

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
FISIOLOGIA

TAÍNA SCHEID

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE UMA FRAÇÃO
ANTIOXIDANTE DE *SCHINUS TEREBINTHIFOLIUS* SOBRE
PARÂMETROS NOCICEPTIVOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO EM
SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE RATOS SUBMETIDOS A UM
MODELO DE DOR NEUROPÁTICA**

Tese de doutorado

PORTO ALEGRE

2014

TAÍNA SCHEID

**EFEITOS DA ADMINISTRAÇÃO DE UMA FRAÇÃO
ANTIOXIDANTE DE *SCHINUS TEREBINTHIFOLIUS* SOBRE
PARÂMETROS NOCICEPTIVOS E DE ESTRESSE OXIDATIVO EM
SISTEMA NERVOSO CENTRAL DE RATOS SUBMETIDOS A UM
MODELO DE DOR NEUROPÁTICA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas: Fisiologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Fisiologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Wania A. Partata.

PORTO ALEGRE

2014

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Santo Expedito, por iluminar os meus caminhos.

À Wania, por orientar com presença, atenção, paciência, sabedoria. Pelo incentivo, pelo respeito ao ritmo de cada um, por compartilhar suas reflexões sobre a ciência, a vida, o ser humano. Pela amizade.

À minha família, pelo incentivo, amor, aconchego.

À Nelma, pelos ricos encontros que tivemos.

Ao Willian Ricardo, pelo incentivo em vários momentos. Pelas reflexões compartilhadas com atenção e carinho. Pelo trabalho dominical com os ratinhos.

Aos meus amigos e colegas de laboratório: Ana Paula, Maira, Carolina, Jéssica, Andréa, Felipe. Pelo companheirismo na bancada e na vida. Amadurecemos (!) juntos! Em especial à Maira, pelos meses de auxílio diário no trabalho com os animais, com certeza a fase mais delicada dos experimentos. E à Ana, amiga querida, que nunca deixou um dia de experimento sem trilha sonora, e trouxe sua empolgação, energia e dotes culinários pra deixar os nossos corações mais felizes.

Aos professores do PPG Fisiologia, pelos ensinamentos.

À Prof. Gilsane Lino Von Poser, pela disponibilização do laboratório de Farmacognosia (Faculdade de Farmácia, UFRGS) para preparação das frações de *Schinus terebinthifolius*.

Ao Prof. Eduardo Miranda Ethur, pela disponibilização do laboratório do Núcleo de Estudo e Pesquisa de Produtos Naturais (UNIVATES) para a preparação das frações e da triagem fitoquímica. Pela participação das prestativas alunas Raquel, Ana Caroline e Bárbara nos experimentos com a aroeira.

Ao Prof. Aldo B. Lucion, por disponibilizar seu laboratório para realização dos experimentos comportamentais. E agradeço ao Thiago por auxiliar nestes experimentos com a maior disposição.

Ao pessoal da Secretaria do PPG Fisiologia, Alice, Diego, Vanessa, Daniele, por sua presteza na resolução dos vários trâmites burocráticos.

À Cláudia, pelo cuidado e organização com os equipamentos e especialmente com o freezer -80°C, onde foram mantidas as amostras de trabalho. Pela conversa animada, pela presteza.

Aos amigos e colegas de pós-graduação, Rafael, Jéssica, Felipe, Gustavo, Fernanda, Liciane, pela troca de ideias, dúvidas, alegrias, perspectivas.

Este trabalho foi realizado com recursos da FAPERGS e CNPq. Obrigada!

"Descobri como é bom chegar quando se tem paciência. E para se chegar, onde quer que seja, aprendi que não é preciso dominar a força, mas a razão. É preciso, antes de mais nada, querer".

Amyr Klink

RESUMO

O tratamento da dor neuropática, uma condição clínica que resulta de lesão ao sistema somatossensorial, é ainda um grande desafio. O envolvimento das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERONs) na fisiopatologia desta dor aponta para o potencial de moléculas antioxidantes como novas abordagens terapêuticas. *Schinus terebinthifolius* é uma planta tradicionalmente usada no tratamento de condições dolorosas e seus extratos apresentam variados compostos fenólicos, moléculas com potencial antioxidante. Assim, o presente estudo teve como objetivos, primeiramente, determinar o potencial antioxidante de diferentes frações obtidas das folhas de *Schinus terebinthifolius*, a fim de selecionar aquela com melhor desempenho antioxidante. Para isso foram medidos o potencial reativo antioxidante total (TRAP) e as atividades sequestradoras dos radicais DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) e hidroxil das frações hexano (HeF), diclorometano (DcF), acetato de etila (EtF) e metanol (MeF). Também foi realizada uma triagem fitoquímica destas frações, por cromatografia em camada delgada (CCD), e a medida da concentração de fenóis totais. Após, a fração selecionada, MeF, foi diluída em solução salina e administrada intraperitonealmente (20 mg/kg, 10 dias) em ratos com lesão nervosa por compressão do nervo isquiático (CCI), um modelo de dor neuropática, e lesão tecidual pelo isolamento desse nervo (*sham*), para avaliação de seus efeitos sobre a sensibilidade mecânica e térmica, e sobre a atividade das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutaciona peroxidase (GPx) e glutaciona transferase (GST), e as concentrações de ácido ascórbico (AA), tióis totais (T-SH), peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos lipídicos (LPO), na medula espinal lombossacral e todo o córtex cerebral. Ainda, foram avaliados possíveis efeitos desta fração sobre comportamentos locomotores e do tipo ansiedade (teste do campo aberto e labirinto em cruz

elevado), e sobre as enzimas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), γ -glutamil transpeptidase (GGT) e bilirrubina e suas frações, além da massa corporal, em ratos sem qualquer intervenção cirúrgica. A CCI induziu o desenvolvimento de hiperalgesia térmica e mecânica nos ratos tratados com salina, e a administração de MeF preveniu estes eventos. Diferentes parâmetros de estresse oxidativo apresentaram-se alterados na medula espinal e córtex cerebral dos animais com lesão CCI e *sham*, e a administração de MeF foi capaz de modificar alguns destes parâmetros, particularmente nos animais *sham* aos três dias. Em relação aos possíveis efeitos adversos da administração de MeF, não foram observadas diferenças significativas nos comportamentos locomotores e do tipo ansiedade, nos parâmetros plasmáticos e na massa corporal. Estes resultados demonstram que a MeF de *Schinus terebinthifolius* possui propriedades antinociceptivas e é capaz de alterar parâmetros de estresse oxidativo no SNC em animais *sham* e CCI. Possivelmente estes, e outros mecanismos relacionados à atividade anti-inflamatória já descrita para componentes de *Schinus terebinthifolius*, estejam contribuindo para a ação antinociceptiva da fração. Assim, considerando este potencial e a ausência de efeitos adversos sobre os parâmetros estudados, a MeF pode ser um candidato no tratamento para condições dolorosas.

ABSTRACT

The management of neuropathic pain, a clinical condition that results of somatosensory system injury, is still a major challenge to clinicians. The implication of reactive oxygen species in the development of this pain type points to antioxidant molecules as new approaches in the management of pain. *Schinus terebinthifolius* is traditionally used to treat wounds and painful conditions and it was related that is rich in phenolic compounds, antioxidant molecules. So, in this study it was determined the antioxidant potential of different fractions of leaves of *Schinus terebinthifolius* to select the fraction with the best antioxidant performance. For this purpose, Total reactive antioxidant potential (TRAP), DPPH and hydroxyl scavenging activities of hexane (HeF), dichloromethane (DcF), ethyl acetate (EtF) and methanol (MeF) fractions were measured. It was also performed a qualitative screening of these fractions, by thin layer chromatography (TLC) and the measure of total phenolic content. After, the selected fraction, MeF was diluted in saline and administered (20 mg / kg, i.p., 10 days) in rats with peripheral injury by chronic constriction injury (CCI), a model of neuropathic pain, and tissue injury by isolation of this nerve (*sham*), to evaluate their effects on mechanical and thermal sensitivity, and on the activity of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) and glutathione transferase (GST), and the concentrations of ascorbic acid (AA), total thiols (T-SH), hydrogen peroxide and lipid hydroperoxide (LPO) in the lumbosacral spinal cord and the cerebral cortex. Still, we evaluated possible effects of this fraction on locomotor and anxiety-like behaviors (open field and elevated plus maze tests), and on the enzymes aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), γ -glutamyl transpeptidase (GGT),

bilirubin and on body weight in naïve rats. CCI significantly induced thermal hyperalgesia and mechanical allodynia in animals treated with saline. The administration of MeF prevented the development of thermal hyperalgesia and increased mechanical threshold. Different oxidative stress parameters were altered in spinal cord and cerebral cortex of animals with *sham* CCI surgery, and the administration of MeF was able to modify some of these parameters, particularly in *sham* at three days. No significant differences were observed in locomotor and anxiety-like behaviors, plasma parameters and body weight. These results demonstrate that the MeF of *Schinus terebinthifolius* has antinociceptive properties and is able to change parameters of oxidative stress in the CNS in sham and CCI animals. Possibly these and other related anti-inflammatory activity, already described for components of *Schinus terebinthifolius*, are contributing to the antinociceptive fraction mechanisms. So, considering this potential and the absence of side effects related to the parameters studied, MeF may be a candidate for the treatment for painful conditions.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema de um segmento da medula espinal ilustrando a formação do nervo isquiático pela união das raízes dorsais e ventrais da medula espinal.....	25
Figura 2 – Fotografia mostrando a árvore, à esquerda, e folhas e frutos de <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi, à direita.....	28
Figura 3 – Compostos químicos já identificados em folhas, frutos e cascas de <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi.....	31
Figura 4 – Esquema geral mostrando o protocolo experimental.....	42
Figura 5 – Região de coleta da espécie <i>Schinus terebinthifolius</i> , na cidade de Lajeado, região sul do Brasil (A). A fotografia indicada pela seta que emerge da região de Lajeado mostra um galho com folhas da espécie <i>Schinus terebinthifolius</i> (B).....	44
Figura 6 – Esquema temporal mostrando os dias das avaliações das sensibilidades mecânica e térmica (testes de von Frey e placa quente, respectivamente), da cirurgia, morte e coleta dos tecidos nos ratos dos grupos experimentais controle, <i>Sham</i> e CCI (Experimento 1, A); e da pesagem, realização dos testes de campo aberto e labirinto, morte e coleta de sangue nos ratos do grupo controle (Experimento 2, B).....	53
Figura 7 – Medidas da sensibilidade térmica em ratos sem qualquer manipulação cirúrgica (Controle), submetidos à manipulação (<i>SHAM</i>) e compressão no nervo isquiático (CCI) que receberam administrações intraperitoneais de solução salina ou fração metanólica (MeF) obtida a partir de folhas de <i>Schinus terebinthifolius</i> , na dose de 20 mg/kg/dia, por dez dias.....	71

Figura 8 – Medidas da sensibilidade mecânica em ratos sem qualquer manipulação cirúrgica (Controle), submetidos à manipulação (*SHAM*) e compressão no nervo isquiático (CCI) que receberam administrações intraperitoneais de solução salina ou fração metanólica (MeF) obtida a partir de folhas de *Schinus terebinthifolius*, na dose de 20 mg/kg/dia, por dez dias.....72

Figura 9 – Parâmetros de estresse oxidativo em **medula espinal** de ratos sem qualquer manipulação cirúrgica (Controle), submetidos à manipulação (Sham) e compressão no nervo isquiático (CCI) que receberam administrações intraperitoneais de solução salina ou fração metanólica (FM) de *Schinus terebinthifolius*, na dose de 20 mg/kg/dia, por dez dias. Estão representadas as atividades das enzimas superóxido dismutase (A), catalase (B), glutathione peroxidase (C) e concentrações de peróxido de hidrogênio (D).....76

Figura 10 – Parâmetros de estresse oxidativo em **medula espinal** de ratos sem qualquer manipulação cirúrgica (Controle), submetidos à manipulação (Sham) e compressão no nervo isquiático (CCI) que receberam administrações intraperitoneais de solução salina ou fração metanólica (FM) de *Schinus terebinthifolius*, na dose de 20 mg/kg/dia, por dez dias. Estão representadas as atividade da enzima glutathione transferase (A) e concentrações de tióis totais (B), ácido ascórbico (C) e hidroperóxidos lipídicos, produtos de lipoperoxidação (D).....77

Figura 11 – Parâmetros de estresse oxidativo em **córtex cerebral** de ratos sem qualquer manipulação cirúrgica (Controle), submetidos à manipulação (Sham) e compressão no nervo isquiático (CCI) que receberam administrações intraperitoneais de solução salina ou fração metanólica (FM) de *Schinus terebinthifolius*, na dose de 20 mg/kg/dia, por dez dias. Estão representadas as atividades das enzimas superóxido dismutase (A), catalase (B), glutathione peroxidase (C) e concentrações de peróxido de hidrogênio (D).....80

Figura 12 – Parâmetros de estresse oxidativo em **córtex cerebral** de ratos sem qualquer manipulação cirúrgica (Controle), submetidos à manipulação (Sham) e compressão no nervo isquiático (CCI) que receberam administrações intraperitoneais de solução salina ou fração metanólica (FM) de *Schinus terebinthifolius*, na dose de 20 mg/kg/dia, por dez dias. Estão representadas a atividade da enzima glutathione transferase (A) e concentrações de tióis totais (B), ácido ascórbico (C) e hidroperóxidos lipídicos, produtos de lipoperoxidação (D).81

Figura 13 – Esquema do sistema nervoso central de um rato mostrando, nos quadros ao lado, a síntese dos resultados dos parâmetros de estresse oxidativo avaliados na medula espinal e córtex cerebral de ratos submetidos à manipulação (*Sham*) e compressão no nervo isquiático (CCI) que receberam administrações intraperitoneais de solução salina (A) ou fração metanólica (MeF) de *Schinus terebinthifolius* (B), na dose de 20 mg/kg/dia, por três dias e dez dias.....82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classes de constituintes, solventes e reveladores empregados na triagem fitoquímica das frações obtidas de folhas de <i>Schinus terebinthifolius</i>	46
Tabela 2. Propriedades antioxidantes (A), teor de fenóis totais (B) e classes de constituintes vegetais (C) das diferentes frações obtidas de folhas de <i>Schinus terebinthifolius</i>	68
Tabela 3. Efeitos da administração de fração metanólica (MeF) das folhas de <i>Schinus terebinthifolius</i> e salina sobre comportamentos do tipo ansiedade e locomoção em ratos sem qualquer intervenção cirúrgica.....	84
Tabela 4. Efeitos da administração de fração metanólica (MeF) das folhas de <i>Schinus terebinthifolius</i> e salina sobre parâmetros plasmáticos indicativos de dano hepático em ratos sem qualquer intervenção cirúrgica.....	85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA Ácido ascórbico

BHT Butil hidroxi tolueno

CAT Catalase

CCI Compressão no nervo isquiático

CDNB 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno

DcF Fração diclorometano

DHA dehidroascorbato

DPPH 2,2-difenil-1-picril-hidrazila

EAAT Transportador de aminoácidos excitatórios

ERONs Espécies reativas de oxigênio e nitrogênio

EtF Fração acetato de etila

GPx Glutathiona peroxidase

GST Glutathiona transferase

GSH Glutathiona reduzida

H₂O₂ Peróxido de hidrogênio

HeF Fração hexano

LPO Lipoperoxidação

MeF Fração metanol

NADPH Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato, forma reduzida

NOX NADPH oxidase

PBS Tampão fosfato-salina

SNC Sistema nervoso central

SOD Superóxido dismutase

T-SH Tióis totais

TRAP Potencial reativo antioxidante total

x_c⁻ Trocador glutamato-cistina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
1.1 Dor neuropática	20
1.2 A compressão do nervo isquiático, um modelo para o estudo da dor neuropática periférica	23
1.3 Plantas medicinais na pesquisa por novas substâncias para o manejo da dor neuropática	25
1.4 <i>Schinus terebinthifolius</i> Raddi	26
1.5 Envolvimento das Espécies Reativas de Oxigênio de Nitrogênio (ERONs) na fisiopatologia da dor neuropática	32
2. HIPÓTESE	38
3. OBJETIVOS	39
3.1 Objetivo geral	39
3.2 Objetivos específicos	39
4. MATERIAIS E MÉTODOS	42
4.1 Esquema geral do protocolo experimental	42
4.2 Reagentes	43
4.3 Triagem fitoquímica e avaliação da atividade antioxidante das frações das folhas de <i>Schinus terebinthifolius</i>	43
4.3.1 Coleta do material vegetal	43

4.3.2	Preparação das frações.....	44
4.3.3	Triagem fitoquímica das frações.....	45
4.3.4	Avaliação da atividade antioxidante das frações.....	47
4.3.4.1	Atividade sequestradora do radical DPPH.....	47
4.3.4.2	Atividade sequestradora do radical hidroxil.....	48
4.3.4.3	Potencial antioxidante total (TRAP).....	49
4.4	Efeito da administração da fração metanólica de <i>Schinus terebinthifolius</i> sobre parâmetros nociceptivos em ratos controle, <i>sham</i> e com compressão do nervo isquiático.....	50
4.4.1	Animais: procedência e manutenção.....	50
4.4.2	Delineamento experimental.....	50
4.4.3	Compressão do nervo isquiático.....	54
4.4.4	Parâmetros nociceptivos.....	55
4.4.4.1	Sensibilidade térmica (Teste da Placa quente).....	55
4.4.4.2	Sensibilidade mecânica (Teste de Von Frey).....	55
4.5	Efeito da administração da fração metanólica de <i>Schinus terebinthifolius</i> sobre parâmetros oxidativos em medula espinal e córtex cerebral de ratos controle, <i>sham</i> e com compressão do nervo isquiático.....	56
4.5.1	Preparação das amostras.....	56
4.5.2	Atividade das enzimas antioxidantes.....	57
4.5.3	Ácido ascórbico.....	59
4.5.4	Peróxido de Hidrogênio.....	59
4.5.5	Tióis Totais.....	60
4.5.6	Hidroperóxidos lipídicos.....	60

4.5.7 Proteínas.....	61
4.6 Efeito da administração da fração metanólica de <i>Schinus terebinthifolius</i> sobre comportamentos locomotores e do tipo ansiedade, massa corporal e parâmetros plasmáticos indicativos de dano hepático em ratos controle.....	62
4.6.1 Teste do Campo aberto.....	62
4.6.2 Teste do Labirinto em Cruz Elevado.....	63
4.6.3 Massa corporal.....	63
4.6.4 Parâmetros plasmáticos.....	64
4.7 Análise estatística.....	64
5. RESULTADOS.....	66
5.1 Triagem fitoquímica e avaliação da atividade antioxidante das frações das folhas de <i>Schinus terebinthifolius</i>.....	66
5.1.1 Rendimento das frações.....	66
5.1.2 Triagem fitoquímica das frações.....	66
5.1.3 Atividade antioxidante das frações.....	67
5.2 Efeito da administração da fração metanólica de <i>Schinus terebinthifolius</i> sobre parâmetros antinociceptivos em ratos controle, <i>sham</i> e com compressão no nervo isquiático.....	69
5.2.1 Sensibilidade térmica.....	69
5.2.2 Sensibilidade mecânica.....	69
5.3 Efeito da administração da fração metanólica de <i>Schinus terebinthifolius</i> sobre parâmetros de estresse oxidativo em medula espinal e córtex cerebral de ratos controle, <i>sham</i> e com compressão do nervo isquiático.....	73
5.3.1 Medula espinal.....	73
5.3.2 Córtex cerebral.....	78

5.4 Efeito da administração da fração metanólica de <i>Schinus terebinthifolius</i> sobre comportamentos locomotores e do tipo ansiedade, massa corporal e parâmetros plasmáticos indicativos de dano hepático em ratos controle.....	83
6. DISCUSSÃO.....	86
7. CONCLUSÕES.....	100
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	101
ANEXOS.....	113

1. INTRODUÇÃO

1.1 Dor neuropática

De acordo com a definição dada pela Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP, *International Association for the Study of Pain*), a dor é uma experiência sensorial desagradável associada a um dano tecidual real ou potencial ou descrita em termos que sugerem tal dano, a qual envolve não apenas componentes sensoriais, mas também emocionais (LOESER; TREEDE, 2008). Para que um estímulo nocivo seja percebido como doloroso existe um intrincado trajeto envolvendo diferentes regiões do sistema nervoso. Entretanto, nem sempre um estímulo periférico é necessário para que ocorra a sensação de dor (ex. dor talâmica) e, em contrapartida, pode haver estimulação nociceptiva sem que ocorra dor (LOPES, 2004). Dessa forma, é importante distinguir o fenômeno de dor, que é subjetivo, do fenômeno de nocicepção, que diz respeito aos processos neurais de codificação e processamento do estímulo nocivo (LOESER; TREEDE, 2008). A nocicepção, portanto, aparece como o objeto de estudo mais adequado nas abordagens para o estudo da dor onde são empregados modelos animais (incapazes de verbalizar sua percepção do fenômeno doloroso) (KAVALIERS, 1988).

A dor pode ser classificada de várias formas (quanto a sua natureza, duração, intensidade), mas para os propósitos deste texto cabe abordar a diferença entre a dor nociceptiva e a neuropática. A dor nociceptiva tem a finalidade essencial de sinalizar a ocorrência de danos à integridade física, e decorre da ativação fisiológica dos nociceptores. Nesse caso a sensação de dor está diretamente ligada à presença do estímulo nocivo, e cessa

assim que este se encerra ou, havendo dano tecidual (não neural) e conseqüente processo inflamatório, sua duração é limitada ao processo de cura da lesão (BONICA; LOESER, 2001). A dor neuropática, por sua vez, ocorre em função de lesão ou doença que afete o sistema somatossensorial (NICKEL et al., 2012) em função de traumas mecânicos, doenças metabólicas ou nutricionais (diabetes, hipotireoidismo, pelagra), alcoolismo, uso de fármacos (anti-retrovirais, anti-neoplásicos), exposição a toxinas (acrilamida, óxido de etileno, arsênio), neoplasias, lesões vasculares (isquemia, hemorragias, malformações), entre outros (BARON; BINDER; WASNER, 2010). Tanto o sistema nervoso periférico quanto o central podem ser acometidos por tais injúrias, o que caracteriza a dor em neuropática periférica ou central, respectivamente. Como resultado, ocorrem diversas alterações (ditas mal adaptativas) ao longo de todo neuroeixo (COHEN; MAO, 2014).

Após uma lesão nervosa periférica, por exemplo, ocorrem alterações na expressão e funcionalidade de canais iônicos na fibra nervosa nociceptiva e vizinhas a ela, o que favorece a ocorrência de disparos ectópicos repetidos e contribui para o processo de sensibilização central, dor espontânea e hiperalgesia (dor aumentada frente a um estímulo nocivo) (XU; YAKSH, 2011). A sensibilização central, cuja função adaptativa é de facilitar o aparecimento de respostas reflexas e comportamentos protetores, quando decorrente de estimulação nociceptiva sustentada e de alta frequência, como ocorre nas lesões nervosas, conduz a alterações neuronais permanentes (LOPES, 2004), o que parece ser um dos fenômenos chave na fisiopatologia da dor neuropática. Alguns dos eventos envolvidos no desenvolvimento desta sensibilização, como alterações na neurotransmissão glutamatérgica, são mediados por vias de sinalização envolvendo espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERONs) (JANES; NEUMANN; SALVEMINI, 2012). A participação das EROs na fisiopatologia da dor neuropática, por sua relevância neste trabalho, será abordada com mais detalhes adiante. Além disso, ocorrem modificações no fenótipo neuroquímico dos neurônios nociceptivos, com

incremento na liberação de substâncias algogênicas, como a substância P, inclusive por fibras que usualmente transmitem apenas informação inócua (fibras β) (NICKEL et al., 2012), evento que parece ser importante para o aparecimento do fenômeno de alodinia (dor frente a um estímulo inócua), tão comum nos pacientes com dor neuropática (VON HEHN; BARON; WOOLF, 2012). Estes e outros mecanismos conduzem a uma diversidade de sintomas bastante característicos, como dor persistente ou de aparecimento súbito, sem estímulo aparente, dor em queimação ou choque e alterações na sensibilidade, como a alodinia e hiperalgesia já mencionadas (WOOLF; MANNION, 1999; MAGRINELLI; ZANETTE; TAMBURIN, 2013). Esta rica sintomatologia está sujeita ainda a variações individuais relacionadas à existência de comorbidades e características genéticas, e à própria forma de encarar a dor.

É, portanto, um grande desafio manejar o quadro doloroso neuropático, com o qual convivem entre 6,9 e 10% da população, e que possui grande impacto negativo na qualidade de vida do indivíduo acometido (VAN HECKE et al., 2014). As intervenções terapêuticas envolvem o uso de fármacos, os bloqueios nervosos, a neuroestimulação, acupuntura e técnicas psicoterápicas (BARON; BINDER; WASNER, 2010). Apesar desta interdisciplinaridade crescente, a abordagem farmacológica é a mais utilizada e é comum a prescrição de vários medicamentos para tratar um único indivíduo. Os fármacos que apresentam os resultados mais promissores (ex. antidepressivos tricíclicos, anticonvulsivantes) são distintos daqueles corriqueiramente empregados no alívio da dor nociceptiva ou inflamatória (ex. analgésicos não-opioides, anti-inflamatórios esteroides e não-esteroides), pois estes últimos são ineficientes no tratamento da dor neuropática (MAGRINELLI; ZANETTE; TAMBURIN, 2013). Informações oriundas de estudos clínicos randomizados, realizados com pacientes acometidos por neuropatias de diferentes etiologias, têm fornecido evidências para a elaboração de recomendações sobre os fármacos mais

eficazes (de primeira, segunda e terceira linhas de tratamento (DWORKIN et al., 2007; ATTAL et al., 2010). Apesar destas diretrizes e do crescente número de substâncias, menos de 50% dos pacientes obtêm alívio satisfatório da dor, e existem uma série de efeitos adversos associados que dificultam a adesão e comprometem o tratamento (MAGRINELLI; ZANETTE; TAMBURIN, 2013). Para ilustrar esta situação, uma das classes consideradas de primeira linha, a de antidepressivos tricíclicos, possui como reações adversas mais comuns a sedação, os efeitos anticolinérgicos (boca seca, retenção urinária, constipação, taquicardia), o ganho de peso e a hipotensão ortostática, além de efeitos sobre o ritmo cardíaco (DWORKIN et al., 2007; BARON; BINDER; WASNER, 2010). E apesar de possuírem NNT (número necessário a tratar) próximo a 2, já que os tricíclicos conferem melhora na dor de um paciente, em cada dois tratados, o alívio na intensidade da dor não costuma ser superior a 30-50% (FINNERUP; SINDRUP; JENSEN, 2010). Existe, portanto, a necessidade de buscar substâncias que tenham melhor desempenho no alívio desta dor, com menores efeitos adversos.

1.2 A compressão no nervo isquiático, um modelo para o estudo da dor neuropática periférica.

O emprego de modelos animais na pesquisa básica, associado aos estudos clínicos, tem trazido importantes contribuições sobre os mecanismos fisiopatológicos e sobre terapias mais seletivas e eficazes no manejo da dor neuropática (JAGGI; JAIN; SINGH, 2011).

Um dos modelos mais utilizados para o estudo da dor neuropática periférica, simulando situações clínicas onde o nervo é comprimido (ex. Síndrome do Túnel do Carpo), é a compressão no nervo isquiático (CCI, do inglês *chronic constriction injury*). A dor neuropática periférica ocorre em função de injúria ao sistema nervoso periférico e envolve o

aparecimento de alterações sensoriais como a hiperalgesia e a alodinia (KLUSÁKOVA; DUBOVÝ, 2009). Estes sintomas também podem ser observados em animais submetidos a modelos experimentais, como a CCI, e a observação de tais respostas permite inferir sobre a existência de dor (DUBNER, 1983; KAVALIERS, 1988). A compressão no nervo isquiático, proposta por Bennet e Xie (1988), consiste em aplicar quatro amarraduras no tronco comum do nervo isquiático do animal, unilateralmente (Figura 1), com fio bioabsorvível. Esta compressão no nervo promove alterações em diferentes regiões do neuroeixo, já a partir dos primeiros dias após a lesão. Localmente, observou-se isquemia, liberação de substâncias pró-inflamatórias, edema intraneural (WAGNER; MYERS, 1996; MARCHAND; PERRETI; MCMAHON, 2005) e degeneração de fibras mielinizadas e não mielinizadas (GABAY; TAL, 2004). Estes eventos periféricos conduzem a modificações na excitabilidade e conectividade em regiões espinais e supraespinais (SAADÉ; JABBUR, 2008; BLOM et al.; 2014), cuja mediação parece envolver a liberação/formação de citocinas, neurotrofinas (MARCHAND; PERRETI; MCMAHON, 2005; AL-AMIN et al, 2011) e espécies reativas de oxigênio (PATHAK et al, 2014). As alterações comportamentais que se seguem, como hiperalgesia mecânica e térmica, podem ser observadas a partir dos primeiros dias após a lesão (GOECKS et al., 2012; HORST et al. 2014) e persistem por várias semanas (JAGGI; JAIN; SINGH, 2011). Assim, o emprego deste modelo é útil para a observação e o conhecimento de fenômenos e moléculas envolvidos na dor neuropática, especialmente aquela resultante da compressão nervosa.

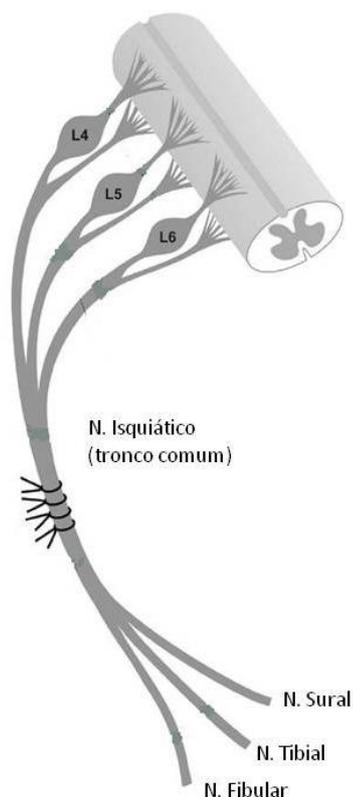


Figura 1 – Esquema de um segmento da medula espinhal ilustrando a formação do nervo isquiático pela união das raízes dorsais e ventrais da medula espinhal. Nas raízes dorsais estão mostrados os gânglios das raízes dorsais (L4, L5, L6) do nervo isquiático, o qual é composto por dois nervos, o tibial, que posteriormente se divide também no nervo sural, e o fibular. No tronco comum do nervo isquiático estão mostradas as quatro amarraduras (adaptado de Klusáková e Dubový, 2009).

1.3 Plantas medicinais na pesquisa por novas substâncias para o manejo da dor neuropática.

A aplicação de produtos naturais, principalmente de plantas medicinais, na prevenção e cura de doenças, é uma das mais antigas práticas humanas (HALBERSTEIN, 2005). A investigação científica sobre o potencial medicinal das plantas é uma forma de reconhecimento sobre a importância desta prática milenar, e uma forma de trazer informações racionais e seguras sobre seu uso, nos diferentes agravos de saúde. E apesar das refinadas tecnologias que possibilitam o desenvolvimento de fármacos sintéticos, as plantas medicinais continuam sendo extensamente estudadas por fornecerem produtos de grande diversidade molecular e consequentes mecanismos de ação (NGO; OKOGUN; FOLK, 2013).

O interesse pelo uso de plantas como alternativas terapêuticas no alívio da dor neuropática também tem crescido (YUAN et al, 2010; AMIN e HOSSEINZADEH, 2012;

MUTHURAMAN, 2012; MEHTA e TRIPATHI, 2014), tanto porque a prospecção etnomedicinal permite direcionar as investigações para aquelas espécies com potencial analgésico, como porque as plantas, como já mencionado, possuem grande variedade molecular que podem se mostrar particularmente úteis nestes quadros de dor, de fisiopatologia complexa.

Em uma revisão sistemática recente sobre plantas medicinais aplicadas em modelos de dor neuropática, mostrou-se que a maioria dos estudos é oriunda da Índia, Brasil e China, possivelmente por sua grande biodiversidade (QUINTANS et al., 2014). De fato, o Brasil ocupa grande parte da região conhecida como neotropical, onde se encontra um terço de toda biodiversidade do planeta (DESMARCHELIER, 2010). O Brasil também é rico em tradições no uso das plantas medicinais, inclusive provenientes da cultura Ameríndia, descritas desde a chegada dos primeiros portugueses ao país (OLIVEIRA et al., 2012). Entretanto, muitos estudos ainda são realizados com plantas exóticas, em detrimento às espécies nativas (QUINTANS et al., 2014). Isto contribui para a erosão cultural quanto ao uso tradicional das plantas nativas e conseqüente subvalorização de suas potencialidades medicinais, pois estas não são devidamente estudadas. Assim, consoante ao que vem estimulando a Organização Mundial da Saúde, no sentido de valorizar o uso de plantas medicinais de uso tradicional, e também estudá-las quanto a sua eficácia e segurança, o presente trabalho elegeu a espécie nativa *Schinus terebinthifolius* para estudo de seu potencial antinociceptivo em um modelo de dor neuropática.

1.4 *Schinus terebinthifolius* Raddi.

A espécie nativa *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae) (Figura 2), conhecida popularmente como aroeira vermelha ou aroeira mansa, ocorre desde a Bahia até o Rio

Grande do Sul (CORREA, 1984). Em outras regiões do mundo é conhecida como *aguará-miybá* (Paraguai), *chichita* (Argentina), *copal* (Cuba), *poivrier rose* (França) e *Florida Holly* (Estados Unidos) (MORTON, 1978; CORREA, 1984). É uma planta que pode apresentar-se sob a forma arbustiva (2-3 metros de altura) ou arborescente (7-8 m), estabelecendo-se tanto em solos úmidos, quanto secos, arenosos e argilosos. É por isso considerada uma espécie com grande plasticidade ecológica, e por vezes invasora, em alguns locais onde foi introduzida e cresce vigorosamente, como na Flórida (SPECTOR; PUTZ, 2006). Essa propriedade lhe torna útil no reflorestamento de áreas degradadas, na reposição de mata ciliar e na estabilização de dunas (GRISI, 2010).

Os frutos da aroeira também são bastante apreciados na culinária internacional, principalmente por seu sabor picante suave, o que o torna muito empregado como condimento (*poivrier rose*, Europa; pimenta-rosa, Brasil) (LENZI; ORTH, 2004). A planta também costuma ser lembrada pelas reações alérgicas, geralmente cutâneas, que ocasiona em algumas pessoas sensíveis. Essa propriedade que algumas espécies da família Anacardiaceae possuem de causar dermatite resulta da ação de substâncias conhecidas como alquilfenóis ou lipídeos fenólicos, já identificados em alguns gêneros, como o *Rhus* e *Anacardium* (AGUILAR-ORTIGOZA; SOSA; AGUILAR-ORTIGOZA, 2003; CORREIA; DAVID; DAVID, 2006), mas incomuns em *Schinus terebinthifolius*.



Figura 2 – Fotografia mostrando a árvore, à esquerda, e folhas e frutos de *Schinus terebinthifolius* Raddi, à direita. (do autor).

Quanto as suas propriedades medicinais, relatos de naturalistas que percorreram o Brasil no século XIX mostram que a planta era usada por índios e comunidades locais para tratar ferimentos e dores artríticas (VON MARTIUS, 1854; BURTON, 1976), além de infecções do sistema urinário e respiratório, e para o alívio de condições dolorosas diversas, como reumatismo, gota e dores lombares (MORTON, 1978). Existem descrições do uso das folhas, frutos, casca e lenho, em preparações diversas, como chás (infusões, decocções), alcoolaturas e emplastos (MORTON, 1978). Pelo reconhecimento de suas potencialidades medicinais, a aroeira esteve presente na primeira edição da Farmacopéia Brasileira (1926) e, recentemente, foi integrada à Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS).

Na literatura científica, a maioria das informações quanto às atividades farmacológicas de *Schinus terebinthifolius* trata de seus efeitos antimicrobianos (GUERRA et al., 2000; MELO JUNIOR et al, 2002; AMORIM e SANTOS, 2003; EL-MASSRY, 2009; SILVA et al, 2010), corroborando seu uso tradicional em infecções. Quanto ao seu potencial em quadros

dolorosos, porém, poucos estudos foram realizados. Alguns trabalhos com extratos e componentes isolados indicam que *Schinus terebinthifolius* possui propriedades anti-inflamatórias (MOURELLE, 1993; JAIN, 1995; CAVALHER-MACHADO et al, 2008; HERINGER, 2009) e cicatrizantes (COUTINHO et al, 2006; LUCENA et al, 2006; NUNES et al, 2006). Recentemente também se demonstrou um efeito redutor na hiperalgesia, em animais submetidos a um modelo de dor neuropática, a lesão do nervo poupado (SNI, do inglês *spared nerve injury*), após administração do óleo essencial dos frutos de *Schinus terebinthifolius*, e isoladamente dos monoterpenos α -felandreno e limoneno, também presentes na composição do óleo essencial (PICINELLI, 2014). Estes trabalhos apontam para o potencial da espécie como possível agente terapêutico no manejo de inflamação e dor. Entretanto, os efeitos observados no estudo de Piccinelli et al. (2014), com os frutos, parecem relacionar-se a mono e sesquiterpenos, componentes característicos dos óleos essenciais. E a aroeira, como já mencionado, era usada tradicionalmente sob a forma de diferentes preparações e empregando distintas partes da planta, o que resulta em uma grande variedade de extratos e compostos vegetais a serem prospectados farmacologicamente.

Com efeito, estudos sobre a composição química de *Schinus terebinthifolius*, empregando-se diferentes partes da planta, permitiram a identificação de vários compostos, como ácidos fenólicos, flavonoides e triterpenos (Figura 3). Como constituintes voláteis, foram identificados diversos mono e sesquiterpenos, tanto nas folhas como nos frutos. E estas classes de compostos majoritariamente descritas em *Schinus terebinthifolius*, a saber, os flavonoides, terpenos e fenóis, estão entre as mais estudadas em modelos de dor neuropática (QUINTANS et al., 2014) e sobre as quais já existem descrições de propriedades antinociceptivas e anti-inflamatórias (CALIXTO et al., 2000; ANJANEYULU; CHOPRA, 2003).

Particularmente em extratos alcoólicos obtidos das folhas de *Schinus terebinthifolius* foram identificados diversos compostos fenólicos (Figura 3), como os ácidos cafeico, cumárico e siríngico (EL-MASSRY et al., 2009); galato de metila; quercitrina; miricetina e miricetrina (CERUKS et al., 2007); pentagaloilglicose, um precursor de taninos (HAYASHI, 1989; CAVALHER-MACHADO et al., 2009); quercetina e canferol (JOHANN et al., 2010); e biflavonóides como a agatisflavona (KASSEM, 2004). Os compostos fenólicos, além de exibirem propriedades antimicrobianas, anti-inflamatórias e antinociceptivas, são reconhecidamente antioxidantes (SOOBRAATTEE et al., 2005). Em extratos alcoólicos obtidos das folhas de *Schinus terebinthifolius*, também foi observada relação entre compostos fenólicos e atividade antioxidante. Os extratos ricos em fenólicos tiveram boa atividade antioxidante (EL-MASSRY et al., 2009); CERUKS et al., 2007).

Atualmente o potencial antioxidante apresentado por algumas moléculas tem sido uma das estratégias na busca por novos analgésicos e para o conhecimento dos mecanismos envolvidos na dor neuropática, como será abordado a seguir.

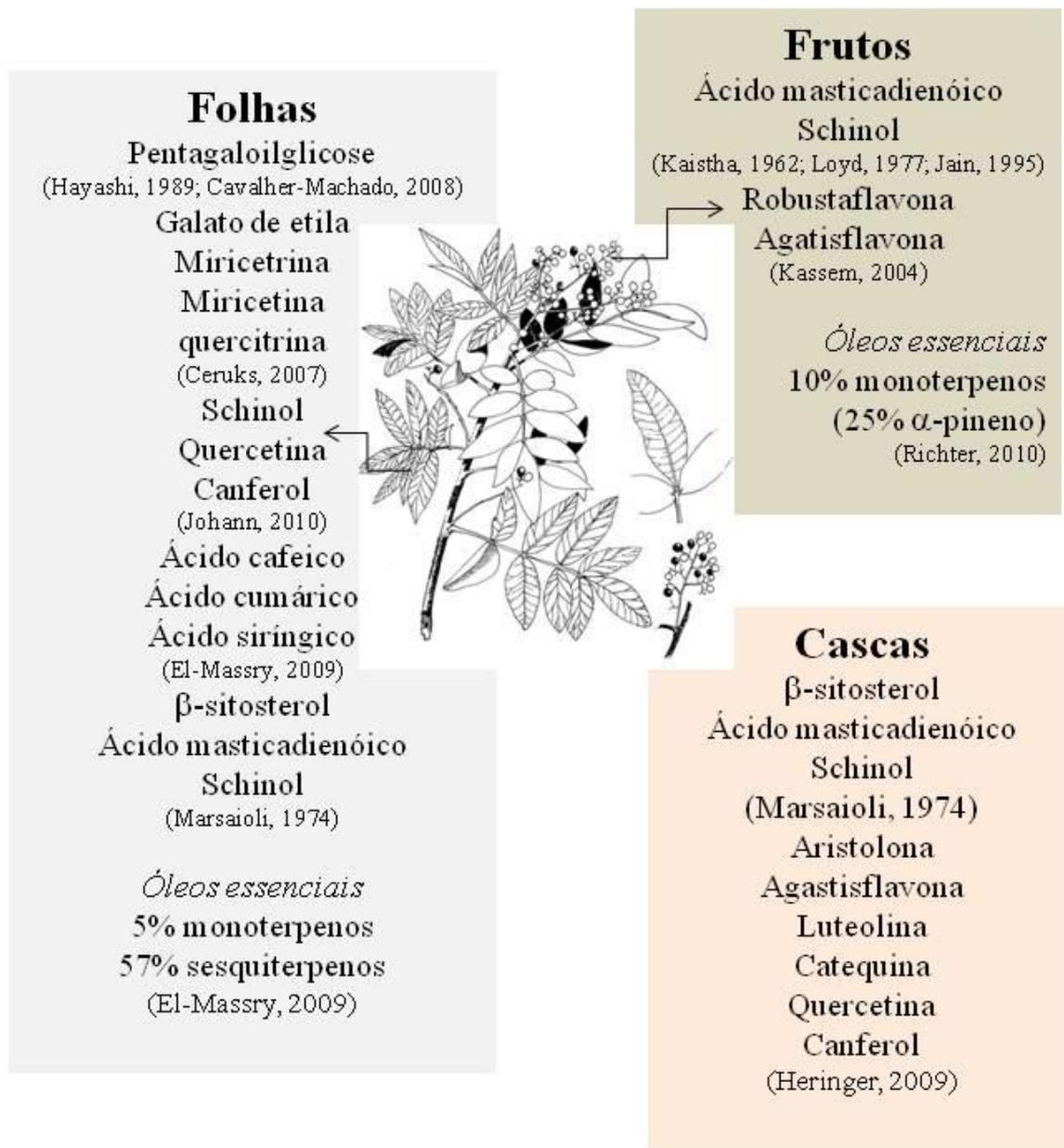


Figura 3 – Compostos químicos já identificados em folhas, frutos e cascas de *Schinus terebinthifolius* Raddi (do autor).

1.5 Envolvimento das Espécies Reativas de Oxigênio e de Nitrogênio (ERONs) na fisiopatologia da dor neuropática.

As espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERONs), como o ânion superóxido, o óxido nítrico, o peróxido de hidrogênio, o peroxinitrito e o radical hidroxil, consistem em espécies radicalares e não radicalares formadas a partir do metabolismo celular. Apesar do potencial de reagir com outras moléculas de forma deletéria, atualmente vem se reconhecendo que estas espécies são fundamentais para a sinalização e manutenção de um ambiente redox adequado às diferentes funções celulares (LEVONEN et al., 2014).

O processo de fosforilação oxidativa mitocondrial, e enzimas NADPH oxidase e citocromo P450 são algumas das fontes endógenas usuais de geração de ERONs (POLJSAK; SUPUT, MILISAV, 2013). Para regular a produção e neutralização destas espécies reativas, as células contam com sistemas antioxidantes – moléculas que, quando presentes em baixas concentrações em relação a um substrato oxidável, previnem a oxidação deste (HALLIWELL, 1991). Entre as principais defesas antioxidantes celulares está a enzima superóxido dismutase (SOD), que catalisa a conversão do ânion superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio. O peróxido de hidrogênio, oriundo da ação da SOD ou de outras fontes, pode ser eliminado pela ação da enzima catalase (CAT), ou peroxidases como a glutathione peroxidase (GPx). Estas últimas enzimas utilizam diversas moléculas redutoras neste processo, como o ácido ascórbico, a glutathione (GSH) e a tioredoxina (FRIDOVICH, 1999). O peróxido de hidrogênio tem função sinalizadora, porém também contribui para a formação do radical hidroxil, altamente reativo, e com ação sobre os lipídeos celulares, oxidando-os (CIRCU; AW, 2010). Os hidroperóxidos lipídicos, produtos primários desta lipoperoxidação, podem ser detoxificados pela GPx e pela glutathione transferase (GST), enzima que é ainda importante na metabolização de xenobióticos (NIKI et al., 2005).

As defesas antioxidantes não-enzimáticas, como o ácido ascórbico e a GSH, recém mencionados, também exercem papel fundamental na manutenção de um ambiente redox adequado às diferentes funções celulares. O ácido ascórbico atua diretamente como *scavenger* de ERONs e na reciclagem da vitamina E (MAY, 2011). É particularmente importante ao sistema nervoso, em cujos neurônios ocorre em concentração superior àquela encontrada na maioria dos outros tecidos. Os neurônios também expressam grande quantidade de transportadores (SVCT2) para captação de ácido ascórbico (RICE, 2000; HARRISON; MAY, 2009). A GSH é um tripeptídeo (L- γ -glutamil-L-cisteinilglicina) de ampla distribuição e importância em animais e plantas, e que atua em combinação com outros sistemas de defesa antioxidante, reduzindo e regenerando várias moléculas oxidadas, além de atuar diretamente sobre as ERONs (SIES, 1999). A GSH e outros tióis celulares são capazes de reagir com a maioria dos oxidantes fisiológicos, resultando em modificações em seus grupamentos sulfidríla, os quais podem ser regenerados por moléculas como o ácido ascórbico (WINTERBOURN; HAMPTON, 2008).

Quando as ERONs se sobressaem frente ao sistema antioxidante celular, seja por um aumento em sua geração ou diminuição nas defesas antioxidantes, ocorre o fenômeno de estresse oxidativo, levando a perturbações na sinalização redox e/ou danos às macromoléculas (RAY; HUANG; TSUJI, 2012; SIES, 2014). São inúmeros os estudos que relatam a participação de ERONs no desenvolvimento das mais diversas patologias - cardiovasculares, metabólicas e neurodegenerativas – por suas ações oxidantes e deletérias sobre proteínas, lipídios e ácidos nucleicos (SHICHIRI, 2014). Entretanto, o envolvimento das ERONs na patogênese de doenças não se restringe aos danos oxidativos, pois nos últimos anos se mostrou que estas espécies também interagem e regulam mensageiros intracelulares em vias de sinalização de vários processos, como proliferação, metabolismo e sobrevivência celular

(KENNEDY et al., 2012; RAY; HUANG; TSUJI, 2012), além de condições de inflamação e excitotoxicidade (SORG, 2004; NISHIKAWA; HASCHIDA; TAKAKURA, 2009).

Nos quadros de dor neuropática, as principais informações sobre a participação das ERONs vêm de estudos empregando modelos animais. São descritas alterações nas defesas antioxidantes e incremento na formação de ERONs, tanto em modelos de lesão nervosa central quanto periférica (GUEDES, 2006; 2008; 2009; GWAK; HASSSLER; HULSEBOSCH, 2013). Em relação à compressão de nervo periférico, modificações em parâmetros de estresse oxidativo no nervo lesionado, foram amplamente descritas (KHALIL, LIU, HELME, 1999; NAIK et al., 2006; MUTHURAMAN, SINGH, 2011; THIAGARAJAN et al., 2012). Estas alterações indicam que no local da lesão se estabelece uma condição de estresse oxidativo, o que é demonstrado pela maior formação de ERONs, de produtos de lipoperoxidação e redução na concentração de GSH, um importante antioxidante celular. Este quadro de estresse oxidativo na periferia parece estar ligado à reação inflamatória local, que resulta em intensa formação de ERONs, por meio da ação de enzimas como a NADPH oxidase (NOX), xantina oxidase (XO) e óxido nítrico sintase (NOS) (MITTAL et al., 2014). Em um destes estudos, a administração de N-acetil-cisteína reduziu a hiperalgesia dos animais, e sabe-se que esta molécula, entre outras ações já conhecidas, é antioxidante. Porém, as mudanças não se limitam apenas ao local da lesão. Pathak et al. (2014) demonstraram que as modificações em parâmetros de estresse oxidativo, decorrentes da CCI, também podem ser observadas no sistema nervoso central, inclusive no córtex cerebral.

Já se tem descrito que algumas ERONs exercem papel pró-nociceptivo, pró-inflamatório e regulatório em vários mecanismos relacionados a condições de dor persistente (LITTLE; DOYLE; SALVEMINI, 2012). A sensibilização central, por exemplo, é um mecanismo importante no desenvolvimento da dor neuropática e ao qual se atribui a

participação de ERONs. Alguns dos mecanismos subjacentes a esta sensibilização envolvem a modulação de proteínas cinases, alterações na neurotransmissão glutamatérgica e modificações no funcionamento e expressão de canais iônicos (SALVEMINI et al., 2011). A atividade de proteínas cinases, como a PKC (proteína cinase C), é central para várias vias de sinalização neuronais e gliais que conduzem à sensibilização periférica e central. A PKC pode ser modulada por ERONs, tendo já sido descrito um aumento em sua fosforilação quando em presença de superóxido e peroxinitrito (HONGPAISAN; WINTERS; ANDREWS, 2004). Além disso, a PKC pode regular diretamente a ação da NADPH oxidase, uma importante fonte de geração de superóxido (SHARMA et al., 1991), o que parece ser importante para a manutenção da sensibilização central (SALVEMINI et al., 2011).

A neurotransmissão glutamatérgica também pode sofrer modulação pelas ERONs. Uma das formas pela qual estas espécies podem modular a função de macromoléculas, como receptores e canais, é pela modificação de sua estrutura (ISCHIA et al., 2011). A nitração de resíduos de tirosina das subunidades do receptor NMDA, de glutamato, leva a um aumento nas correntes de cálcio e incremento sustentado na neurotransmissão nociceptiva (ZANELLI; ASHRAF; MISHRA, 2002). As ERONs também podem nitrar e comprometer a função dos transportadores de recaptção de glutamato e cisteína, comprometendo, desta forma, a formação intracelular de GSH (fundamental na proteção antioxidante celular) (AOYAMA et al., 2008) e aumentando a quantidade extracelular de glutamato. Neste caso, a sensibilização pode ser favorecida pela maior excitotoxicidade glutamatérgica associada à diminuição no conteúdo antioxidante tiólico intracelular (SALVEMINI et al., 2011).

Tendo em vista estas informações, muitos trabalhos têm se direcionado à prospecção de moléculas antioxidantes, visando a modificação das ações exercidas pelas ERONs no estabelecimento das alterações neuroquímicas e sensoriais presentes em condições de dor

neuropática. Com efeito, vários estudos mostraram que a administração de antioxidantes tem efeitos atenuantes sobre as alterações sensoriais características deste quadro doloroso (YOWTAK, 2013; HORST, et al. 2014; PATHAK et al, 2014).

A espécie nativa *Schinus terebinthifolius*, neste contexto, apresenta promissor efeito antinociceptivo, considerando seu uso tradicional em condições de dor e sua composição rica em fenólicos potencialmente antioxidantes, além de outras moléculas potencialmente anti-inflamatórias (flavonoides, terpenos). Todavia, é ainda incipiente o número de estudos mostrando o efeito analgésico da espécie, e a contribuição de suas características antioxidantes na promoção deste efeito.

Assim, o principal objetivo deste trabalho foi avaliar os efeitos da administração de uma fração antioxidante, produzida a partir de folhas de *Schinus terebinthifolius*, sobre parâmetros nociceptivos em animais submetidos a um modelo de dor neuropática periférica, a compressão no nervo isquiático (CCI). Como a espécie apresenta diferentes compostos fenólicos, e potencial antioxidante, hipotetizou-se que sua administração também poderia modificar as alterações em parâmetros de estresse oxidativo que ocorrem no sistema nervoso de ratos com lesão periférica, e por isso foram avaliados diferentes destes parâmetros na medula espinal e no córtex cerebral destes animais. Para tanto, inicialmente produziram-se quatro frações da planta, as quais foram testadas quanto ao potencial antioxidante *in vitro*, e presença e quantidade de fenóis totais. A fração com melhor desempenho foi, então, administrada intraperitonealmente (20 mg/kg), por dez dias, em animais com e sem dor neuropática induzida por CCI.

Embora existam poucos estudos sobre a toxicidade da aroeira (PIRES et al.; 2004; LIMA et al.; 2009), Carlini, Duarte-Almeida e Tabach (2012) apontaram para a ocorrência de efeitos tóxicos após a administração prolongada (83 dias) de extratos aquosos das cascas.

Assim, também foram conduzidos testes para avaliar se a administração da fração de *Schinus*, na dose de 20 mg/kg, por onze dias, modificaria parâmetros comportamentais de locomoção e do tipo-ansiedade, parâmetros plasmáticos indicativos de dano hepático e a massa corporal de ratos sem qualquer intervenção cirúrgica.

2. HIPÓTESE

Como a espécie *Schinus terebinthifolius* é tradicionalmente empregada no alívio de condições dolorosas e inflamatórias, e alguns trabalhos mostraram que extratos e componentes desta planta tiveram ação anti-inflamatória em animais, espera-se que a administração intraperitoneal de uma fração obtida de folhas desta espécie, na dose de 20 mg/kg, por dez dias, seja capaz de reduzir a hiperalgesia térmica e mecânica em ratos submetidos à compressão no nervo isquiático, um modelo de dor neuropática. Como *Schinus terebinthifolius* possui grande variedade de compostos fenólicos - moléculas antioxidantes - espera-se ainda que o tratamento com a mesma modifique parâmetros de estresse oxidativo na medula espinal e córtex cerebral, já que é sabido que em situações de dor neuropática ocorrem alterações nos sistemas antioxidantes e espécies reativas de oxigênio no sistema nervoso central. Por fim, espera-se que o tratamento com a fração de *Schinus terebinthifolius* não resulte em efeitos adversos sobre comportamentos locomotores e do tipo ansiedade, e sobre medidas plasmáticas indicativas de dano hepático.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Este trabalho teve como objetivo geral, inicialmente selecionar uma fração, preparada de folhas de *Schinus terebinthifolius*, que apresentasse boa atividade antioxidante e maior concentração de compostos fenólicos para, então, avaliar os efeitos da administração intraperitoneal desta fração, na dose de 20 mg/kg, por dez dias, sobre parâmetros: 1) nociceptivos, e de 2) estresse oxidativo em medula espinal e córtex cerebral, importantes regiões centrais no processamento da informação nociceptiva, empregando para isto ratos com compressão no nervo isquiático, um modelo de dor neuropática. Ainda, foi avaliado se esta administração provocaria efeitos tóxicos nos animais.

3.2 Objetivos específicos

- 1) Produzir frações a partir de folhas de *Schinus terebinthifolius*, por meio de extração sucessiva com solventes de distintas polaridades;
- 2) Conduzir triagem fitoquímica qualitativa das frações produzidas, por cromatografia em camada delgada, para observar a presença de classes de compostos vegetais, inclusive fenólicos para, posteriormente, realizar a quantificação dos fenóis totais em cada fração;
- 3) Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* das frações, empregando-se os seguintes ensaios: atividade sequestradora dos radicais 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DDPH) e hidroxil, e potencial reativo antioxidante total (TRAP);

4) Determinar os efeitos da administração intraperitoneal da fração metanólica (MeF) de *Schinus terebinthifolius* (20 mg/kg, por dez dias) em ratos com e sem dor neuropática induzida por CCI, sobre:

a) Parâmetros nociceptivos:

- Avaliação da sensibilidade térmica, nos períodos 0 (pré-lesão), 3, 5, 7 e 10 dias após a intervenção cirúrgica;

- Avaliação da sensibilidade mecânica, nos períodos 0 (pré-lesão), 3, 5, 7 e 10 dias após a intervenção cirúrgica;

b) Parâmetros de estresse oxidativo, no segmento lombossacral da medula espinal e homogeneizado de todo o córtex cerebral, mediante determinação de:

- Atividade de enzimas antioxidantes: superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e glutathione transferase;

- Antioxidantes não-enzimáticos: concentração de ácido ascórbico e tióis totais

- ERONs: concentração de peróxido de hidrogênio

- Lipoperoxidação: concentração de hidroperóxidos lipídicos

5) Avaliar os efeitos da administração intraperitoneal da fração MeF de *Schinus terebinthifolius* (20 mg/kg, por onze dias) em ratos sem intervenção cirúrgica sobre:

a) Parâmetros comportamentais locomotores e do tipo-ansiedade, pelos testes de campo aberto e labirinto em cruz elevado;

b) Parâmetros plasmáticos indicativos de dano hepático, pela determinação das enzimas aminotransferases Aspartato (AST) e Alanina (ALT) e γ -glutamil transpeptidase (GGT); bilirrubina total e frações;

b) Massa corporal, pela pesagem dos animais no início e ao final do tratamento.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Esquema geral do protocolo experimental

As atividades realizadas neste trabalho são apresentadas, de início, de forma agrupada e esquemática (Figura 4), para compreensão global do protocolo experimental. No decorrer da descrição metodológica são apresentadas maiores informações.

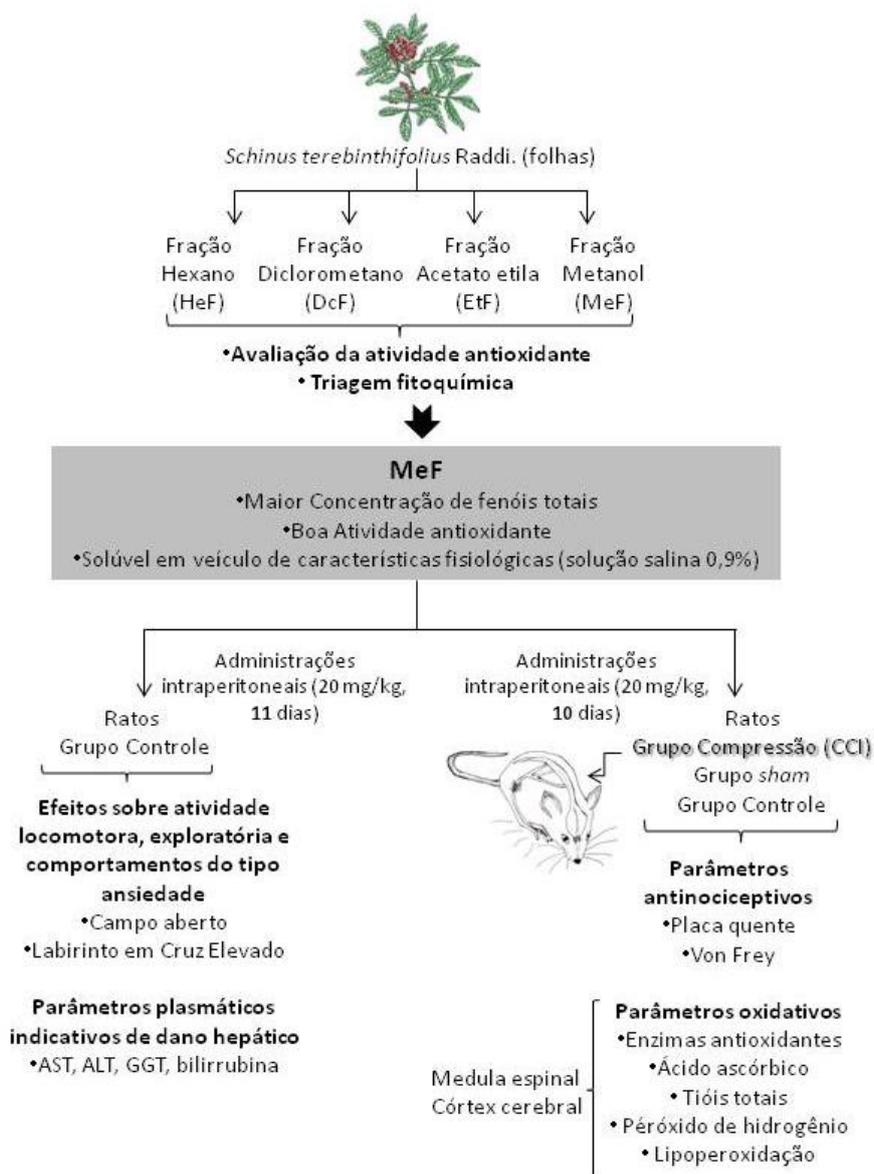


Figura 4 – Esquema geral mostrando o protocolo experimental

4.2 Reagentes

Os reagentes empregados neste trabalho foram oriundos, em sua maioria, dos fabricantes Sigma-Aldrich (enzimas, radicais, padrões antioxidantes), Merck, Nuclear e Synth (solventes orgânicos, ácidos), grau de pureza para análise (P.A). A qualidade da água empregada na limpeza de materiais pode ser descrita como água reagente (destilação simples) e para o preparo de soluções utilizou-se água purificada (destilação e troca iônica) (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2010).

4.3 Triagem fitoquímica e avaliação da atividade antioxidante das frações das folhas de *Schinus terebinthifolius*

4.3.1 Coleta do material vegetal

As folhas de *Schinus terebinthifolius* foram coletadas no mês de junho dos anos de 2010 e 2013 (período de frutificação), em Lajeado – RS, município situado a 110 km da capital Porto Alegre – RS (Figura 5). O material vegetal foi identificado pelo Prof. Dr. João André Jarenkow e exsicata depositada no Herbário do Departamento de Botânica da UFRGS (ICN), sob o número 166738. A autorização para acesso à amostra de componente do patrimônio genético foi obtida junto ao CNPq, sob o número 010738/2013-4.

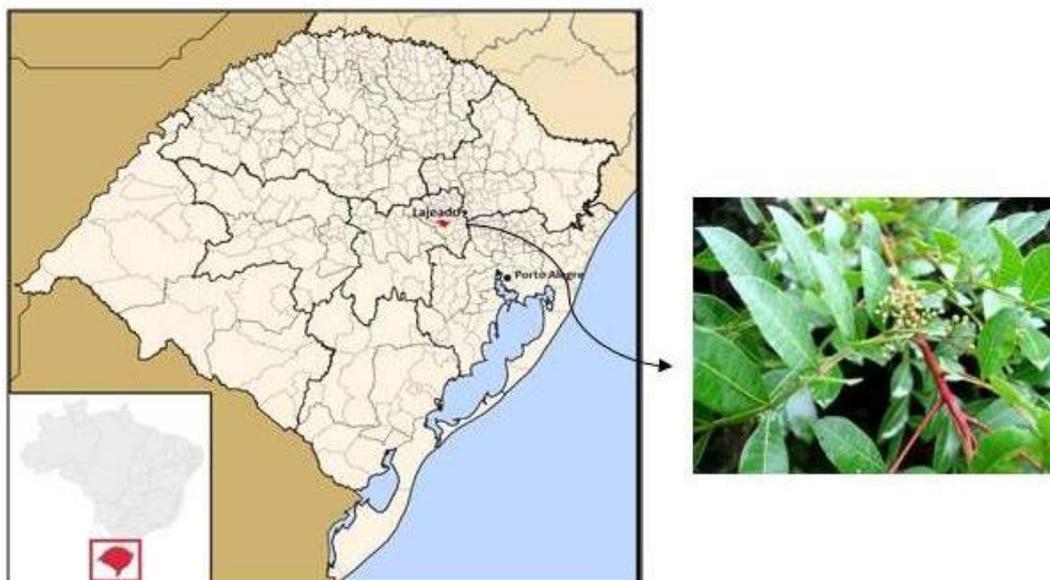


Figura 5 – Região de coleta da espécie *Schinus terebinthifolius*, na cidade de Lajeado, região sul do Brasil (A). A fotografia indicada pela seta que emerge da região de Lajeado mostra um galho com folhas da espécie *Schinus terebinthifolius* (B).

4.3.2 Preparação das frações

As folhas coletadas de *Schinus terebinthifolius* foram submetidas à secagem em estufa com circulação de ar ($40^{\circ} \pm 2^{\circ}\text{C}$, por 22 horas) e posteriormente trituradas em moinho de facas. Em seguida montantes de 200 g deste material foram submetidos à maceração sucessiva com quatro diferentes solventes, nesta ordem: hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol (0,5 L de solvente por dia, trocas diárias, por 12 dias cada solvente). As soluções extrativas obtidas pela maceração com cada solvente foram filtradas e o solvente removido, empregando-se evaporador rotatório, em banho-maria ($<45^{\circ}\text{C}$). Os extratos resultantes foram pesados e calculados quanto aos seus rendimentos, e doravante denominar-se-ão “frações”. Assim, obtiveram-se as frações hexano (HeF), diclorometano (DcF), acetato de etila (EtF) e metanol (MeF) como resultado da maceração com cada referido solvente. As frações foram guardadas em frascos de vidro âmbar e mantidas em temperatura de $2-8^{\circ}\text{C}$.

4.3 3 Triagem fitoquímica das frações

A triagem fitoquímica qualitativa foi realizada com as frações empregando-se cromatografia em camada delgada (CCD), conforme preconizado por Wagner e Bladt (1996). Inicialmente foram preparadas soluções de cada fração na concentração de 0,25% (m/v), utilizando-se como diluente solução de metanol e acetato de etila (7:3). Em seguida, alíquotas de 15 µL dessas soluções foram aplicadas em placas de sílica gel (60 F₂₅₄ Merck®). Diferentes sistemas eluentes e reveladores foram utilizados para a verificação da presença de distintas classes de constituintes vegetais (Tabela 1). Adicionalmente foram aplicadas nas placas algumas substâncias ou extratos de referência para as classes de compostos em estudo, a saber: ácido gálico, ácido cafeico, ácido clorogênico, rutina, quercetina e cumarinas extraídas do cumaru.

Tabela 1. Classes de constituintes, solventes e reveladores empregados na triagem fitoquímica das frações obtidas de folhas de *Schinus terebinthifolius*.

Classes de constituintes	Sistema de solventes	Revelador	Reação positiva
Alcalóides	Acetato de etila:metanol:água (100:25:5)	Reagente de Dragendorff	Visível: Bandas marrons ou alaranjadas, pouco estáveis
Compostos fenólicos	Acetato de etila: ácido acético (100:10)	Cloreto férrico 10%	Visível: Azul escuro, verde escuro
Cumarinas	Acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético: água (100:11:11:10)	Hidróxido de potássio 5% (etanólico)	Intensificação na fluorescência verde azulada no UV _{365 nm} Visível: bandas
Antraquinonas	Acetato de etila: metanol (90:10)	Hidróxido de potássio 5% (etanólico)	avermelhadas e fluorescência alaranjada no UV _{365 nm}
Flavonóides	Acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético: água (100:11:11:10)	Cloreto de alumínio 5% (etanólico)	Intensificação na fluorescência verde amarelada no UV _{365 nm}
Esteróides/triterpenos	Acetato de etila:metanol:água (100:25:5)	Reagente de Lieberman-Burchard, aquecimento a 100°C, 10 minutos	Visível: bandas marrons ou violeta (núcleo triterpeno) Azul esverdeadas (núcleo esteroide)

A quantificação de fenóis totais das frações foi realizada conforme descrito por Sousa et al. (2007), com pequenas modificações. Inicialmente misturou-se 0,1 mL de solução de cada fração (0,1 mg/mL) a 7,4 mL de água, 0,5 mL do reagente de Folin-Ciocalteu (1,3 N) e a 2,0 mL de carbonato de sódio (20%). Esta mistura foi colocada em banho-maria (28° ± 2°C), onde permaneceu por 1h30min. Em seguida, as absorbâncias das soluções foram medidas a 750 nm. O teor de fenóis totais foi determinado aplicando-se o valor das absorbâncias das frações na equação da reta obtida a partir da curva de calibração, construída com diferentes concentrações do padrão fenólico ácido gálico. Os resultados foram expressos em mg EAG (equivalentes de ácido gálico) por g de fração (mg EAG/ g fração). As análises foram realizadas em triplicata.

4.3.4 Avaliação da atividade antioxidante das frações

4.3.4.1 Atividade sequestradora do radical DPPH

Este ensaio foi realizado conforme descrito por Sousa et al. (2007), com pequenas modificações. O radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), de coloração púrpura em comprimento de onda de 515 nm, quando reduzido por substâncias antioxidantes tem sua coloração modificada, o que pode ser medido espectrofotometricamente pela redução em sua absorvância neste mesmo comprimento de onda. O procedimento experimental consistiu em adicionar 0,1 mL das soluções metanólicas de cada uma das frações e de antioxidantes conhecidos (ácido ascórbico e BHT), ambos em concentrações entre 25-500 µg/mL, a 0,9 mL de solução metanólica de DPPH (40,0 mg/mL). Após 30 minutos de espera, em temperatura ambiente ($22^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$), as absorvâncias foram lidas a 515 nm (Espectrofotômetro de UV/Visível Cary[®] 100, Varian). O experimento foi realizado em triplicata. A partir dos dados da curva de calibração do DDPH e das absorvâncias das frações e padrões antioxidantes, em cada concentração testada, foram calculadas as concentrações percentuais de DPPH remanescente, conforme segue:

% DPPH remanescente = $([DDPH_f]/[DPPH_i]) \times 100$, onde:

$[DDPH_f]$ é a concentração de DPPH no meio reacional após reação com frações ou antioxidantes padrão; $[DPPH_i]$ é a concentração de DPPH inicial (40 mg/mL). A concentração eficiente – quantidade de antioxidante necessária para decrescer em 50% a concentração inicial de DPPH (CE50%) – foi calculada a partir de uma curva exponencial de primeira ordem (eixo x, concentrações das frações ou padrões e eixo y, % DPPH remanescente), empregando-se o programa Origin Pro 8.0.

4.3.4.2 Atividade sequestradora do radical hidroxil

Este ensaio, conduzido conforme descrito por Chobot et al. (2010), tem por finalidade quantificar os radicais hidroxil indiretamente por meio da formação do produto de degradação da deoxiribose, o malondialdeído (MDA). O meio reacional conteve 250 µL de soluções das frações ou do antioxidante padrão, BHT, ambos em concentrações entre 25-250 µg/mL, 50 µL de deoxiribose (10 mM), 50 µL peróxido de hidrogênio (10 mM), 100 µL de solução de cloreto férrico e EDTA (1:1, 50 mM) e 50 µL ácido ascórbico (1 mM) em tampão fosfato (50 mM, pH 7.4). Este meio foi incubado por 1 hora a 27°C. Após este período de incubação, 20 µL de BHT (2.5%) e 500 µL ácido tiobarbitúrico (1%) foram adicionados, o que resultou no aparecimento de coloração rosa. Estes meios foram então aquecidos por 30 minutos, a 85 °C, e após resfriados em banho de gelo. A absorvância do MDA formado foi medida a 532 nm (Espectrofotômetro de UV/Visível Cary® 100, Varian). O experimento foi realizado em triplicata. A partir das absorvâncias das frações e do antioxidante, nas diferentes concentrações, calculou-se o percentual de MDA remanescente, conforme segue:

$\% \text{ MDA remanescente} = (\text{Abs MDA}_t / \text{Abs MDA}_{100\%}) \times 100$, onde:

MDA_t é a absorvância de MDA no meio reacional após reação com frações ou antioxidante padrão; $\text{Abs MDA}_{100\%}$ é a absorvância de MDA cujo meio reacional não continha frações ou antioxidante. A concentração eficiente – quantidade de antioxidante necessária para decrescer em 50% a concentração de MDA formada (CE50%) – foi calculada a partir de uma curva exponencial de primeira ordem (eixo x, concentrações das frações ou padrões e eixo y, % MDA remanescente), empregando-se o programa Origin Pro 8.0.

4.3.4.3 Potencial reativo antioxidante total (TRAP)

O potencial reativo antioxidante total é um dos ensaios mais utilizados para avaliar a capacidade antioxidante de amostras *in vitro*, e baseia-se na medida da intensidade da quimioluminescência (QL) emitida pelo luminol após interação com radicais formados pela decomposição do composto 2,2'-Azo-bis-amidinopropano (ABAP) (DRESCH et al., 2009). Inicialmente realizou-se leitura da QL (Espectrômetro de cintilação LKB Rack Beta-1215) emitida pelo meio reacional, até estabilização. Este meio foi composto por 2,96 mL de uma solução de ABAP (20 mM) e 10 µL de luminol (5.6 mM). Após, 30 µL de soluções de Trolox (antioxidante análogo ao alfa-tocoferol), em diferentes concentrações (0,267-1,067 µM), foram adicionados a este meio e a QL medida. A QL foi então registrada por 1800 s após a adição de Trolox. O mesmo procedimento foi realizado adicionando-se soluções das frações (2,5-50,0 µg/mL). A última medida de QL antes da adição de Trolox ou das frações foi considerada 100%. Os ensaios foram realizados em triplicata e à temperatura ambiente de 25 ± 2 °C. Para calcular a quantidade de equivalentes de Trolox (mM) foram realizadas as seguintes etapas: inicialmente foram construídos gráficos (% contagens por minuto x tempo, em segundos) e calculadas as áreas sob a curva (AUC) de cada um deles, por meio do programa Origin Pro 8.0. Em seguida, foi feita a plotagem das concentrações de Trolox e suas respectivas AUC. Por fim, os valores de AUC das frações em diferentes concentrações foram aplicados na equação da reta resultante desta curva padrão de Trolox, e os equivalentes de Trolox foram obtidos, em micromolar.

4.4 Efeito da administração da fração metanólica de *Schinus terebinthifolius* sobre parâmetros antinociceptivos em ratos controle, *sham* e com compressão no nervo isquiático

4.4.1 Animais: procedência e manutenção

Após aprovação pelo Comitê de Ética desta Universidade (# 19388, Anexo A), foram solicitados ao Centro de Reprodução e Experimentação de Animais de Laboratório (CREAL) ratos da linhagem *Wistar*, machos, com massa corporal entre 200-300g e 60 dias de vida. Os animais foram mantidos no ratário do Instituto de Ciências Básicas da Saúde, UFRGS, acomodados em caixas de polietileno forradas com maravalha (40x30x16cm), com livre acesso à água e alimentação, sob ciclo claro/escuro de 12 horas (das 07h00min às 19h00min) e temperatura ambiental de 22 ± 2 °C. A limpeza das caixas foi realizada, no máximo, a cada dois dias. A transferência destes animais para o Laboratório de Neurobiologia Comparada ocorreu nos dias dos testes comportamentais, da cirurgia e/ou morte.

4.4.2 Delineamento experimental

Os grupos experimentais foram preparados em dois momentos distintos, visando avaliar:

1. O efeito da administração de MeF sobre **parâmetros nociceptivos e de estresse oxidativo** em ratos controle, *sham* e com compressão no nervo isquiático.

2. Efeito da administração de MeF sobre **comportamentos locomotores e do tipo ansiedade, massa corporal e parâmetros plasmáticos indicativos de dano hepático**, em ratos controle.

Para o **experimento de número 1** foram preparados três grupos experimentais, conforme segue:

- Grupo controle: ratos que não sofreram intervenção cirúrgica;
- Grupo *sham*: ratos que tiveram o nervo isquiático exposto, porém sem compressão;
- Grupo CCI: ratos que foram submetidos à compressão unilateral no nervo isquiático direito.

Os animais destes grupos experimentais receberam intraperitonealmente solução salina (Solução fisiológica de cloreto de sódio 0,9%, ADV[®]) ou MeF de *S. terebinthifolius*, na dose de 20 mg/kg, por dez dias. A administração foi realizada diariamente, com início no dia da intervenção cirúrgica (dia 0), após a realização desta e passados os efeitos da anestesia, e nos dias seguintes sempre em mesmo horário, ao fim da tarde (Figura 6-a). Nos animais do grupo controle, as administrações também iniciaram no dia 0, ao fim da tarde, sempre em mesmo horário. Para a preparação da MeF, esta foi dissolvida em solução salina (0,9%), na concentração de 20 mg/mL, de modo que o volume administrado diariamente a cada animal não foi maior do que 0,4 mL. A preparação das soluções ocorreu minutos antes da administração.

No **experimento 1**, os ratos dos diferentes grupos experimentais foram mortos, metade no dia três e outra metade no dia dez (Figura 6-a), para a obtenção do segmento lombossacral da medula espinal e todo córtex cerebral. Estes tecidos foram utilizados para avaliação dos seguintes parâmetros pró-oxidantes e antioxidantes: atividades das enzimas SOD, CAT, GST, GPx, quantificação de peróxido de hidrogênio, ácido ascórbico, tióis totais e hidroperóxidos lipídicos.

Ainda no **experimento 1**, os diferentes grupos experimentais (controle, *sham* e CCI) foram submetidos aos testes comportamentais para avaliação das alterações nas sensibilidades mecânica e térmica (testes de Von Frey e placa quente, respectivamente). Os testes foram realizados no dia 0 (pré-cirurgia) e aos 3, 5, 7 e 10 dias após a cirurgia (Figura 6-a).

Em suma, no **experimento 1** foram realizados 12 grupos experimentais (controle Salina e MeF; *sham* Salina e MeF; CCI Salina e MeF), mortos em dois tempos (três dias e dez dias). Cada grupo experimental foi composto por **seis (06) animais**, o que totalizou **72 ratos nesta etapa da pesquisa**.

No **experimento 2** foram usados apenas ratos do grupo controle (grupo sem intervenção cirúrgica). Essa etapa foi realizada com o intuito de avaliar possíveis efeitos tóxicos da administração da MeF sobre comportamentos do tipo ansiedade e de locomoção, utilizando para isso os testes de campo aberto e labirinto em cruz elevado. Esse grupo experimental foi usado ainda para avaliar o efeito da MeF sobre alguns parâmetros plasmáticos, indicativos de dano ao fígado (AST, ALT, GGT e bilirrubina), e sobre a massa corporal dos animais.

Os animais deste **experimento 2** receberam intraperitonealmente solução salina (Solução fisiológica de cloreto de sódio 0,9%, ADV[®]) ou MeF de *Schinus terebinthifolius*, na dose de 20 mg/kg, por onze dias. Neste caso, as administrações foram realizadas por um dia adicional (onze dias, em vez de dez dias) para que ambos os testes comportamentais (campo aberto e labirinto em cruz elevado) pudessem ser conduzidos próximos ao final do tratamento, mas com devido intervalo entre cada teste para evitar estresse aos animais. Assim, o teste de campo aberto foi realizado no dia nove, enquanto o do labirinto em cruz elevado, no dia onze (figura 6-b). A administração da MeF e solução salina foi realizada diariamente, sendo o dia da primeira administração denominado dia 0. As administrações foram feitas sempre entre 16h30 e 17h. Assim como no experimento 1, a MeF foi dissolvida em solução salina (0,9%), na concentração de 20 mg/mL, de modo que o volume administrado ao animal diariamente não foi maior do que 0,4 mL.

Neste **experimento 2**, os ratos foram mortos no dia onze (Figura 6-b) e o sangue coletado para avaliação de parâmetros plasmáticos indicativos de dano hepático. Para determinação da massa corporal, os animais foram pesados no dia 0 e no dia 11.

Em suma, no **experimento 2** foram realizados 2 grupos experimentais (controle Salina e MeF). Como cada grupo foi composto por doze (12) animais, foram necessários **24 ratos para essa etapa da pesquisa**. Somando os dois experimentos, o número total de animais necessários para a realização do presente trabalho foi **96 ratos**.

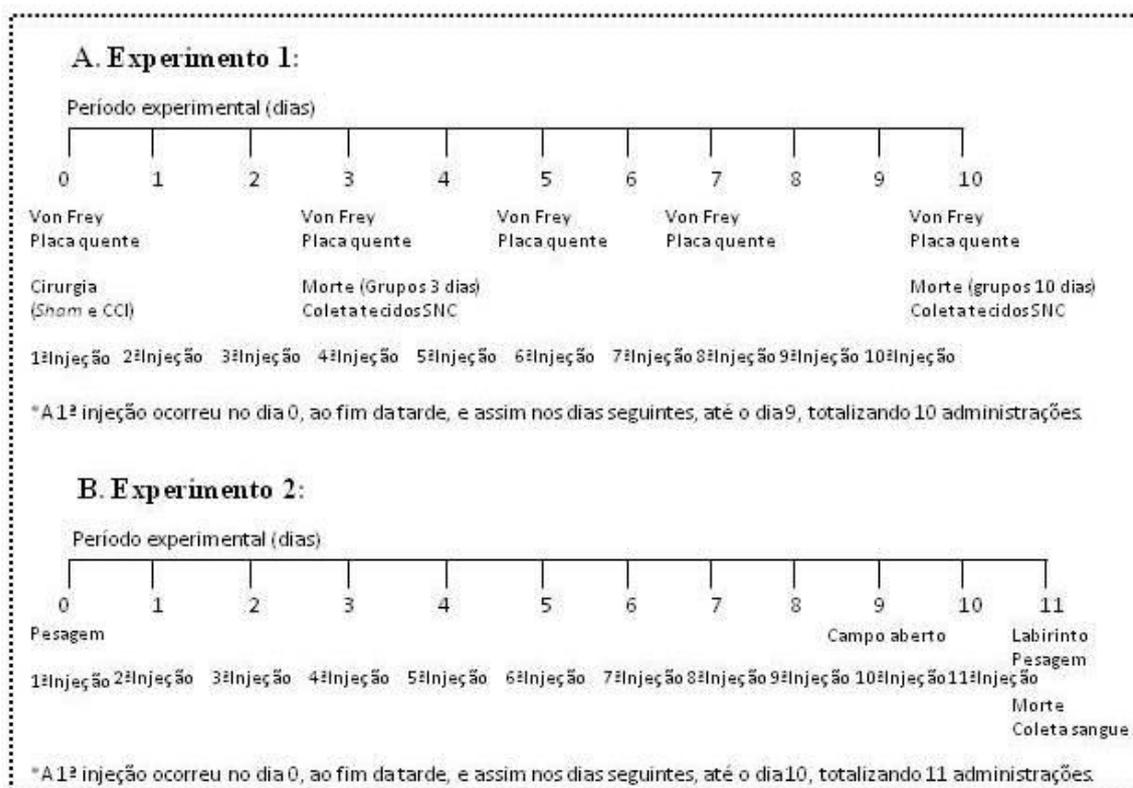


Figura 6 – Esquema temporal mostrando os dias das avaliações das sensibilidades mecânica e térmica (testes de von Frey e placa quente, respectivamente), da cirurgia, morte e coleta dos tecidos nos ratos dos grupos experimentais controle, *Sham* e CCI (Experimento 1, A); e da pesagem, realização dos testes de campo aberto e labirinto, morte e coleta de sangue nos ratos do grupo controle (Experimento 2, B).

4.4.3 Compressão no nervo isquiático

Para o procedimento de compressão no nervo isquiático direito, os ratos foram previamente anestesiados com uma solução de cetamina (90 mg/kg, i.p.) e xilazina (10 mg/kg, i.p.) e posicionados em decúbito dorsal para a realização da tricotomia da coxa direita. A intervenção foi iniciada pela assepsia da pele com álcool 70%, seguida de incisão cutânea e subcutânea longitudinal no membro posterior direito, no terço médio da coxa, para expor o músculo bíceps femoral, o qual foi afastado para permitir a visualização e abordagem do nervo isquiático direito. O procedimento de compressão crônica no nervo isquiático foi realizado conforme técnica descrita por Bennett e Xie (1988), a qual consiste em realizar quatro amarraduras leves no tronco comum do nervo (próximo à ramificação em sural, tibial e fibular), com um milímetro de distância entre um nó e outro, resultando em cerca de cinco milímetros de nervo com compressão. O fio utilizado para a amarração do nervo foi o *catgut* cromado 4.0 tipo c bioabsorvível (Shalon[®]). Após o procedimento, o local da incisão foi suturado com fio de nylon não absorvível 4.0 (Somerville[®]) e o antimicrobiano rifamicina (Rifocina Spray[®] 10 mg/mL, 1 jato) foi aplicado sobre a pele suturada. Os animais pertencentes ao grupo denominado *sham* ou manipulado passaram por todo este processo, com exceção da compressão nervosa. Os animais controle não sofreram intervenção cirúrgica. Após a cirurgia, os animais foram acomodados nas caixas com maravalha e mantidos em observação no Laboratório de Neurobiologia até a recuperação anestésica. Em seguida, ocorreram as primeiras administrações de MeF ou salina, conforme descrito previamente.

4.4.4 Parâmetros nociceptivos

4.4.4.1 Sensibilidade térmica (Teste da placa quente)

Para a determinação da sensibilidade térmica nos animais CCI, *sham* e controle, os mesmos foram submetidos ao teste da placa quente. Vinte e quatro horas antes do teste os animais foram ambientados à placa em temperatura ambiente, por um período de 5 minutos. Nos dias do teste, a placa foi aquecida e mantida a temperatura de 50° C. Então, cada animal foi colocado sobre esta placa e o tempo para a manifestação de comportamentos indicativos de nocicepção (reflexo de retirada das patas, lambr as patas) foi determinado e anotado. Assim que o animal manifestou tal comportamento, este foi imediatamente retirado do contato com a placa para não lesionar os tecidos com a alta temperatura. O tempo de corte foi 20 segundos, após o qual o animal foi retirado da placa quente. Os testes foram realizados no dia 0 (pré-cirurgia) e aos 3, 5, 7 e 10 dias após a mesma, entre nove e dez horas da manhã, pelo mesmo experimentador.

4.4.4.2 Sensibilidade mecânica

Para a determinação da sensibilidade mecânica nos animais CCI, *sham* e controle, os mesmos foram submetidos ao teste de Von Frey, empregando-se analgesímetro digital. Vinte e quatro horas antes do teste os animais foram ambientados às caixas de acrílico próprias para o teste, por um período de 5 minutos. Nos dias do teste os ratos foram colocados individualmente nestas mesmas caixas de acrílico, cujo assoalho é composto por uma malha metálica de 5 mm², permitindo ao experimentador visualizar e acessar as patas dos animais. Utilizando-se um equipamento de Von Frey eletrônico (Analgesímetro digital Insight), foram aplicadas pressões crescentes à superfície plantar da pata posterior direita do animal (ipsilateral à lesão, no caso dos *sham* e CCI) até que se observasse um movimento de retirada

do membro. A pressão aplicada foi instantaneamente convertida em força pelo transdutor e registrada pelo equipamento, em gramas. Em cada um dos dias do experimento, cada animal recebeu cinco aplicações de pressão, com intervalo de 10-15 segundos entre cada uma, e a média das leituras de força representou o limiar de sensibilidade mecânica para aquele animal, naquele período. Os testes foram realizados no dia 0 (pré-cirurgia) e aos 3, 5, 7 e 10 dias após a mesma, entre oito e nove horas da manhã, pelo mesmo experimentador.

4.5 Efeito da administração da fração metanólica de *Schinus terebinthifolius* sobre parâmetros de estresse oxidativo em medula espinal e córtex cerebral de ratos controle, *sham* e com compressão no nervo isquiático

4.5.1 Preparação das amostras

Imediatamente após a morte dos animais, por decapitação, a medula espinal e o encéfalo foram removidos e transferidos para uma placa de Petri resfriada em banho de gelo, contendo solução salina 0,9%. O segmento lombossacral da medula espinal e todo o córtex cerebral foram separados, pesados e congelados em nitrogênio líquido. A homogeneização dos tecidos foi realizada em solução aquosa de cloreto de potássio (1,15%), em um volume de cinco vezes a massa de cada tecido, e solução isopropanólica de fenilmetilsulfonil fluoreto (100 mM), em um volume de um vigésimo da massa de cada tecido. Após homogeneização em aparelho mixer manual, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 1000 g (Centrífuga refrigerada RC-5C, Sorvall). Os sobrenadantes foram reservados para os diferentes ensaios e mantidos em freezer a -80°C até o momento das determinações bioquímicas. Excetuando-se a medida do peróxido de hidrogênio, os demais ensaios (SOD,

CAT, GPx, GST, AA, T-SH, lipoperoxidação) foram realizados com os tecidos nervosos homogeneizados, como recém descrito.

4.5.2 Atividade das enzimas antioxidantes

A atividade da enzima **catalase** (CAT) foi quantificada conforme técnica descrita por Aebi (1984). A medida foi realizada em cubeta de quartzo empregando-se 50 μ L de amostra do tecido nervoso, 1.950 μ L de tampão fosfato 0,1 M (pH = 7,4) e 50 μ L de peróxido de hidrogênio (0,88 M), a partir do qual observou-se o gradativo decaimento nas absorvâncias medidas, nos tempos 0, 15 s, 30 s, 45 s e 60 s, representando a ação enzimática da catalase das amostras sobre o peróxido de hidrogênio em solução. As leituras foram realizadas em comprimento de onda de 240 nm (Espectrofotômetro T60, PG Instruments). Os resultados foram expressos em picomoles por miligrama de proteína.

Para quantificar a atividade da enzima **superóxido dismutase** (SOD) realizou-se técnica descrita por Misra e Fridovich (1972), cujo método consiste em avaliar indiretamente a ação desta enzima, que ao neutralizar os radicais superóxido gerados durante a auto-oxidação da adrenalina reduz a formação de adrenocromo, um subproduto colorido desta auto-oxidação e que pode ser medido em comprimento de onda de 480 nm. Inicialmente realizou-se uma leitura temporal das absorvâncias (Espectrofotômetro T60, PG Instruments) da adrenalina (60 mM, pH = 2), em meio contendo tampão glicina (pH = 11,3). Em pH elevado a auto-oxidação é favorecida e o equipamento registrou a formação de adrenocromo característica. Em seguida, realizou-se a leitura da absorvância das amostras, cada qual nos volumes de 15 e 30 μ L em presença de 50 μ L de adrenalina. Neste caso, em função da presença de SOD nas amostras, menos adrenocromo foi formado. O ensaio proporciona uma medida indireta da atividade enzimática, e por isso os resultados foram expressos em unidades

de SOD por miligrama de proteína, que representa a quantidade de enzima capaz de inibir em 50% a velocidade de auto-oxidação da adrenalina.

Para determinação da atividade da enzima **glutathione transferase** (GST), empregou-se técnica cujo princípio baseia-se na conjugação da glutathione reduzida (GSH) ao 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB), pela GST presente na amostra em estudo. O composto resultante, dinitrofenilglutathione, pode então ser detectado espectrofotometricamente, a 340 nm, conforme descrito por Habig, Pabst e Jacoby (1974).

Em uma cubeta de quartzo, adicionaram-se os seguintes reagentes: 970 μL de tampão fosfato 0,1 M (pH = 6,5), 30 μL de amostra e 200 μL de GSH. Zerou-se o espectrofotômetro e rapidamente adicionou-se 100 μL de CDNB (20 mM). A reação foi observada por um minuto, e as absorbâncias nos tempos 0 e 60 s foram anotadas, para posterior cálculo da atividade enzimática, expressa em picomoles por minuto, por miligrama de proteína.

A enzima **glutathione peroxidase** (GPx) catalisa a reação de hidroperóxidos com a glutathione reduzida (GSH) para formar glutathione oxidada (GSSG) e o produto da redução do hidroperóxido. Logo, sua atividade pode ser determinada medindo-se o consumo de NADPH na reação de redução acoplada à reação da GPx (FLOHÉ e GUNZLER, 1984). Para esta determinação, mediu-se a atividade da glutathione peroxidase a 340 nm, em um meio de reação que continha: tampão fosfato (140 mM, pH = 7,5), EDTA (1 mM), NADPH (0,24 mM), azida sódica (1 mM), GSH (5 mM), glutathione redutase (0,25 U/mL) e, por fim, hidroperóxido de ter-butílica (0,5 mM). A atividade da GPx foi expressa em nmoles de peróxido/hidroperóxido reduzido /min/mg de proteína.

4.5.3 Ácido ascórbico

O ensaio de quantificação do ácido ascórbico foi realizado conforme técnica descrita por Roe e Kuether (1942), com pequenas adaptações. Inicialmente produziu-se uma curva padrão de ácido ascórbico (AA). As diferentes concentrações de AA foram então misturadas com carvão ativado, de granulometria 1-2 mm, tratado previamente com ácido clorídrico (10%), para conversão do AA em sua forma oxidada, o dehidroascorbato. Após, adicionou-se 10 µL de solução de tiouréia (10%) e 75 µL de 2,3-dinitrofenilhidrazina (DNPH) (2%) e os tubos *ependorfs* contendo essa mistura de soluções foram colocados em banho-maria a 37 °C, por 3 horas. Terminado este período de tempo, adicionou-se 375 µL de ácido sulfúrico (85%), gota a gota, com os *ependorfs* em banho de gelo, e aguardou-se 30 minutos para leitura das absorbâncias em espectrofotômetro, a 540 nm (Espectrofotômetro T60, PG Instruments). Na presença de AA desenvolve-se uma coloração alaranjada, proporcional à concentração. As amostras tiveram o mesmo tratamento, porém com a adição de ácido tricloroacético ocorre desproteinização, sendo necessário centrifugar novamente os *ependorfs* por breve período de tempo, e seguir o ensaio utilizando o sobrenadante obtido. A partir da curva padrão, obtiveram-se as concentrações de AA (sob a forma de dehidroascorbato) das amostras em micromolar de AA por miligrama de proteína.

4.5.4 Peróxido de Hidrogênio

O ensaio para mensurar a concentração de peróxido de hidrogênio nos tecidos baseia-se na oxidação do vermelho de fenol por este peróxido, mediado pela peroxidase do rabanete, e foi conduzido conforme técnica descrita por Pick e Keisari (1980), com pequenas modificações. Para tanto, fatias finas do tecido nervoso foram incubadas em tampão dextrose-fosfato (5 mM; 10 mM, pH = 7,0), por 30 minutos, sob agitação. Após este período, o meio de

incubação foi coletado e adicionado à solução contendo vermelho de fenol (0,28 mM) e peroxidase de rabanete (8,5 U/mL). Após 5 minutos de espera, adicionou-se a essa mistura hidróxido de sódio (1,0 M) e realizou-se a leitura da absorbância, em comprimento de onda de 610 nm (Espectrofotômetro T60, PG Instruments). Os resultados foram expressos em micromols de peróxido por grama de tecido.

4.5.5 Tióis Totais

A medida da concentração de tióis totais (T-SH) foi conduzida conforme descrito por Aksenov e Markesbery (2001). Para tanto, 30 µL de amostra foram misturados a 1 mL de tampão PBS/EDTA (pH = 7,5) e a 30 µL de ácido 5,5'- ditiobis (2-nitrobenzóico) (DTNB, 10 mM). Após 30 minutos de incubação, a temperatura ambiente, as absorbâncias foram lidas a 412 nm (Espectrofotômetro T60, PG Instruments). A medida de TNB formado foi calculada conforme a fórmula:

$$\text{TNB} = (A_{412} - A_{412 \text{ sem proteína}} - A_{412 \text{ sem DTNB}}) / \epsilon_{412\text{TNB}}, \text{ onde:}$$

$\epsilon_{412\text{TNB}} = 14.150 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, A_{412} é a absorbância da amostra; $A_{412 \text{ sem proteína}}$ é a absorbância do meio reacional sem amostra; $A_{412 \text{ sem DTNB}}$ é a absorbância do meio sem DTNB. Os resultados foram expressos em micromoles por miligrama de proteína.

4.5.6 Hidroperóxidos lipídicos

Os hidroperóxidos são produtos primários da oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados. Um dos métodos para medir a concentração destes compostos é a técnica do xilenol laranja, cujo método baseia-se na reação de oxidação do Fe^{+2} a Fe^{+3} , na presença de lipoperóxidos e formação de complexos de Fe^{+3} com xilenol laranja (JIANG; WOOLLARD;

WOLFF, 1991). O reagente de trabalho foi composto por metanol 90%, xilenol laranja 100 μM , ácido sulfúrico 25 mM, BHT 4 mM e sulfato ferroso 250 μM . A mistura foi preparada no dia do experimento. As amostras de tecidos foram diluídas em água (1:10) antes do ensaio e separadas em duas alíquotas de 90 μL cada, sobre as quais foi adicionado 10 μL de metanol (99%) ou 10 μL de trifenilfosfina (TPP) (10 mM). Ambos os grupos foram incubados por 30 minutos, à temperatura ambiente. Após, pipetou-se em microplaca de 96 poços 10 μL de amostra em quadruplicata (uma duplicata com metanol e outra duplicata com TPP) e, em seguida, adicionou-se 90 μL do reagente de trabalho. A placa permaneceu em agitação por 30 minutos, à temperatura ambiente ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), e depois as absorbâncias foram lidas a 570 nm (Espectrofotômetro com leitor de microplacas Anthos Zenyth, 200rt). Os valores de absorbância (abs) utilizados para os cálculos foram: $\text{abs} = \text{absmetanol} - \text{absTPP}$. Os resultados foram expressos em nanomoles de hidroperóxidos por miligrama de proteína.

4.5.7 Proteínas

A quantificação do conteúdo proteico dos tecidos foi realizada pelo método colorimétrico descrito por Lowry et al. (1951), em espectrofotômetro SP-22, BIOSPECTRO, em comprimento de onda de 625 nm. O conteúdo de proteínas da amostra foi calculado com base nas absorbâncias desta e de um fator de calibração obtido de uma curva-padrão de albumina.

4.6 Efeito da administração da fração metanólica de *Schinus terebinthifolius* sobre comportamentos locomotores e do tipo ansiedade, massa corporal e parâmetros plasmáticos indicativos de dano hepático em ratos controle

O campo aberto (CA) e o labirinto em cruz elevado (LCE) são testes largamente utilizados para avaliar comportamentos relacionados à ansiedade e locomotores em animais (especialmente roedores) expostos a uma situação naturalmente aversiva (espaços abertos, desprotegidos e elevados) (SCHMITT; HIEMKE, 1998; PRUT; BELZUNG, 2003). Várias substâncias podem modificar estes comportamentos, e é pertinente avaliar possíveis efeitos tóxicos empregando tais testes.

Animais sem qualquer manipulação cirúrgica (grupo controle), que receberam MeF (20 mg/kg) ou salina, foram submetidos ao teste de campo aberto (dia 09) e ao teste de labirinto em cruz elevado (dia 11), para avaliar possíveis efeitos tóxicos da MeF sobre a atividade locomotora e sobre comportamentos relacionados à ansiedade. Ambos os testes foram realizados pela manhã (10h), em dias diferentes (9 e 11) para evitar estresse aos animais. O número de animais utilizados para estes experimentos foram 12 por grupo (salina e MeF), totalizando 24 ratos.

4.6.1 Teste do Campo aberto

O campo aberto consistiu em uma arena circular (90 cm diâmetro, 50 cm altura) cujo piso estava marcado em 12 setores (4 centrais e 8 periféricos). Os animais, após período de ambientação na sala de comportamento (20 minutos), foram colocados individualmente no aparato e vários comportamentos foram registrados, por 5 minutos, a saber: número de cruzamentos totais, periféricos e centrais; latência (em segundos) para o primeiro cruzamento; latência para entrar nos setores centrais e tempo gasto neles (em segundos); número de

rearings (comportamento exploratório em que o animal fica sobre duas patas), tempo de congelamento (*freezing*) e auto-limpeza (*grooming*) (em segundos). O número de cruzamentos foi avaliado como medida da atividade motora e a latência para entrar e o tempo de permanência na área central, como medida de comportamentos do tipo ansiedade (PRUT; BELZUNG, 2003).

4.6.2 Teste do Labirinto em Cruz Elevado

O labirinto em cruz elevado consistiu em um aparato com dois braços abertos, opostos (40 cm x 10 cm) e dois braços fechados, também opostos e de mesma medida dos abertos, elevados a 50 centímetros do solo. No dia do teste, os animais foram ambientados na sala de comportamento (20 minutos) e, então, colocados individualmente no centro do labirinto, e os seguintes parâmetros comportamentais foram registrados por 5 minutos: número de entradas e tempo gasto nos braços abertos e fechados. As porcentagens destas variáveis foram calculadas posteriormente em relação ao número total de entradas e do tempo gasto em ambos os braços. Também foi registrado o número de vezes que o animal apresentou os comportamentos de *rearing* e *head dip* nos braços abertos e o tempo (em segundos) em que realizou o comportamento de avaliação de risco (*risk assessment*).

4.6.3 Massa corporal

Os animais foram pesados no dia 0, antes das administrações de MeF ou salina, e ao final do tratamento, no dia 11 (Figura 6-b)

4.6.4 Parâmetros plasmáticos

O efeito da administração de MeF e salina em animais controle, por 11 dias, foi avaliado quanto a alguns parâmetros plasmáticos indicativos de dano hepático. Para tanto, o sangue destes animais foi coletado em tubos *ependorfs* contendo heparina e prontamente centrifugado por 20 minutos, a 1000 g (Sorvall). O plasma foi utilizado na análise das enzimas alanina aminotransferase (ALT), aspartato aminotransferase (AST), gama-glutamiltranspeptidase (GGT) e bilirrubina total, direta e indireta (kits comerciais da In Vitro Diagnostica, Brasil).

4.7 Análise estatística

O cálculo do número mínimo de animais (n) foi realizado a partir de dados de: atividade de enzimas antioxidantes em animais com compressão periférica (NAIK et al., 2006), para as técnicas de estresse oxidativo; dados de ratos com lesão nervosa periférica submetidos ao teste da placa quente (GUEDES et al, 2006), para os parâmetros nociceptivos; dados do labirinto em cruz elevado (SOUZA et al.; 2013), para avaliar os comportamentos do tipo ansiedade e locomotor. Foi estabelecido nível de significância de 0,05 e poder estatístico de 90%. Os dados de fenóis totais e atividade antioxidante foram analisados por ANOVA de uma via, seguida do pós-teste de Tukey, exceto no ensaio do DPPH, onde foi conduzido o teste de Kruskal-Wallis. Os resultados dos testes de Von Frey e da placa quente foram analisados pelo emprego de ANOVA para amostras repetidas, seguida do pós-teste de Tukey. Os resultados dos parâmetros de estresse oxidativo foram analisados estatisticamente por meio de ANOVA de três vias seguida do pós-teste de Holm-Sidak. Os dados bioquímicos plasmáticos, de massa corporal e labirinto em cruz elevado foram analisados pelo teste “t” não pareado. Os dados do teste de campo aberto foram analisados pelo teste de Mann-Whitney.

Em todos os testes foram consideradas diferenças estatisticamente significativas quando o valor de P foi $<0,05$. Todas as análises estatísticas foram realizadas usando os softwares Sigma Stat 3.5 e Origin 8.0.

5. RESULTADOS

5.1 Triagem fitoquímica e avaliação da atividade antioxidante das frações obtidas das folhas de *Schinus terebinthifolius*

5.1.1 Rendimento das frações

As frações obtidas das folhas de *Schinus terebinthifolius*, após remoção do solvente, apresentaram os seguintes rendimentos: HeF (3,84%), DcF (1,49%), EtF (1,63%) e MeF (5,30%).

5.1.2 Triagem fitoquímica das frações

A partir da triagem fitoquímica qualitativa, empregando-se cromatografia em camada delgada, alguns reveladores e padrões de referência, identificou-se a presença de antraquinonas, triterpenos/esteróides e compostos fenólicos em todas as frações, embora a intensidade da reação positiva tenha sido distinta entre elas (Tabela 2-c). As frações EtF e MeF também apresentaram flavonoides, e apenas a MeF apresentou cumarinas. Nenhuma das frações apresentou reação positiva frente ao reagente de *Dragendorff* (revelador para alcaloides) (Tabela 2-c).

Os resultados da quantificação de fenóis totais mostraram-se consoantes com a intensidade de reação positiva na triagem qualitativa (Tabela 2-b). Obtiveram-se as maiores concentrações destes compostos na MeF (406,35 mg EAG/g fração), seguido por EtF (357,62

mg EAG/g fração). As menores concentrações foram encontradas nas DcF (32,27 mg EAG/g fração) e HeF (7,49 mg EAG/g fração).

5.1.3 Atividade antioxidante das frações

No ensaio da atividade sequestradora do radical DPPH, embora a análise não-paramétrica mostrou que não houve diferença significativa entre os resultados de CE50 das frações e padrões antioxidantes (exceto AA x HeF, $p < 0,05$), os valores apresentados por MeF e EtF foram semelhantes aos dos antioxidantes ácido ascórbico e BHT (Tabela 2-a), enquanto HeF e DcF apresentaram atividades ao menos 80 vezes menores que MeF e EtF.

No ensaio da atividade sequestradora do radical hidroxil, as frações que apresentaram melhor desempenho foram a HeF e EtF, com valores de CE₅₀ similares ao do BHT. Neste teste, as frações DcF e MeF apresentaram valores de CE50 maiores, indicando menor atividade antioxidante quando comparadas às outras frações e ao padrão ($p < 0,001$) (Tabela 2-a).

No ensaio que avaliou a capacidade antioxidante total (TRAP), as maiores atividades foram apresentadas pela EtF, seguida pela fração MeF, quando testadas nas concentrações de 2,5 e 5 µg/mL. Nas concentrações de 25 e 50 µg/mL, por sua vez, a MeF apresentou maior atividade, seguida pela EtF. Os valores de equivalentes de Trolox apresentados pelas HeF e DcF foram aproximadamente 50% menores do que os apresentados pela EtF e MeF, nas diferentes concentrações testadas.

Considerando a presença de variados compostos fenólicos (antraquinonas, flavonoides, cumarinas), a maior concentração de fenóis totais e o bom desempenho nos testes antioxidantes (DPPH e TRAP), a fração metanólica (MeF) foi eleita para o estudo do potencial antinociceptivo de *Schinus terebinthifolius* em ratos submetidos à compressão no nervo isquiático. Além disso, MeF apresentou o maior rendimento e adequada dissolução no

veículo de administração intraperitoneal (solução fisiológica 0,9%), sem a necessidade da adição de adjuvantes.

Tabela 2. Propriedades antioxidantes (A), teor de fenóis totais (B) e classes de constituintes vegetais (C) das diferentes frações obtidas de folhas de *Schinus terebinthifolius*.

Frações de <i>Schinus terebinthifolius</i>						Antioxidante padrão
	HeF	DcF	EtF	MeF		
A						
Atividade sequestradora do radical DPPH*, em CE ₅₀		688,43^a ± 595 (25%)	238,87^{ab} ± 233 (25%)	5,23^{ab} ± 5,11 (25%)	3,02^{ab} ± 2,85 (25%)	BHT 6,23^{ab} ± 6,14 (25%) 6,37 (75%)
		887 (75%)	240 (75%)	5,24 (75%)	3,13 (75%)	AA 2,29^b ± 2,24 (25%) 2,75 (75%)
Atividade sequestradora do radical Hidroxil**, em CE ₅₀		59,09 ± 4,8 ^a	146,21 ± 6,8 ^b	32,57 ± 0,8 ^c	134,09 ± 7,0 ^b	BHT 46,21 ± 0,8 ^{ac}
Pontencial Antioxidante Total (TRAP)**	2,5 µg/mL	1,5 ± 0,03 ^a	2,3 ± 0,03 ^b	5,5 ± 0,01 ^c	3,2 ± 0,04 ^d	N.D
	5 µg/mL	1,7 ± 0,1 ^a	2,4 ± 0,03 ^b	5,2 ± 0,01 ^c	4,0 ± 0,07 ^d	
	10 µg/mL	1,9 ± 0,1 ^a	2,5 ± 0,03 ^b	5,5 ± 0,01 ^c	4,9 ± 0,08 ^c	
	25 µg/mL	1,3 ± 0,1 ^a	2,6 ± 0,1 ^b	5,3 ± 0,02 ^c	5,8 ± 0,08 ^d	
	50 µg/mL	1,6 ± 0,1 ^a	2,9 ± 0,1 ^b	5,6 ± 0,01 ^c	6,9 ± 0,06 ^d	
B						
Fenóis Totais**		7,49 ± 1,0 ^a	32,27 ± 8,4 ^a	357,62 ± 19 ^b	406,35 ± 16 ^c	
C						
Antraquinonas		++	++	+	+	
Triterpenos/Esteróides		+	+	++	+	
Compostos fenólicos		+	+	++	++	
Flavonóides		-	-	++	++	
Cumarinas		-	-	-	+	
Alcalóides		-	-	-	-	

CE₅₀: quantidade de antioxidante necessária para decrescer em 50% a concentração inicial do radical em estudo.

*Dados representam a mediana e percentis 25 e 75%; **Dados representam a média ± erro padrão da média. Os dados que estão na mesma linha, com letras sobrescritas diferentes, são significativamente diferentes (p<0.05). N.D (não determinado). AA (Ácido ascórbico). DPPH (radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila). As unidades foram expressas como: TRAP, em µM equivalentes de Trolox; DPPH e hidroxil, em µg/mL; Fenóis totais, em mg equivalentes de ácido gálico (EAG)/g fração. (++) reação positiva forte; (+) reação positiva fraca; (-) ausência de reação. HeF, fração hexano; DcF, fração diclorometano; EtF, fração acetato de etila; MeF, fração metanol.

5.2 Efeito da administração da fração metanólica de *Schinus terebinthifolius* sobre parâmetros nociceptivos em ratos controle, *sham* e com compressão no nervo isquiático

5.2.1 Sensibilidade térmica

Os animais submetidos à compressão no nervo isquiático, tratados com salina, apresentaram diminuição no tempo de latência para a retirada das patas no teste da placa quente, passados três dias da lesão nervosa ($p < 0,05$). Esse resultado indica aumento na sensibilidade térmica (hiperalgia térmica) (Figura 7). Nos períodos subsequentes, os valores apresentaram-se similares aos valores pré-cirurgia. A administração de MeF evitou a ocorrência de hiperalgesia térmica nos animais do grupo CCI, já que estes não apresentaram mudanças significativas no tempo de latência para a retirada da pata, em relação aos valores pré-cirúrgicos, nos diferentes tempos experimentais.

Os animais dos grupos controle e *sham*, tantos os que receberam salina quanto MeF, não apresentaram alterações significativas nas latências de retirada da pata nos diferentes períodos experimentais, indicando que não houve hipersensibilização térmica passível de ser medida pela placa quente.

5.2.2 Sensibilidade mecânica

No teste de Von Frey, os animais submetidos à compressão no nervo isquiático, tratados com salina, apresentaram diminuição na força limiar para a retirada da pata, após três dias da lesão ($p < 0,002$). Essa redução na força limiar foi observada nos demais períodos avaliados (5, 7 e 10 dias, $p < 0,05$), indicando aumento na sensibilidade mecânica (hiperalgesia mecânica) (Figura 8). Os animais do grupo CCI tratados com MeF, por sua vez, apresentaram

valores de força limiar semelhantes aos valores pré-cirúrgicos aos três dias após a lesão. O valor da força limiar foi significativamente maior do que os valores pré-cirúrgicos também aos cinco, sete e dez dias após a lesão ($p < 0,05$). Estes resultados mostram que o tratamento com MeF evitou o desenvolvimento de hipersensibilidade mecânica nos animais submetidos à compressão no nervo isquiático, nos referidos tempos experimentais.

Nos animais do grupo *sham* tratados com salina, observou-se diminuição na força limiar para a retirada da pata, após três dias da lesão tecidual ($p < 0,05$). Porém, não nos demais períodos analisados (5, 7 e 10 dias). Já nos animais *sham* tratados com MeF, não se observou a diminuição no limiar de força em nenhum dos períodos experimentais, mostrando que o tratamento evitou o fenômeno de hipersensibilização também nos animais com lesão *sham*.

Nos animais controle tratados com salina ou MeF, por sua vez, não foram encontradas alterações nos limiares de força, em nenhum dos tempos analisados.

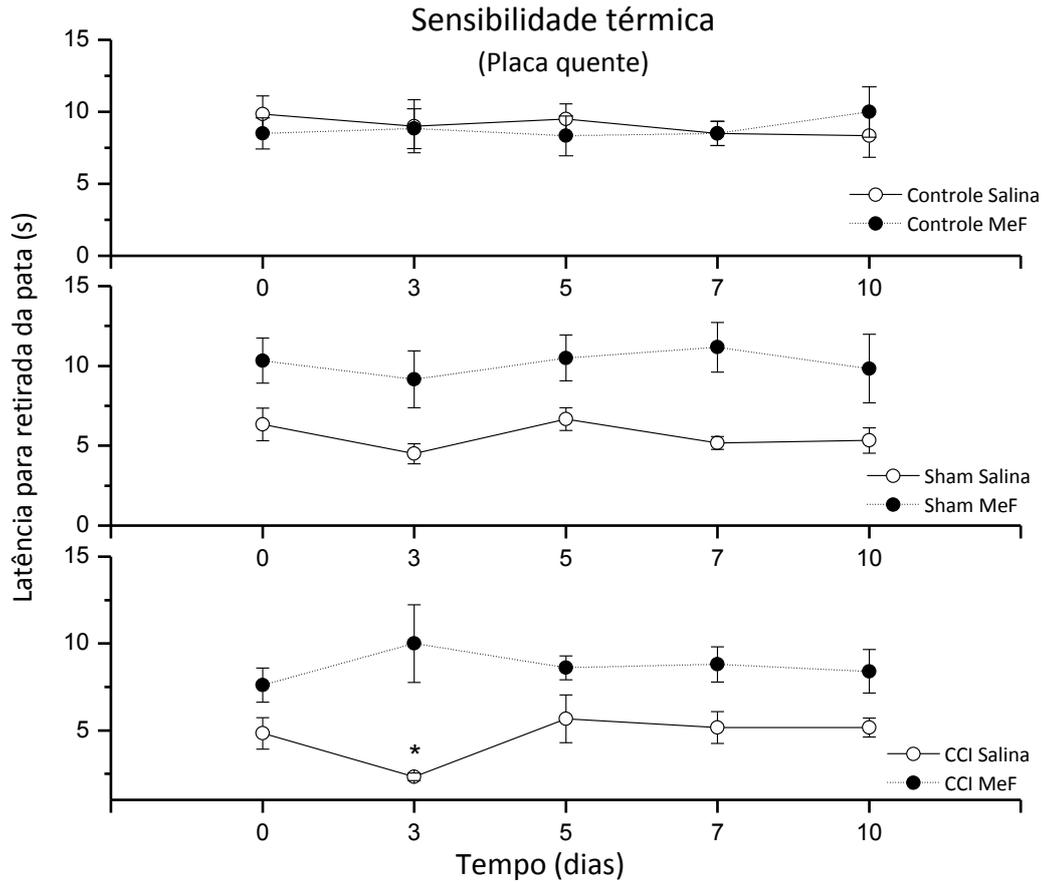


Figura 7 – Medidas da sensibilidade térmica em ratos sem qualquer manipulação cirúrgica (Controle), submetidos à manipulação (SHAM) e compressão no nervo isquiático (CCI) que receberam administrações intraperitoneais de solução salina ou fração metanólica (MeF) obtida a partir de folhas de *Schinus terebinthifolius*, na dose de 20 mg/kg/dia, por dez dias. As medidas foram realizadas nos dias 0 (pré-lesão), 3, 5, 7 e 10 após a intervenção cirúrgica. * Indica diferença significativa quando comparado ao tempo 0 (pré-lesão), do mesmo grupo experimental ($P < 0,05$, ANOVA para amostras repetidas, seguida do pós-teste de Tukey). CCI, do inglês *chronic constriction injury*.

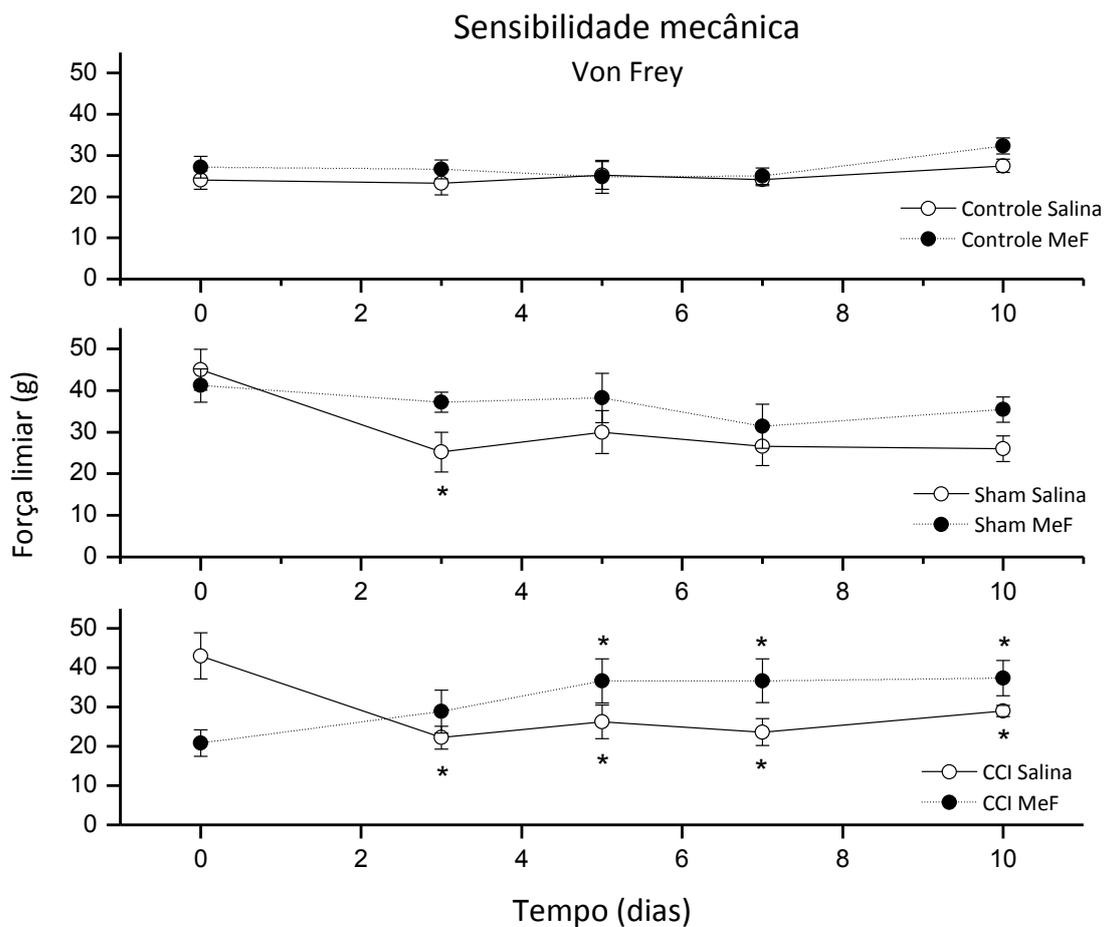


Figura 8 – Medidas da sensibilidade mecânica em ratos sem qualquer manipulação cirúrgica (Controle), submetidos à manipulação (SHAM) e compressão no nervo isquiático (CCI) que receberam administrações intraperitoneais de solução salina ou fração metanólica (MeF) obtida a partir de folhas de *Schinus terebinthifolius*, na dose de 20 mg/kg/dia, por dez dias. As medidas foram realizadas nos dias 0 (pré-lesão), 3, 5, 7 e 10 após a intervenção cirúrgica. * Indica diferença significativa quando comparado ao tempo 0 (pré-lesão), do mesmo grupo experimental ($P < 0,05$, ANOVA para amostras repetidas, seguida do pós-teste de Tukey). CCI, do inglês *chronic constriction injury*.

5.3 Efeito da administração da fração metanólica de *Schinus terebinthifolius* sobre parâmetros oxidativos em medula espinal e córtex cerebral de ratos controle, *sham* e com compressão no nervo isquiático

Inicialmente serão apresentados os resultados dos parâmetros de estresse oxidativo na medula espinal, e após no córtex cerebral. Para uma visão geral dos resultados obtidos em ambos os tecidos, consultar a figura 10, ao final deste item.

5.3.1 Medula espinal

A atividade da enzima superóxido dismutase (SOD) aumentou significativamente na medula espinal dos animais tratados com salina e submetidos à cirurgia *sham* e CCI, quando comparada aos valores do grupo controle. Esse acréscimo estava presente aos três dias e aos dez dias após a cirurgia ($p < 0,05$). Nos animais tratados com MeF, observou-se situação semelhante. A atividade da SOD aumentou na medula espinal dos ratos *sham* e CCI, nos dois períodos avaliados ($p < 0,05$) (Figura 9-A).

A atividade da catalase (CAT) apresentou-se elevada na medula espinal dos animais *sham* tratados com salina aos três dias após a lesão ($p < 0,05$), quando comparada aos grupos controle e CCI de mesmo período e tratamento. Aos dez dias, porém, a atividade desta enzima diminuiu na medula espinal dos grupos *sham* e CCI tratados com salina ($p < 0,05$). O tratamento com MeF, por sua vez, não modificou a situação observada nos animais salina aos três dias, ou seja, a atividade da CAT também apresentou-se elevada, em mesma magnitude, na medula espinal do grupo *sham* ($p < 0,05$). Aos dez dias, entretanto, diferente do que se observou no tratamento com salina, apenas o grupo *sham* apresentou atividade da CAT diminuída na medula espinal ($p < 0,05$) (Figura 9-B).

A atividade da enzima glutathiona peroxidase (GPx) mostrou-se diminuída na medula espinal dos grupos *sham* e CCI salina, quando comparados ao seu controle, tanto aos três dias como aos dez dias ($p < 0,05$). Nos animais que receberam MeF, uma diminuição na atividade da GPx da medula espinal foi observada no grupo CCI, aos três dias, e nos grupos *sham* e CCI, aos dez dias ($p < 0,05$) (Figura 9-C).

A concentração de peróxido de hidrogênio apresentou-se elevada na medula espinal dos ratos *sham* tratados com salina, tanto aos três dias ($p < 0,001$) quanto aos dez dias ($p < 0,05$), quando comparada aos valores dos grupos CCI e controle dos respectivos períodos. Os animais tratados com MeF não apresentaram diferenças significativas nas concentrações de peróxido de hidrogênio da medula espinal (Figura 9-D).

A atividade da enzima glutathiona transferase (GST), à semelhança do que se observou na atividade da GPx, mostrou-se diminuída na medula espinal dos grupos *sham* e CCI salina, quando comparados ao seu controle, tanto aos três dias como aos dez dias ($p < 0,001$). A atividade da GST também apresentou-se diminuída na medula espinal dos ratos *sham* e CCI tratados com MeF, aos três dias e aos dez dias ($p < 0,001$) (Figura 10-A).

A concentração de tióis totais (T-SH), assim como a atividade da GPx e GST, mostrou-se diminuída na medula espinal dos grupos *sham* e CCI que receberam administração de salina, quando comparados ao seu controle ($p < 0,001$). Essa redução foi observada tanto aos três dias como aos dez dias. Nos animais tratados com MeF, a concentração de T-SH da medula espinal aumentou no grupo *sham* e diminuiu no grupo CCI, aos três dias ($p < 0,001$). Aos dez dias, a concentração de T-SH apresentou-se diminuída na medula espinal dos grupos *sham* e CCI ($p < 0,001$). Aqui é importante salientar que o grupo controle tratado com MeF, por dez dias, apresentou maiores concentrações de T-SH na medula espinal, quando

comparado aos grupos controle que receberam salina por três dias e dez dias, e ao próprio grupo controle tratado com MeF por três dias ($p < 0,05$) (Figura 10-B).

A concentração de ácido ascórbico (AA), na forma de dehidroascorbato, mostrou-se aumentada na medula espinal dos animais do grupo CCI salina, tanto aos três dias quanto aos dez dias, quando comparados aos grupos sham e controle de seu respectivo período ($p < 0,05$). Nos animais tratados com MeF, o aumento de AA na medula espinal do grupo CCI foi observado aos três dias ($p < 0,05$), mas não aos dez dias, quando as concentrações de AA nesse tecido não apresentaram modificações significativas entre os grupos experimentais (Figura 10-C).

Os valores de hidroperóxidos lipídicos, indicativos de lipoperoxidação, não apresentaram modificações significativas na medula espinal, quando comparados os grupos controle, *sham* e CCI, de mesmo tratamento e período (Figura 10-D).

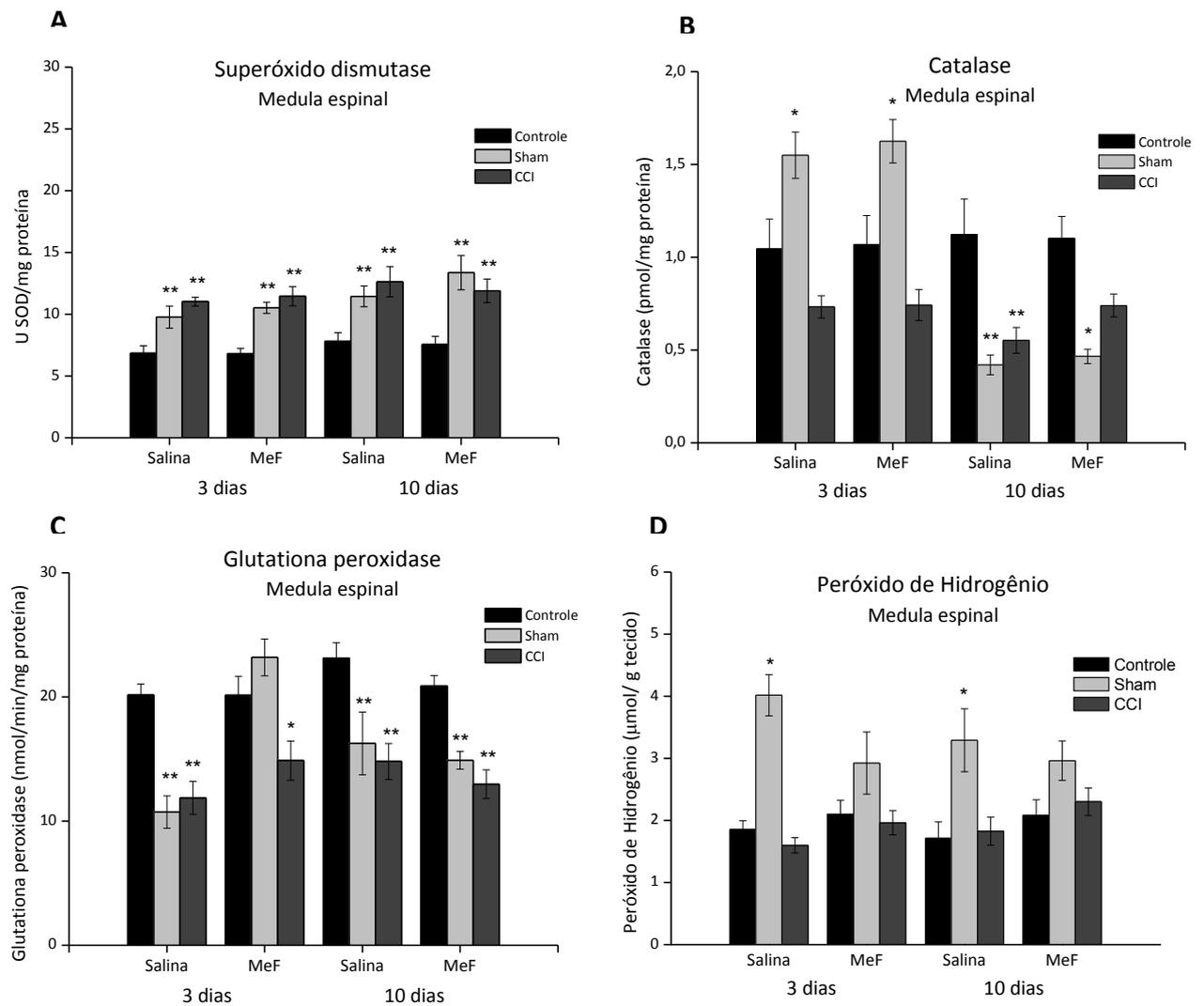


Figura 9 – Parâmetros de estresse oxidativo em **medula espinal** de ratos sem qualquer manipulação cirúrgica (Controle), submetidos à manipulação (Sham) e compressão no nervo isquiático (CCI) que receberam administrações intraperitoneais de solução salina ou fração metanólica (FM) de *Schinus terebinthifolius*, na dose de 20 mg/kg/dia, por dez dias. Estão representadas as atividades das enzimas superóxido dismutase (A), catalase (B), glutathiona peroxidase (C) e concentrações de peróxido de hidrogênio (D). Os dados representam a média \pm erro padrão, $n = 6$ animais. * Indica diferença significativa quando comparado ao controle e sham, ou, controle e CCI, de mesmo tratamento e período experimental. ** Indica diferença significativa quando comparado ao controle, de mesmo tratamento e período experimental ($P < 0,05$; ANOVA de três vias seguida do pós-teste de Holm-Sidak).

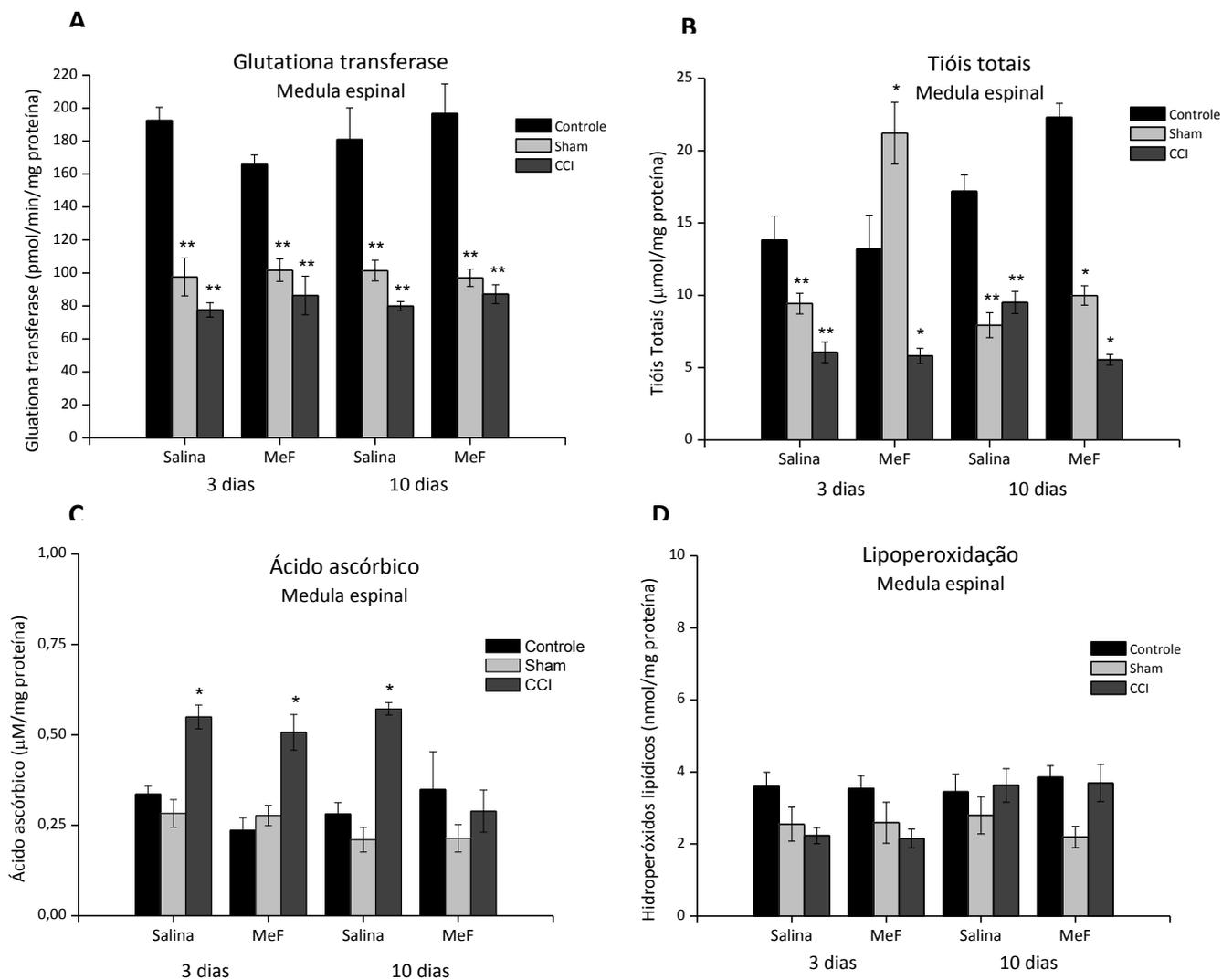


Figura 10 – Parâmetros de estresse oxidativo em **medula espinal** de ratos sem qualquer manipulação cirúrgica (Controle), submetidos à manipulação (Sham) e compressão no nervo isquiático (CCI) que receberam administrações intraperitoneais de solução salina ou fração metanólica (FM) de *Schinus terenbinthifolius*, na dose de 20 mg/kg/dia, por dez dias. Estão representadas a atividade da enzima glutathione transferase (A) e concentrações de tióis totais (B), ácido ascórbico (C) e hidroperóxidos lipídicos, produtos de lipoperoxidação (D). Os dados representam a média \pm erro padrão, $n = 6$ animais. * Indica diferença significativa quando comparado ao controle e sham, ou, controle e CCI, de mesmo tratamento e período experimental. ** Indica diferença significativa quando comparado ao controle, de mesmo tratamento e período experimental ($P < 0,05$; ANOVA de três vias seguida do pós-teste de Holm-Sidak).

5.3.2 Córtex cerebral

No córtex cerebral, a atividade da SOD não variou significativamente em nenhum dos tempos nos animais dos grupos *sham* e CCI tratados com salina, quando comparados ao grupo controle de mesmo tratamento. A administração de MeF, contudo, resultou em aumento da atividade desta enzima no córtex cerebral dos animais *sham*, aos três dias, e nos animais CCI, aos dez dias ($p < 0,05$) (Figura 11-A).

A atividade da CAT não apresentou modificações significativas no córtex cerebral, quando comparados os grupos controle, *sham* e CCI de mesmo tratamento e período (Figura 11-B).

Aos três dias, a atividade da GPx não mudou significativamente no córtex cerebral dos ratos controle, *sham* e CCI tratados com salina e MeF. A atividade dessa enzima, por sua vez, apresentou-se diminuída no córtex cerebral dos ratos *sham* e CCI tratados com salina e MeF por dez dias ($p < 0,05$) (Figura 11-C).

A concentração de peróxido de hidrogênio, no córtex cerebral, aumentou significativamente apenas no grupo CCI tratado com salina, aos três dias ($p < 0,001$). A administração de MeF, nesse período, não provocou alterações estatisticamente significativas na concentração de peróxido de hidrogênio do córtex cerebral dos diferentes grupos experimentais. Nenhuma mudança significativa ocorreu no córtex cerebral dos ratos controle, *sham* e CCI tratados com salina e MeF aos dez dias (Figura 11-D).

A atividade da GST, por sua vez, não apresentou modificações significativas no córtex cerebral, quando comparados os grupos controle, *sham* e CCI, de mesmo tratamento e período (Figura 12-A).

A concentração de T-SH também não apresentou modificações significativas no córtex cerebral, quando comparados os grupos controle, *sham* e CCI, de mesmo tratamento e período (Figura 12-B).

Já a concentração de AA, tanto aos três dias como aos dez dias, apresentou-se diminuída no córtex cerebral dos animais *sham* salina, quando comparada aos ratos controle e CCI do respectivo período ($p < 0,001$). O tratamento com MeF, por três dias, resultou em aumento na concentração de AA nos animais CCI ($p < 0,001$), mas os valores dos ratos *sham* mantiveram-se diminuídos ($p < 0,001$). Aos dez dias, à semelhança do ocorrido no grupo salina para o período, apenas o córtex cerebral do grupo *sham* apresentou menores concentrações de AA ($p < 0,001$) (Figura 12-C).

Os valores de hidroperóxidos lipídicos não apresentaram modificações significativas no córtex cerebral, quando comparados os grupos controle, *sham* e CCI, de mesmo tratamento e período (Figura 12-D).

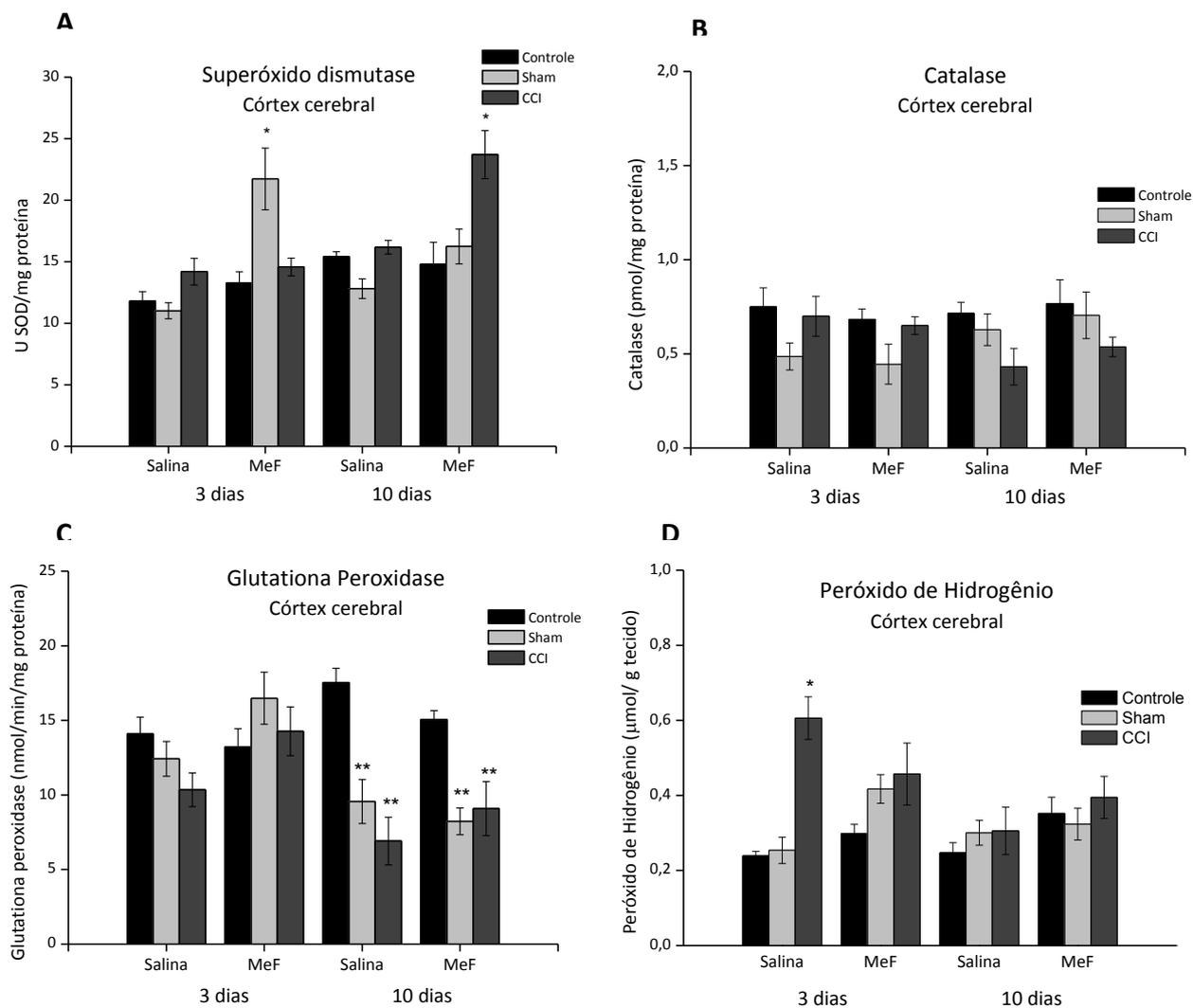


Figura 11 – Parâmetros de estresse oxidativo em **córtex cerebral** de ratos sem qualquer manipulação cirúrgica (Controle), submetidos à manipulação (Sham) e compressão no nervo isquiático (CCI) que receberam administrações intraperitoneais de solução salina ou fração metanólica (FM) de *Schinus terebinthifolius*, na dose de 20 mg/kg/dia, por dez dias. Estão representadas as atividades das enzimas superóxido dismutase (A), catalase (B), glutathione peroxidase (C) e concentrações de peróxido de hidrogênio (D). Os dados representam a média \pm erro padrão, n = 6 animais. * Indica diferença significativa quando comparado ao controle e sham, ou, controle e CCI, de mesmo tratamento e período experimental. ** Indica diferença significativa quando comparado ao controle, de mesmo tratamento e período experimental (P < 0,05; ANOVA de três vias seguida do pós-teste de Holm-Sidak).

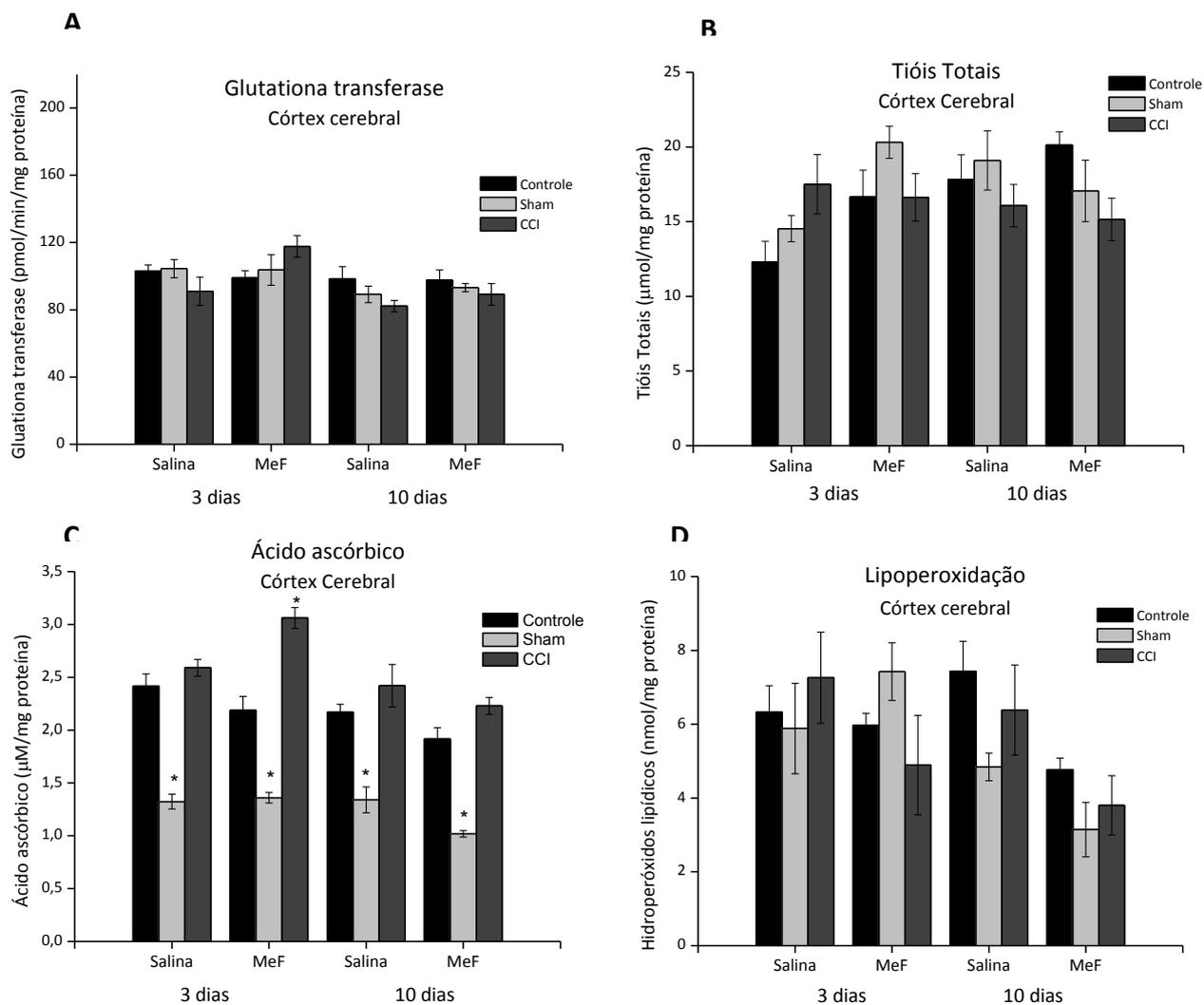


Figura 12 – Parâmetros de estresse oxidativo em **córtex cerebral** de ratos sem qualquer manipulação cirúrgica (Controle), submetidos à manipulação (Sham) e compressão no nervo isquiático (CCI) que receberam administrações intraperitoneais de solução salina ou fração metanólica (FM) de *Schinus terebinthifolius*, na dose de 20 mg/kg/dia, por dez dias. Estão representadas a atividade da enzima glutathione transferase (A) e concentrações de tióis totais (B), ácido ascórbico (C) e hidroperóxidos lipídicos, produtos de lipoperoxidação (D). Os dados representam a média \pm erro padrão, $n = 6$ animais. * Indica diferença significativa quando comparado ao controle e sham, ou, controle e CCI, de mesmo tratamento e período experimental. ** Indica diferença significativa quando comparado ao controle, de mesmo tratamento e período experimental ($P < 0,05$; ANOVA de três vias seguida do pós-teste de Holm-Sidak).

Na figura 13 encontra-se um esquema mostrando uma síntese dos resultados dos parâmetros de estresse oxidativo avaliados nesse estudo.

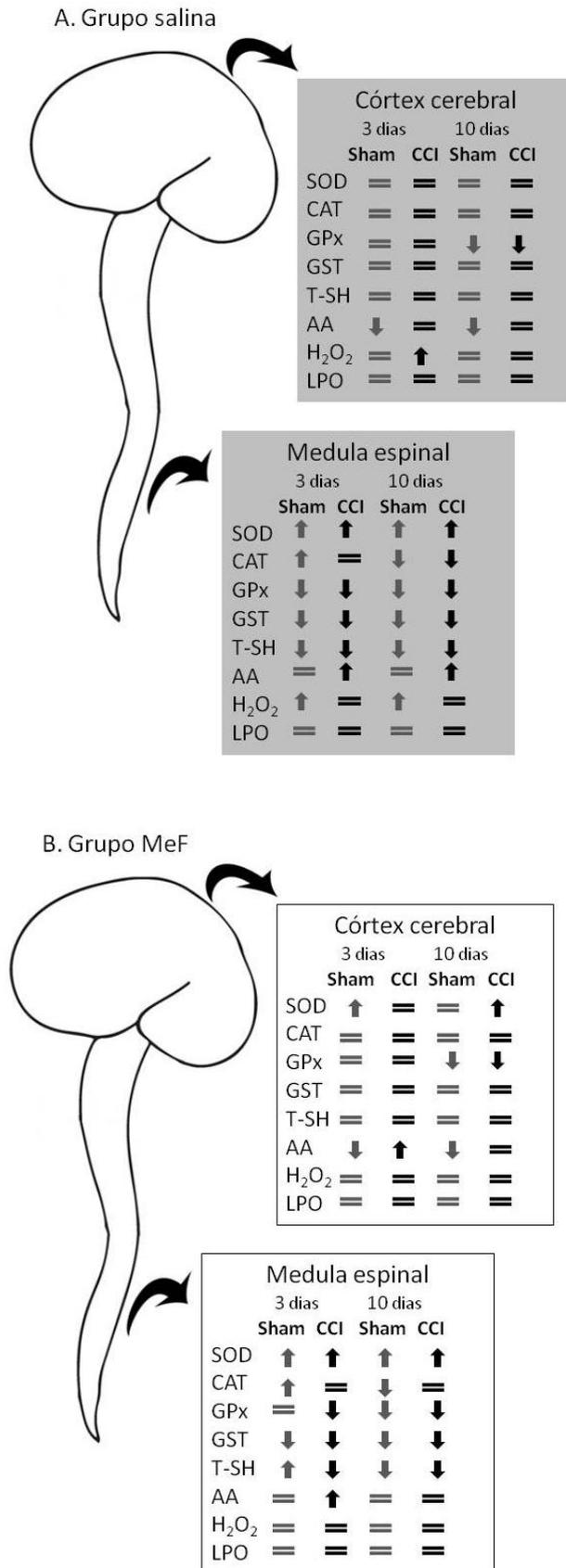


Figura 13 – Esquema do sistema nervoso central de um rato mostrando, nos quadrados ao lado, a síntese dos resultados dos parâmetros de estresse oxidativo avaliados na medula espinal e córtex cerebral de ratos submetidos à manipulação (*Sham*) e compressão no nervo isquiático (CCI) que receberam administrações intraperitoneais de solução salina (A) ou fração metanólica (MeF) de *Schinus terebinthifolius* (B), na dose de 20 mg/kg/dia, por três dias e dez dias. Para abreviaturas, ver texto ou lista de abreviaturas e siglas.

5.4 Efeito da administração da fração metanólica de *Schinus terebinthifolius* sobre comportamentos locomotores e do tipo ansiedade, massa corporal e parâmetros plasmáticos indicativos de dano hepático em ratos controle

Os parâmetros comportamentais, avaliados nos testes de campo aberto e labirinto em cruz elevado, não diferiram significativamente entre os animais tratados com MeF e salina (Tabela 3).

Os parâmetros plasmáticos analisados (γ -GT, AST, ALT, bilirrubina e suas frações) não diferiram significativamente entre os animais que receberam salina e MeF por onze dias (Tabela 4). A administração de MeF também não modificou, de forma estatisticamente significativa, a massa corporal dos animais tratados por onze dias (inicial: 234 ± 7 g; final: 256 ± 5 g), quando comparado ao grupo que recebeu salina pelo mesmo período (inicial: 245 ± 11 g; final: 287 ± 14 g).

Tabela 3. Efeitos da administração de fração metanólica (MeF) das folhas de *Schinus terebinthifolius* e salina sobre comportamentos do tipo ansiedade e locomoção em ratos sem qualquer intervenção cirúrgica.

Teste do Labirinto em Cruz Elevado							
Parâmetros comportamentais	Salina			MeF		T	
	Média	± EPM		Média	± EPM		
% Tempo nos braços abertos (s)	13,29	3,13		17,54	4,76	0,472	
% Tempo nos braços fechados (s)	86,71	3,13		82,46	4,76	0,472	
% Entradas nos braços abertos	21,49	3,63		19,73	4,12	0,753	
% Entradas nos braços fechados	78,51	3,63		80,27	4,12	0,753	
<i>Rearings</i> nos braços abertos	0,00	0,00		0,00	0,00	-	
<i>Head dips</i>	7,42	2,36		7,42	1,82	1,0	
<i>Risk assessment</i> (s)	16,53	4,27		19,34	3,41	0,612	

Teste do Campo Aberto							
Parâmetros comportamentais	Salina			MeF			U
	Mediana	25%	75%	Mediana	25%	75%	
Cruzamentos totais	52,0	38,0	64,0	56,0	40,0	72,0	0,532
Cruzamentos periféricos	45,0	35,0	50,0	44,0	36,0	50,0	0,818
Cruzamentos centrais	2,0	1,0	5,0	4,0	0,0	8,0	0,447
Tempo na área central (s)	3,6	0,7	7,2	9,1	1,7	24,6	0,189
Latência para o 1º cruzamento (s)	7,1	3,0	11,1	6,1	5,0	10,0	0,948
Latência para área central (s)	110,0	47,1	154,1	68,1	62,1	158,0	0,844
<i>Rearings</i>	14,0	11,0	23,0	23,0	12,0	29,0	0,292
<i>Freezing</i> (s)	0,0	0,0	10,8	0,0	0,0	0,0	0,108
<i>Grooming</i> (s)	3,9	0,0	8,1	1,0	0,0	15,0	0,946

Resultados estão expressos como média ± erro padrão da média (Teste do labirinto) e mediana e percentis (Teste do campo aberto); n = 12 ratos. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos (Teste *t* de Student, para Labirinto em Cruz Elevado; Teste de Mann-Whitney, para o Campo Aberto; P<0,05).

Tabela 4. Efeitos da administração de fração metanólica (MeF) das folhas de *Schinus terebinthifolius* e salina sobre parâmetros plasmáticos indicativos de dano hepático em ratos sem qualquer intervenção cirúrgica.

Parâmetros	Grupos experimentais	
	Salina	MeF
AST (UI/L)	32,49 ± 1,65	27,16 ± 3,10
ALT (UI/L)	51,57 ± 1,41	47,00 ± 1,93
GGT (UI/L)	28,50 ± 3,21	24,45 ± 4,58
Bilirrubina total (mg/dL)	2,07 ± 0,30	2,09 ± 0,24
Bilirrubina direta (mg/dL)	1,04 ± 0,16	1,57 ± 0,31
Bilirrubina indireta (mg/dL)	0,89 ± 0,19	0,52 ± 0,10

Dados representam a média ± erro padrão da média. n = 6 ratos/grupo. AST = aspartato aminotransferase, ALT = alanina aminotransferase, GGT = γ -glutamiltanspeptidase. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos (Teste *t*-Student, P<0.05).

6. DISCUSSÃO

O presente trabalho teve como objetivos inicialmente selecionar uma fração antioxidante, com grande concentração de compostos fenólicos, a partir de folhas de *Schinus terebinthifolius*, uma planta nativa e tradicionalmente usada em quadros dolorosos para, posteriormente, avaliar os efeitos antinociceptivos da administração da mesma, por dez dias, em ratos com compressão no nervo isquiático (CCI) direito, um modelo de dor neuropática. Foi avaliado ainda se esse tratamento modificaria parâmetros de estresse oxidativo na medula espinal e córtex cerebral dos animais, e os efeitos tóxicos decorrentes da administração da MeF, por onze dias, em ratos sem qualquer intervenção cirúrgica, avaliando nesses comportamentos locomotores e do tipo ansiedade, marcadores plasmáticos indicativos de dano hepático e massa corporal. Após triagem fitoquímica qualitativa das frações obtidas, para observar a presença de classes de compostos vegetais, inclusive fenólicos, e realização da quantificação dos fenóis totais em cada fração, selecionou-se a fração metanólica (MeF) para a continuidade do estudo.

Os resultados mostraram que os animais submetidos à CCI, e que receberam solução salina, desenvolveram hiperalgesia mecânica e térmica, o que está de acordo com estudos prévios (MUTHURAMAN; SINGH, 2011; HORST et al., 2014) e demonstra que a aplicação do modelo foi efetiva em promover alterações nas sensibilidades, indicativos de dor neuropática (KLUSÁKOVÁ; DUBOVÝ, 2009). Porém, no presente estudo a hipersensibilidade térmica foi observada nos animais com lesão nervosa tratados com salina apenas aos três dias após a cirurgia, enquanto em outros trabalhos mostrou-se que este fenômeno pode durar vários dias (ZUROWSKI et al., 2012; THIAGARANJAN et al., 2012).

Considerando o que é comumente descrito na literatura, é improvável que tenha ocorrido recuperação dos animais nesse curto período de tempo. É provável que a ausência de alterações estatisticamente significativas na sensibilidade térmica dos animais CCI, após os três dias da intervenção cirúrgica, seja decorrente de uma limitação no teste utilizado. Um exemplo de limitação no teste da placa quente é a impossibilidade de se estabelecer o lado corporal do animal que está dando menor sustentação ao seu peso. Provavelmente os ratos com lesão no nervo isquiático estavam com menor sustentação de seu peso corporal no lado lesionado, mas isto não pode ser medido no teste empregado. Apesar dessa limitação, o teste da placa quente é um teste muito utilizado em estudos com modelos experimentais em condições de dor neuropática (GUEDES ET AL., 2006; MUTHURAMAN; SINGH, 2011; HORST ET AL., 2014).

O aumento na sensibilidade mecânica também foi observado nos animais com lesão *sham* que receberam administração de salina por três dias após a cirurgia. Estes dados mostram que a lesão *sham* também resulta em hipersensibilização nos primeiros dias após a injúria. Provavelmente essa hipersensibilização seja consequência da incisão nos tecidos cutâneo e muscular. Sabe-se que a lesão tecidual provoca liberação de citocinas pró-inflamatórias, fatores de crescimento e outros mediadores, ocasionando maior excitabilidade em neurônios aferentes primários e sensibilização periférica, que posteriormente leva a maior excitabilidade em neurônios do corno dorsal da medula espinal, à sensibilização central e ao desenvolvimento de hiperalgesia (MIFFLIN; KERR, 2013). Entretanto, a hiperalgesia decorrente de lesões teciduais em animais *sham* é observada de forma transitória, como relatado em estudos anteriores deste grupo de pesquisa (GUEDES et al., 2006; SCHEID et al., 2013; HORST et al., 2014).

A administração intraperitoneal da MeF, por sua vez, evitou o desenvolvimento de hiperalgesia (térmica e mecânica) nos animais submetidos à CCI. Além disso, evitou a hiperalgesia mecânica nos animais com lesão *sham*. Estes resultados sugerem que os efeitos antinociceptivos, nos dois tipos de lesões, possivelmente se devem a efeitos modulatórios de componente(s) da fração, como será discutido a seguir, sobre moléculas com importante papel no processo de sensibilização periférica e/ou central.

As propriedades medicinais da espécie *Schinus terebinthifolius* na dor e inflamação ainda são pouco estudadas. Entre os estudos que existem a respeito deste tema, a maioria empregou extratos da planta em modelos de dor inflamatória aguda. Nesses estudos, a administração de extratos de *Schinus terebinthifolius* mostrou efeito anti-inflamatório (MOURELLE, 1993; JAIN et al., 1995; CAVALHER-MACHADO et al., 2008; HERINGER, 2009; KASSUYA, 2012), propriedade também demonstrada por outros membros da família Anacardiaceae (MORUCCI et al., 2012; ONASANWO et al., 2012; DAS et al., 2013). Como a CCI e a lesão *sham* induzem inflamação no local da lesão nos primeiros dias após a intervenção cirúrgica (PATHAK et al., 2013; MIFFLIN; KERR, 2013), e esse quadro inflamatório contribui para a sensibilização e desenvolvimento de hipersensibilidade à estímulos nocivos e inócuos (VON HEHN; BARON; WOOLF, 2012), é provável que o efeito antinociceptivo da MeF tenha sido proporcionado pela ação anti-inflamatória de componente(s) da fração. Está demonstrado que a redução no processo inflamatório contribui para o efeito antinociceptivo observado em estudos com modelos de dor neuropática (CÂMARA et al., 2013). Infelizmente, não foram determinados fatores pró-inflamatórios no presente estudo. Esse é, sem dúvida, um tema interessante que será abordado em futuros estudos desse grupo de pesquisadores.

Quanto às moléculas envolvidas neste efeito anti-inflamatório e/ou antinociceptivo, estudos mostraram que compostos fenólicos e triterpenos/esteroides possuem efeitos benéficos em quadros de dor neuropática e inflamação (CALIXTO et al., 2000; QUINTANS et al., 2014). Como os resultados da triagem fitoquímica por CCD do presente estudo mostraram a presença de compostos fenólicos, como flavonoides, cumarinas e antraquinonas, assim como triterpenos/esteroides na MeF de *Schinus terebinthifolius*, é plausível considerar que essas moléculas tenham contribuído para o efeito antinociceptivo observado neste estudo. Ainda, alguns flavonoides, como quercetina, miricetrina e miricetina, foram identificados em extratos de *Schinus terebinthifolius*, e os mesmos apresentaram efeitos atenuantes sobre hipersensibilidades em modelos de dor neuropática (ANJANEYULU; CHOPRA, 2003; MEOTTI et al., 2006). Ainda, Hagenacker et al. (2010) demonstraram que tal efeito antinociceptivo é parcialmente mediado por modulação na atividade da proteína cinase C (PKC) e de canais de cálcio, ambos envolvidos nos processos de sensibilização periférica e central em condições dolorosas (VON HEHN; BARON; WOOLF, 2012). Apesar do presente estudo não ter realizado a identificação de componentes individuais nas frações, é possível que tais moléculas estejam presentes na MeF, já que os flavonoides mencionados podem ser extraídos com solventes alcoólicos (CERUKS et al., 2007). Nesse caso, não se pode descartar a contribuição destes flavonóides no efeito antinociceptivo dessa fração. Todavia, como alguns triterpenos presentes nos frutos e folhas da aroeira apresentaram efeito inibitório *in vitro* sobre a fosfolipase A2 (JAIN et al., 1995), enzima que tem sua atividade aumentada em condições de dor neuropática (MA et al., 2013), também é possível que estes compostos estejam participando dos efeitos apresentados por MeF.

Além da contribuição de moléculas inflamatórias no desenvolvimento de hiperalgesia em modelos de dor, como a CCI, este fenômeno também parece relacionar-se a presença de peroxinitrito, formado a partir da reação do radical superóxido com o óxido nítrico (NO), no

sistema nervoso central (TRACHOOTHAM et al., 2008; SALVEMINI, 2011). Pode-se sugerir a formação de peroxinitrito em regiões do sistema nervoso central dos ratos lesionados, e contribuição dessa molécula no quadro de hiperalgesia dos animais, uma vez que a CCI induz acréscimo na formação de metabólitos de óxido nítrico (HORST et al., 2014) e superóxido (PATHAK et al., 2014) na medula espinal. Além disso, a reação entre essas moléculas, para formação do peroxinitrito, é favorecida em detrimento à dismutação do superóxido pela SOD (LITTLE; DOYLE; SALVEMINI, 2012).

O peroxinitrito é uma das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (ERONs), assim como o superóxido e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), as quais também estão envolvidas no processamento da informação dolorosa (WANG et al. 2004; JANES; NEUMANN; SALVEMINI, 2012; NISHIO et al., 2013). Essas EROns estão envolvidas tanto na dor neuropática como na inflamatória (SALVEMINI; DOYLE; CUZZOCREA, 2006). De fato, estudos com modelos de dor neuropática mostraram aumento na produção de EROns, tanto periféricamente (KIM et al., 2004; PATHAK et al., 2014) como no sistema nervoso central (SCHEID et al., 2013, KIM et al., 2010). Como compostos fenólicos e triterpenos/esteroides são moléculas com potencial antioxidante (ASSIMOPOULOU et al., 2005; SOOBRATTE, 2005), e antioxidantes vem sendo estudados como novas opções terapêuticas no tratamento da dor neuropática (AZEVEDO et al., 2013; YOWTAK et al., 2013), no presente estudo postulou-se que o efeito antinociceptivo da MeF poderia envolver sua ação antioxidante no sistema nervoso central, pois, como mencionado na introdução, em condições de dor neuropática há mudanças em parâmetros de estresse oxidativo nesse tecido (GUEDES, 2006; 2008; 2009; GOECKS et al., 2012; SCHEID, et al., 2013; HORST et al., 2014). Ademais, a lesão em nervo ocasiona maior consumo de oxigênio e formação de EROns na medula espinal (PARK et al., 2006).

Assim, a maior formação de superóxido e peroxinitrito provavelmente foi importante para a hiperalgesia observada nos animais CCI e *sham* que receberam administrações de salina. Uma maior formação de superóxido provavelmente foi responsável pela maior atividade da enzima SOD na medula espinal desses ratos, tanto aos três dias como aos dez dias após a intervenção cirúrgica, situação não modificada pela administração de MeF. Na medula espinal dos animais *sham*, esta maior atividade da SOD resultou em aumento no H_2O_2 . A inexistência deste aumento na medula espinal dos ratos CCI provavelmente foi consequência de uma maior ativação de mecanismos que rapidamente degradaram o H_2O_2 em excesso, como a ação das peroxirredoxinas (MARTIN; CAO; BULLEID, 2014; SIES, 2014), não medidas nesse trabalho. O controle das concentrações de H_2O_2 é necessário, já que esta é uma molécula neuromoduladora e seu aumento pode ocasionar inibição na transmissão sináptica (RICE, 2011) e liberação de cálcio intracelular (NISHIO et al., 2013).

Em seguimento ao exposto, postula-se que a atividade da CAT mostrou-se aumentada na medula espinal dos ratos *sham* que receberam salina e MeF, por três dias, pela maior formação de H_2O_2 oriundo da maior atividade da SOD. Entretanto, a maior atuação da CAT não impediu o aumento do H_2O_2 nos animais que receberam salina. A administração de MeF, por sua vez, evitou a elevação dos teores de H_2O_2 . Isto provavelmente se relaciona com a presença de moléculas com potencial antioxidante nessa fração, as quais podem ter contribuído para o acréscimo no valor dos tióis totais (T-SH) aos três dias. Os T-SH são um grupo de moléculas que participa diretamente na neutralização de radicais, além de atuar como cofatores em vários sistemas enzimáticos (SIES, 1999). Assim, os T-SH também podem ter contribuído para a manutenção da atividade da GPx, uma das principais enzimas neutralizadoras do H_2O_2 , na medula espinal dos ratos *sham* tratados com MeF por três dias. A participação direta de moléculas da MeF na eliminação do H_2O_2 também deve ser considerada (KAINDL et al., 2008; RODRIGO; MIRANDA, VERGARA, 2011). Essa ação direta pode ter

tido um papel importante na manutenção da concentração de H_2O_2 frente a redução na atividade das enzimas GPx e GST, e T-SH aos dez dias. Além disso, é provável que o aumento no H_2O_2 na medula espinal dos ratos *sham* salina, aos três dias e dez dias, tenha sido a causa da diminuição dos T-SH nesse tecido. Ademais, o H_2O_2 , frente à interação com metais, também contribui na formação de um radical altamente reativo, o radical hidroxil, o qual é neutralizado principalmente pela GSH, o que corrobora o papel do H_2O_2 no consumo de T-SH (RICE, 2011). Como consequência, a atividade das enzimas GST e a GPx, que utilizam esses tióis como cofatores, também foram reduzidas. A redução na atividade da CAT na medula espinal dos ratos *sham*, aos 10 dias, não parece se relacionar com a concentração de H_2O_2 , mas resultar de mecanismos modulatórios oriundos da condição dolorosa. Outros autores também relataram redução na atividade dessa enzima em medula espinal de ratos com dor neuropática (GUEDES et al., 2006).

Curiosamente os ratos CCI que receberam salina também apresentaram diminuição nos T-SH, aos três e dez dias, apesar de não terem o H_2O_2 elevado nesses períodos. Neste caso, o consumo dos T-SH pode estar ocorrendo pela maior sensibilização decorrente da CCI, que resulta em maior formação dos ERONs, superóxido, óxido nítrico e peroxinitrito, na medula espinal desses animais, como sugerido anteriormente. A elevação nos teores de óxido nítrico, frente à presença de radicais tiólicos formados por sua ação sobre ERONs, favorece a formação de nitrosotióis (DIERS; KESZLER; HOGG, 2014). Embora esta reação seja reversível, pode estar contribuindo temporariamente para a redução dos T-SH. Além disso, os T-SH podem estar diminuídos pelo incremento na liberação de glutamato nos animais submetidos à CCI, como será explicado a seguir.

A síntese de GSH, um dos principais T-SH, ocorre no citoplasma, e depende da captação de cisteína, que em neurônios é 90% mediada por transportadores de aminoácidos

excitatórios (EAAT) (ROBERT et al., 2014). Os neurônios obtêm grande parte da cisteína do meio extracelular, a partir da liberação de GSH das reservas dos astrócitos, os quais mantêm concentrações desta molécula em torno de 8 mM, enquanto em neurônios a concentração é de 2-3 mM. A GSH liberada por células gliais, incluindo os astrócitos, é clivada em cistina e cisteína, sendo esta última usada pelos neurônios para formar nova GSH. Os astrócitos podem usar tanto a cisteína quanto a cistina, e a captação desta última ocorre pelo trocador glutamato-cistina (x_c^-). O sistema x_c^- promove a captura de cistina e a liberação de glutamato para fora da célula. Entretanto, elevadas concentrações de glutamato extracelular poderiam inibir o x_c^- . Porém, a concentração extracelular de glutamato é regulada pela atividade de EAAT, que removem este glutamato deste meio. Assim, a cooperação dos astrócitos na formação da GSH neuronal se mostra fundamental e está diretamente relacionada à dinâmica glutamatérgica (ROBERT et al., 2014). Já se demonstrou que a neurotransmissão glutamatérgica está aumentada em modelos de dor neuropática (AL-GHOUL et al., 1993), e que a expressão de um dos transportadores de glutamato (EAAT-2) (CHANG et al., 2013) e da subunidade catalítica do x_c^- estão diminuídos na medula espinal após a CCI (BERNABUCCI et al., 2012). Este panorama possivelmente está contribuindo para os baixos valores de T-SH na medula dos animais submetidos à CCI que receberam salina, e consequente redução nas atividades da GPx e GST. Diante dessa redução nos T-SH, é provável que o AA passou a desempenhar importante papel na manutenção das condições intracelulares de células da medula espinal, inclusive nos valores de H_2O_2 . Um apoio a essa hipótese é o aumento no valor de AA na medula espinal dos ratos CCI, aos três e dez dias.

A administração de MeF não foi capaz de modificar esse quadro relacionado ao tióis, mas resultou em mudanças no AA e CAT, aos dez dias. A manutenção dos valores de AA e da atividade da CAT similares aos do grupo controle provavelmente se relaciona ao maior

período de administração da MeF, que resulta em possíveis efeitos antioxidantes a longo prazo.

Alguns dos parâmetros de estresse oxidativo também se mostraram alterados no córtex cerebral de ratos *sham* e CCI que receberam administrações de salina e MeF. Porém, diferente da medula espinal, a CCI provocou aumento significativo nos valores de H₂O₂ no córtex cerebral dos ratos tratados com salina por três dias após a lesão nervosa periférica. É possível que esse acréscimo se relacione também com o processo de sensibilização, tal como foi inferido para os resultados da medula espinal. Diversos estudos mostram que o processo de sensibilização na medula espinal se estende às regiões superiores do neuroeixo (SAADÉ; JABBUR, 2008; OHSAWA; YAMAMOTO, ONO, 2013).

Nesse contexto, os valores aumentados de H₂O₂ podem se relacionar com a atividade da SOD, cujo valor foi levemente superior ao encontrado no córtex cerebral de ratos *sham* e controle que receberam administrações de salina por três dias, embora a média nos três grupos não diferisse significativamente nesse período. Porém, o pequeno acréscimo na atividade da SOD não explica o grande aumento no H₂O₂. Considerando que as principais enzimas envolvidas em sua detoxificação (CAT, GPX) apresentaram atividade sem alterações significativas, provavelmente o aumento no H₂O₂ está relacionado a outros mecanismos que favoreceram sua formação. Uma das fontes de geração de H₂O₂ à qual se tem atribuído papel nos quadros de dor é a enzima NADPH oxidase (NOX) (KIM et al., 2010; IM et al., 2012). LIM, KIM e LEE (2013) demonstraram que a lesão de nervo periférico resultou em maior expressão da NOX pelas células gliais no SNC, e que isto estava relacionado a maior sensibilização. Desta forma é possível que a ativação glial e maior atividade da NOX estejam contribuindo para elevar a formação de H₂O₂ no córtex cerebral dos animais com CCI.

A administração de MeF, por sua vez, evitou este aumento no H₂O₂, e promoveu o incremento na concentração de AA. Embora o mecanismo pelo qual a fração estimulou este aumento seja desconhecido, possivelmente estas maiores concentrações de AA tenham contribuído para a manutenção do H₂O₂ em valores semelhantes aos do grupo controle.

Curiosamente, a administração de MeF também resultou em aumento na atividade da SOD no córtex cerebral dos animais *sham*, aos três dias, e CCI, aos dez dias. Este incremento provavelmente está relacionado com uma maior disponibilidade de superóxido, o substrato da SOD. Como já mencionado, em situações de dor ocorre maior formação de superóxido e óxido nítrico e estas moléculas reagem preferencialmente para formar peroxinitrito (SALVEMINI, 2011). Possivelmente uma ação da MeF sobre este óxido nítrico tenha limitado a reação com o superóxido. Assim, a maior disponibilidade do superóxido pode ter permitido maior dismutação deste pela SOD, o que pode explicar a atividade aumentada dessa enzima no córtex cerebral dos ratos *sham* que receberam MeF.

A manutenção da atividade da GST, tanto aos três dias quanto aos dez dias, provavelmente se deve aos T-SH, cofatores para essa enzima, os quais não mostraram alterações significativas no córtex de ratos *sham* e CCI que receberam salina, nesses períodos. Essa pode também ser a causa da manutenção da atividade da GPx, aos três dias, no córtex desses ratos. A manutenção da atividade da GPx e CAT, nesse período, provavelmente contribuiu para manter baixos os valores de H₂O₂. A diminuição na atividade da GPx, aos dez dias, no córtex cerebral de ratos *sham* e CCI que receberam salina provavelmente se relaciona ao valor baixo de H₂O₂, pois os T-SH não mudaram nesse período. Ademais, a atividade da CAT se manteve sem alterações, a qual também deve ter contribuído para manter baixo o valor de H₂O₂. A administração da MeF não alterou esse quadro.

Um achado intrigante do presente estudo foi a redução no valor de AA no córtex cerebral de ratos *sham* salina, tanto aos três como aos dez dias. É possível que isto se relacione com o uso diferencial de lactato ou glicose pelo neurônio. Castro et al. (2009) mostraram que o aumento na neurotransmissão glutamatérgica resulta em maior ativação glial e uso preferencial de lactato pelo neurônio em detrimento da via glicolítica. Em situações de menor atividade prevalece o uso da rota glicolítica. É possível que nos animais *sham* esteja mais ativada a rota glicolítica. Como glicose e dehidroascorbato usam o mesmo transportador (HARRISON; MAY, 2009), a competição pode ter resultado em limitação na entrada de dehidroascorbato e, conseqüentemente, maior susceptibilidade a sua degradação no meio extracelular. Isso pode ser a explicação para os valores reduzidos de AA no córtex cerebral dos ratos *sham* tratados com salina. Esse provável mecanismo não é alterado pela administração da MeF.

Comparando-se os resultados bioquímicos da medula espinal e córtex cerebral de ratos com e sem CCI no nervo isquiático, que receberam administrações de salina e MeF por três dias e dez dias, observou-se que as alterações diferiram nesses tecidos em muitos dos parâmetros de estresse oxidativo estudados. Isto pode sugerir diferentes mecanismos de regulação desse sistema nessas regiões do sistema nervoso central. Entretanto, apesar de não ser possível descartar essa possibilidade, também considerada por outros autores (SCHEID et al., 2013), é possível que as diferenças sejam decorrentes do uso de todo o córtex cerebral, em detrimento a apenas o segmento lombossacral da medula espinal. Isto permitiu a obtenção de resultados locais na medula espinal, pois é no segmento lombossacral que entram, e de onde saem, as informações que trafegam no nervo isquiático (SAADÉ; JABBUR, 2008). O uso de todo o córtex cerebral, porém, pode ter proporcionado certa limitação na aquisição de resultados locais. Apesar de essa limitação não invalidar os resultados obtidos, ela deve ser considerada na interpretação dos mesmos. Assim, é provável a existência de mecanismos

locais de regulação similares no córtex cerebral e medula espinal nos parâmetros de estresse oxidativo abordados no presente estudo.

Ainda, as mudanças nos parâmetros de estresse oxidativo oriundas da lesão periférica parecem indicar que as mesmas contribuem para a sinalização intracelular em condição de dor neuropática, já que nenhuma alteração significativa ocorreu na medida de lipoperoxidação realizada, tanto no córtex cerebral como na medula espinal. Guedes et al. (2006) também mostraram que a formação das espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico, outra medida de lipoperoxidação, não mudou na medula espinal de ratos em uma condição de dor (GUEDES et al., 2006). Entretanto, outras medidas de dano às macromoléculas devem ser realizadas para complementar esses dados.

A administração da MeF, por sua vez, parece influenciar a mudança nos parâmetros de estresse oxidativo oriundas da lesão periférica, possivelmente devido a presença de moléculas com potencial antioxidante nessa fração. Assim, não se descarta que esse efeito central da MeF pode estar contribuindo para seu efeito antinociceptivo, embora não se observe uma relação direta entre estas alterações e tais efeitos. Possivelmente estes, e outros mecanismos relacionados à atividade anti-inflamatória já descrita para componentes de *Schinus terebinthifolius*, estejam ocorrendo conjuntamente. Além disso, compostos fenólicos e triterpenos, moléculas presentes na MeF, possuem diversas ações no tecido nervoso, inclusive efeitos protetores sobre a barreira hematoencefálica (KAM et al., 2012), a qual é alterada em condições de dor neuropática (RADU et al., 2013). Assim, diferentes mecanismos devem estar atuando na promoção do efeito antinociceptivo da MeF.

Em relação ao potencial tóxico da espécie *Schinus terebinthifolius*, relatos antigos descreveram que o contato com a planta pode causar reações alérgicas em algumas pessoas (BURTON, 1869), e que ingestão de maiores quantidades dos frutos pode causar indigestão e

vômitos (MORTON, 1978). Diante destas informações, e dos poucos estudos sobre a toxicidade da espécie (PIRES et al., 2004; LIMA et al., 2009; CARLINI et al., 2012), o presente trabalho também avaliou se a administração de MeF poderia resultar em modificações em parâmetros comportamentais e bioquímicos nos animais tratados com a fração, por onze dias. Os comportamentos relacionados à ansiedade e locomotores foram avaliados porque se postulou que MeF poderia ter ações sobre o SNC, já que sua composição incluía a presença de classes de compostos vegetais sobre os quais existem relatos de efeitos centrais (YOUUDIM; SHUKITT-HALE; JOSEPH, 2004; PASSOS et al., 2009). Apesar dos possíveis efeitos sobre o SNC, o tratamento com MeF não ocasionou modificações significativas nos diferentes parâmetros comportamentais avaliados pelos testes de campo aberto e labirinto em cruz elevado. Em acordo aos dados deste trabalho estão os resultados de Carlini et al. (2012), que mostraram que a administração oral de um extrato de *Schinus terebinthifolius* (17,6 mg/kg), por oitenta e três dias, não modificou a locomoção dos animais, frente ao teste de Rota Rod.

Os parâmetros plasmáticos indicativos de dano hepático (AST, ALT, GGT e bilirrubina) foram medidos porque o fígado é fundamental na metabolização de xenobióticos e, por conseguinte, deve participar da metabolização dos compostos presentes na MeF. Diversas plantas de uso medicinal têm potencial de causar danos ao fígado, principalmente após uso contínuo e prolongado (CHITTURI; FARREL, 2000). Além disso, a administração da MeF pela via intraperitoneal possivelmente deu às diversas moléculas presentes nesta fração, largo acesso ao sistema portal hepático, e ao fígado, antes de outros órgãos (LUKAS; BRINDLE; GREENGARD, 1971). Quanto ao potencial hepatóxico da MeF, os resultados do presente trabalho mostraram que a administração desta fração não provocou modificações nos parâmetros plasmáticos estudados e, portanto, indicam que MeF tem baixo potencial de causar dano ao fígado de ratos, quando administrada na dose de 20 mg/kg, por 11 dias. Esses

dados corroboram os resultados descritos por Lima et al. (2009), os quais estudaram os efeitos da administração de um extrato de *Schinus terebinthifolius*, na dose de até 5,0 g/kg, por quarenta e cinco dias. Estes autores avaliaram estes mesmos parâmetros plasmáticos e realizaram análise histológica do fígado dos animais tratados, e também não encontraram modificações significativas nos mesmos.

Entretanto, apesar da ausência de alterações nos parâmetros comportamentais, plasmáticos e sobre a massa corporal, após a administração da MeF, não se pode descartar que esta fração apresente toxicidade frente a outros sistemas orgânicos, não avaliados aqui. Assim, os próximos estudos empregando esta fração devem ser acompanhados de outras avaliações sobre sua toxicidade. Afinal, não apenas o uso tradicional, mas a literatura científica, mesmo que escassa, aponta para possíveis efeitos tóxicos de *Schinus terebinthifolius*.

7. CONCLUSÃO

Estes resultados permitem concluir que a fração metanólica (MeF) obtida das folhas de *Schinus terebinthifolius* apresenta efeito antinociceptivo frente a um modelo de lesão nervosa periférica, e também frente a lesão de tecidos cutâneos e musculares (lesão *sham*), em ratos. Além disso, a administração de MeF foi capaz de modificar variados parâmetros de estresse oxidativo no sistema nervoso central destes animais, e isto pode estar relacionado ao potencial antioxidante desta fração. Entretanto, não é possível saber em que medida estas propriedades antioxidantes e as modificações nos parâmetros de estresse oxidativo estão contribuindo para os efeitos antinociceptivos. É possível que tanto estas ações centrais quanto propriedades anti-inflamatórias já descritas para a espécie participem destes efeitos sobre a nocicepção. A presença de classes de compostos químicos em MeF, com ações sobre a inflamação e dor, reforça esta ideia. Por fim, a administração desta fração não resultou em efeitos adversos aos animais, em relação aos parâmetros estudados. Assim, a MeF, fração obtida da planta nativa *Schinus terebinthifolius*, pode ser considerada um candidato no tratamento nos quadros de dor, e para a confirmação deste potencial, novos e sistemáticos estudos devem ser realizados.

REFERÊNCIAS

- AEBI, H. Catalase in vitro. **Methods of Enzymology**, v. 125, p. 121-126, 1984.
- AGUILAR-ORTIGOZA, C. J.; SOSA, V.; AGUILAR-ORTIGOZA, M. Toxic phenols in various Anacardiaceae species. **Economic Botany**, v. 57, p. 354-364, 2003.
- AKSENOV, M. Y.; MARKESBERY, W. R. Changes in thiol content and expression of glutathione redox system genes in the hippocampus and cerebellum in Alzheimer's disease. **Neuroscience Letters**, v. 302, p. 141-145, 2001.
- AL-AMIN, H. et al. Chronic dizocilipine or apomorphine and development of neuropathy in two animal models II: effects on brain cytokines and neurotrophins. **Experimental Neurology**, v. 228, p. 30-40, 2011.
- AL-GHOUL, W. M. et al. Glutamate immunocytochemistry in the dorsal horn after injury or stimulation of the sciatic nerve of rats. **Brain Research Bulletin**, v. 30, p. 453-459, 1993.
- AMIN, B.; HOSSEINZADEH, H. Evaluation of aqueous and ethanolic extracts of saffron, *Crocus sativus* L., and its constituents, safranal and crocin in allodynia and hyperalgesia induced by chronic constriction injury model of neuropathic pain in rats. **Fitoterapia**, v. 83, p. 888-895, 2012.
- AMORIM, M. M. R.; SANTOS, L. C. Tratamento da vaginose bacteriana com gel vaginal de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi): ensaio clínico randomizado. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 25, n. 2, p. 95-102, 2003.
- ANJANEYULU, M.; CHOPRA, K. Quercetin, a bioflavonoid, attenuates thermal hyperalgesia a mouse model of diabetic neuropathic pain. **Progress in Neuropsychopharmacology and Biological Psychiatry**, v. 27, p. 1001-1005, 2003.
- ASSIMOPOULOU, A. N. et al. Antioxidant activity of natural resins and bioactive triterpens in oil substrates. **Food Chemistry**, v. 92, p. 721-727, 2005.
- ATTAL, N. et al. EFSN guidelines on the pharmacological treatment of neuropathic pain: 2010 revision. **European Journal of Neurology**, v. 17, p. 1113-1123, 2010.
- AZEVEDO, M. I. et al. The antioxidant effects of the flavonoids rutin and quercetin inhibit oxaliplatin-induced chronic painful peripheral neuropathy. **Molecular Pain**, v. 9, p. 53-67, 2013.
- BARON, R.; BINDER, A.; WASNER, G. Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. **The Lancet: Neurology**, v. 9, p. 807-819, 2010.

BENNET, G. J.; XIE, Y. K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. **Pain**, v. 33, n. 1, p. 87-107, 1988.

BERNABUCCI, M. et al. N-acetyl-cysteine causes analgesia by reinforcing the endogenous activation of type-2 metabotropic glutamate receptors. **Molecular Pain**, v. 8, p. 77-91, 2012.

BLOM, S. M et al. Nerve injury-induced causes neuropathic pain desinhibition of the anterior cingulate cortex. **The Journal of Neuroscience**, v. 34, p. 5754-5764, 2014.

BONICA, J. J.; LOESER, J. D. History's of pain concepts and therapies. In: LOESER, J. D et al. (eds). **Bonica's management of pain**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p. 3-25, 2001.

BURTON, R. **Viagem do Rio de Janeiro a Morro Velho**. Belo Horizonte: Itatiaia; São Paulo: EDUSP, 1976 [1869]. Disponível em: Dataplant – Banco de dados e amostras de plantas aromáticas, medicinais e tóxicas da UFMG <www.dataplant.org.br/bd2.php?id=4> Acesso em: mar. 2014.

CALIXTO, J. B. et al. Naturally occurring antinociceptive substances from plants. **Phytotherapy Research**, v. 14, p. 401-418, 2000.

CARLINI, E. A.; DUARTE-ALMEIDA, J. M.; TABACH, R. Assessment of the toxicity of the Brazilian pepper trees *Schinus terebinthifolius* Raddi (Aroeira-da-praia) and *Myracrodruon urundeuva* Allemão (Aroeira-do-sertão). **Phytotherapy Research**, v. 27, p. 692-698, 2012.

CÂMARA C. C et al. Oral gabapentin treatment accentuates nerve and peripheral inflammatory responses following experimental nerve constriction in *Wistar* rats. **Neuroscience Letters**, v. 556, p. 93-98, 2013.

CASTRO, M. A. et al. A metabolic switch in brain: glucose and lactate metabolism modulation by ascorbic acid. **Journal of Neurochemistry**, v. 110, p. 423-440, 2009.

CAVALHER-MACHADO, S. C. et al. The anti-allergic activity of the acetate fraction of *Schinus terebinthifolius* leaves in IgE induced mice paw edema and pleurisy. **International Immunopharmacology**, v. 8, p. 1552-1560, 2008.

CERUKS, M. et al. Constituintes fenólicos polares de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae). **Química Nova**, v. 30, p. 597-599, 2007.

CHANG, L. et al. Suppressing SNAP-25 and reversing glial glutamate transporters relieve neuropathic pain in rats by ameliorating imbalanced neurotransmission. **Chinese Medical Journal**, v. 126, p. 4100-4104, 2013.

CHITTURI, S.; FARRELL, G. C. Herbal hepatotoxicity: and expanding, but poorly defined problem. **Journal of Gastroenterology and hepatology**, v. 15, p. 1093-1099, 2000.

CHOBOT, V. Simultaneous detection of pro- and antioxidative effects in the variants of the deoxyribose degradation assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 2088-2094, 2010.

CIRCU, M. L.; AW, T. Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems and apoptosis. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 48, p. 749-762, 2010.

COHEN, S. P.; MAO, J. Neuropathic pain: mechanisms and their clinical implications. **British Medical Journal**, v. 348, p. 7656, 2014.

CORRÊA, M. P. **Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas**. Imprensa Nacional: Rio de Janeiro, 1984.

CORREIA, S. J.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. Metabólitos secundários de espécies de Anacardiaceae. **Química Nova**, v. 29, p. 1287-1300, 2006.

COUTINHO, I. H. I L. S et al. Efeito do extrato hidroalcoólico de aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) na cicatrização de anastomoses colônicas. Estudo experimental em ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, p. 49-54, 2006.

DAS, S. et al. Evaluation of an ethnomedicinal combination containing *Semecarpus kurzii* and *Hernandia peltata* used for the management of inflammation. **Pharmaceutical Biology**, v. 51, p. 677-685, 2013.

DESMARCHELIER, C. Neotropics and natural ingredients for pharmaceuticals: why isn't South American biodiversity on the crest of the wave? **Phytotherapy Research**, v. 24, p. 791-799, 2010.

DIERS, A.; KESZLER, A.; HOGG, N. Detection of S-nitrosothiols. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – General Subjects**, v. 1840, p. 892-900, 2014.

DRESCH, M. T. K. et al. Optimization and validation of an alternative method to evaluate total reactive antioxidant potential. **Analytical Biochemistry**, v. 385, p. 107-114, 2009.

DUBNER, R. Pain research in animals. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 406, p. 128-132, 1983.

DWORKIN, R. H. et al. Pharmacologic management of neuropathic pain: Evidence-based recommendations. **Pain**, v. 132, p. 237-251, 2007.

EL-MASSRY, K. F. et al. Chemical compositions and antioxidant/antimicrobial activities of various samples prepared from *Schinus terebinthifolius* leaves cultivated in Egypt. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 5265-5270, 2009.

FARMACOPÉIA brasileira. 5. ed. Brasília: ANVISA, 2010.

FINNERUP, N. B.; SINDRUP, S. H.; JENSEN, T.S. The evidence for pharmacological treatment of neuropathic pain. **Pain**, v. 150, p. 573-581, 2010.

FLOHÉ, L.; GUNZLER, W. A. Assays of glutathione peroxidase. **Methods of Enzymology**, v. 105, p. 114-121, 1984.

FRIDOVICH, I. Fundamental aspects of reactive oxygen species, or what's the matter with oxygen. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 893, p. 13-18, 1999.

GABAY, E.; TAL, M. Pain behavior and nerve electrophysiology in the CCI model of neuropathic pain. **Pain**, v. 110, p. 354-360, 2004.

GOECKS, C. S. B. et al. Assessment of oxidative parameters in rat spinal cord after chronic constriction injury of the sciatic nerve. **Neurochemical Research**, v. 37, p. 1952-1958, 2012.

GRISI, F. A. **Aspectos fisiológicos de aroeira (*Schinus terebinthifolius*) sob níveis distintos de saturação hídrica em ambiente protegido, e área ciliar em processo de recuperação**. 2010. 112 f. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal: Silvicultura) – Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

GUEDES, R. P. et al. Neuropathic pain modifies antioxidant activity in rat spinal cord. **Neurochemical Research**, v. 31, p. 603-609, 2006.

GUEDES, R. P. et al. Increase in reactive oxygen species and activation of Akt signaling pathway in neuropathic pain. **Cellular and Molecular Neurobiology**, v. 28, p. 1049-1056, 2008.

GUEDES R. P. et al. Sciatic nerve transection increases glutathione antioxidant system activity and neuronal nitric oxide synthase expression in rat spinal cord. **Brain Research Bulletin**, v. 80, p. 422-427, 2009.

GUERRA, M. J. M. et al. Actividad antimicrobiana de un extracto fluido al 80% de *Schinus terebinthifolius* Raddi (copal). **Revista Cubana de Plantas Mediciniais**, v. 5, p. 23-25, 2000.

GWAK, Y. S; HASSSLER, S. E; HULSEBOSCH, C. E. Reactive oxygen species contribute to neuropathic pain and locomotor dysfunction via activation of CamKII in remote segments following spinal cord contusion injury in rats. **Pain**, v. 154, p. 1699-1708, 2013.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JACOBY, W.B. Glutathione s-transferases. The first enzymatic in mercapturic acid formatin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 249, p. 7130-7139, 1974.

HAGENACKER, T. et al. Anti-allodynic effect of the flavonoid myricetin in a rat model of neuropathic pain: involvement of p38 and protein kinase C mediated modulation of calcium channels. **European Journal of Pain**, v. 14, p. 992-998, 2010.

HALBERSTEIN, R. A. Medicinal plants: historical and cross-cultural usage patterns. **Annals of Epidemiology**, v. 15, p. 686-699, 2005.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease. **The American Journal of Medicine**, v. 91, p. S14-S22, 1991.

HARRISON, F. E.; MAY, J. M. Vitamin C function in the brain: vital role of the ascorbate transporter SVCT2. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 46, p. 719-730, 2009.

HAYASHI, T. et al. Pentagalloylglucose, a xanthine oxidase inhibitor from a Paraguayan crude drug “molle-I” *Schinus terebinthifolius*. **Journal of Natural Products**, v. 52, p. 210-211, 1989.

HERINGER, A. P. **Aspectos químicos, ecológicos e farmacológicos de *Schinus terebinthifolius* Raddi**. 2009. 161 f. Dissertação (Mestrado em Química de Produtos Naturais) – Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais, Universidade do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2009.

HONGPAISAN, J.; WINTERS, C. A.; ANDREWS, S. B. Strong calcium entry activates mitochondrial superoxide generation, upregulating kinase signaling in hippocampal neurons. **Journal of Neuroscience**, v. 24, p. 10878-10887, 2004.

HORST, A. et al. Effect of N-acetylcysteine on the spinal cord glutathione system and nitric oxide metabolites in rats with neuropathic pain. **Neuroscience Letters**, v. 569, p. 163-168, 2014.

IM, Y. B. et al. Molecular targeting of NOX 4 for neuropathic pain after traumatic injury of the spinal cord. **Cell Death and Disease**, v. 3, p. 426-440, 2012.

ISCHIA, M. D. et al. Secondary targets of nitrite-derived reactive oxygen species: nitrosation/nitration pathways, antioxidant defense mechanisms and toxicological implications. **Chemical Research in Toxicology**, v. 24, p. 2071-2092, 2011.

JAGGI, A. S.; JAIN, V.; SINGH, N. Animal models of neuropathic pain. **Fundamental & Clinical Pharmacology**, v. 25, p. 1-28, 2011.

JAIN, M. et al. Specific competitive inhibitor of secreted phospholipase A2 from berries of *Schinus terebinthifolius*. **Phytochemistry**, v. 39, p. 537-547, 1995.

JANES, K.; NEUMANN, W. L.; SALVEMINI, D. Anti-superoxide and anti-peroxynitrite strategies in pain suppression. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1822, p. 815-821, 2012.

JIANG, Z. Y.; WOOLLARD, A. C. S.; WOLFF, S. P. Lipid hydroperoxide measurement by oxidation of Fe⁺² in the presence of xylenol orange. Comparison with the TBA assay and an iodometric method. **Lipids**, v. 26, p. 853-856, 1991.

JOHANN, S. et al. Antifungal activity of schinol and new biphenyl compound isolated from *Schinus terebinthifolius* against the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, v. 9, p. 30-35, 2010.

KAINDL, U. et al. Dietary antioxidants resveratrol and quercetin protect cells from exogenous pro-oxidative damage. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 1320-1326, 2008.

KAISTHA, K. K.; KIER, L. B. Structural studies on the triterpenes of *Schinus terebinthifolius*. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 51, p. 1136-1139, 1962.

KASSEM, M. E. et al. Biphenyl esters and biflavonoids from the fruits of *Schinus terebinthifolius*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 40, p. 447-450, 2004.

KASSUYA, E. K. **Atividade anti-inflamatória do metil galato e do extrato metanólico obtido de *Schinus terebinthifolius* e de derivados de metil galato no modelo experimental de inflamação em camundongos**. 2012. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde), Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, Mato Grosso do Sul, 2012.

KAM, A. et al. The protective effects of natural products on blood brain barrier breakdown. **Current Medicinal Chemistry**, v. 19, p. 1830-1845, 2012.

KHALIL, Z.; LIU, T.; HELME, R. D. Free radicals contribute to the reduction in the peripheral vascular responses and the maintenance of thermal hyperalgesia in rats with chronic constriction injury. **Pain**, v. 79, p. 31-37, 1999.

KAVALIERS, M. Evolutionary and comparative aspects of nociception. **Brain Research Bulletin**, v. 21, p. 923-931, 1988.

KENNEDY, K. A. M. et al. Reactive oxygen species and the neuronal fate. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 69, p. 215-221, 2012.

KIM, D. et al. NADPH oxidase 2-derived reactive oxygen species in spinal cord microglia contribute to peripheral nerve injury-induced neuropathic pain. **Proceeding of the National Academy of Sciences**, v. 107, p. 14851-14856, 2010.

KIM, H. K. et al. Reactive oxygen species play a important role in a rat model of neuropathic pain. **Pain**, v. 111, p. 116-124, 2004.

KLUSÁKOVA, I.; DUBOVÝ, P. Experimental models of peripheral neuropathic pain based on traumatic nerve injuries – an anatomical perspective. **Annals of Anatomy**, v. 191, p. 248-259, 2009.

LENZI, M.; ORTH, A. I. Fenologia reprodutiva, morfologia e biologia floral de *Schinus terebinthifolius* Raddi (Anacardiaceae), em restinga da Ilha de Santa Catarina, Brasil. **Biotemas**, v. 17, p. 67-89, 2004.

LEVONEN, A. L. et al. Redox regulation of antioxidants, autophagy, and the response to stress: implications for electrophile therapeutics. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 71, p. 196-207, 2014.

LIMA, L. B; et al. Acute and subacute toxicity of *Schinus terebinthifolius* bark extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 126, p. 473, 2009.

LIM, H.; KIM, D.; LEE, S. J. Toll-like receptor 2 mediates peripheral nerve injury-induced NADPH oxidase 2 expression in spinal cord microglia. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 288, p. 7572-7579, 2013.

LITTLE, J. W.; DOYLE, T.; SALVEMINI, D. Reactive nitroxidative species and nociceptive processing: determining the roles for nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite in pain. **Amino Acids**, v. 42, p. 75-94, 2012.

LLOYD, H.A. Terpenes of *Schinus terebinthifolius*. **Phytochemistry**, v. 16, p. 1301-1302, 1977.

LOESER, J. D.; TREEDE, R. D. The Kyoto protocol of IASP basic pain terminology. **Pain**, v. 137, p. 473-477, 2008.

LOPES, J. C. M. **Fisiopatologia da dor**. Lisboa: Permanyer Portugal, 2004.

LOWRY, O. H. et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 193, p. 265-275, 1951.

LUCENA, P. L. H. et al. Avaliação da ação da aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) na cicatrização de feridas cirúrgicas em bexiga de ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, p. 46-51, 2006.

LUKAS, G.; BRINDLE, S. D.; GREENGARD, P. The route of absorption of intraperitoneally administered compounds. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 178, p. 562-566, 1971.

MA, L. et al. An LPA species (18:1 LPA) plays key roles in the self-amplification of spinal LPA production in the peripheral neuropathic pain model. **Molecular Pain**, v. 9, p. 29-29, 2013.

MAGRINELLI, F.; ZANETTE, G.; TAMBURIN, S. Neuropathic pain: diagnosis and treatment. **Practical Neurology**, v. 13, p. 292-307, 2013.

MARCHAND, F.; PERRETI, M.; MCMAHON, S. B. Role of immune system in chronic pain. **Nature Reviews: Neuroscience**, v. 6, p. 521-532, 2005.

MARSAIOLI, A. J. **Estudo fitoquímico de *Schinus terebinthifolius* Raddi**. 1974. 95 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1974.

MARTIN, R. E.; CAO, Z.; BULLEID, N. J. Regulating the level of intracellular hydrogen peroxide: the role of peroxiredoxin IV. **Biochemical Society Transactions**, v. 42, p. 42-46, 2014.

MAY, J. M. The SLC23 family of ascorbate transporters: ensuring that you get and keep you daily dose of vitamin C. **British Journal of Pharmacology**, v. 164, p. 1793-1801, 2011.

MEHTA, A. K.; TRIPATHI, C. D. *Commiphora mukul* attenuates peripheral neuropathic pain induced by chronic constriction injury of sciatic nerve in rats. **Nutritional Neuroscience**, 2014.

MELO JUNIOR, E. J. M. et al. Medicinal plants in the healing of dry socket in rats: microbiological and microscopic analysis. **Phytomedicine**, v. 9, p. 109-116, 2002.

- MEOTTI et al. Anti-allodynic property of flavonoid myricitrin in models of persistent inflammatory and neuropathic pain in mice. **Biochemical Pharmacology**, v. 72, p. 1707-1713, 2006.
- MIFFLIN, K. A.; KERR, B. J. The transition from acute to chronic pain: understanding how different biological systems interact. **Canadian Journal of Anesthesia/Journal canadien d'anesthésie**, v. 61, p. 112-122, 2014.
- MISRA, H. P.; FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the autoxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 247, n. 10, p. 3170-3175, 1972.
- MITTAL, M. et al. Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. **Antioxidants and redox signaling**, v. 20, p. 1126-1167, 2014.
- MOGIL, J. S. Pain genetics: past, present and future. **Trends in genetics**, v. 28, p. 258-266, 2012.
- MORTON, J. F. Brazilian pepper – its impact on people, animals and the environment. **Economic Botany**, v. 32, p. 353-359, 1978.
- MORUCCI, F. et al. Antinociceptive activity of aqueous extract and isolated compounds of *Lithrea molleoides*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, p. 401-406, 2012.
- MOURELLE, F. et al. Actividad antiinflamatoria del *Schinus terebintifolius* (Copal) em ratas. **Revista Cubana de Farmacia**, v. 27, p. 139-144, 1993.
- MUTHURAMAN, A. et al. Ameliorative effects of *Ocimum sanctum* in sciatic nerve transection-induced neuropathy in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, p. 56-62, 2008.
- MUTHURAMAN, A.; SINGH, N. Attenuating effect of *Acorus calamus* extract in chronic constriction injury induced neuropathic pain in rats: an evidence of anti-oxidative, anti-inflammatory, neuroprotective and calcium inhibitory effects. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 11, p. 24-37, 2011.
- MUTHURAMAN, A.; SINGH, N. Neuroprotective effect of saponin rich extract of *Acorus calamus* L. in rat model of chronic constriction injury (CCI) of sciatic nerve-induced neuropathic pain. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 142, p.723-731, 2012.
- NAIK, A. K. et al. Role of oxidative stress in pathophysiology of peripheral neuropathy and modulation by N-acetyl-L-cysteine in rats. **European Journal of Pain**, v. 10, n. 7, p. 573-579, 2006.
- NGO, L. T.; OKOGUN, J. I.; FOLK, W. R. 21st Century natural product research and drug development and traditional medicines. **Natural Product Reports**, v. 30, p. 584-592, 2013.
- NICKEL, F. T. et al. Mechanisms of neuropathic pain. **European Neuropsychopharmacology**, v. 22, p. 81-91, 2012.

- NIKI, E. et al. Lipid peroxidation: mechanisms, inhibition and biological effects. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 338, p. 668-676, 2005.
- NISHIKAWA, M.; HASCHIDA, M.; TAKAKURA, Y. Catalase delivery for inhibiting ROS-mediated tissue injury and tumor metastasis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 61, p. 319-326, 2009.
- NISHIO, N. et al. Reactive oxygen species enhance excitatory synaptic transmission in rat spinal dorsal horn neurons by activating TRPA1 and TRPV1 channels. **Neuroscience**, v. 247, p. 201-212, 2013.
- NUNES, J. A. J. et al. Evaluation of the hydroalcoholic *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira) extract in the healing process of the alba linea in rats. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 21, p. 8-15, 2006.
- OLIVEIRA, V. B. et al. Native foods from Brazilian biodiversity as a source of bioactive compounds. **Food Research International**, v. 48, p. 170-179, 2012.
- ONASANWO, S.A. et al. Analgesic and anti-inflammatory properties of the leaf extracts of *Anacardium occidentale* in the laboratory rodents. **Nigerian Journal of Physiological Sciences**, v. 27, p. 65-71, 2012.
- OHSAWA, M.; YAMAMOTO, S.; ONO, H. Contribution of the sensitization of supraspinal nociceptive transmission in chronic pain. **Yakugaku zasshi: Journal of the Pharmaceutical Society of Japan**, v. 134, p. 387-395, 2013.
- PARK, E. et al. Levels of Mitochondrial reactive oxygen species increase in rat neuropathic spinal dorsal horn neurons. **Neuroscience Letters**, v. 391, p. 108-111, 2006.
- PASSOS, C. S. et al. Terpenóides com atividade sobre o sistema nervoso central (SNC). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, p. 140-149, 2009.
- PATHAK, N. N. et al. Atorvastatin attenuates neuropathic pain in rat neuropathy model by down-regulating oxidative damage at peripheral, spinal and supraspinal levels. **Neurochemistry International**, v. 68, p. 1-9, 2014.
- PATHAK, N. N. et al. Antihyperalgesic and anti-inflammatory effects of atorvastatin in chronic constriction injury-induced neuropathic pain in rats. **Inflammation**, v. 36, p. 1468-1478, 2013.
- PICCINELLI, A. N. et al. Antihyperalgesic and antidepressive actions of R-(+)-limonene, α -phellandrene and essential oil from *Schinus terebinthifolius* in a neuropathic pain model. **Nutritional Neuroscience**, 2014.
- PICK, E.; KEISARI, Y. A simple colorimetric method for the measurement of hydrogen peroxide produced by cells in culture. **Journal of Immunological methods**, v. 38, n. 1-2, p. 161-170, 1980.

PIRES, O. C. et al. Análise preliminar da toxicidade aguda e dose letal mediana (DL50) comparativa entre os frutos de pimenta-do-reino do Brasil (*Schinus terebinthifolius*) e pimenta do reino (*Piper nigrum* L.). **Acta Farmacêutica Bonaerense**, v. 23, p. 176-182, 2004.

POLJSAK, B.; SUPUT, D.; MILISAV, I. Achieving the balance between ROS and antioxidants: when use the synthetic antioxidants. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2013, 2013.

PRUT, L.; BELZUNG, C. The open field as a paradigm to measure the effects of drugs on anxiety-like behaviors. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, n. 1-3, p. 3-33, 2003.

QUINTANS, J. S. S. et al. Natural products evaluated in neuropathic pain models: a systematic review. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 114, p. 442-450, 2014.

RADU, B. M. et al. Neurovascular unit in chronic pain. **Mediators of inflammation**, v. 2013, 2013.

RAY, P. D.; HUANG, B. W.; TSUJI, Y. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. **Cellular Signalling**, v. 24, p. 981-990, 2012.

RICE, M. E. Ascorbate regulation and its neuroprotective role in the brain. **Trends in Neuroscience**, v. 23, p. 209-216, 2000.

RICE, M. E. Hydrogen peroxide, a dynamic neuromodulator. **The neuroscientist**, v. 17, p. 389-406, 2011.

RICHTER, R. et al. Spyrociclopropane-type sesquiterpene hydrocarbons from *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Phytochemistry**, v. 71, p. 1371-1374, 2010.

ROBERT, S. M. et al. Role of glutamate transporters in redox homeostasis of the brain. **Neurochemistry International**, v. 78, p. 181-191, 2014.

RODRIGO, R.; MIRANDA, A.; VERGARA, L. Modulation of endogenous antioxidant systems by wine polyphenols in human disease. **Clinica Chimica Acta**, v. 412, p. 410-424, 2011.

ROE, J. H.; KUETHER, C.A. The determination of ascorbic acid in whole blood and urine through the 2,4-dinitrophenylhydrazine derivative of dehydroascorbic acid. **The Journal of Biological Chemistry**, p. 399-407, 1942.

SAADÉ, N. E.; JABBUR, S. J. Nociceptive behavior in animal models for peripheral neuropathy: spinal and supraspinal mechanisms. **Progress in Neurobiology**, v. 86, p. 22-47, 2008.

SALVEMINI, D. et al. Roles of reactive oxygen and nitrogen species in pain. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, p. 951-966, 2011.

SALVEMINI, D.; DOYLE, T.; CUZZOCREA, S. Superoxide, peroxyntirite and oxidative/nitrosative stress in inflammation. **Biochemical Society Transactions**, v. 34, p. 965-970, 2006.

SCHEID, T. et al. Sciatic nerve transection modulates oxidative parameters on spinal and supraspinal regions. **Neurochemical Research**, v. 38, p. 935-942, 2013.

SCHMITT, U.; HIEMKE, C. Combination of open field and elevated plus-maze: a suitable test battery to assess strain as well as treatment differences in rat behavior. **Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry**, v.22, p. 1197-1215, 1998.

SHARMA, P. et al. NADPH oxidase activation by protein kinase C-isotypes. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 177, p. 1033-1040, 1991.

SHICHIRI, M. The role of lipid peroxidation in neurological disorders. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 54, p. 151-160, 2014.

SIES, H. Glutathione and its role in cellular functions. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 27, p. 916-921, 1999.

SIES, H. Role of metabolic H₂O₂ generation: redox signaling and oxidative stress. **Journal of Biological Chemistry**, v. 289, p. 8735-8741, 2014.

SILVA, A. B. et al. Antibacterial activity, chemical composition and citotoxicity of leaf's essential oil from Brazilian pepper tree (*Schinus terebinthifolius* Raddi). **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 41, p. 158-163, 2010.

SOOBRAATTEE, M. A. et al. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanism and actions. **Mutation Research**, v. 579, p. 200-213, 2005.

SORG, O. Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? **Comptes rendus Biologies**, v. 327, p. 649-662, 2004.

SOUSA, C. M. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, p. 351-355, 2007

SPECTOR, T.; PUTZ, F. E. Biomechanical plasticity facilitates invasion of maritime forests in the southern USA by Brazilian pepper (*Schinus terebinthifolius*). **Biological Invasions**, v. 8, p. 255-260, 2006.

SPIX, J. B.; MARTIUS, C. F. P. **Viagem pelo Brasil (1817-1820)**. Belo Horizonte: Itatiaia; São Paulo: EDUSP, v. 2, 1981 [1823].

THIAGARAJAN, V. R. K.; Ameliorative potential of *Butea monosperma* on chronic constriction injury of sciatic nerve induce neuropathic pain in rats. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 84, p. 1091-1104, 2012.

TRACHOOTHAM, D. et al. Redox regulation of cell survival. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 10, p. 1343-1374, 2008.

VAN HECKE, O. et al. Neuropathic pain in the general population: a systematic review of epidemiological studies. **Pain**, v. 155, p. 654-662, 2014.

VON HEHN, C. A.; BARON, R.; WOOLF, C. J. Deconstructing the neuropathic pain phenotype to reveal neural mechanisms. **Neuron**, v. 73, n. 4, p. 638-652, 2012.

VON MARTIUS, C. F. P. **Systema de material medica vegetal brasileira**. Rio de Janeiro: Typografia Universal de Laemmert, p. 112, 1854. Disponível em: Dataplant – Banco de dados e amostras de plantas aromáticas, medicinais e tóxicas da UFMG <www.dataplant.org.br/bd2.php?id=4> Acesso em: mar. 2014.

XU, Q.; YAKSH, T. L. A brief comparison of the pathophysiology of inflammatory versus neuropathic pain. **Current Opinion in Anaesthesiology**, v. 24, p. 400-407, 2011.

ZANELLI, S. SA.; ASHRAF, Q. M.; MISHRA, O. P. Nitration is a mechanism of regulation of the NMDA receptor function during hypoxia. **Neuroscience**, v. 112, p. 869-877, 2002.

ZUROWSKI, D. et al. Exogenous melatonin abolishes mechanical allodynia but not thermal hyperalgesia in neuropathic pain. The role of the opioid system and benzodiazepine-gabaergic mechanism. **Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 63, p. 641-647, 2012.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas**. 2. ed. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 1996.

WAGNER, R.; MYERS, R. R. Schwann cells produce tumor necrosis factor alpha: expression on injured and non-injured nerves. **Neuroscience**, v. 73, p. 625-629, 1996.

WANG, Z. et al. A newly identified role of superoxide in inflammatory pain. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 309, p. 869-878, 2004.

WASNER, G; BARON, R. Pain: clinical pain assessment: from bedside to better treatment. **Nature Reviews Neurology**, v. 5, p. 359-361, 2009.

WINTERBOURN, C. C.; HAMPTON, M. B. Thiol chemistry and specificity in redox signaling. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 45, p. 549-561, 2008.

WOOL, C. J.; MANNION, R. J. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms and management. **Lancet**, v. 353, p. 1959-1964, 1999.

YOUDEM, K. A.; SHUKITT-HALE, B.; JOSEPH, J. A. Flavonoids and the brain: interactions at the blood brain-barrier and their physiological effects on the central nervous system. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 37, p. 1683-1693, 2004.

YOWTAK, J. et al. Effect of antioxidant treatment on spinal GABA neurons in a neuropathic pain model in the mouse. **Pain**, v. 154, p. 2469-2476, 2013.

YUAN, Y. et al. The protective effects of *Achyranthes bidentata* polypeptides in an experimental model of mouse sciatic nerve crush injury. **Brain Research Bulletin**, v. 81, p. 25-32, 2010.

ANEXO A – Carta de aprovação do Comitê de ética



UFRGS
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA
Comissão De Ética Na Utilização De Animais



CARTA DE APROVAÇÃO

Comissão De Ética Na Utilização De Animais analisou o projeto:

Número: 19388

Título: EFEITO DA ADMINISTRAÇÃO DO EXTRATO DE *Schinus terebinthifolius* SOBRE PARÂMETROS OXIDATIVOS DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL EM UM MODELO DE DOR NEUROPÁTICA

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

WANIA APARECIDA PARTATA - coordenador desde 30/07/2010
Taína Scheid - Aluno de Doutorado desde 30/07/2010

Comissão De Ética Na Utilização De Animais aprovou o mesmo em seus aspectos éticos e metodológicos de acordo com as Diretrizes e Normas Nacionais e Internacionais, especialmente a Lei 11.794 de 08 de novembro de 2008 que disciplina a criação e utilização de animais em atividades de ensino e pesquisa.

Porto Alegre, Quinta-Feira, 9 de Dezembro de 2010

FLAVIO ANTONIO PACHECO DE ARAUJO
Coordenador da comissão de ética