanólicos das folhas e raízes da *Memora nodosa* ( *Silva Manso* ) Miers ( *Bignoniaceae* ). *Revsita Brasileira Pl. Med.*, 15(3), 423–430.
- Tresvenzol, L. M. F., Parente, L. M. L., Lino Júnior, R. S., Fiuza, T. S., Bara, M. T. F., Cunha, L. C., Laxor, L. P., Miguel, M. P., & Paula, J. R. (2013). Avaliação da toxicidade aguda e da atividade cicatrizante dos extratos etanólicos das folhas e raízes da *Memora nodosa* (*Silva Manso*) Miers (*Bignoniaceae*). *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 15(3), 423–430. <https://doi.org/10.1590/S1516-05722013000300016>
- Usman, M., Khan, W. R., Yousaf, N., Akram, S., Murtaza, G., Kudus, K. A., Ditta, A., Rosli, Z., Rajpar, M. N., & Nazre, M. (2022). Exploring the Phytochemicals and Anti-Cancer Potential of the Members of Fabaceae Family: A Comprehensive Review. *Molecules*, 27(12), 3863. <https://doi.org/10.3390/molecules27123863>
- VACHER, J.; DUCHÊNE-MARULLAZ, P.; BARRAT, P. (1964). A propos de quelques produits usuels. Comparaison de deux méthodes d'étude des analgésiques. *The Journal of Experimental Medicine*, 11, 51–58.
- Valadares, M. C. (2006). Acute toxicity evaluation: strategies post “DL50 test era”. *Revista Eletrônica de Farmácia*, 3(2), 93–98.
- Valentim, S. M. S., Luz, P. B. da, Cardoso, E. L. O., Moretto, G., Moreira, A. C. S., Amaral, A. J. C., Miranda, B. S. de O., Freire, L. R., & Oliveira, K. L. de. (2023). Viability of Sucupira-Branca (*Pterodon emarginatus* VOGEL.) seeds collected directly from the mother tree and on the soil. In *DEVELOPMENT AND ITS APPLICATIONS IN SCIENTIFIC KNOWLEDGE*. Seven Editora. <https://doi.org/10.56238/devopinterscie-188>
- Vaou, N., Stavropoulou, E., Voidarou, C., Tsigalou, C., & Bezirtzoglou, E. (2021). Towards Advances in Medicinal Plant Antimicrobial Activity: A Review Study on Challenges and Future Perspectives. *Microorganisms*, 9(10), 2041. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9102041>

- Vieira, J. R. C., Leite, R. M. P., Lima, I. R., Navarro, D. do A. F., Bianco, E. M., & Leite, S. P. (2012). Oviposition and Embryotoxicity of *Indigofera suffruticosa* on Early Development of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2012, 1–5. <https://doi.org/10.1155/2012/741638>
- Vilahur, G., Ben-Aicha, S., Diaz-Riera, E., Badimon, L., & Padró, T. (2019). Phytosterols and Inflammation. *Current Medicinal Chemistry*, 26(37), 6724–6734. <https://doi.org/10.2174/0929867325666180622151438>
- Vilegas, J. H. Y., Marchi, E., & Lancas, F. M. (1997). Extraction of lowpolarity compounds (with emphasis on coumarin and kaurenoic acid) from *Mikania glomerata* (Guaco) leaves. *Phytochemical Analysis*, 8, 266–2070.
- Wagner, Hildebert; Bladt, S. (2001). Plant Drug Analysis - A Thin Layer Chromatography Atlas. *Springer Science & Business Media*, 385.
- Waller, J. P., Burke, S. P., Engel, J., Chade, A. R., & Bidwell, G. L. (2021). A dose-escalating toxicology study of the candidate biologic ELP-VEGF. *Scientific Reports*, 11(1), 6216. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-85693-6>
- Wang, G., Yang, F., Zhou, W., Xiao, N., Luo, M., & Tang, Z. (2023). The initiation of oxidative stress and therapeutic strategies in wound healing. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 157, 114004. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2022.114004>
- Wang, P.-H., Huang, B.-S., Horng, H.-C., Yeh, C.-C., & Chen, Y.-J. (2018). Wound healing. *Journal of the Chinese Medical Association*, 81(2), 94–101. <https://doi.org/10.1016/j.jcma.2017.11.002>
- Wang, X., & Liu, Y. (2022). Offense and Defense in Granulomatous Inflammation Disease. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2022.797749>
- Weeratunga, P., Moller, D. R., & Ho, L.-P. (2024). Immune mechanisms of granuloma formation in sarcoidosis and tuberculosis. *Journal of Clinical Investigation*, 134(1). <https://doi.org/10.1172/JCI175264>
- Wilkinson, H. N., & Hardman, M. J. (2020). Wound healing: cellular mechanisms and pathological outcomes. *Open Biology*, 10(9). <https://doi.org/10.1098/rsob.200223>
- Woolf, C. J. (2022). Pain modulation in the spinal cord. *Frontiers in Pain Research*, 3. <https://doi.org/10.3389/fpain.2022.984042>
- Xia, S., Lu, Y., Wang, J., He, C., Hong, S., Serhan, C. N., & Kang, J. X. (2006). Melanoma growth is reduced in fat-1 transgenic mice: Impact of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(33), 12499–12504. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605394103>
- Xiang, Y., Zhang, M., Jiang, D., Su, Q., & Shi, J. (2023). The role of inflammation in autoimmune disease: a therapeutic target. *Frontiers in Immunology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2023.1267091>



- Xie, Y., Yang, W., Tang, F., Chen, X., & Ren, L. (2014). Antibacterial Activities of Flavonoids: Structure-Activity Relationship and Mechanism. *Current Medicinal Chemistry*, 22(1), 132–149. <https://doi.org/10.2174/0929867321666140916113443>
- Xu, G., Sun, J., Liang, Y., Yang, C., & Chen, Z.-Y. (2011). Interaction of fatty acids with oxidation of cholesterol and  $\beta$ -sitosterol. *Food Chemistry*, 124(1), 162–170. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.06.003>
- Yadav, M., Parle, M., Jindal, D. K., & Dhingra, S. (2018). Protective effects of stigmasterol against ketamine-induced psychotic symptoms: Possible behavioral, biochemical and histopathological changes in mice. *Pharmacological Reports*, 70(3), 591–599. <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2018.01.001>
- Yadav, P., Chauhan, C., Singh, S., Banerjee, S., & Murti, K. (2022).  $\beta$ -sitosterol in Various Pathological Conditions: An Update. *Current Bioactive Compounds*, 18(6). <https://doi.org/10.2174/1573407218666211230144036>
- Yamaguchi, A., Botta, E., & Holinstat, M. (2022). Eicosanoids in inflammation in the blood and the vessel. *Frontiers in Pharmacology*, 13. <https://doi.org/10.3389/fphar.2022.997403>
- Yanguas, S. C., Willebrords, J., Johnstone, S. R., Maes, M., Decrock, E., De Bock, M., Leybaert, L., Cogliati, B., & Vinken, M. (2017). Pannexin1 as mediator of inflammation and cell death. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1864(1), 51–61. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.10.006>
- Yao, W., Cheng, J., Kandhare, A. D., Mukherjee-Kandhare, A. A., Bodhankar, S. L., & Lu, G. (2021). Toxicological evaluation of a flavonoid, chrysin: morphological, behavioral, biochemical and histopathological assessments in rats. *Drug and Chemical Toxicology*, 44(6), 601–612. <https://doi.org/10.1080/01480545.2019.1687510>
- YATSUDA, R., ROSALEN, P. L., CURY, J. A., MURATA, R. M., REHDERB, V. L. G., MELOB, L. V., & KOO, H. (2005). Effects of Mikania genus plants on growth and cell adherence of mutans streptococci. *Journal Ethnopharmacology*, 97, 83–189.
- Yazbek, P. B., Tezoto, J., Cassas, F., & Rodrigues, E. (2016). Plants used during maternity, menstrual cycle and other women's health conditions among Brazilian cultures. *Journal of Ethnopharmacology*, 179, 310–331. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2015.12.054>
- Yin, J., Shi, D., Sun, Y., Zhu, P., Zhao, Y., Xu, X., Chen, H., Wu, Y., Yuan, Z., & Gao, X.-H. (2023). IRF7 and CTSS are pivotal for cutaneous wound healing and may serve as therapeutic targets. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 8(1), 322. <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01517-1>
- Yin, Y., Liu, X., Liu, J., Cai, E., Zhu, H., Li, H., Zhang, L., Li, P., & Zhao, Y. (2018). Beta-sitosterol and its derivatives repress lipopolysaccharide/ d -galactosamine-induced acute hepatic injury by inhibiting the oxidation and inflammation in mice. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 28(9), 1525–1533.

<https://doi.org/10.1016/j.bmcl.2018.03.073>

- Yin, Z.-Y., Li, L., Chu, S.-S., Sun, Q., Ma, Z.-L., & Gu, X.-P. (2016). Antinociceptive effects of dehydrocorydaline in mouse models of inflammatory pain involve the opioid receptor and inflammatory cytokines. *Scientific Reports*, 6(1), 27129. <https://doi.org/10.1038/srep27129>
- Yuk, J. E., Woo, J. S., Yun, C.-Y., Lee, J.-S., Kim, J.-H., Song, G.-Y., Yang, E. J., Hur, I. K., & Kim, I. S. (2007). Effects of lactose- $\beta$ -sitosterol and  $\beta$ -sitosterol on ovalbumin-induced lung inflammation in actively sensitized mice. *International Immunopharmacology*, 7(12), 1517–1527. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2007.07.026>
- Zhang, H., Wang, Y., Qu, M., Li, W., Wu, D., Cata, J. P., & Miao, C. (2023). Neutrophil, neutrophil extracellular traps and endothelial cell dysfunction in sepsis. *Clinical and Translational Medicine*, 13(1). <https://doi.org/10.1002/ctm2.1170>
- Zhang, L., Hu, C., Xu, W., Wu, D., & Lei, S. (2022). Advances in wound repair and regeneration: Systematic comparison of cell free fat extract and platelet rich plasma. *Frontiers in Chemistry*, 10. <https://doi.org/10.3389/fchem.2022.1089277>
- Zhang, R., Han, Y., McClements, D. J., Xu, D., & Chen, S. (2022). Production, Characterization, Delivery, and Cholesterol-Lowering Mechanism of Phytosterols: A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 70(8), 2483–2494. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.1c07390>
- Zhaogao, L., Yaxuan, W., Mengwei, X., Haiyu, L., Lin, L., & Delin, X. (2023). Molecular mechanism overview of metabolite biosynthesis in medicinal plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 204, 108125. <https://doi.org/10.1016/J.PLAPHY.2023.108125>
- Zhong, J., Scholz, T., Yau, A. C. Y., Guerard, S., Hüffmeier, U., Burkhardt, H., & Holmdahl, R. (2018). Mannan-induced Nos2 in macrophages enhances IL-17-driven psoriatic arthritis by innate lymphocytes. *Science Advances*, 4(5). <https://doi.org/10.1126/sciadv.aas9864>
- Zhou, G.-R., Liao, B.-S., Li, Q.-S., Xu, J., & Chen, S.-L. (2021). Establishing a genomic database for the medicinal plants in the Brazilian Pharmacopoeia. *Chinese Medicine*, 16(1), 71. <https://doi.org/10.1186/s13020-021-00484-5>
- Ziegler, A.-M., Minkalis, A. L., Langdon, E. R., & Vining, R. (2022). Learning the neurobiology of pain: A scoping review of pain education from an instructional design perspective. *Patient Education and Counseling*, 105(6), 1379–1401. <https://doi.org/10.1016/j.pec.2021.09.021>
- Zumbusch, A. S., McEachern, E. L. F., Morgan, O. B., Nickner, E., & Mogil, J. S. (2024). Normative Preclinical Algesiometry Data on the von Frey and Radiant Heat Paw-Withdrawal Tests: An Analysis of Data from More Than 8,000 Mice Over 20 Years. *The Journal of Pain*. <https://doi.org/10.1016/j.jpain.2024.01.333>

# APÊNDICE A – Protocolo de avaliação macroscópica de feridas.

<b>Cor do leito da ferida</b>									
Opções de cor: Amarela (A); Vermelha (V) ou Preta (P)									
Ferida	Dias de experimento								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Ferida A									
Ferida B									
Ferida C									
Ferida D									

<b>Cor da borda da ferida</b>									
Opções de cor: Amarela (A); Vermelha (V) ou Preta (P)									
Ferida	Dias de experimento								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Ferida A									
Ferida B									
Ferida C									
Ferida D									

<b>Área da ferida</b>									
Ferida	Dias de experimento								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Ferida A									
Ferida B									
Ferida C									
Ferida D									

<b>Secreção da ferida</b>									
Opções de secreção: Serosa (Se); Sanguinolento (Sa); Purulento (P) ou Sem secreção (SS)									
Ferida	Dias de experimento								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Ferida A									
Ferida B									
Ferida C									
Ferida D									

<b>Inchaço da ferida</b>									
Ferida	Dias de experimento								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Ferida A									
Ferida B									
Ferida C									
Ferida D									

<b>Classificação quanto ao grau da ferida</b>									
Ferida	Dias de experimento								
	0	1	2	3	4	5	6	7	8
Ferida A									
Ferida B									
Ferida C									
Ferida D									

GRAU I: Não apresenta secreção, ulceração, nem inchaço avermelhado em torno;  
 GRAU II: Pouca secreção, cicatriz pouco lisada e inchaço ligeiramente avermelhado em torno da ferida;  
 GRAU III: Apresenta nível de secreção médio, cicatriz em parte lisadas e inchaço em torno da ferida;  
 GRAU IV: Secreção maciça, cicatriz totalmente lisada e com inchaço vermelho óbvio ao redor da ferida com manifestações infecciosas sistêmicas.

Fonte adaptada de (Garros et al., 2006; Santos, Czezczko, Nassif, et al., 2006; Tresvenzol et al., 2013).

APÊNDICE B – Protocolo experimental utilizado na triagem farmacológica, conforme o “*Screening Hipocrático*”.

ATIVIDADE FARMACOLÓGICA	QUALIFICAÇÃO DOS EFEITOS						
	Sem efeito;(-) Efeito diminuído;(+) Efeito aumentado; e (++) Efeito intenso						
	TEMPO						
	Até 30'	1 h	2 h	4 h	8 h	12 h	24 h
1) Atividade espontânea							
Posição do corpo							
Atividade motora							
2) Resposta afetiva motora							
Toque e fuga							
Passividade posicional							
Isolamento							
Elevação da cauda							
<b>Neurológico</b>							
1) Tônus muscular							
Mioclonia facial							
Extensão patas traseiras							
Força de apreensão							
2) Equilíbrio e marcha							
Reflexo de endireitamento							
Tônus muscular							
Marcha com fraqueza muscular							
3) Excitação e depressão do SNC							
Vocalização							
Mordendo pata							
Agressividade							
Sedação/prostração							
Hipnose/ vira barriga pra cima							
Anestesia/ aperta rabo							
Tremores cabeça ou corpo							
Contorções							
Convulsões							
Mortalidade							
<b>Fisiológico</b>							
Hiperemia							
Hipotermia							
Respiração rápida							
Dispneia							
Vermelhidão/rubor							
Cianose							
Piloereção							
Fechamento palpebral							
Micção							
Diarreia							
Secreção fezes							
Sangramentos oculares							
Espirros							
Fungar							
Lacrimejamento							
Priapismo							

Fonte: Adapta de (CAMPBELL; RICHTER, 1967; LITCHFIELD; WILCOXON, 1949; MALONE; ROBICHAUD, 1983).

## ANEXO A – Reveladores para CCD

### **Ferrocianeto de potássio 1% (m/v) (WAGNER; BLADT, 2001)**

A solução foi preparada pela dissolução de 0,10 g de ferrocianeto de potássio em 10 mL de água destilada e foi armazenada a -4°C.

### **Cloreto de Ferro III 2% (m/v) (WAGNER; BLADT, 2001)**

O reagente foi preparado pela adição de 0,20 g de cloreto de ferro a 10 mL de água destilada e guardou-se a -4°C.

### **Reagente de Liebermann-Burchard (WAGNER; BLADT, 2001)**

O reagente foi preparado pela adição cuidadosa de 5 mL de anidrido acético e 5 mL de ácido sulfúrico a 50 mL de etanol, enquanto se arrefece em gelo. O reagente foi preparado na altura do ensaio, devido à sua instabilidade.

### **Reagente de Wagner (BROSSI, 1988)**

O reagente foi preparado pela dissolução de 1 g de iodo e 10 g de iodeto de potássio em 50 mL de água destilada e pela adição de 2 mL de ácido acético glacial. O volume foi completo até 100 mL com água destilada.

## ANEXO B – Termo de aprovação do Comitê de Ética de Pesquisa em Animal.

Página 1 de 1



Universidade Federal da Bahia  
Instituto Multidisciplinar em Saúde - Campus Anísio Teixeira  
COMISSÃO DE ÉTICA EM USO DE ANIMAIS  
(CEUA - IMS/CAT - UFBA)



PROJETO DE PESQUISA - Protocolo 075/2019 - Aprovado sem restrições em 31/10/2019
<p><b>Título:</b> Avaliação das atividades anti-inflamatória, antinociceptiva, cicatrizante e toxicológica do extrato etanólico, frações e subfrações do caule e casca da <i>Aeschynomene martii</i> Benth.</p> <p><b>Protocolo:</b> 075/2019</p> <p><b>Pesquisador:</b> Regiane Yatsuda</p> <p><b>Instituição:</b> Instituto Multidisciplinar em Saúde – Campus Anísio Teixeira – UFBA</p>
CERTIFICADO
<p>A Comissão de Ética em Uso de Animais (CEUA - IMS/CAT - UFBA) certifica que o projeto de pesquisa "<b>Avaliação das atividades anti-inflamatória, antinociceptiva, cicatrizante e toxicológica do extrato etanólico, frações e subfrações do caule e casca da <i>Aeschynomene martii</i> Benth</b>", Protocolo nº <b>075/2019</b>, do pesquisador <b>Regiane Yatsuda</b>, que foi submetido à avaliação desta Comissão, está de acordo com os princípios éticos da experimentação animal e foi <b>aprovado</b> na 27ª Reunião Ordinária do dia 31 de outubro de 2019.</p>
CERTIFICATE
<p>The Committee on Ethics in Animal Use (CEUA - IMS / CAT - UFBA) certifies that the research project "<b>Evaluation of the antiinflammatory, antinociceptive, healing and toxicological activities of the ethanolic extract, fractions and subfractions of <i>Aeschynomene martii</i> Benth stem and bark</b>" Protocol nº <b>075/2019</b> of the researcher <b>Regiane Yatsuda</b>, who was submitted to the evaluation of this Commission is in accordance with the ethical principles of animal experimentation and was approved at the 27th ordinary meeting on 10/31/2019.</p>

Bruno Lopes Bastos  
Coordenador CEUA - IMS/CAT – UFBA

Vitória da Conquista, 31 de outubro de 2019.

## ANEXO C – Registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico.



Ministério do Meio Ambiente - MMA

**Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA**

Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

**Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico**

<b>Número: 12292-1</b>	<b>Data da Emissão: 06/08/2007 22:48</b>
<b>Dados do titular</b>	
Registro no Ibama: 2060948	Nome: Regiane Yatsuda
	CPF: 288.773.518-70

**Observações, ressalvas e condicionantes**

1	A participação do(a) pesquisador(a) estrangeiro(a) nas atividades previstas nesta autorização depende de autorização expedida pelo Ministério de Ciência e Tecnologia (CNPq/MCT);
2	A autorização ou licença do Ibama não exige o pesquisador da necessidade de obter outras anuências, como: I) do proprietário, arrendatário, possessor ou morador quando as atividades de pesquisa forem realizadas em área de domínio privado; II) da comunidade indígena envolvida, ouvido o órgão indigenista oficial, quando as atividades de pesquisa forem executadas em terra indígena; III) do Conselho de Defesa Nacional, quando as atividades de pesquisa forem executadas em área indispensável à segurança nacional; IV) da autoridade marítima, quando as atividades de pesquisa forem executadas em águas jurisdicionais brasileiras, na plataforma continental ou na zona econômica exclusiva; V) da Fundação Palmares, quando as atividades de pesquisa forem executadas em áreas de Quilombolas; VI) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e da Agência Nacional de Vigilância Sanitária, quando da entrada e saída de material biológico do País; VII) do Departamento Nacional da Produção Mineral, quando a pesquisa visar a exploração de depósitos fossilíferos ou a extração de espécimes fósseis; VIII) do órgão gestor da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, entre outras.
3	O material biológico coletado deverá ser utilizado exclusivamente para atividades didáticas ou científicas sem potencial de uso econômico;
4	É necessário a obtenção de anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como de consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade
5	Este documento não abrange a coleta de vegetais hidróbios, tendo em vista que o Decreto-Lei nº 221/1967 e o Art. 36 da Lei nº 9.605/1998 estabelecem a necessidade de obtenção de autorização para coleta de vegetais hidróbios para fins científicos.
6	Este documento não é válido para: a) coleta ou transporte de espécies que constem nas listas oficiais de espécies ameaçadas de extinção; b) recebimento ou envio de material biológico ao exterior; e c) realização de pesquisa em unidade de conservação federal ou em caverna. □
7	Este documento não dispensa a obtenção de autorização de acesso ao componente do patrimônio genético ou ao conhecimento tradicional associado nos termos da legislação vigente.

**Táxons autorizados**

Nível taxonômico	Táxon(s)
FILO	Coniferophyta, Magnoliophyta, Lycopodiophyta, Ginkgophyta

Este documento (Comprovante de registro para coleta de material botânico, fúngico e microbiológico) foi expedido com base na Instrução Normativa Ibama nº154, de 01 de março 2007, publicada no DOU do dia 02/03/2007. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Ibama/Sisbio na internet ([www.ibama.gov.br/sisbio](http://www.ibama.gov.br/sisbio)).

**Código de autenticação: 16978523**

Página 1/1



## ANEXO D – Registro de autorização para atividade com finalidade científica.



Ministério do Meio Ambiente - MMA  
Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade - ICMBio  
Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade - SISBIO

## Autorização para atividades com finalidade científica

Número: 13258-3	Data da Emissão: 27/05/2020 23:17:32	Data da Revalidação*: 01/01/2021
De acordo com o art. 28 da IN 03/2014, esta autorização tem prazo de validade equivalente ao previsto no cronograma de atividades do projeto, mas deverá ser revalidada anualmente mediante a apresentação do relatório de atividades a ser enviado por meio do Sisbio no prazo de até 30 dias a contar da data do aniversário de sua emissão.		

## Dados do titular

Nome: Regiane Yatsuda	CPF: 288.773.518-70
Título do Projeto: Avaliação da atividade biológica de compostos isolados de plantas medicinais do Sudoeste da Bahia	
Nome da Instituição: Universidade Federal da Bahia	CNPJ: 15.180.714/0001-04

## Cronograma de atividades

#	Descrição da atividade	Início (mês/ano)	Fim (mês/ano)
1	fitoquímica e atividade biológica plantas	10/2007	12/2007
2	coleta de plantas	10/2007	12/2007
3	coleta de plantas para análise fitoquímica e biológica	11/2019	11/2020

## Equipe

#	Nome	Função	CPF	Nacionalidade
1	Lucas Miranda Marques	pesquisador colaborador	284.451.368-95	Brasileira
2	Mariluze Peixoto Cruz	pesquisador colaborador	963.926.655-87	Brasileira
3	Ana Paula Trovatti Uetanabaro	Pesquisadora Colaboradora	847.867.876-04	Brasileira

## Observações e ressalvas

1	O pesquisador somente poderá realizar atividade de campo após o término do estado de emergência devido à COVID-19, assim declarado por ato da autoridade competente.
2	Em caso de pesquisa em UNIDADE DE CONSERVAÇÃO, o pesquisador titular desta autorização deverá contactar a administração da unidade a fim de CONFIRMAR AS DADAS das expedições, as condições para realização das coletas e de uso da infraestrutura da unidade.
3	O titular de autorização ou de licença permanente, assim como os membros de sua equipe, quando da violação da legislação vigente, ou quando da inadequação, omissão ou falsa descrição de informações relevantes que subsidiaram a expedição do ato, poderá, mediante decisão motivada, ter a autorização ou licença suspensa ou revogada pelo ICMBio, nos termos da legislação brasileira em vigor.
4	Este documento somente poderá ser utilizado para os fins previstos na Instrução Normativa ICMBio nº 03/2014 ou na Instrução Normativa ICMBio nº 10/2010, no que especifica esta Autorização, não podendo ser utilizado para fins comerciais, industriais ou esportivos. O material biológico coletado deverá ser utilizado para atividades científicas ou didáticas no âmbito do ensino superior.
5	As atividades de campo exercidas por pessoa natural ou jurídica estrangeira, em todo o território nacional, que impliquem o deslocamento de recursos humanos e materiais, tendo por objeto coletar dados, materiais, espécimes biológicos e minerais, peças integrantes da cultura nativa e cultura popular, presente e passada, obtidos por meio de recursos e técnicas que se destinem ao estudo, à difusão ou à pesquisa, estão sujeitas a autorização do Ministério de Ciência e Tecnologia.
6	O titular de licença ou autorização e os membros da sua equipe deverão optar por métodos de coleta e instrumentos de captura direcionados, sempre que possível, ao grupo taxonômico de interesse, evitando a morte ou dano significativo a outros grupos; e empregar esforço de coleta ou captura que não comprometa a viabilidade de populações do grupo taxonômico de interesse em condição in situ.
7	Esta autorização NÃO exige o pesquisador titular e os membros de sua equipe da necessidade de obter as anuências previstas em outros instrumentos legais, bem como do consentimento do responsável pela área, pública ou privada, onde será realizada a atividade, inclusive do órgão gestor de terra indígena (FUNAI), da unidade de conservação estadual, distrital ou municipal, ou do proprietário, arrendatário, posseiro ou morador de área dentro dos limites de unidade de conservação federal cujo processo de regularização fundiária encontra-se em curso.
8	Este documento não dispensa o cumprimento da legislação que dispõe sobre acesso a componente do patrimônio genético existente no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, ou ao conhecimento tradicional associado ao patrimônio genético, para fins de pesquisa científica, bioprospecção e desenvolvimento tecnológico. Veja maiores informações em <a href="http://www.mma.gov.br/cgen">www.mma.gov.br/cgen</a> .

Este documento foi expedido com base na Instrução Normativa nº 03/2014. Através do código de autenticação abaixo, qualquer cidadão poderá verificar a autenticidade ou regularidade deste documento, por meio da página do Sisbio/ICMBio na Internet ([www.icmbio.gov.br/sisbio](http://www.icmbio.gov.br/sisbio)).

Código de autenticação: 0132580320200527

Página 1/4