



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

SIMONE BORTOLAN DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTINOCICEPTIVOS E ANTI-
INFLAMATÓRIOS DA BOLDINA E DA FRAÇÃO POLAR DO
EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS DA *Vernonia*
condensata BAKER EM CAMUNDONGOS**

SIMONE BORTOLAN DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTINOCICEPTIVOS E ANTI-
INFLAMATÓRIOS DA BOLDINA E DA FRAÇÃO POLAR DO
EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS DA *Vernonia*
condensata BAKER EM CAMUNDONGOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Estefânia
Gastaldello Moreira.

Co-orientadora: Prof. Dr. Waldiceu Aparecido
Verri Júnior.

Londrina
2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Santos, Simone Bortolan.

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTINOCICEPTIVOS E ANTI-INFLAMATÓRIOS DA BOLDINA E DA FRAÇÃO POLAR DO EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS DA *Vernonia condensata* BAKER EM CAMUNDONGOS / Simone Bortolan Santos. - Londrina, 2016. 73 f. : il.

Orientador: Estefânia Gastaldello Moreira.

Coorientador: Waldiceu Aparecido Verri Júnior.

Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2016.

Inclui bibliografia.

1. Plantas medicinais - Teses. 2. *Vernonia condensata* BAKER - Teses. 3. Boldina - Teses. 4. Anti-inflamatória - Teses. I. Moreira, Estefânia Gastaldello. II. Verri Júnior, Waldiceu Aparecido. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. IV. Título.

SIMONE BORTOLAN DOS SANTOS

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS ANTINOCICEPTIVOS E ANTI-
INFLAMATÓRIOS DA BOLDINA E DA FRAÇÃO POLAR DO
EXTRATO AQUOSO DAS FOLHAS DA *Vernonia condensata* BAKER
EM CAMUNDONGOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Londrina.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a. Dr^a Estefânia Gastaldello
Moreira
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a. Dr^a Rubia Casagrande
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Dr^a Ana Carolina Rossaneis
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a. Dr^a Ieda Spacino Scarminio
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Prof^a. Dr^a Andressa de Freitas Mendes Dionísio
Universidade Estadual de Londrina - UEL

Londrina, 21 de junho de 2016.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por guiar o meu caminho e estar junto de mim em todos os momentos.

Ao meu marido Flávio, por todo amor, paciência e ajuda imensurável. Te amo!!!

À minha mãe Helena que sempre me incentivou a estudar.

Aos meus sogros Ulisses e Helena e meu cunhado Fábio que me apoiaram durante esse tempo.

À minha orientadora, Estefânia G. Moreira pela grande oportunidade de trabalhar junto, pela imensa paciência, confiança, compreensão e ensinamentos. Muito, muito obrigada!!!

Ao meu co-orientador Waldiceu Ap. Verri Jr. pela disponibilidade e auxílio nesse trabalho.

À Cássia Calixto que ajudou em cada experimento realizado sempre com disposição e alegria contagiante e a Bárbara Santos que foi mais que uma aluna de IC, uma companhia, em todos os momentos de desenvolvimento desse trabalho. Sem vocês não seria o mesmo!!!

Às minhas amigas: Adriana, Larissa, Dani, Cláudia, pela amizade e companheirismo e por ouvirem minhas inúmeras reclamações e desesperos. Obrigada pelo privilégio dessa amizade!!!

Aos meus amigos de NASF 7 e 10 pelos muitos momentos compartilhados: Camila, Regina, Vanessa, Ana Carolina, Alisson, Berbel, Sérgio, Camila, Helen, Flávia, Juliana, Roger e Altair.

Às equipes de saúde das UBS Norte que me apoiaram.

A todos os professores e pesquisadores que aceitaram o convite para participar da banca deste trabalho.

Enfim, a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a concretização deste trabalho, muito obrigada!

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”.

Marthin Luther King

Santos, Simone B. **Avaliação dos efeitos antinociceptivos e anti-inflamatórios da boldina e da fração polar do extrato aquoso das folhas da *Vernonia condensata* BAKER em camundongos.** 2016. 73 f. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

RESUMO

Fármacos anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) estão entre os medicamentos mais comumente usados pela população mas causam sérios efeitos indesejáveis, sendo os mais importantes a lesão gástrica, falência renal e asma. Assim, a busca por analgésicos e anti-inflamatórios eficazes e desprovidos da toxicidade clássica dos AINES é importante. A *Vernonia condensata* Baker é uma espécie freqüentemente utilizada na medicina popular, sendo habitualmente utilizada para distúrbios gastrintestinais e hepáticos. Efeitos analgésico e anti-inflamatório dessa planta têm sido descritos. Além disso, compostos ativos derivados de plantas representam uma importante fonte de novos fármacos. A boldina, isolada da casca da planta boldo do Chile (*Pneumus boldo* M.), apresenta potencial antinociceptivo, anti-inflamatório, antipirético, imunomodulador, relaxante muscular, antiproliferativo, antidiabético, antiplaquetário, citoprotetor, tripanocida e antioxidante. Diante desse contexto o presente trabalho teve por objetivo investigar, em camundongos, os efeitos analgésico e anti-inflamatório, bem como possíveis mecanismos envolvidos nos mesmos da fração polar do extrato aquoso (FPEA) obtido das folhas da *V. condensata* e também da boldina. FPEA, boldina, ibuprofeno (controle positivo) ou água (controle negativo) foram administrados por gavagem 30 minutos antes do estímulo inflamatório. Foram utilizados os modelos de contorções abdominais induzidas por ácido acético (0,8%) ou parabenoquinona (PBQ, 0,0189%); teste da formalina (1,5%) com injeção intraplantar de 25 µL; hiperlagesia mecânica, edema, migração de leucócitos e quantificação de TNF- α e a IL-1 β na pata após injeção intraplantar de carragenina i (100 µg/pata). Foi realizada também a contagem total e diferencial dos leucócitos na cavidade peritoneal induzidos por LPS. Os resultados do experimento com a FPEA sugerem que: FPEA reduziu significativamente a nocicepção nos testes de contorção e formalina. Além disso, também houve redução do processo inflamatório agudo induzido pela administração intraplantar de carragenina, como evidenciado pela redução do edema, da migração de leucócitos e dos níveis das citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IL-1 β). Os resultados do experimento com a boldina indicaram que a boldina foi capaz de reduzir a inflamação e nocicepção majoritariamente reduzindo o recrutamento de células imunitárias e a inibição da produção de mediadores inflamatórios. Frente ao acima exposto, o presente estudo comprova as atividades anti-inflamatória e analgésica da FPEA e da boldina administradas por via oral e indica que tais efeitos devem-se à inibição da migração de leucócitos e produção de mediadores inflamatórios tais como TNF- α e IL-1.

Palavras-chaves: Plantas medicinais. *Vernonia condensata* BAKER. Boldina. Antinocicepção. Anti-inflamatória.

Santos, Simone B. **The antinociceptive and anti-inflammatory effects of boldine and polar fraction of the aqueous extract from *Vernonia condensata* BAKER leaves in mice.** 2016. 73 p. Thesis (Doctoral Degree in Health Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2016.

ABSTRACT

Non steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) are among the most used drugs but they may cause serious side effects, such as gastric lesion, kidney failure and asthma. In this way, the search for new anti-inflammatory and analgesic drugs is important. *Vernonia condensata* Baker is an herb used in folk medicine for gastric and liver disorders. Analgesic and anti-inflammatory effects have also been reported. Moreover, new drugs usually derive from plants active compounds. Boldine was isolated from the bark of Boldo do Chile (*Pneumus boldo* M) and it has been reported to present antinociceptive, anti-inflammatory, antipyretic, immunomodulatory, muscle relaxant, antiproliferative, antidiabetic, antiplatelet, cytoprotective, trypanocidal and antioxidant potential. In this context, the present study aimed to investigate in mice possible mechanisms involved in the analgesic and anti-inflammatory effects of the polar fraction of the aqueous extract (PFAE) obtained from the leaves of *V. condensata* and also boldine. PFAE or boldine, ibuprofen (positive control) or water (negative control) were administered orally 30 minutes before the inflammatory stimulus. Evaluations included writhing induced by acetic acid (0.8%) or PBQ (0.0189%); inflammation induced by intraplantar formalin (1.5%); mechanical hyperalgesia, edema, leukocytes migration and quantification of TNF- α and IL-1 β after intraplantar carrageenan administration (100 mg/paw). It was also carried out total and differential count of leukocytes in the peritoneal cavity induced by LPS. The results suggest that PFAE significantly reduced nociception and the acute inflammatory process generated by intraplantar carrageenan administration, as indicated by reduced edema, leukocyte migration and the levels of pro-inflammatory cytokines (TNF- α and IL-1 β). Boldine reduced inflammation and nociception largely reducing the recruitment of immune cells and inhibiting the production of inflammatory mediators. In conclusion, this study suggests that both PFAE and boldine administered orally inhibits leukocyte migration and inflammatory mediators such as TNF- α and IL-1.

Keywords: Medicinal herbs. *Vernonia condensata* BAKER. Boldine. Antinociceptive. Anti-inflammatory.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AINES	Anti-inflamatórios não esteroidais
ANOVA	Análise de variância
Cg	Carragenina
EPM	Erro padrão da media
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FPEA	Fração polar do extrato aquoso
HTAB	Brometo de hexadecil-trimetilamônio
i.d.	Intradérmica
i.p.	Intraperitoneal
i.pl.	Intraplantar
IL	Interleucina
K ₂ PO ₄	Fosfato de potássio
KC	Quimiocina derivada de queratinócitos
MAO	Monoaminaoxidase
MPO	Mieloperoxidase
NAG	N-acetyl- β -D-glucosaminidase
NBT	Azul de nitrotetrazólio
NO	Óxido nítrico
PBQ	Ácido p-aminobenzóico
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGs	Prostaglandinas
SNK	Student-Newman-Keuls
TNF	Fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	10
2	OBJETIVOS	17
2.1	Objetivo Geral	17
2.2	Objetivos Específicos	17
3	MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1	Drogas, reagentes e soluções	18
3.2	Animais	18
3.3	Procedimentos experimentais	18
3.4	Avaliação da coordenação motora	19
3.5	Testes de contorções abdominais	19
3.6	Teste da formalina	19
3.7	Avaliação da hiperalgesia mecânica pelo teste de pressão crescente na pata	19
3.8	Avaliação do edema da pata	20
3.9	Migração de leucócitos para a cavidade peritoneal	20
3.10	Contagem diferencial de polimorfonucleares na cavidade peritoneal	20
3.11	Avaliação indireta da migração de leucócitos para a pata	21
3.12	Dosagem das citocinas	22
3.13	Análise estatística	22
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO – ARTIGOS CIENTÍFICOS	23
4.1	Analgesic and anti-inflammatory properties of boldine	23
4.2	Polar fraction of the aqueous extract from Vernonia condensate BAKER leaves reduces nociception, inflammation, cell recruitment and cytokine levels in mice	42
5	CONCLUSÕES GERAIS	65
	REFERÊNCIAS	66

ANEXO A: Guia para autores – Journal of Natural Products e Pharmacology Biochemistry and Behavior	73
--	-----------

1 INTRODUÇÃO

***Vernonia condensata* BAKER**

Os produtos vegetais são amplamente utilizados no mundo inteiro. Nos países pobres, eles representam uma alternativa terapêutica economicamente viável; nos países ricos, uma alternativa terapêutica em consonância com o tendencioso consumo de produtos naturais. Acredita-se que entre os motivos que explicam a opção pelo uso destes produtos estão: o custo elevado e os efeitos indesejáveis dos medicamentos clássicos, aliados à admiração pelos produtos naturais (BRESOLIN & CHECHINEL, 2003). Dessa forma torna-se importante a busca por analgésicos e anti-inflamatórios eficazes e desprovidos da toxicidade clássica dos anti-inflamatórios alopáticos utilizados. Estima-se que 80% da população de países em desenvolvimento façam uso de produtos vegetais (YUNES & CALIXTO, 2001), número esse não muito distante dos 70% relatados em estudos conduzidos em países desenvolvidos (BUTTAR & JONES, 2003; KOREN et al., 2008).

Além de serem usadas na medicina popular, as plantas medicinais também têm reconhecida importância como fontes de substâncias farmacologicamente ativas (GARCIA, 2000), devido à grande diversidade estrutural de substâncias produzidas. Muitos medicamentos disponíveis hoje no mercado foram originados direta ou indiretamente de fontes vegetais ou animais. Estima-se que em torno de 25% de todos os medicamentos modernos sejam derivados, direta ou indiretamente de plantas superiores (BRANDÃO et al., 2010; CALIXTO, 2000).

O Boldo do Chile (*Pneumus boldo* Molina), da família *Monimiaceae*, é uma planta mundialmente conhecida pelas suas propriedades digestivas e hepatoprotetoras. Essa planta, originária dos Andes Chilenos, cresce muito bem em regiões de clima frio, seco e pedregoso. No Brasil, não é comum encontrar essa espécie de boldo e o que é conhecido por boldo do Chile aqui na realidade se trata de outras espécies de plantas como a *Vernônia condensata* BAKER que possuem propriedades terapêuticas semelhantes ao boldo do Chile original (ALONSO, 1998; RUIZ et al., 2008).

O gênero *Vernonia* (*Asteraceae* = *Compositae*) possui cerca de 1000 espécies distribuídas amplamente em países tropicais e subtropicais e utilizadas na medicina tradicional, principalmente na América Central e do Sul e África (MONTEIRO et al., 2001; SILVA et al., 2011). Inúmeras patologias têm sido tratadas com o uso da *Vernonia*, incluindo verminoses, febre, problemas gastrintestinais e inflamação (LORENZI & MATTOS, 2002; ALVES & NEVES, 2003).

Toyang & Verpoorte (2013) realizaram uma revisão sobre o potencial médico de plantas do gênero *Vernonia*, no qual listam 109 espécies com os mais variados efeitos terapêuticos. Essas plantas podem ser encontradas em diferentes países de clima quente como por exemplo a *V. brachycalyx* O, usada comumente no Kênia no tratamento da malária e dores estomacais; *V. cinerea* LESS, utilizada na Índia, Tanzânia, China, Nigéria para tratar malária, febre, artrite, inflamações, asma, etc.; *V. oligocephala* EDGEW, usada na África do Sul para reumatismo, diarreia, diabetes, desordens estomacais, colite ulcerativa e outras doenças. Esse gênero também está sendo utilizado na Austrália, Antártida e Suíça: *V. glabra* STEETZ para diabetes, *V. hirsuta* DC. para cólicas, dores de garganta, cefaleia e tosse e *V. myriantha* HOOK para doenças mentais.

No Brasil, Toyang & Verpoorte (2013), relatam o uso da *V. brasiliiana* L.; *V. chalybaea* MART para edema e problemas hepáticos; *V. cognata* LESS como reforço imunológico; *V. polyanthes* Less para reumatismo, bronquite e tosse e *V. condensata* BAKER para problemas digestivos, dores musculares, desordens hepáticas, diarreia, cefaleia, anemias, infecções, tosse e picada de serpente (VALVERDE et al., 2001; FRUTUOSO et al., 1994; RISSO et al., 2010; SILVA et al., 2011; AFONSO et al., 2015).

A *V. condensata* Baker é popularmente conhecida no Brasil como “boldo”, “boldo grande”, “assa-peixe”, “figatil”, “macelão”, “alumã”, entre outros (LORENZI & MATOS, 2002). Na composição química da *V. condensata*, são documentadas as presenças de saponinas, glicosídeos cardiotônicos (vernonina), flavonóides, alcalóides (boldina), óleos essenciais e lactonas sesquiterpênicas (MONTEIRO et al., 2001; IGANCI et al., 2003).

Em nosso laboratório, temos avaliado a influência de diferentes sistemas extratores na atividade analgésica e/ou antiinflamatória das folhas da *V. condensata* (BARROS et al., 2007). Nós observamos que diferentes solventes em diferentes porcentagens influenciam a atividade farmacológica da *V. condensata* (RISSO et al., 2010) e empregando-se análises quimiométricas (BRUNS et al., 2006) pudemos sugerir que o melhor sistema extrator seria uma mistura de solventes composta por 60% de acetona, 30% de diclorometano e 10% de etanol. Dando continuidade a nossos estudos, tanto o extrato aquoso das folhas de *V. condensata* quanto o orgânico otimizado (obtido com a mistura de solventes acima descrita) foram fracionados e o efeito analgésico e anti-inflamatório das diferentes frações obtidas foi avaliado no teste de contorções abdominais em camundongos induzidas por ácido acético. Uma vez que cada fração contém diferentes metabólitos, o fracionamento de extratos permite a investigação da participação de diferentes classes de metabólitos no efeito farmacológico de um extrato. Pudemos observar que o extrato aquoso gerou

praticamente uma única fração, a polar, que contém principalmente, alcalóides quaternários e n-óxidos (AFONSO, 2015 KOSTER et al., 1959).

A caracterização dos componentes presentes nos extratos da *V. condensata* foi realizada em cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodos (HPLC-DAD-UV) e cromatografia líquida de ultra-eficiência acoplada a um espectrômetro de massa com uma interface de *electrospray* (UPLC-MS-ESI). Nesses experimentos de caracterização dos extratos foi utilizado como padrão a boldina ((S) -2,9-di-hidroxi-1,10-dimetoxi-aporfina) obtida comercialmente, já que Monteiro et al. (2001) e Iganci et al. (2003) relataram que este composto estava presente na *V. condensata*. Os resultados indicam a presença de compostos heterocíclicos como alcaloides de N-óxido (AFONSO et al., 2015). Ainda, os resultados do HPLC-DAD-UV corroboram o estudo publicado por Valverde et al. (2001) da presença dos vernoniosídeos A2, A3, B1, B2, D, sendo que o isolado B2 possui atividade antinociceptiva. No entanto no extrato utilizado em nosso laboratório não foi detectada a presença da boldina.

Diante deste contexto, a boldina foi utilizada neste trabalho em experimentos separados dos testes realizados com a fração do extrato obtido da *V. condensata*.

Boldina

A boldina ((S) -2,9-di-hidroxi-1,10-dimetoxi-aporfina), primeira aporfina isolada por Bourgoïn e Verne (SPEISKY & CASSELS, 1993), trata-se de um alcaloide (Figura 1) presente em grandes quantidades (12 a 19% do teor de alcalóides totais) nas folhas e casca do *Pneumus boldo* MOLINA (boldo do chile), árvore vastamente encontrada no Chile (GERHARDT et al., 2009; O'BRIEN et al., 2006).

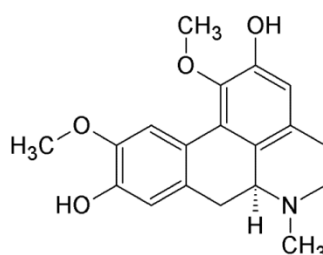


Figura 1. Molécula da boldina. Fonte: Gerhardt et al., 2009

Este isolado tem sido descrito na literatura por apresentar diversas propriedades farmacológicas como atividade antipirética (BACKHOUSE et al., 1994), imunomoduladora (MOREIRA et al., 2001), relaxante muscular (LAU et al., 2013; KANG et al., 1998; CHULIA et al., 1996), antinociceptiva (ZHAO et al., 2006), anti-inflamatória (BACKHOUSE et al.,

1994; ESTELLÉS et al., 2005), antidiabética (YU, 2009; LAU et al., 2013), antiproliferativa (GERHARDT et al., 2009), antiplaquetária (O'BRIEN et al., 2006), citoprotetora (KRINGSTEIN et al., 1995; JIMÉNEZ et al., 2000; BANNACH et al., 1996), tripanomicida (MORELLO et al., 1994) e antioxidante (JIMÉNEZ et al., 2000; KONRATH et al., 2008; SCHMEDA-HIRSCHMANN et al., 2003; SPEISKY et al., 1991).

Em testes experimentais investigando efeito antinociceptivo e anti-inflamatório da boldina, foi relatado que ela: apresentou efeito antinoceptivo em camundongos (20 mg/kg, i.p.) avaliados no teste de contrações abdominais induzidas por ácido acético e no teste da formalina (Zhao et al., 2006); reduziu o edema de pata induzido por carragenina em porquinhos da índia (34 mg/kg, intragástrica) (Backhouse et al., 1994).

Sabe-se que substâncias com potencial anti-inflamatório podem atuar por mecanismos antioxidantes (MILIAN et al. 2006). O'Brien et al. (2006) citam várias publicações cujos experimentos *in vitro* sugerem atividade antioxidante para a boldina. Em 2000, Jiménez et al. avaliaram o efeito protetor da boldina (*in vitro*) na lise dos eritrócitos induzida pelo radical livre 2,2-azobis- (2- amidinopropano) (AAPH) e relataram efeito citoprotetor da boldina tempo-dependente na hemólise induzida quimicamente. Efeito antioxidante da boldina também foi sugerido em neutrófilos humanos expostos, a um estímulo oxidante (N formil-metionil-leucil-fenilalanina) para a geração de EROs (Milian et al., 2004).

Inflamação e modelos animais para avaliação de atividade anti-inflamatória e antinocicpetiva

Mesmo havendo uma grande gama de medicamentos analgésicos e anti-inflamatórios disponíveis no mercado, estes produzem muitos efeitos indesejáveis variando desde distúrbios gastrintestinais leves (náusea, diarreia e vômito) até complicações mais graves como úlceras e sangramentos. Assim, diversos estudos têm investigado a capacidade analgésica e anti-inflamatória de produtos de origem vegetal (YUAN et al., 2006).

Existem diversos modelos animais para a avaliação da atividade antinociceptiva e anti-inflamatória de novas drogas.

Testes de dor manifesta envolvem a administração (intradérmica, intraperitoneal ou intraplantar) de uma substância irritante para gerar o estímulo nociceptivo. São testes que avaliam de forma quantitativa o comportamento do animal por um período de tempo após a indução com o estímulo. Estes testes englobam as contrações abdominais, teste da

formalina e testes com estímulos em órgãos cavitários como modelos de dor visceral (LEBARS et al., 2001).

Para verificar o efeito antiinflamatório de uma droga, alguns testes são propostos na literatura, como: hiperalgesia mecânica através da pressão crescente na pata, dosagem de mediadores da inflamação ou de produtos presente nos leucócitos responsáveis pela migração celular, como a dosagem da mieloperoxidase (MPO), enzima presente em abundância nos grânulos azurófilos dos neutrófilos e a N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG), uma isoenzima presente em macrófagos que foram ativados pela presença de um antígeno (Cg ou LPS) (VERRI et al., 2005; VALÉRIO et al., 2007; VALÉRIO et al., 2009; BRADLEY et al 1982; BOURBOUZE et al., 1991). Para isso é necessário ter conhecimento dos mecanismos envolvidos nos processos inflamatórios induzidos.

A inflamação é a resposta fisiológica protetora do organismo que ocorre nos tecidos vascularizados em consequência a uma lesão tecidual causada por agentes químicos, físicos ou microorganismos. O processo da inflamação aguda está envolvido com uma cascata de eventos e sinais. Há uma série de reações vasculares que levam a alterações no fluxo sanguíneo e na permeabilidade dos vasos. Uma das primeiras manifestações é a vasodilatação que resulta em um aumento do fluxo de sanguíneo, levando ao aparecimentos dos sinais cardinais locais como rubor (eritema) e calor. A vasodilatação é dependente de vários mediadores como as aminas vasoativas (histamina, serotonina), cininas (bradicinina) e óxido nítrico (NO) que atuam no endotélio. Esses mediadores causam o aumento da permeabilidade vascular ocasionando a exsudação do plasma para o espaço extravascular, originando o edema. Além disso, os mediadores também são reponsáveis pela contração das células endoteliais que resulta no aumento do espaço entre as mesmas facilitando ainda mais o extravasamento do plasma.

O fluxo de sangue aumentado nos vasos dilatados gera uma congestão de eritrócitos e aumento da viscosidade sanguínea levando a uma estase vascular. Ao mesmo tempo, células endoteliais também são ativadas pelos mediadores e acabam por aumentar os níveis de expressão das moléculas de adesão, dessa forma ocorre a diapedese, transmigração dos leucócitos através do endotélio chegado ao tecido local (DIAZ-PEREZ et al., 1976; PARENAL et al., 1993).

A carragenina é um polissacarídeo extraído de algumas algas marinhas vermelhas. Esse polissacarídeo é amplamente utilizado em medicamentos, alimentos e outros produtos (FAO CORPORATE DOCUMENT REPOSITORY, 2016).

Nos modelos experimentais de inflamação, a carragenina tem sido utilizada amplamente como estímulo inflamatório. A injeção *i.pl* dessa substância produz uma

reposta inflamatória local definida pelo aumento da permeabilidade vascular, migração de neutrófilos e produção de mediadores inflamatórios (SELLOUM et al., 2003).

Os mediadores liberados pela injeção de carragenina atuam na sensibilização de neurônios nociceptivos aferentes primários. Em camundongos esse estímulo induz inicialmente a produção das citocinas TNF α (fator de necrose tumoral α) e CXCL1 (quimiocina derivada de queratinócitos, KC). Ambas atuam por induzir a produção da interleucina 1 β (IL1 β) que por sua vez estimula a produção de prostanóides (prostaglandina E2, PGE2). A PGE2 é reponsável pela sensibilização neuronal através da fosforilação dos canais de sódio resistentes à tetrodotoxina, gerando um aumento nos níveis intra-neurais de sódio e assim facilita a despolarização induzida por estímulos mecânicos e químicos, causados por exemplo pela bradicinina. Todo esse processo gera um aumento na sensibilidade e dor (hiperalgesia) (CUNHA et al., 2005). A figura 2 apresenta um esquema dos mediadores liberados a partir da injeção de carragenina e Lipopolissacarídeo (LPS).

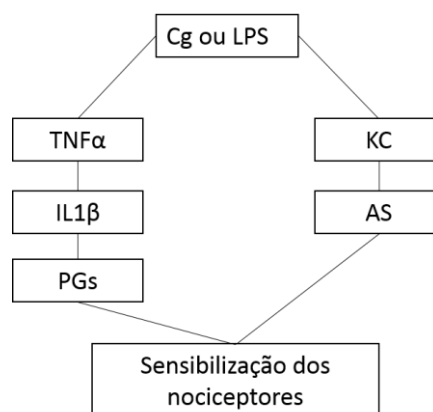


Figura 2: Diagrama representativo da cascata inflamatória induzida pela carragenina (Cg) liberando mediadores inflamatórios. AS: aminas simpáticas; PGs: prostanóides. Adaptado de Cunha et al. (2004) e Verri et al. (2007).

Além da carragenina também é utilizado como indutor de inflamação o lipopolissacarídeo (LPS) presente na parede celular de bactérias gram negativas. Trata-se de uma endotoxina que é capaz de sensibilizar o sistema imunológico causando o recrutamento de neutrófilos, cuja finalidade será fagocitar o agente invasor e secretar os grânulos do seu interior que possuem enzimas capazes de combater o agente agressor. Durante a infecção por bactérias gram negativas, mesmo após a morte das bactérias, o LPS presente pode causar danos levando ao processo inflamatório. A ativação de

macrófagos pelo LPS gera a ativação do fator nuclear Kappa B (NF- κ B) e citocinas pró inflamatórias (TNF α , IL1 β e IL33), por fim causam a sensibilização (hiperalgesia) de neurônios nociceptivos (RUIZ-MIYAZAWA et al., 2015).

Assim, o objetivo desta pesquisa foi de aprofundar os estudos sobre a atividade antinociceptiva e antiinflamatória da fração polar do extrato aquoso (FPEA) das folhas da *Vernonia condensata* Baker e da boldina em modelos de nocicepção e inflamação em camundongos tendo a via oral para a administração dessas substâncias por se tratar de uma via de relevância para humanos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar, em camundongos, o efeito analgésico e anti-inflamatório da fração polar do extrato aquoso (FPEA) obtido das folhas da *Vernonia condensata* Baker e da boldina administradas oralmente em modelos de dor e inflamação a fim de investigar possíveis mecanismos envolvidos nestes efeitos.

2.2 Objetivos Específicos

- Realizar a dose resposta da boldina no teste de hiperalgesia mecânica;
- Determinar a dose da FPEA e tempo de pré tratamento da boldina e FPEA (dados não mostrados);
- Avaliar o efeito antinociceptivo da FPEA e da boldina em diferente modelos de dor manifesta;
- Investigar o efeito anti-inflamatório da FPEA e da boldina em modelos induzidos pela carragenina;
- Avaliar se a redução do recrutamento de células de defesa está envolvido com o efeito da FPEA e boldina;
- Pesquisar o efeito da FPEA na inflamação de pata induzida por carragenina, utilizando os testes da mieloperoxidase (MPO) e N-acetyl- β -D-glucosaminidase (NAG);
- Avaliar o efeito anti-inflamatório da boldina em modelos induzidos por LPS injetado na cavidade peritoneal, empregando os testes de MPO, contagem total de leucócitos e de polimorfonucleares;
- Analisar o efeito da FPEA e da boldina sobre a produção das citocinas TNF- α e IL1 β .

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Drogas, reagentes e soluções

Foram utilizadas as seguintes drogas e soluções: boldina (Sigma-Aldrich, EUA) 40 mg/mL em água; ibuprofeno (IBU: Zambon Laboratórios Farmacêuticos, Brasil) 200 mg/mL em água; carragenina (Cg: FMC Corp, EUA) 0,012 mg/mL em solução salina; formaldeído (Merck, Brasil) 1,5% em solução salina; p-benzoquinona (PBQ: Sigma Aldrich, EUA) 0,189 mg/mL em dimetilsulfóxido (F. Maia, Brasil) 2%; ácido acético (Labsynth, Brasil) a 0,8% em solução salina; brometo de hexadecil-trimetilamônio (HTAB) a 0,5%; tampão fosfato de potássio (K₂PO₄) 50 mM pH 6,0 (Darmstadt, Hessen, Alemanha); o-dianisidina e dicloridrato de peróxido de hidrogênio 0,05%; 4-nitrofenilo N-acetil-D-β-glucosaminida (NAG) 2,24 mM e tampão glicina 0,2 M, pH10,6; Lipopolissacarídeo 200ng/200μL (LPS: *Escherichia coli* 0111:B4, santa Cruz Biotechnology). Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

3.2 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss machos (25±5g) obtidos do Biotério Central da Universidade Estadual de Londrina (UEL). Eles foram mantidos em gaiolas plásticas para camundongos no Biotério do Departamento de Ciências Fisiológicas com temperatura e luz ambiente controladas (22±2°C; 12h claro/escuro) e livre acesso a alimento e água. Todos os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual de Londrina (protocolo 07863).

3.3 Procedimentos experimentais

Os animais foram mantidos sob restrição alimentar durante 3 h antes do tratamento. Eles foram divididos em grupos de 6 animais: água (0,1 mL/g, controle negativo), IBU (200 mg/kg, controle positivo), boldina (40 mg/kg) e FPEA (100 mg/kg). O tempo de pré tratamento foi de 30 minutos antes dos testes ou o estímulo inflamatório.

As doses da boldina e da FPEA bem como o tempo de pré tratamento foram determinados em estudos-piloto.

3.4 Avaliação da coordenação motora

A fim de verificar se a dose da boldina e FPEA avaliadas nesta pesquisa induzia relaxamento muscular, os camundongos foram avaliados em um *rotarod* (Insight, Brasil). Os animais foram treinados a permanecer na barra giratória (4 rpm) durante o 1º dia. No 2º dia, os animais que não permaneceram na barra com uma aceleração de 6 a 12 rpm durante 120 segundos foram descartados. Após esta seleção, os animais foram tratados com solução salina, boldina ou FPEA e colocados na barra giratória 30 minutos após o tratamento. O tempo que eles permaneceram na barra foi anotado e 180 segundos foi o limite de tempo de observação (DUNHAM; MIYA, 1957).

3.5 Testes de contorções abdominais

Os testes de contorções abdominais induzidos pelo ácido acético e PBQ foram realizados como descrito por Koster (1959) e Valério et al. (2007). Os animais dos 4 grupos foram injetados via intraperitoneal (i.p.) com ácido acético (0,1 mL/10g a 0,8%) ou PBQ (0,1mL/g a 0,0189%). O comportamento nociceptivo foi quantificado por 20 minutos após esses estímulos químicos por contagem do número de contorções (contrações dos músculos abdominais acompanhadas de um alongamento do corpo e extensão dos membros posteriores).

3.6 Teste da formalina

Os camundongos receberam uma injeção i.pl. de 25 µL de formalina a 1,5% e foram determinados o número de sacudidas (*flinches*) na pata e o tempo gasto lambendo a pata a cada 5 minutos, durante 30 minutos. Para a análise dos dados, o teste foi dividido em duas fases, sendo a primeira entre 0-5 minutos e a segunda entre 20-30 minutos (VALÉRIO et al. 2009). As fases diferem quanto ao significado dos resultados. Basicamente a fase 1 se refere à estimulação direta de nociceptores, enquanto que a fase 2 está envolvida com efeitos antinociceptivo central e mecanismos periféricos (SHIBATA et al., 1989, CHANG et al., 2009).

3.7 Avaliação da hiperalgesia mecânica pelo teste de pressão crescente na pata

Os animais receberam o estímulo i.pl. com Cg (100 µg/pata) e a hiperalgesia mecânica foi avaliada por uma versão eletrônica dos filamentos de Von Frey (medidor de pressão eletrônico) como previamente descrito (CUNHA et al., 2004). Brevemente, os

animais foram colocados em gaiolas de acrílico (12×10×17 cm) com piso de grade de arame, 15-30min antes do início do teste. O teste consiste em evocar um reflexo na pata traseira com um transdutor de força de mão adaptado com uma ponta de polipropileno de 0,5 mm². O investigador aplica uma pressão sobre a zona central da pata traseira, que aumenta progressivamente até que o animal recue a pata. O ponto final foi caracterizado pela remoção da pata seguida de movimento de sacudida. Cada medição foi repetida 4 vezes e o valor médio foi utilizado. Além disso, as medições foram obtidas em 4 pontos de tempo: zero (animais sem tratamento) e 1, 3 e 5 horas após o estímulo com a Cg. Os resultados são expressos pelo delta (Δ) do início da retirada (em g) calculado da diferença entre o tempo zero e os tempos 1, 3 e 5 horas (CUNHA et al., 2004).

3.8 Avaliação do edema de pata

As alterações no volume da pata (formação de edema) foram determinadas utilizando paquímetro, assim verificando a altura da mesma. Foram realizadas medições no tempo 0 (antes da injeção ipl. do estímulo) e 1, 3 e 5 horas após o estímulo nociceptivo com Cg (100 µg/pata, CUNHA et al., 2004). A variação da altura da pata foi determinada pelo Δ entre os tempos decorridos após a administração do estímulo e o tempo 0 (basal). O resultado está expresso em mm/pata (ZARPELON et al., 2013).

3.9 Migração de leucócitos para a cavidade peritoneal

Os animais receberam o estímulo através de uma injeção i.p. de Cg (500µg/cavidade) ou LPS (200 ng/cavidade). Os camundongos foram eutanasiados 4 horas mais tarde e foram recolhidas as células da cavidade peritoneal através da introdução de 3,0 mL de solução salina tamponada com fosfato (PBS) contendo 1 mM de EDTA. Os leucócitos foram contados utilizando um contador de células. Os resultados são expressos pelo número de células $\times 10^6$ /cavidade (VALÉRIO *et al.*, 2007; KENJI *et al.*, 2015).

3.10 Contagem diferencial de polimorfonucleares na cavidade peritoneal

As células recolhidas da contagem total de leucócitos (item 3.4.6) foram depositadas em lâminas de microscópio e coradas utilizando o kit de coloração para análise histológica Panoptic (fornecidos pela LABORCLIN, Pinhais, PR, Brasil). As contagens de células foram executadas com microscópio em aumento de 400x (Olympus

Optical Co., Alemanha). Os valores estão expressos como o número de células $\times 10^4$ /cavidade.

3.11 Avaliação indireta da migração de leucócitos para a pata: atividade da MPO e da NAG

MPO é uma enzima presente em abundância nos grânulos azurófilos dos neutrófilos e tem sido utilizada como medida indireta da infiltração dos mesmos em diversos tecidos (VALÉRIO et al 2009 e BRADLEY et al 1982). As amostras de pele da pata foram coletadas após 5h do estímulo com Cg 100 μg /pata (CUNHA et al., 2004), em tampão K₂PO₄ 50 mM (pH6,0) contendo brometo de hexadecil-trimetilamônio (HTAB) a 0,5% e foram homogeneizadas utilizando Ultra-Turrax® (IKA T10 Basic, CQA Química, Pualínia, SP). Em seguida, os homogeneizados foram centrifugados a 16,100xg durante 2 minutos a 4°C. Foram retirados 15 μL do sobrenadante resultante e misturados com 200 μL de tampão fosfato 50 mM pH 6,0, contendo 0,167 mg/mL de o-dianisidina e dicloridrato de peróxido de hidrogênio 0,05% e foi determinada a atividade da enzima por ensaio espectrofotométrico em 450 nm (BEL SP2000UV, Photonics, São Paulo, SP, Brasil). As amostras de MPO foram comparadas a uma curva padrão de neutrófilos e o resultado apresentado como atividade de MPO (número de neutrófilos $\times 10^4$ /pata).

A NAG é uma isoenzima presente em macrófagos que foram ativados pela presença de um antígeno (Cg), sendo portanto uma medida indireta da ativação dessas células no local da lesão inflamatória (BOURBOUZE et al., 1991). A atividade da NAG foi determinada após 5h do estímulo com Cg 100 μg /pata (CUNHA et al., 2004), por um método colorimétrico adaptado anteriormente descrito por Horinouchi et al. (2013). Assim, 20 μL de sobrenadante, anteriormente obtido no ensaio da MPO, foram colocados numa placa de 96 poços e adicionados 80 μL de tampão fosfato 50 mM (pH 6,0). A reação foi iniciada pelo acréscimo de 4-nitrofenilo N-acetil-D- β -glucosaminida 2,24 mM. A placa foi incubada durante 10 minutos a 37°C e então a reação foi estacionada pela adição de 100 μL de tampão glycine 0,2 M, pH 10,6. A atividade enzimática foi determinada espectrofotometricamente a 400 nm (Multiskan GO Microplate Spectrophotometer, ThermoScientific, Finlândia). Os resultados de NAG estão apresentados como atividade da NAG (macrófagos $\times 10^4$ / mg de tecido).

3.12 Dosagem de citocinas

Três horas após a injeção i.pl. de Cg (100 μg /pata), os animais foram eutanasiados

com éter e a pele da pata foi removida e homogeneizada em 500 μ L de tampão contendo inibidores de protease (VERRI *et al.* 2006b). As amostras foram centrifugadas e os níveis de IL1 β e TNF α foram determinados dos sobrenadantes por ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*) utilizando um kit (eBioscience) de acordo com as instruções do fabricante. Os resultados são expressos com pg de citocina/100 mg de pele de pata.

3.13 Análise estatística

Inicialmente foram avaliadas a normalidade (teste de Shapiro-Wilk) e homogeneidade de variância (teste de Levene) a fim de se decidir por análise paramétrica ou não paramétrica. Nos testes envolvendo a FPEA os resultados obtidos da hiperalgesia mecânica através da pressão crescente na pata, contorções com ácido acético x tempo de gavagem, contorções com PBQ, teste da formalina, edema na pata, atividade da MPO e NAG, migração para a cavidade peritoneal, as dosagens citocinas TNF α e IL1 β foram analisados por ANOVA complementada por Student-Newman-Keuls (SNK). Nos experimentos com boldina os resultados obtidos do teste de dose x resposta com pressão crescente na pata, contorções com PBQ, edema na pata, migração de leucócitos para a cavidade peritoneal, contagem diferencial de polimorfonucleares, as dosagens de citocinas TNF α e IL1 β e a na fase 2 do teste de formalina foram analisados por ANOVA complementada por SNK.

A fase 1 do teste de formalina foi avaliada por análise de medidas repetidas (RMANOVA) complementada com SNK e o teste não paramétrico Kruskal-Wallis complementado com Dunn foi utilizado para analisar os dados do teste de contorções com ácido acético x tempo de gavagem. Os dados do teste de rotarod para ambos os experimentos foram analisados pelo teste t de Student não pareado. Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM) e as conclusões estabelecidas considerando um $p < 0,05$.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO – ARTIGOS CIENTÍFICOS

4.1 ARTIGO 1 – submetido a Journal of Natural Products

ANALGESIC AND ANTI-INFLAMMATORY PROPERTIES OF BOLDINE

Simone Bortolan[†], Bárbara Daiane dos Santos[†], Sabrina Afonso[‡], Ieda Scarminio[‡], Cássia Calixto Campos[§], Waldiceu Aparecido Verri Jr.[§], Estefânia Gastaldello Moreira^{†}.*

[†]Department of Physiological Sciences, State University of Londrina, Londrina, Parana, 86057-970, Brazil.

[‡]Department of Chemistry, State University of Londrina, Londrina, Parana, 86057-970, Brazil.

[§]Department of Pathological Sciences, State University of Londrina, Londrina, Parana, 86057-970, Brazil.

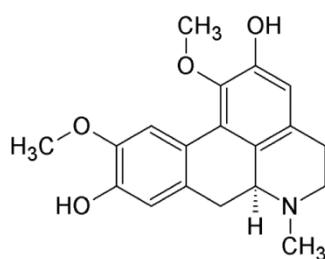
*Tel: + 55 43 3371 4307. E-mail address: egmoreira@uel.br (E. G. Moreira).

ABSTRACT

The use of medicinal plants and their active compounds represents an important source for new analgesics/anti-inflammatories drugs. Boldine, the first aporphine isolated from the bark of the Chilean boldo tree (*Pneumus boldo* M.), has been shown to have potential antinociceptive, anti-inflammatory, antipyretic, immune-modulating, muscle-relaxing, antiproliferative, antidiabetic, antiplatelet, cytoprotective, trypanocidal and antioxidant effects. The aim of this study was to investigate possible antinociceptive and anti-inflammatory effects of boldine administered through a human-relevant route. Oral pretreatment with boldine reduced the overt pain-like behavior induced by acetic acid, p-benzoquinone and formalin. Boldine also diminished carrageenan-induced mechanical hyperalgesia, edema, myeloperoxidase activity and leukocyte migration and lacked effect on motor coordination. Boldine was also able to inhibit the release of cytokines $TNF\ \alpha$ and $IL1\ \beta$. The results suggest that boldine reduces inflammation and nociception majorly by reducing immune cells recruitment and inhibiting the production of inflammatory mediators, such as cytokines. The present study provides evidence of the anti-inflammatory and analgesic activities of boldine administered orally.

INTRODUCTION

Medicinal plants have been used as source for new drugs, including analgesics/anti-inflammatories. Boldine ((S)-2,9-dihydroxy-1,10-dimethoxy-aporphine) was the first aporphine isolated by Bourgoin and Verne ¹ from the bark of the Chilean boldo tree (*Pneumus boldo* M.), which is largely used for gastrointestinal distress.



Boldine

Boldine has been described to present antipyretic ², immune-modulating ³, muscle-relaxing ⁴⁻⁶, antinociceptive ⁷, antiproliferative ⁸, antidiabetic ^{4,9}, anti-inflammatory ^{2,10}, antiplatelet ¹¹, cytoprotective ¹²⁻¹⁴, trypanocidal ¹⁵ and antioxidant activities ^{13,16-18}. Moreover, it showed ability to inhibit tyrosinase ¹⁹. The few toxicological studies that evaluated boldine reported a possible reproductive toxicity in rats (800 mg/kg, oral) ²¹, deaths in guinea pigs (1000 mg/kg, oral) ¹¹ and cats (250 mg/kg, iv) ²² as well as lack of mutagenicity ²³.

Regarding the studies that evaluated the potential anti-inflammatory and/or antinociceptive effects of boldine, two out of three were conducted injecting this compound intraperitoneally ^{7,10}. The third study reported that oral administration of boldine (40 mg/kg) decreased paw edema in guinea pigs ².

The aim of this study was to investigate if boldine would present antinociceptive and/or anti-inflammatory effects when administered through a human-relevant route, i.e., oral. To reach this objective, boldine was evaluated in different models of inflammation and nociception and all the experiments were conducted with a positive control group (treated

with the non-steroidal anti-inflammatory, ibuprofen) in order to certify the sensitivity of the experimental conditions. The analysis included quantification of cytokines in order to investigate if these substances would be involved in the action of boldine.

RESULTS AND DISCUSSION

Boldine Dose Determination. In order to select the most fit dose of boldine for our study, three doses (4, 10 and 40 mg/kg, gavage, 30 min before the carrageenan stimulus) were evaluated in the mechanical hyperalgesia test. ANOVA complemented with Student Newman Keuls (SNK) showed that boldine (4 mg/kg, 10 and 40 mg/kg) and ibuprofen (200 mg/kg) decreased hyperalgesia 1h [$F(5,35) = 22.508$, $p < 0.0001$] and 3h [$F(5,34) = 32.618$, $p < 0.0001$] after the carrageenan stimulus. At 5h [$F(5,35) = 34.325$, $p < 0.0001$], however, 10mg/Kg of boldine lacked statistical significance (Figure 1A).

Based on our results and considering that Lanhers²⁰ reported lack of boldine anti-inflammatory effect when administered to mice (*i.p.*) in the doses of 10 and 20 mg/kg but Backhouse² reported reduced carrageenan-induced paw edema when 34 mg/Kg of boldine was administered (intragastrically) to guinea pigs, we chose the dose of 40 mg/kg to continue our study.

Considering that in our study different behavioral models would be employed, it was essential to rule out possible motor effects of boldine. The evaluation of 40 mg/kg of boldine in a rotarod showed that it does not interfere with motor coordination as demonstrated by Student's t test [$t_{28} = 0.16$, $p = 0.87$] and presented in Figure 1B.

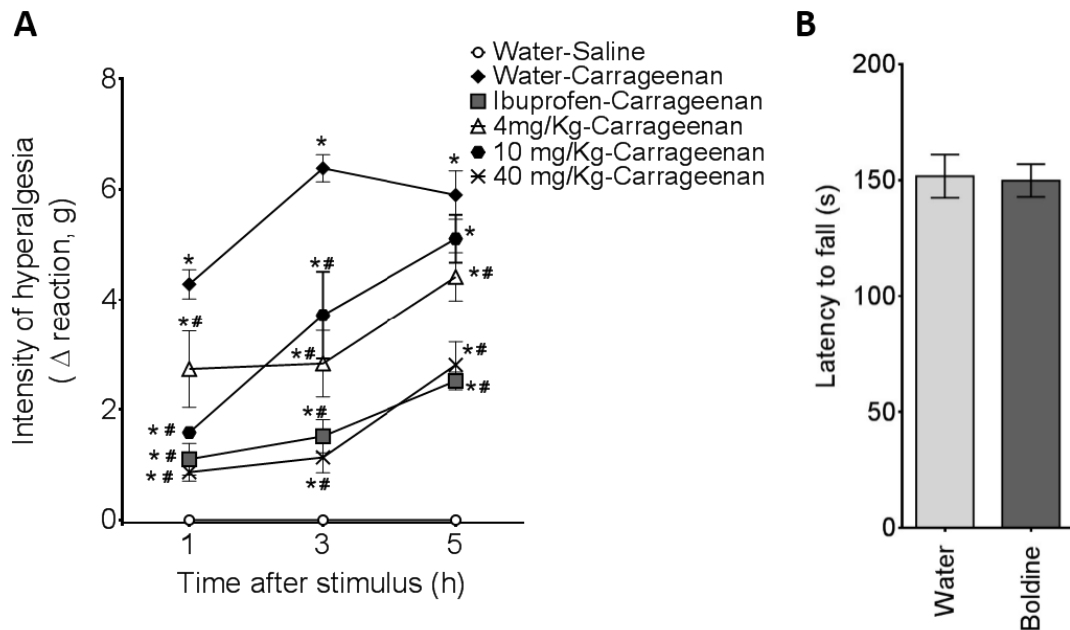


Figure 1. Boldine reduces carrageenan-induced mechanical hyperalgesia (A). Mice were gavaged with ibuprofen (200mg/kg) or boldine (4, 10, 40 mg/kg) 30 min before carrageenan intraplantar injection (100 μ g/paw). Data are presented as means \pm SEM (n=6) and were analyzed by one-way ANOVA complemented with SNK, *p < 0.01 compared to water group; # p < 0.01 compared to carrageenan group. Boldine does not alter motor coordination of mice as evaluated in the rotarod test (B). Mice were treated with water or boldine (40 mg/kg) 30 min before the test. Data are means \pm SEM of 6 animals per group and were analyzed by Student's unpaired t test.

Boldine reduces pain-like behavior induced by various stimuli. Acetic acid- and p-benzoquinone (PBQ)-induced writhes are used to evaluate analgesic effect by central and/or peripheral actions. Both boldine and ibuprofen reduced acetic acid [$F(2,23)=33.8$, $p<0.01$] and PBQ-induced writhes [$F(2,25)=246.2$, $p<0.01$] as indicated by one-way ANOVA complemented with SNK (Figure 2A and 2B).

Nociception models usually involves release of catecholamines and/or arachidonic metabolites²⁴. Chemical-induced abdominal writhing models are very useful in the trial of molecules with unknown pharmacodynamics properties due to their high sensitivity.

Acetic acid induces the release of endogenous mediators such as substance P, histamine, bradykinins, prostaglandins, IL-1, IL-6, CXCL1 e CXCL5 and TNF- α ²⁵. PBQ also presents a similar effect, but PBQ inflammatory response depends more on cytokines such as IL-18, interferon (IFN- γ) and endothelin-1²⁵. Inhibition of both substances-induced writhes suggests that the analgesic effect of boldine results from its inhibitory activity on important inflammatory mediators.

In the formalin test (Figure 2C and D), boldine and ibuprofen inhibited both phases of the test. RMANOVA complemented with SNK showed that during phase 1, ibuprofen and boldine significantly reduced licking time [$F(2,14)=16.81$, $p<0.001$] whereas during phase 2, ibuprofen and boldine significantly reduced licking time [$F(2,16)=4.14$, $p<0.001$]. Regarding flinching movements only boldine reduced it during phase 1 [$F(2,13)=14.77$, $p<0.001$] whereas during phase 2 both ibuprofen and boldine were effective [$F(2,15)=14.953$, $p<0.001$].

In the formalin test, the first phase is neurogenic, in which pain is evoked by activation of primary afferent neuronal fibers in the periphery, causing release of neuropeptides such as substance P and calcitonin gene-related peptide in central and peripheral terminals²⁶. Moreover, in this phase the inflammatory response is initiated and bradykinins and histamine are released. Phase 1 and 2 are sensitive to opioidergic analgesics²⁷ but anti-

inflammatory drugs can also reduce phase 1 response, since inflammatory mediators are released. On the other hand, phase 2 is a mix of peripheral mechanisms, because the blockade of the first phase does not prevent the second one from occurring²⁸ and alterations in the dorsal horn of the spinal cord also be detected. The peripheral mechanism involved in the second phase evokes histamine, bradykinin, serotonin and prostaglandin E2 release. Even though non-steroidal anti-inflammatories are described to act in this phase when evaluated in the formalin test ²⁷, in our study ibuprofen also acted in phase 1 reducing licking time

Zhao²⁹ investigated the antinociceptive activity of alkaloids isolated from *Lindera angustifolia* in kuming mice and reported that boldine (20 mg/kg, i.p.) inhibited writhes induced by acetic acid and licking time in the test of formalin in the first and second test phase, corroborating the results obtained in this work.

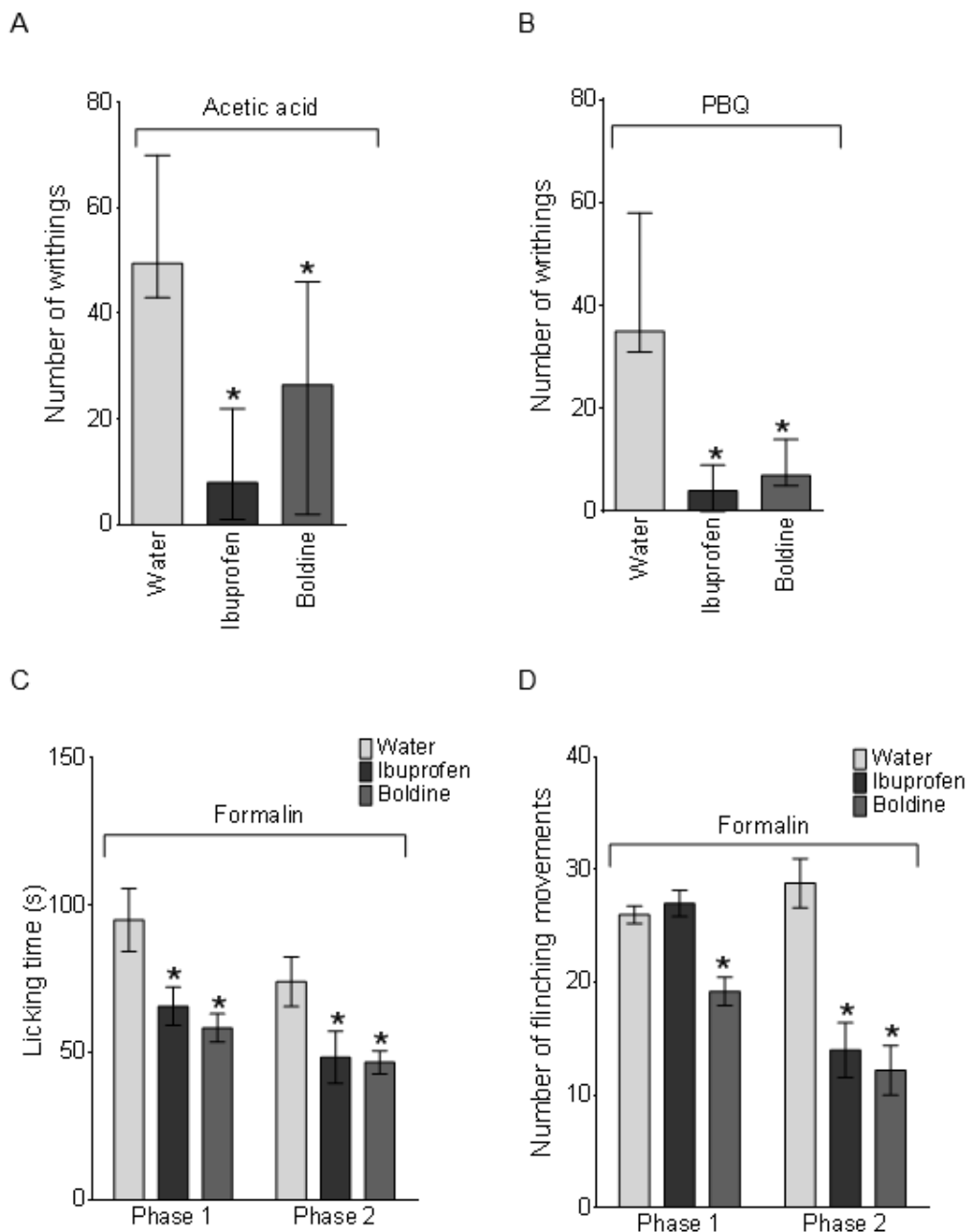


Figure 2. Boldine inhibits nociception induced by acetic acid (A), PBQ (B) and formalin (C, D). Mice were treated with ibuprofen (200mg/kg) or boldine (40 mg/kg) 30 minutes before i.p. injection of acetic acid 0.8% or PBQ 0.0189% or i.pl. injection of 25uL of formalin 0.1%. The number of writhes was evaluated for 20 minutes, licking time and the number of flinching movements were evaluated for 30 minutes. Data are presented as means \pm SEM (n=6) and were analyzed by one-way ANOVA (A and B) or RMANOVA (C and D) complemented with SNK, *p < 0.01 compared with water group.

Boldine inhibits carrageenan-induced edema. Carrageenan induces inflammation by releasing prostaglandins, which leads to edema³⁰. ANOVA complemented with SNK showed that boldine and ibuprofen reduced edema 3h [F(3,22)=24.99, $p<0.001$] and 5h [F(3,22)=12.69, $p<0.001$] after i.pl. stimulus with carrageenan (Figure 3).

The swelling occurs as a consequence of changes in blood flow and permeability of vessels. Various inflammatory mediators (e.g., histamine, prostaglandins, NO) induces vasodilation and later NO increases vascular permeability culminating in edema³¹. The present results suggest that boldine may decrease the formation of these inflammatory mediators since it was able to reduce carrageenan-induced edema.

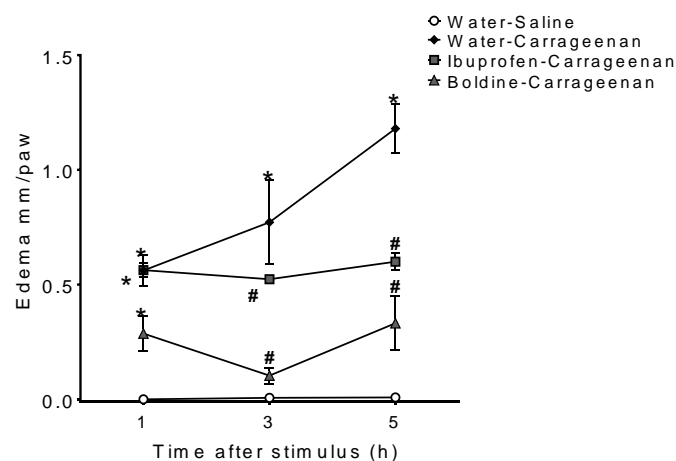


Figure 3. Boldine reduces carrageenan-induced edema. Mice were treated with ibuprofen (200mg/kg) or boldine (40 mg/kg) 30 min before carrageenan i.pl. injection (100 μ g/paw). Data are presented as means \pm SEM (n=6) and were analyzed by ANOVA complemented with SNK, * $p<0.01$ compared with water group. # $p<0.01$ compared with carrageenan group.

Boldine inhibits MPO activity and leukocyte migration to the peritoneal cavity.

Carrageenan and lipopolysaccharide (LPS) from gram-negative bacteria stimulates the inflammatory cascade through the release of several pro-inflammatory cytokines. In mice, the initial release of tumoral necrose factor (TNF α) and chemokine derived from keratinocytes (CXCL1) releases IL-1 β , which in turn stimulates PGE2 production³², mediators that are responsible for the recruitment of leukocytes (neutrophils) to the injury site³³⁻³⁵.

ANOVA and SNK showed that compared to water-LPS group, boldine inhibited MPO activity [F(3,30)=14.21 p<0.0001] (Figure 4A), leucocytes migration [F(3,31)=16.3, p<0.0001] (Figure 4B) and differential polymorphonuclear cell counts [F(3,27)=51.52, p<0.0001] (Figure 4C). MPO is an enzyme contained in azurophile granuli of neutrophils and have been used as a surrogate of neutrophil infiltration in tissues^{36,37}. Bradykinins, substance P, histamine, prostaglandin and cytokines trigger leukocytes (neutrophils) recruitment to the site of injury after stimulus with LPS or carrageenan^{38,39}. This result reinforces a possible peripheral-mediated anti-inflammatory action of boldine.

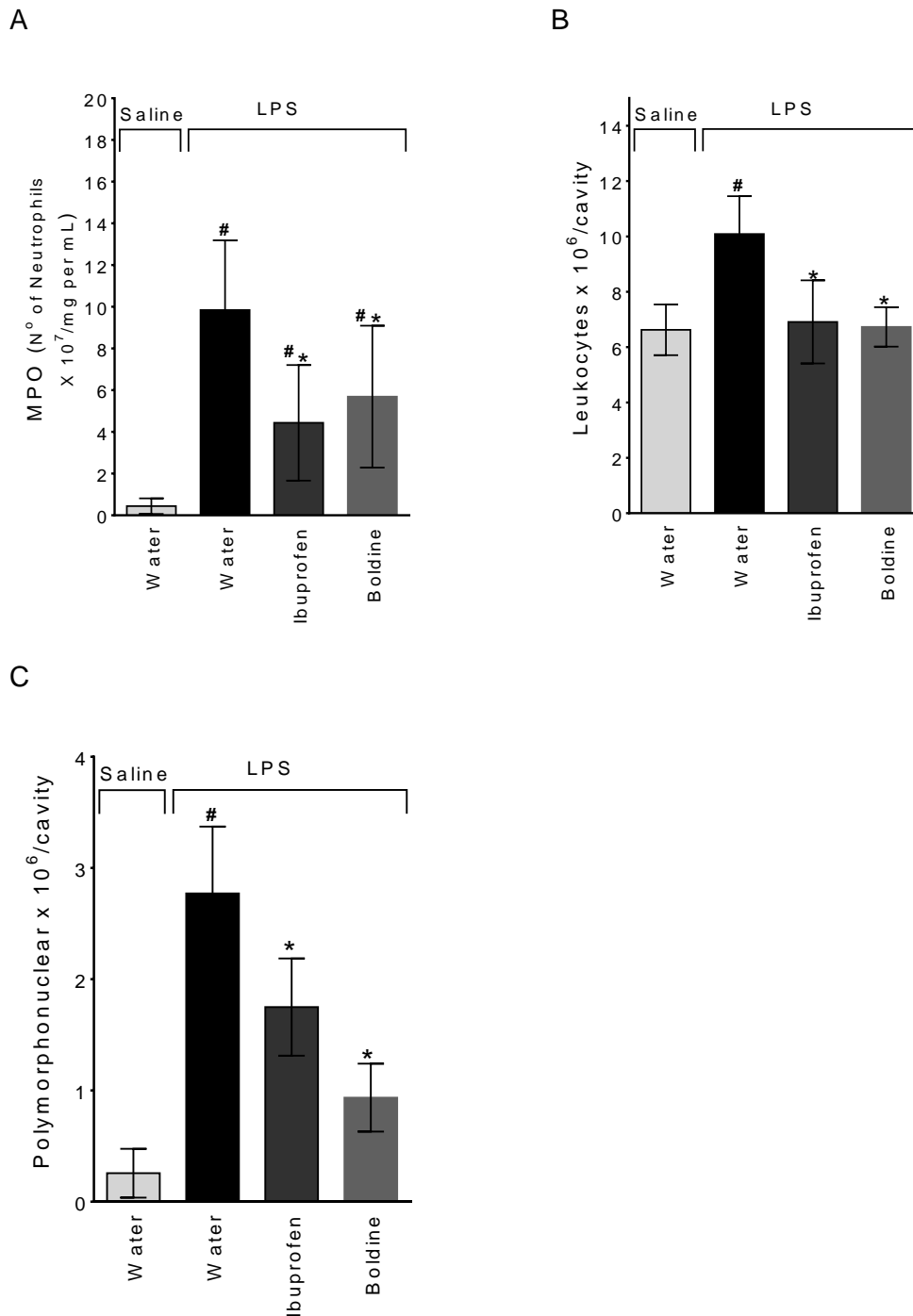


Figure 4. Boldine reduces LPS-induced neutrophil recruitment (A), leukocyte migration to the peritoneal cavity (B) and polymorphonuclear count (C). Mice were treated with ibuprofen (200mg/kg) or boldine (40 mg/kg) 30 min before LPS i.p. injection (200 ng/cavity). Data are presented as means \pm SEM (n=6) and were analyzed by ANOVA complemented with SNK, #p<0.01 compared to water group; *p<0.01 compared to LPS group.

Boldine reduced TNF- α and IL-1 β levels in the paw injected with carrageenan. TNF- α and IL-1 β are examples of pro-inflammatory cytokines⁴⁰. IL-1 β synthesis depends on many mediators, including TNF- α , IFN- α , β and γ , LPS, viruses and antigens^{40, 42, 37}. ANOVA complemented with SNK showed that boldine and ibuprofen significantly reduced TNF- α [F(3,26)=4.58, $p < 0.01$] and IL-1 β [F(3,27)=15.71, $p < 0.01$] levels in the paw 3 h after carrageenan stimulus (Figure 5A and B). Therefore, our results indicate that boldine acts preventing the sensitization of nociceptors through inhibition of production and/or release of inflammatory mediators. Moreover, the same mediators are also involved in the writhes induced by acetic acid and PBQ³², suggesting that inhibition of immune cells migration to the injured site also occurs through activation of these mediators.

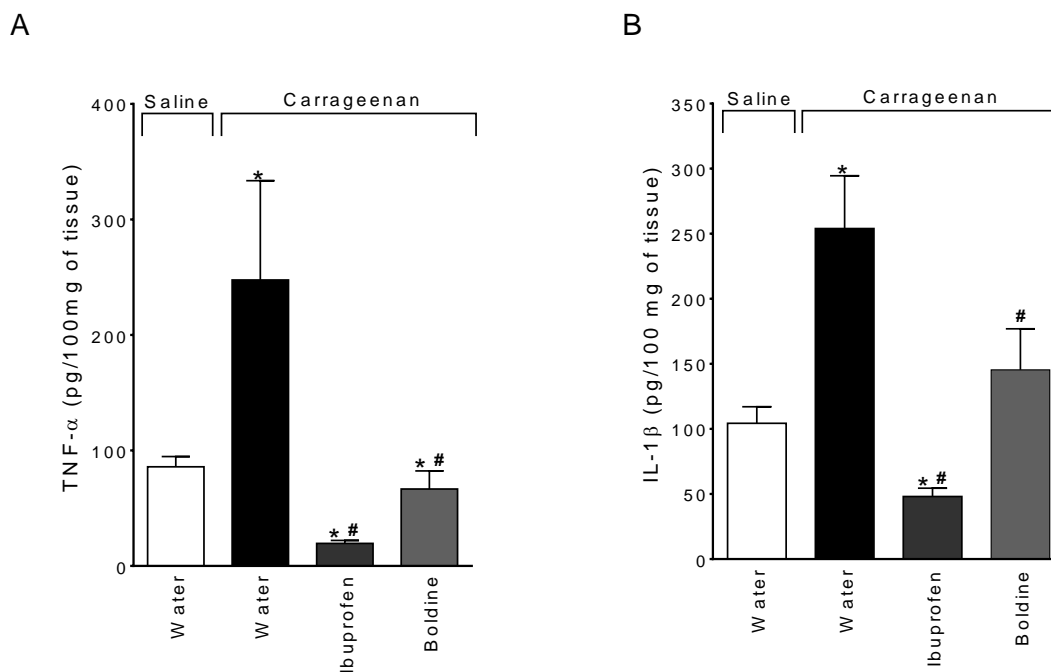


Figure 5. Boldine reduces carrageenan-induced increase of TNF- α (A) and IL-1 β (B). Mice were treated with ibuprofen or boldine 30 min before carrageenan i.pl. injection (100 μ g/paw). Data are presented as means \pm SEM (n=6) and were analyzed by ANOVA complemented with SNK, * $p < 0.01$ compared to water group; # $p < 0.01$ compared to carrageenan group.

In conclusion, the results suggest that boldine administered orally reduces inflammation and nociception acting majorly in the periphery through the reduction of immune cells recruitment and inhibition of inflammatory mediators.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by CNPq (junior fellowship to B. D. Santos; senior fellowships to I. Scarminio and W. Verri), CAPES (PhD fellowship to S. Bortolan) and Fundação Araucária (senior fellowship to E. G. Moreira).

EXPERIMENTAL SECTION

Drugs, reagents and solutions. The following drugs and solutions were used: 40 mg/mL boldine (Sigma-Aldrich, USA) in saline; 200 mg/mL ibuprofen (Zambon Laboratórios Farmacêuticos, Brazil) in water; 0.012mg/mL carrageenan (FMC Corp, USA) in saline; lipopolysaccharide (LPS) from gram-negative bacteria 1 ng/ μ L; 1.5% formaldehyde (Merck, Brazil) in saline; 0.189 mg/mL p-benzoquinone (PBQ: Sigma Aldrich, USA) in 2% dimethyl sulfoxide (F. Maia, Brazil), 0.8% acetic acid (Labsynth, Brazil) in saline.

Animals. Male Swiss mice (25 \pm 5g) from the Universidade Estadual de Londrina (UEL) colony were kept in standard plastic cages in a temperature- and light- controlled room (22 \pm 2°C; 12 h dark/light) with free access to food and tap water. All experimental procedures were approved by the Ethics Committee of the Universidade Estadual de Londrina (protocol 07863).

Experimental procedures. Animals were kept under food restriction for 3 h before treatment. They were divided into groups of 6 animals: water (0.1 mL/g, negative control), ibuprofen (200 mg/kg, positive control) and boldine (4, 10 or 40 mg/kg). Mice were gavaged 30 min before the tests or the inflammatory stimulus. The pre-treatment time was chosen

based on a bioavailability study that reported boldine to be present in the liver, brain and heart of rats 30 min after oral administration of 50 and 75mg/kg⁴³. The doses of the drugs were determined in a pilot study after a literature revision⁴⁴.

Writhing response test. Acetic acid and PBQ-induced writhing tests were performed as described by Koster⁴⁵ and Valério²⁵. Mice from the three groups were injected intraperitoneally (i.p.) with PBQ or acetic acid. The nociceptive behavior was quantified for 20 min after these chemical stimuli by counting the number of writhes (contractions of abdominal muscles accompanied by a body stretching and extension of the hind limbs).

Formalin test. Mice received an intraplantar (i.pl.) injection of 25 µL of 1.5% formalin and the number of flinching movements and the time spent licking the paw were determined every 5 min, for 30 min. For the data analysis, the test was divided into two phases: the first one between 0-5 min and the second one between 20-30 min³⁷.

Motor coordination. In order to verify if the dose of boldine used in this work induces muscle relaxation, mice were evaluated in the rotarod test (Insight, Brazil)⁴⁶. The animals were trained (3 training sessions) to remain on a rotating bar (4 rpm). In the next day, animals that did not remain on the rotating bar with an acceleration of 6 to 12 rpm for 120 s were discarded. After this selection, animals were treated with saline or boldine and placed in the rotating bar 30 min after treatment. The time they remained on the bar was recorded and 180 s was the time limit for the observation.

Electronic pressure-meter test. Mice received an i.pl. stimuli with carrageenan (300 µg/ paw) and the mechanical hyperalgesia was tested using an electronic pressure meter. The test consists of evoking a hind paw flexion reflex with a hand-held force transducer adapted with a 0.5 mm² polypropylene tip. The investigator applies a pressure on the central area of the hind paw which increases gradually until the animal removes the paw and flinches it. Each measurement was repeated for 4 times and a mean value was used. Moreover, measurements were obtained at 4 time-points: zero (animal naïve to treatment)

and 1, 3 and 5 h after carrageenan stimuli. The results are expressed by delta (Δ) withdrawal threshold (in g) calculated by the difference between the time zero and the times 1, 3 and 5h⁴⁷.

Paw edema. Alterations in paw height (edema) were measured using a paquimeter. Measures were taken from time 0 (before i.p. injection of carrageenan) and 1, 3 or 5 h after carrageenan injection (nociceptive stimulus). Variation in paw height was determined by Δ between times and time 0, and results were expressed in mm/paw⁴⁸.

Leukocyte migration to the peritoneal cavity and differential cell counts. Animals received an i.p. stimulus of LPS (1 ng/cavity) i.p. injection and were killed 4 h later to have cells collected from the peritoneal cavity. Aliquots of 20 μ L were mixed with 180 μ L of Turk's solution, and the total cell counts were performed in Neubauer chamber. Differential cell counts were performed on microscope slides using the Panoptic staining kit for histological analysis (Laborclin, Pinhais, PR, Brazil). The values were expressed as the total number of cells $\times 10^6$ per cavity. Total and differential cell counts were performed under a light microscope (400_magnification, Olympus Optical Co., Germany)^{22,34}

Myeloperoxidase activity (MPO). Colorimetric assay for MPO activity was used in this study in order to evaluate neutrophils migration to the paw of the animals. Skin samples from the paw were collected 5 hours after the carrageenan stimulus in K₂PO₄ buffer K₂PO₄ 50 mM (pH6,0) containing hexadecil-trimethylamonium bromet (HTAB) 0,5% and were homogeneized using Ultra-Turrax[®] (IKA T10 Basic, CQA Química, Brazil). Homogeneized samples were centrifuged at 16,100xg for 2min at 4°C. 15 μ L from the supernatant were mixed with 200 μ L of phosphate buffer 50 mM pH 6.0, containing 0.167 mg/mL of o-dianisidin and hydrogen peroxide dichloridrate 0.05% and the enzyme activity was determined by spectrophotometry at 450 nm (BEL SP2000UV, Photonics, Brazil). Paw samples were compared to a standard curve of neutrophils and results are shown as MPO activity in neutrophils numbers $\times 10^7$ /mg per mL^{36,37}.

Dosage of cytokine. Three hours after the i.pl injection. of carrageenan (100 µg / paw), the animals were euthanized and paw skin was removed and homogenized in 500 uL of buffer containing protease inhibitors⁴⁹. The samples were centrifuged (3000 rpm x 15 min) and the levels of IL1β and TNF supernatants were determined by an ELISA commercial kit (enzyme-linked immunosorbent assay) according to the manufacturer's instructions. The results are expressed as pg of cytokine/100 mg paw skin.

Statistical analysis. Normality (Shapiro-Wilk test) and homogeneity of variance (Levene test) were evaluated in order to decide for parametric or non-parametric analysis. Results from writhing tests, number of flinching movements, electronic pressure-meter test, dosage of cytokine and leukocyte migration, differential cell counts and myeloperoxidase activity were analyzed by one-way ANOVA complemented with Student Newman Keuls (SNK). Licking time was analyzed by repeated measures analysis of variance (RMANOVA) complemented with SNK. Data from rotarod were analyzed by unpaired Student's t test. A $p < 0.05$ was adopted.

REFERENCES

- (1) Speisky, H.; Cassels, B. K. *Pharmacol. Res.* **1993**, *29* (1), 1–12.
- (2) Backhouse, N.; Delporte, C.; Givernau, M.; Cassels, B. K.; Valenzuela, A.; Speisky, H. *Agents Actions* **1994**, *42* (3-4), 114–117.
- (3) Moreira, R. R.; Carlos, I. Z.; Vilega, W. *Biol. Pharm. Bull.* **2001**, *24* (2), 201–204.
- (4) Lau, Y. S.; Tian, X. Y.; Huang, Y.; Murugan, D.; Achike, F. I.; Mustafa, M. R. *Biochem. Pharmacol.* **2013**, *85* (3), 367–375.
- (5) Kang, J.-J.; Cheng, Y.-W.; Fu, W.-M. *Jpn. J. Pharmacol.* **1998**, *76*, 207–212.
- (6) Chulia, S.; Moreau, J.; Naline, E.; Noguera, M. A.; Ivorra, M. D.; Ocon, M. P. D.; Advenier, C. *Br. J. Pharmacol.* **1996**, *119*, 1305–1312.
- (7) Zhao, Q.; Zhao, Y.; Wang, K. *J. Ethnopharmacol.* **2006**, *106* (3), 408–413.
- (8) Gerhardt, D.; Horn, A. P.; Gaelzer, M. M.; Frozza, R. L.; Delgado-Cañedo, A.; Pelegrini, A. L.; Henriques, A. T.; Lenz, G.; Salbego, C. *Invest. New Drugs* **2009**, *27* (6), 517–525.
- (9) Yu, B. *J. Med. Food* **2009**, *12* (5), 1074–1083.
- (10) Estellés, R.; Milian, L.; Nabah, Y. N. A.; Mateo, T.; Cerdá-Nicolás, M.; Losada, M.; Ivorra, M. D.; Issekutz, A. C.; Cortijo, J.; Morcillo, E. J.; Blázquez, M. A.; Sanz, M.-J. *J. Leukoc. Biol.* **2005**, *78* (3), 696–704.
- (11) O'Brien, P.; Carrasco-Pozo, C.; Speisky, H. *Chem. Biol. Interact.* **2006**, *159* (1), 1–17.
- (12) Kringstein, P.; Cederbaum, A. I. *Free Radic. Biol. Med.* **1995**, *18* (3), 559–563.
- (13) Jiménez, I.; Garrido, A.; Bannach, R.; Gotteland, M.; Speisky, H. *Phytother. Res.* **2000**, *14* (5), 339–343.
- (14) Bannach, R.; Valenzuela, A.; Cassels, B. K.; Nfinez-Vergara, L. J.; Speisky, H. *Cell Biol. Toxicol.* **1996**, *12*, 89–100.
- (15) Morello, A.; Cassels, B. K.; Speisky, H.; Aldunate, J.; Repetto, Y. *Comp. Biochem. Physiol.* **1994**, *107* (3), 367–371.
- (16) Konrath, E. L.; Santin, K.; Nassif, M.; Latini, A.; Henriques, A.; Salbego, C. *Neurotoxicology* **2008**, *29* (6), 1136–1140.
- (17) Schmeda-Hirschmann, G.; Rodriguez, J. a.; Theoduloz, C.; Astudillo, S. L.; Feresin, G. E.; Tapia, A. *Free Radic. Res.* **2003**, *37* (4), 447–452.

- (18) Speisky, H.; Cassels, B. K.; Eduardo, A. L.; Videla, L. A. *Biochem. Pharmacol.* **1991**, *41* (11), 1575–1581.
- (19) Si, Y.-X.; Ji, S.; Wang, W.; Fang, N.-Y.; Jin, Q.-X.; Park, Y.-D.; Qian, G.-Y.; Lee, J.; Han, H.-Y.; Yin, S.-J. *Process Biochem.* **2013**, *48* (1), 152–161.
- (20) Lanhers, M. C.; Joyeux, M.; Soulimani, R.; Fleurentin, J.; Sayag, M.; Mortier, F.; Younos, C. *Planta Med.*, **1991**, *57*, 110-115.
- (21) Almeida, E.R.; Melo, A.M.; Xavier, H. *Phytother. Res.* **2000**, *14*, 99–102.
- (22) Kreitmair, H. *Pharmazie.* **1952**, *7*, 507-511.
- (23) Tavares, D.C; Takahashi, C.S. *Mutat. Res.* **1994**, *321*, 139-145.
- (24) Duarte, I. D. G.; Ferreira-Alves, D.L.; Nakamura-Craig, M. *Life Sci*, **1992**, *50*, 891-897.
- (25) Valério, D. a R.; Cunha, T. M.; Arakawa, N. S.; Lemos, H. P.; Da Costa, F. B.; Parada, C. a; Ferreira, S. H.; Cunha, F. Q.; Verri, W. a. *Eur. J. Pharmacol.* **2007**, *562* (1-2), 155–163.
- (26) Tjolsen, O. G. A.; Berge, S. H.; Rosland, J.H.; Hole, K. *Pain.* **1992**, *51* (1), 5–17.
- (27) Shibata, M.; Ohkubo, T.; Takahashi, H.; Inoki, R. *Pain.* **1989**, *38* (3), 347–352.
- (28) Gaddi, P. J.; Crane, M. J.; Kamanaka, M.; Flavell, R. A.; Yap, G. S.; Salazar – Mather, T. P. *PLoS One* **2012**, *7* (8), e42850.
- (29) Zhao, Q.; Zhao, Y.; Wang, K. *Chen. J. of Ethnopharm.* **2006**, *106*, 408-413.
- (30) Dutra, R.C.; Tavares, C.Z.; Ferraz, S.O.; Sousa, O.V.; Pimenta, D.S. *Braz. J. Pharmacog.* **2006**, *16*, 469-474.
- (31) Kumar, V.; Abbas, A. K.; Fausto, N.; Aster, J.C.. Philadelphia: Saunders, **2010**, 8^o edition.
- (32) Cunha, T, M; Verri, W. A. Jr.; Silva, J. S.; Poole, S.; Cunha, F. Q.; Ferreira, S. H. *PNAS.* **2005**, *102* (5), 1755–1760.
- (33) Durbadal, O.; Mukherjee, H.; Mondal, S.; Jena, A.; Dwivedi, V.P.; Mondal, K.C.; Malhotra, B.; Samanta, A.; Chattopadhyay, D. *Plosone*, **2014**, *9*, 104939.
- (34) Kenji,W.;Miyazawa, R.; Zarpelon, A.C.; Pinho-Ribeiro, F.A.; Pavão-de-Souza, G.F.; Casagrande, R.; Verri-Jr.,W.A. *Plosone*, **2015**, *10*.
- (35) Han-Pin, k., Horng-Chyuan I.; Kou-Hsiung H.; Chun-Hua, W.; Ling-Chuan, I. *Am. J. of Respir.and Crit. Care Med.* **2000**, *162*, 1891–1897.
- (36) Bradley, P.P.; Priebat D.A.; Christensen, R.D.; Rothstein, G. *J. of Invest. Dermat.* **1982**. *78*, *3*, 206–209.

- (38) Vane, J.; Botting, R. *Fed. Am. Soc. Exp. Biol. J.* **1987**, *1*, 89–96.
- (39) Diaz-Perez, J. L.; Goldyne, M. E.; Winkelmann, R. K. *J. Invest. Dermatol.* **1976**, *66*, 149–152.
- (40) Varella, P. P. V.; Forte, W. C. N. (*Journal*), **2014**, 244.
- (41) Huber, J. D.; Campos, C. R.; Mark, K. S.; Davis, T. P. (*Journal*). **2006**, *85721*, 732–740.
- (42) Verri, W. A.; Guerrero, A. T. G.; Fukada, S. Y.; Valerio, D. A.; Cunha, T. M.; Xu, D.; Ferreira, H.; Liew, F. Y.; Cunha, F. Q. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2008**, *105* (7), 2723–2728.
- (37) Valério, D. A.; Georgetti, S. R.; Magro, D. A.; Casagrande, R.; Cunha, T. M.; Vicentini, F. T. M. C.; Vieira, S. M.; Fonseca, M. J. V.; Ferreira, S. H.; Cunha, F. Q. *J. Nat. Prod.* **2009**, *72*, 1975–1979.
- (43) Jimenez, I.; Speisky, H. *Phytother. Res.* **2000**, *14*, 254–260.
- (44) Gotterland, M.; Jimenez, I.; Brunser, O.; Guzman, L.; Romero, S.; Cassels, B. K.; Speisky, H. *Planta Med.* **1997**, *63*, 311–315.
- (45) Koster, R.; Anderson, M.; De Beer, E. *Fed. Proc.* **1959**, *18*, 412–430.
- (46) Dunham, N. W.; Miya, T. S. *J. Am. Pharm. Assoc.* **1957**, *46*, 208–209.
- (47) Cunha, T. M.; Vivancos, G. G.; Moreira, I. F.; Reis, S.; Parada, C. A.; Cunha, F. Q.; Ferreira, S. H. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* **2004**, *37*, 401–407.
- (48) Zarpelon, A. C., Cunha, T. M., Alves-Filho, J. C., Pinto, L. G., Ferreira, S. H., McInnes, I. B., Xu, D., Liew, F. Y., Cunha, F. Q., Verri, W. A. Jr. *British Journal of Pharmacology.* **2013**, *169*, 90–101.
- (49) Verri, W. A., Jr.; Cunha, T. M.; Ferreira, S. H.; Wei, X.; Leung, B. P.; Fraser, A.; McInnes, I. B.; Liew, F. Y.; Cunha, F. Q. *Eur. J. Immunol.* **2007**, *37*, 3373–3380.

4.2 Artigo 2 – submetido a *Phytotherapy Research*

Polar fraction of the aqueous extract from *Vernonia condensata* BAKER leaves reduces nociception, inflammation, leukocyte recruitment and cytokine production in mice.

Simone Bortolan[†], *Bárbara D. Santos*[†], *Sabrina Afonso*[‡], *Cássia Calixto-Campos*[§], *Ieda Scarminio*[‡], *Waldiceu A. Verri, Jr.*^{§#}, *Estefania G. Moreira*^{†**#}.

[†]Department of Physiological Sciences, State University of Londrina, Londrina, Parana, 86057-970, Brazil.

[‡]Department of Chemistry, State University of Londrina, Londrina, Parana, 86057-970, Brazil.

[§]Department of Pathological Sciences, State University of Londrina, Londrina, Parana, 86057-970, Brazil.

Short Title: *V. condensata* anti-inflammatory activity

#Waldiceu A. Verri and Estefania G Moreira share senior authorship.

*Corresponding author:

Estefania G Moreira

Departamento de Ciências Fisiológicas, CCB, UEL, Campus Universitário

Rodovia Celso Garcia Cid, Km 380

86057-970 – Londrina – PR - Brasil

Tel: + 55 43 3371 4307.

E-mail: egmoreira@uel.br

ABSTRACT

Background: Analgesic and anti-inflammatory effects have been suggested for *Vernonia condensata* leaves. In this study, we investigated if the polar fraction of the aqueous extract (PFAE) obtained from the leaves of *Vernonia condensata* Baker would induce analgesic and anti-inflammatory effects after oral administration in mice as well as possible mechanisms involved in these effects

Materials and methods: Mice received water, PFAE or ibuprofen (positive control) per orally 30 min before the inflammatory stimulus, i.e., 0.8% acetic acid or 1890 µg/kg PBQ ip for the writhing test; 1.5% formalin intraplantar (ipl) for the evaluation of paw flinches and licking time and carrageenan (300 µg/paw, ipl or 500 µg/cavity, ip) for the evaluation of paw edema, leukocytes recruitment and quantification of cytokine (TNF and IL-1β) production.

Results: PFAE significantly reduced nociception as evidenced by reduced number of writhes, paw flinches and time spent licking the paw. PFAE also reduced acute inflammatory process once it decreased mechanical hyperalgesia, paw edema, neutrophils recruitment, macrophage activation and production of pro-inflammatory cytokines (TNFα and IL-1β).

Conclusion: The results suggest that PFAE induces analgesic and anti-inflammatory effects through inhibition of leukocyte migration and production of pro-inflammatory mediators (TNFα and IL-1β).

Keywords: *Vernonia condensata* BAKER, aqueous extract, analgesic, anti-inflammatory, cytokine.

1. INTRODUCTION

The species from the genus *Vernonia* (*Asteraceae* = *Compositae*) are widely spread through tropical and subtropical countries. They are used in traditional and folk medicine, particularly in Central and South America and Africa (Monteiro et al., 2001; Silva et al., 2011). *V. condensata* colloquially known in Brazil as “boldo”, “boldo grande”, “assa-peixe”, “figatil” is used as an ailment to gastrointestinal illness, headaches, and as an appetite stimulant (Monteiro et al., 2001). Moreover, it has been reported that *V. condensata* leaves may induce effect analgesic and/or anti-inflammatory (Afonso et al., 2015; Frutuoso et al., 1994; Risso et al., 2010; Valverde et al., 2001). Valverde et al. (2001) isolated vernoniosideo B2 from *V. condensata* leaves and found that this compound was able to reduce writhings in mice generated by acetic acid. Reduced acetic acid induced writhings were also reported by Risso et al. (2010), who evaluated different extracts from *V. condensata* leaves and by Afonso et al. (2015) with different fractions obtained from polar and aqueous extracts obtained from leaves collected in different seasons. The aqueous extract presented an effective analgesic dose 50% (ED_{50}) of 88.3 mg/kg in the acetic-acid induced writhes model and a lethal dose 50% (LD_{50}) higher than 2000 mg/kg, which indicates very low acute toxicity (Risso et al., 2010).

Chemical composition of *V. condensata* includes saponins, cardiogenic glycosides, flavonoids, alkaloids, essential oils and sesquiterpenic lactones (Iganci et al., 2003; Monteiro et al., 2001; Risso et al., 2010). The fractioning of the aqueous extract obtained from this plant yield one single fraction (the polar one), which characterization by high performance liquid chromatography with diode detector and ultra performance liquid

chromatography coupled to mass spectrometer with electrospray interface indicated the presence of heterocyclic compounds, such as n-oxide alkaloids (Afonso et al., 2015). Even though the alkaloid boldine has not been detected in the PFAE, alkaloids similar to it were. Moreover, vernoniosides A2, A3, B1, B2 and D were identified by Afonso et al. (2015) corroborating the study published by Valverde et al. (2001). PFAE effectively reduced acetic acid-induced abdominal writhing (Afonso et al., 2015) suggesting an analgesic effect of this fraction as effective as the non-steroidal anti-inflammatory ibuprofen, used as the positive control.

This study was designed to deeply investigate the analgesic/anti-inflammatory effects of PFAE as well as possible mechanisms involved in these effects. It was evaluated if PFAE would modulate pain sensitivity (writhing and formalin tests) and acute response to an inflammatory stimulus in the hind paw (edema, mechanical hyperalgesia, leukocyte migration and cytokine production).

2. MATERIAL AND METHODS

2.1 Drugs, reagents and solutions

The obtention of PFAE is described in Afonso et al. (2015).

The solutions used were: PFAE 100 mg/mL in water; ibuprofen (Zambon Laboratorios Farmaceuticos, Brazil) 200 mg/mL in water; acetic acid (Labsynth, Brazil) 0.8% in saline; phenyl-p-benzoquinone (PBQ, Sigma Aldrich, USA) 1.89 mg/mL in 2% dimethyl sulfoxide (F. Maia, Brazil), formaldehyde (Merck, Brazil) 1.5% in saline; carrageenan (Santa Cruz Biotechnology, USA) 300 µg/25 µL diluted in saline.

2.2 Animals

Male Swiss mice (25 ± 5 g) from the State University of Londrina (UEL) colony were kept in standard plastic cages in a temperature- and light-controlled room ($22 \pm 2^\circ\text{C}$; 12 h dark/light) with free access to food and tap water. All experimental procedures were approved by the Ethics Committee from UEL (protocol n° 07863).

2.3 Experimental procedures

Animals were kept under food restriction for 3 h before treatment. They were divided into 3 groups of 6 animals: PFAE (100 mg/kg), ibuprofen (200 mg/kg, positive control) or water (0.1 mL/g, negative control). Mice were gavaged 30 min before the tests or the inflammatory stimuli. The dose of PFAE and ibuprofen as well as the pretreatment time were based on previous studies conducted in our laboratory (Afonso et al., 2015; Risso et al., 2010).

2.4 Writhing response tests

Acetic acid- and PBQ-induced writhing tests were performed as described by Koster et al. (1959) and Valério et al. (2009). Mice from the three groups were injected intraperitoneally (i.p.) with acetic acid or PBQ. The nociceptive behavior was quantified for 20 min after these chemical stimuli by counting the number of writhes (contractions of abdominal muscles accompanied by a body stretching and extension of the hind limbs).

2.5 Formalin test

Mice received an intraplantar (i.pl.) injection of 25 μL of 1.5% formalin and the number of flinching movements and the time spent licking the paw were determined every 5 min, for 30 min. For the data analysis, the test was divided into two phases: the first one between 0-5 min and the second one between 20-30 min (Valério et al., 2009).

2.6 Motor coordination

In order to verify if the dose of PFAE used in this work induces muscle relaxation, mice were evaluated in a rotarod (Insight, Brazil) (Dunham; Miya, 1957). The animals were trained (3 training sessions) to remain on a rotating bar (4 rpm). In the next day, animals that did not remain on the rotating bar with an acceleration from 6 to 12 rpm for 120 s were discarded. After this selection, animals were treated with saline or boldine and placed in the rotating bar 30 min after treatment. The time they remained on the bar was recorded and 180 s was the time limit for the observation.

2.7 Electronic pressure-meter test

Mice received an i.pl. stimulus with carrageenan (300 µg/paw) and the mechanical hyperalgesia was tested using an electronic pressure meter. The test consists of evoking a hind paw flexion reflex with a hand-held force transducer adapted with a 0.5 mm² polypropylene tip. The investigator applies a pressure on the central area of the hind paw which increases gradually until the animal removes the paw and flinches it. Each measurement was repeated for 4 times and a mean value was used. Moreover, measurements were obtained at 4 time-points: zero (animal naïve to treatment) and 1, 3 and 5 h after carrageenan stimuli. The results are expressed by delta (Δ) withdrawal threshold (in g) calculated by the difference between the time zero and the times 1, 3 and 5h (Cunha et al., 2004).

2.8 Paw edema

Alterations in paw height (edema) were measured using a paquimeter. Measures were taken from time 0 (before i.pl. injection of carrageenan) and 1, 3 or 5 h after

carrageenan injection (nociceptive stimulus). Variation in paw height was determined by Δ between times and time 0, and results were expressed in mm/paw (Zaperlon et al., 2013).

2.9. Myeloperoxidase activity (MPO)

Colorimetric assay for MPO activity was used in this study in order to evaluate neutrophils migration to the paw of the animals. Skin samples from the paw were collected 5 h after the carrageenan stimulus in K_2PO_4 buffer K_2PO_4 50 mM (pH 6) containing hexadecyl-trimethylammonium bromet 0.5% and were homogenized using Ultra-Turrax® (IKA T10 Basic, CQA Química, Brazil). Homogenized samples were centrifuged at 16,100xg for 2min at 4°C. 15 μ L from the supernatant were mixed with 200 μ L of phosphate buffer 50 mM pH 6.0, containing 0.167 mg/mL of o-dianisidin and hydrogen peroxide dichloridrate 0.05% and the enzyme activity was determined by spectrophotometry at 450 nm (BEL SP2000UV, Photonics, Brazil). Paw samples were compared to a standard curve of neutrophils and results are shown as MPO activity in neutrophils numbers $\times 10^7$ /mg per mL (Bradley et al., 1982; Valério et al., 2009).

2.10 N-acetyl- β -D-glucosaminidase activity (NAG)

NAG activity was accessed by a colorimetric assay adapted from Horinouchi et al. (2013). 20 μ L were taken from the same supernatant used for MPO analyzis (subsection 2.9) and placed in a 96 well-plate with 80 μ L phosphate buffer 50 mM (pH 6). The reaction was started by adding 4-nitrophenil N-acetil-D- β -glucosaminide 2.24 mM. The plate was incubated for 10 min at 37°C and the reaction was ended using 100 μ L of glycine buffer 0.2 M, pH 10.6. NAG activity was determined in a spectrophotometer (Multiskan GO Microplate Spectrophotometer, ThermoScientific, Finland) at 400 nm. Results are shown as NAG activity wich indicates macrophages $\times 10^4$ /mg skin tissue.

2.11 Leukocyte migration to the peritoneal cavity.

Animals received an i.p. stimulus of carragenan (500 µg/cavity) and were killed 4 h later to have cells collected from the peritoneal cavity. Aliquots of 20 µL were mixed with 180 µL of Turk's solution, and the total cell counts were performed in Neubauer chamber. The values were expressed as the total number of cells $\times 10^6$ per cavity (Valério et al 2007).

2.12 Cytokine production by ELISA

Three hours after the i.pl. injection of carrageenan (300 µg/paw), the animals were euthanized and paw skin was removed and homogenized in 500 uL of buffer containing protease inhibitors (Zarpelon et al., 2013). The samples were centrifuged (3,000 rpm x 15 min) and the levels of IL1 β , TNF and IL-10 supernatants were determined by an ELISA commercial kit according to the manufacturer's instructions. The results are expressed as pg of cytokine/100 mg paw skin.

2.13 Statistical analysis

Normality (Shapiro-Wilk test) and homogeneity of variance (Levene test) were evaluated in order to decide for parametric or non-parametric analysis. Results from electronic pressure-meter test, writhing tests (acid acetic or PBQ), licking time, number of flinching movements, edema, leukocyte migration, MPO, NAG and cytokines were analyzed by ANOVA complemented with Student Newman Keuls (SNK). Data from rotarod were analyzed by unpaired Student's t test. A $p < 0.05$ was adopted.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. PFAE inhibits nociceptive behavior induced by acetic acid, PBQ and formalin without interfering with motor coordination

As shown in Figure 1A and 1B, respectively, ANOVA complemented with SNK indicated that PFAE and ibuprofen significantly decreased abdominal writhes induced by acetic acid [$F(2,29)=10.5$, $p<0.0001$] and PBQ [$F(2,29)=17.5$, $p<0.0001$]. These results corroborate the effects observed with aqueous and organic extracts from *V. condensata* leaves (Risso et al., 2010) as well as with PFAE (Afonso et al., 2015) in the acetic acid model. Similar results of PFAE and aqueous extracts were expected since fractioning of the aqueous extract resulted only in a polar fraction, i.e., neither intermediate nor organic fractions were obtained (Afonso et al., 2015).

In order to investigate a possible relaxant effect of PFAE, mice were evaluated in a rotarod (Dunham; Miya, 1957). As can be seen in Figure 1C, PFAE did not interfere with the motor coordination of the animals as indicated by the lack of statistical difference between animals from the control and PFAE groups (Student's t test, $p>0.05$).

The fact that PFAE inhibited the writhing response induced by both stimuli, suggests that it can negatively modulate diverse inflammatory mediators since it has been reported that in the acetic-acid model substance P, histamine, bradykinins, prostaglandins and cytokines (IL-1 β , IL-6, IL-8 and TNF- α) are involved (Valério et al, 2007) whereas in the PBQ model, IL-18, IFN- γ and endothelin-1 (Verri et al., 2008; Magro et al., 2013) are the key players.

In the formalin test, PFAE reduced the number of flinches [$F(2,16)=6.2$, $p<0.05$] during phase 1 (Figure 2A) whereas during phase 2, PFAE and ibuprofen reduced both flinches [$F(2,15)=21.6$, $p<0.001$] and licking time [$F(2,16)=24.5$, $p<0.001$] (Figure 2 B).

The first phase of the formalin test is considered to be neurogenic because pain is evoked by activation of primary afferent neuronal fibers which releases substance P and calcitonin gene-related peptide in central and peripheral terminals (Tjolsen et al., 1992). The first phase also depends on the activation of transient receptor potential ankyrin 1 (TRPA1) (McNamara et al., 2007). On the other hand, the second phase is a mix of peripheral mechanisms including diverse mediators such as histamine, bradykinin, serotonin, cytokines and prostaglandin E₂ and has been described to be sensitive to the effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs (Shibata et al., 1989; Chichorro et al., 2004) such as ibuprofen. The results indicate that PFAE acts majorly by peripheral mechanisms but a neurogenic mechanism can not be ruled out.

3.2. PFAE reduces inflammatory endpoints triggered by carrageenan stimulus

Carrageenan has long been used as an inflammatory stimulus in studies aiming to investigate analgesic and anti-inflammatory potential of drugs as well as possible mechanisms involved (Manchope et al., 2016; Valério et al., 2007). It elicits a prostanoid cascade and releases sympathetic catecholamines, which activate chemical receptors and induce pain (Cunha et al., 2005; Valério et al., 2007;).

PFAE was effective in reducing carrageenan-induced mechanical hyperalgesia evaluated in the electronic pressure-meter test. As observed in Figure 3, mice that were pre-treated with PFAE or ibuprofen before the i.pl. carrageenan injection showed greater

pression in their paw (i.e., presented decreased delta) than water-carrageenan mice did. ANOVA complemented with SNK indicated that the results reached statistical significance at the 3 time points evaluated, i.e., 1h [F(3,23)=49.1, p<0.001], 3h [F(3,23)=33.0, p<0.001] and 5h [F(3,23)=33.2, p<0.001] after the inflammatory stimulus.

PFAE was also effective in reducing carrageenan-induced paw edema (Figure 4A) 1 h [F(3,22)=24.0, p<0.001], 3 h [F(3,22)= 53.5, p<0.001] and 5 h [F(3,22)= 31.5, p<0.001] after the stimulus; leukocytes migration to the paw (Figure 4B and C) and peritoneal cavity (Figure 4D) as well as the levels of TNF- α and IL-1 β in the paw (Figure 5).

The reduced leukocyte migration to the paw was indicated by the decreased activity of the surrogate enzymes MPO [F(3,22)=13.2, p<0.001] and NAG [F(3,22)=15.8, p<0.001], suggesting reduced recruitment of neutrophils (Figure 4B) and macrophages (Figure 4C). This effect is supported by the observed PFAE-induced reduction [F(3,23)= 64.2, p<0.001] in the total number of leukocytes to the peritoneal cavity after an i.p. injection of carrageenan. Cellular recruitment is an important event in inflammatory process and the inhibition of neutrophil recruitment is an interesting target to drugs expected to control pain (Cunha et al, 2008). As a matter of fact, our data suggest that PFAE induces analgesic and anti-inflammatory effects decreasing cellular recruitment and cytokines production (Figure 5) such as TNF- α [F(3,25)=21.4, p<0.001] and IL-1 β [F(3,27)=12.8, p<0.001]. TNF- α and CXCL-1 (keratinocyte derived chemokine) are the first cytokines to be released after carrageenan stimuli causing the release of IL-1 β (Cunha et al., 2005). In turn, IL-1 β stimulates neutrophils to produce PGE₂ (Cunha et al., 2008).

In conclusion, this study demonstrates that PFAE from *V. condensata* leaves presents analgesic and anti-inflammatory effects when administered through a human-

relevant treatment route (oral). This is the first study to describe mechanisms involved in these effects, i.e., PFAE inhibits leukocyte recruitment and cytokine production.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by CNPq (junior fellowship to B.D. Santos; senior fellowships to I. Scarminio and W. A. Verri, Jr), CAPES (Master fellowship to S. Bortolan) and Fundação Araucária (senior fellowship to E.G. Moreira).

REFERENCES

1. Afonso S, Matos AC DE, Marengo VA, Moreira EG, Soares DX, Koolen HHF, Scarminio IS. 2015. Seasonal Effects on HPLC-DAD-UV and UPLC-ESI-MS Fingerprints and Analgesic Activities of *Vernonia Condensata* Baker. *J Braz Chem Soc* **26**: 350-358.
2. Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD, Rothstein G. 1982. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol* **78**: 206–209.
3. Chichorro JG, Lorenzetti BB, Zampronio AR. 2004. Involvement of bradykinin, cytokines, sympathetic amines and prostaglandins in formalin-induced orofacial nociception in rats. *Br J Pharmacol* **141**: 1175-1184.
4. Cunha TM, Verri Jr WA, Schivo IR, Napimoga MH, Parada CA, Poole S, Teixeira MM, Ferreira SH, Cunha FQ. 2008. Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. *J Leukoc Biol* **83**: 824-832.
5. Cunha TM, Verri WA, Silva JS, Poole S, Cunha, FQ, Ferreira SH. 2005. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* **102**: 1755–1760.
6. Dunham NW, Miya TS. 1957. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. *J Am Pharm Assoc* **46**: 208–209.
7. Horinouchi CD, Mendes DA, Soley BDAS. 2013. *Combretum leprosum* Mart. (Combretaceae): potential as an antiproliferative and anti-inflammatory agent. *J Ethnopharmacol* **145**: 311–319.

8. Iganci JRV, Bobrowski VI, Heiden G, Stein VC, Rocha BHG. 2006. Efeito do extrato aquoso de diferentes espécies de boldo sobre a germinação e índice mitótico de *Allium cepa* L. *Arq Inst Biol* **73**: 79-82.
9. Koster R, Anderson MDB. 1959. Acetic acid for analgesic screening. *Fed Proc* **18**: 412–430.
10. Magro DAC, Hohmann MSN, Mizokami SS, Cunha TM, Alves-Filho JC, Casagrande R, Ferreira SH, Liew FY, Cunha FQ, Verri Jr WA. 2013. An interleukin-33/ST2 signaling deficiency reduces overt pain-like behaviors in mice. *Braz J Med Biol Res* **46**: 601-606.
11. Manchope MF, Calixto-Campos C, Coelho-Silva L, Zarpelon AC, Pinho-Ribeiro FA, Georgetti SR, Baracat MM, Casagrande R, Verri Jr WA. 2016. Naringenin inhibits superoxide anion-induced inflammatory pain: role of oxidative stress, cytokines, Nrf-2 and the NO–cGMP–PKG–KATP channel signaling pathway. *Plos One* **11**: e0153015.
12. McNamara CR, Mandel-Brehm J, Bautista DM, Siemens J, Deranian KL, Zhao M, Hayward NJ, Chong JA, Julius D, Moran MM, Fanger CM. 2007. TRPA1 mediates formalin-induced pain. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 13525-13530.
13. Monteiro MHD, Gomes-Carneiro MR, Felzenswalb I, Chahoud I, Paumgartten FJR. 2001. Toxicological evaluation of a tea from leaves of *Vernonia condensata*. *J Ethnopharmacol* **74**: 149-157.
14. Risso WE, Scarminio IS, Moreira EG. 2010. Antinociceptive and acute toxicity evaluation of *Vernonia condensata* Baker leaves extracted with different solvents and their mixtures. *Indian J Exp Biol* **48**: 811-816.
15. Shibata M, Ohkubo T, Takahashi H, Inoki R. 1989. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. *Pain* **38**: 347-352.

16. Silva JB, Temponi VDS, Fernandes FV. 2011. New Approaches to clarify antinociceptive and anti-inflammatory effects of the ethanol extract from *Vernonia condensata* leaves. *Int J Mol Sci* **12**: 8993–9008.
17. Tjolsen OGA, Berge SH, Rosland JH, Hole K. 1992. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* **51**: 5-17.
18. Valério DA, Georgetti SR, Magro DA, Casagrande R, Cunha TM, Vicentini FTMC, Vieira SM, Fonseca MJV, Ferreira SH, Cunha FQ. 2009. Quercetin reduces inflammatory pain: inhibition of oxidative stress and cytokine production. *J Nat Prod* **72**: 1975–1979.
19. Valério DR, Cunha TM, Arakawa NS, Lemos HP, Da Costa FB, Parada C, Ferreira S H, Cunha FQ, Verri WJr. 2007. Anti-inflammatory and analgesic effects of the sesquiterpene lactone budlein A in mice: Inhibition of cytokine production-dependent mechanism. *Eur J Pharmacol* **562**: 155–163.
20. Valverde AL, Cardoso GL, Pereira NA, Silva AJ, Kuster RM. 2001. Analgesic and antiinflammatory activities of vernonioside B2 from *Vernonia condensata*. *Phytother Res* **15**: 263-264.
21. Verri Jr WA, Cunha TM, Magro DA, Domingues AC, Vieira SM, Souza GR, Liew FY, Ferreira SH, Cunha FQ. 2008. Role of IL-18 in overt pain-like behaviour in mice. *Eur J Pharmacol* **588**: 207-212.
22. Verri Jr WA, Cunha TM, Parada CA, Poole S, Cunha FQ, Ferreira SH. 2006. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development? *Pharmacol Ther* **112**: 116-138.
23. Zarpelon AC, Cunha TM, Alves-Filho JC, Pinto LG, Ferreira SH, McInnes IB, Xu D, Liew FY, Cunha FQ, Verri Jr WA. 2013. Interleukin-33/ST2 signalling contributes to

carrageenin-induced innate inflammation and inflammatory pain: role of cytokines, endothelin-1 and prostaglandin E2. *Brit J Pharmacol* **169**: 90-101.

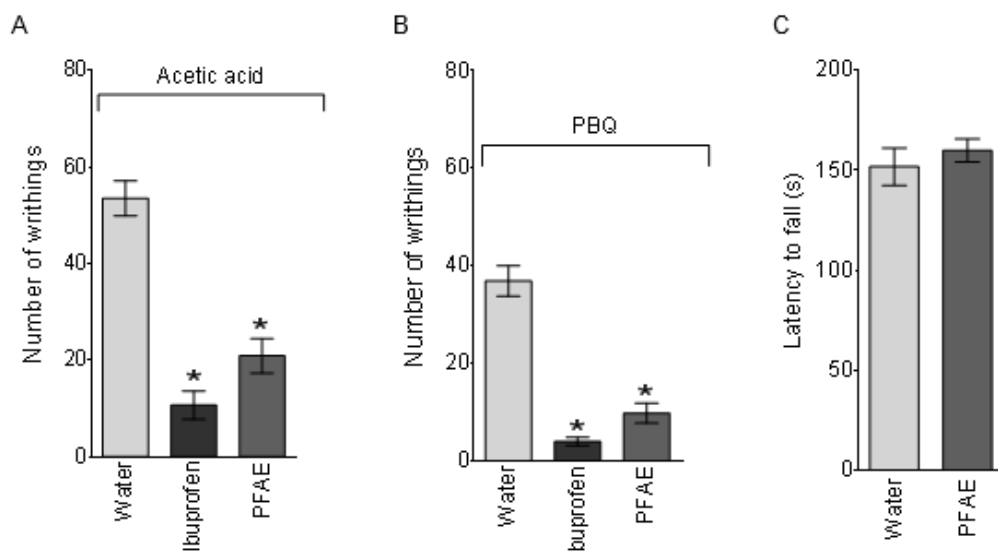


Figure 1. PFAE inhibits the overt pain-like behavior induced by acetic acid and PBQ and does not alter motor coordination. Mice were gavaged with PFAE (100 mg/kg), ibuprofen (200mg/kg) or water 30 min before i.p. injection of 10 mL/kg of acetic acid 0.8% (Pannel A) or 1.89 mg/kg PBQ (Pannel B) and the number of writhes was evaluated for 20 min. In the rotarod (Pannel C) PFAE did not modify motor coordination 30 min after its administration. Data are presented as means \pm SEM (n=6) and were analyzed by one-way ANOVA complemented with SNK, * $p < 0.01$ compared to water group (Pannels A and B) or Student's unpaired t test (Pannel C).

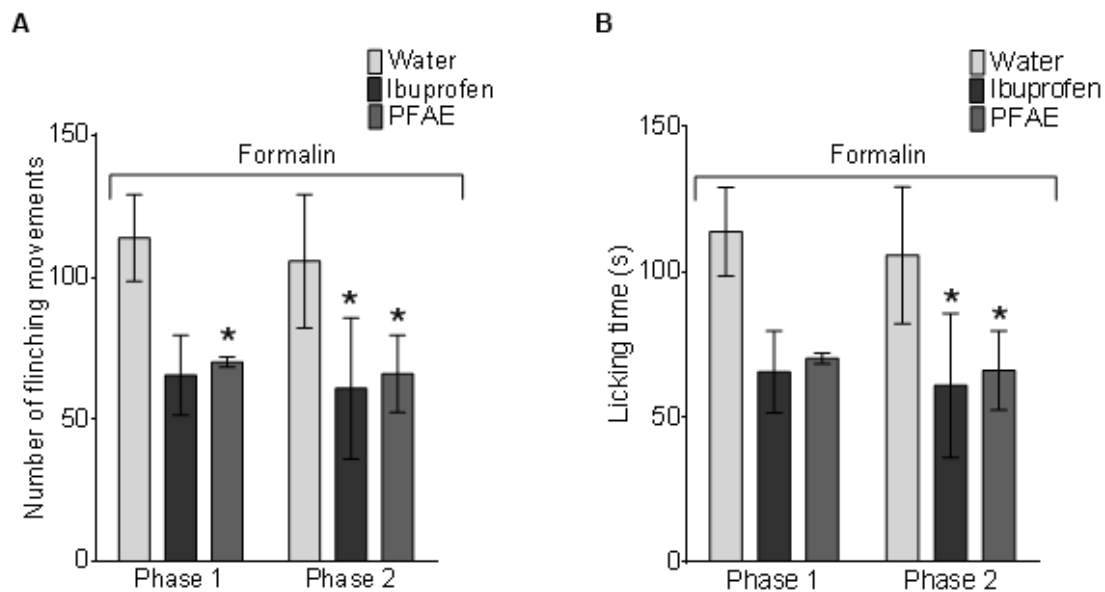


Figure 2. PFAE inhibits nociception induced by formalin. Mice were gavaged with PFAE (100 mg/kg), ibuprofen (200 mg/kg) or water 30 min before i.pl. injection of 25 μ L of formalin 1.5%. The number of flinches (Figure A) and time spent licking the paw (Figure B) were evaluated for 30 min. Data are presented as means \pm SEM (n=6) and were analyzed by one-way ANOVA complemented with SNK, *p<0.01 compared to water group.

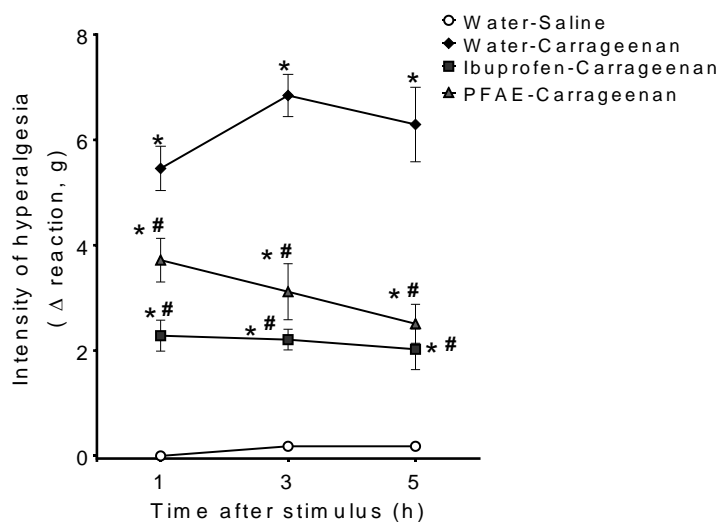


Figure 3. PFAE inhibits carrageenan-induced mechanical hyperalgesia. Mice were gavaged with PFAE (100 mg/kg), ibuprofen (200 mg/kg) or water 30 min before carrageenan i.pl. injection (300 μ g/paw). Data are presented as means \pm SEM (n=6) and were analyzed by one-way ANOVA complemented with SNK, *p<0.01 compared to water group; #p<0.01 compared to carrageenan group.

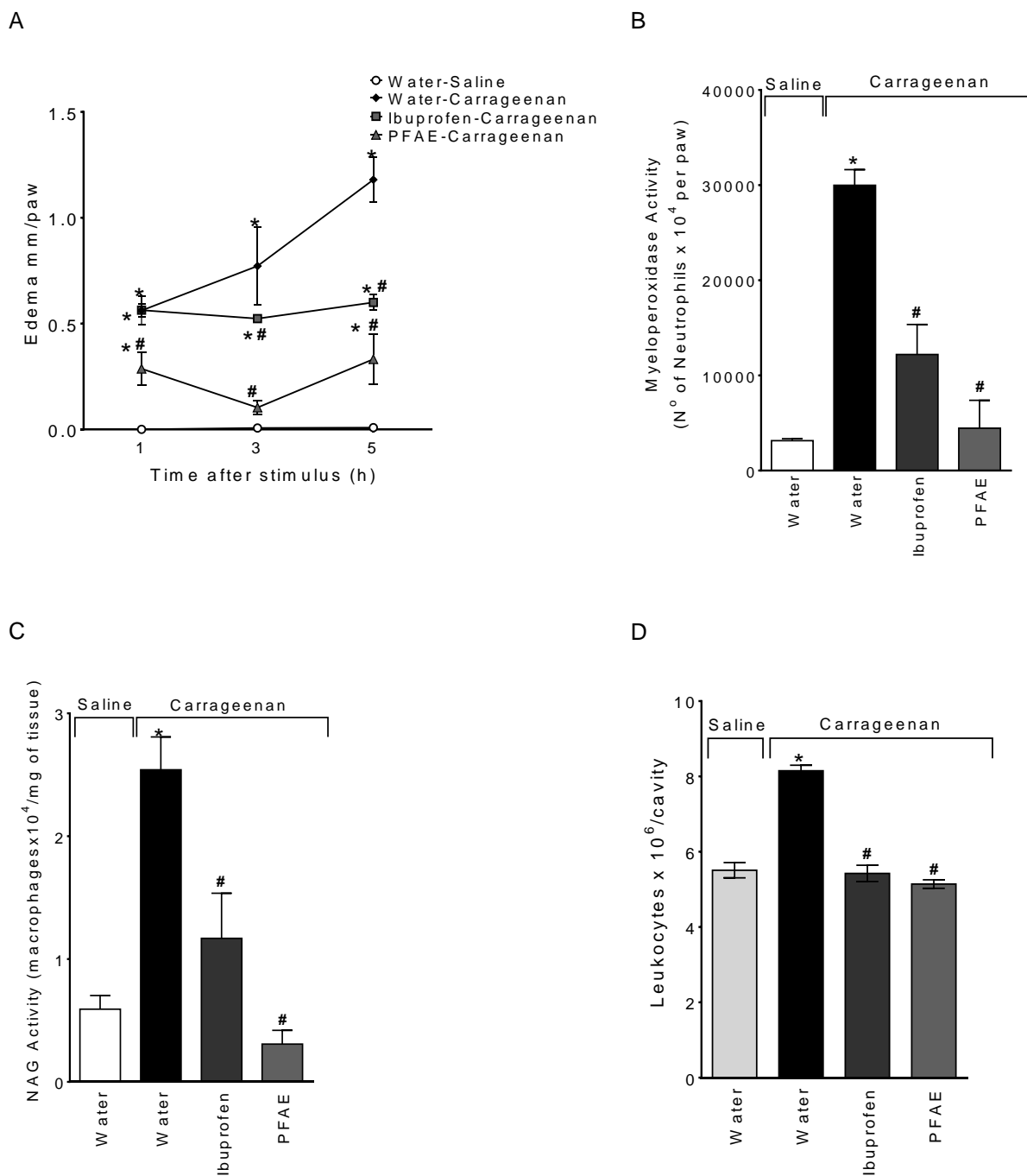


Figure 4. PFAE inhibits carrageenan-induced cellular migration. Mice were treated with PFAE (100 mg/kg), ibuprofen (200 mg/kg) or water 30 min before carrageenan injection (300 μ g/paw, i.pl.) and paw edema (Pannel A), MPO activity (Pannel B) and NAG acitivity (Pannel C) were evaluated. In Pannel D, carrageenan was injected i.p. (500 μ g/cavity). Data are presented as means \pm SEM (n=6) and were analyzed by ANOVA complemented with SNK, *p<0.01 compared to water; # p<0.01 compared to carrageenan.

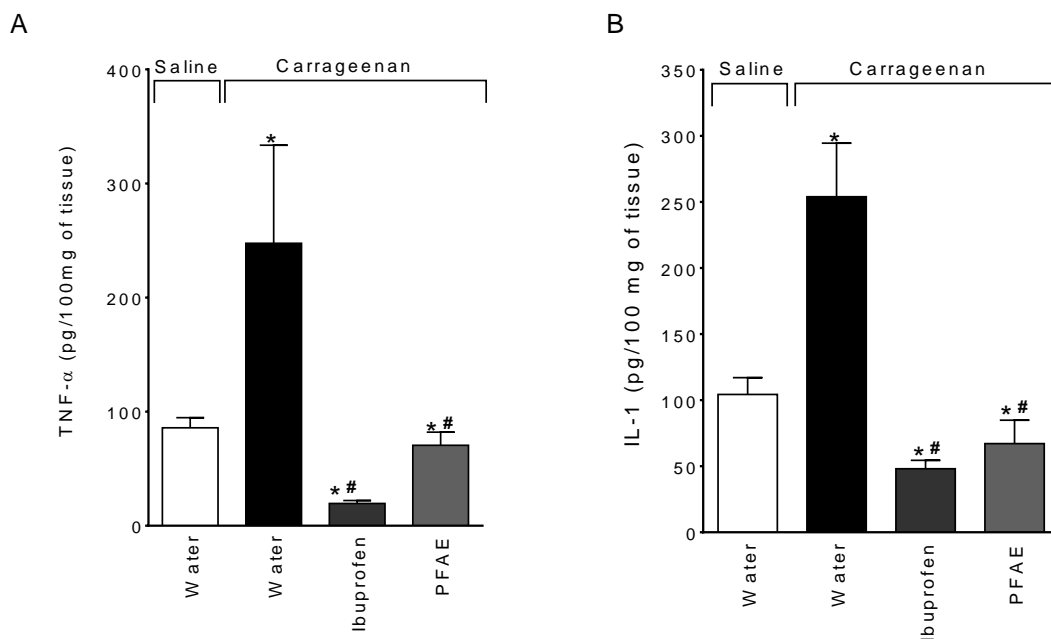


Figure 5. PFAE inhibits carrageenan-induced cytokines production. Mice were treated with PFAE (100 mg/kg), ibuprofen (200 mg/kg) or water 30 min before carrageenan injection (300 μ g/paw). Cytokines were quantified in the paw skin samples 3 h after carrageenan injection. Data are presented as means \pm SEM (n=6) and were analyzed by ANOVA complemented with SNK, *p<0.01 compared to water; #p<0.01 compared to carrageenan group.

REFERENCES

- Afonso, S. 2011 Análise exploratória e avaliação da atividade analgésica em camundongos de extratos das folhas de *Vernonia condensata* Baker. State University of Londrina.
- Afonso, S., Matos, A.C. DE., Marengo, V.A, Moreira, E.G., Soares, D.X., Koolen, H.H.F. Scarminio, I.S. 2015. Seasonal Effects on HPLC-DAD-UV and UPLC-ESI-MS Fingerprints and Analgesic Activities of *Vernonia Condensata* Baker. Journal of the Brazilian Chemical Society, 00, 00,1-9.
- Bradley, P. P., Priebat D. A., Christensen, R. D., Rothstein, G. 1982. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker, Journal of Investigative Dermatology. 78, 3, 206–209.
- Cunha, T. M., Verri Jr. W.A., Schivo, I.R., Napimoga, M.H., Parada, C.A., Poole, S., Teixeira, M.M., Ferreira, S.H., Cunha, F.Q. Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. 2008. Journal of Leukocyte Biology. 83, 824 – 832.
- Cunha, T.M., Verri, W.A., Silva, J.S., Poole, S., Cunha, F.Q., Ferreira, S.H. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. 2005. Proceedings of the National Academy of Sciences, 102, 1755–1760.
- Dunham, N. W., Miya, T. S. 1957. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. Journal of the American Pharmacists Association. 46, 208–209.
- Fruoso, V.S., Gurjão, M.R.R., Cordeiro, R.S.B., Martins, M.A. 1994. Analgesic and anti-ulcerogenic effects of a polar extract from leaves of *Vernonia condensata*. Planta Medica, 60,1, 21-25.
- Horinouchi, C. D., Mendes, D.A., Soley BDA, S. 2013 Combretum leprosum Mart.(Combretaceae): potential as an antiproliferative and anti-inflammatory agent. Journal of Ethnopharmacology. 145, 1, 311–319.
- Iganci, J.R.V., Bobrowski, V.I., Heiden, G., Stein, V.C., Rocha, B.H.G. 2006. Efeito do extrato aquoso de diferentes espécies de boldo sobre a germinação e índice mitótico de *Allium cepa* L. Arquivos do Instituto Biológico, 73, 1, 79-82.
- Koster, R., Anderson, M. De B. 1959. Acetic acid for analgesic screening. Federation Proceedings. 18, 412–430.
- Lorenzi, H., Matos, F.J.A. 2002. Plantas medicinais no Brasil: Nativas e exóticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum.
- Magro, D.A.C., Hohmann, M.S.N., Mizokami, S.S., Cunha, T.M., Alves-Filho, J.C., Casagrande, R., Ferreira, S.H., Liew, F.Y., Cunha, F.Q., Verri Jr, W.A. An interleukin-33/ST2 signaling deficiency reduces overt pain-like behaviors in mice. 2013. Brazilian Journal of Medical and Biological Research 46, 601-606.
- Manchope, M.F., Calixto-Campos, C., Coelho-Silva, L., Zarpelon, A.C., Pinho-Ribeiro, F.A., Georgetti, S.R., Baracat, M.M., Casagrande, R., Verri Jr., W.A. 2016. Naringenin Inhibits

Superoxide Anion Induced Inflammatory Pain: Role of Oxidative Stress, Cytokines, Nrf-2 and the NO-cGMP-PKG-KATP Channel Signaling Pathway. *Plos One*, 1-20.

Monteiro, M.H.D., Gomes-Carneiro, M.R., Felzenswalb, I., Chahoud, I., Paumgarten, F.J.R. 2001. Toxicological evaluation of a tea from leaves of *Vernonia condensata*. *Journal of Ethnopharmacology*, 74, 2, 149-157.

O'Brien, P., Carrasco-Pozo, C., Speisky, H. 2006. Boldine and its antioxidant or health-promoting properties. *Chemico-Biological Interactions*. 159, 1-17.

Risso, W.E., Scarminio, I.S., Moreira, E.G. 2010. Antinociceptive and acute toxicity evaluation of *Vernonia condensata* Baker leaves extracted with different solvents and their mixtures. *Indian Journal of Experimental Biology*, 48, 811-816.

Shibata, M., Ohkubo, T., Takahashi, H., Inoki, R. 1989. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response *Pain*. 38, 347-352.

Silva, J.B., Temponi, V.D.S., Fernandes, F.V. New Approaches to Clarify Antinociceptive and Anti-Inflammatory Effects of the Ethanol Extract from *Vernonia condensata* Leaves. 2011. *International Journal of Molecular Sciences*, 12, 8993-9008.

Tjolsen, O. G. A., Berge, S. H., Rosland, J.H., Hole, K. 1992. The formalin test: an evaluation of the method *Pain*. 51, 5-17.

Valério, D. A., Georgetti, S. R., Magro, D. A., Casagrande, R., Cunha, T. M., Vicentini, F. T. M. C., Vieira, S. M., Fonseca, M. J. V., Ferreira, S. H., Cunha, F. Q. 2009. Quercetin Reduces Inflammatory Pain : Inhibition of Oxidative Stress and Cytokine Production *Journal of Natural Products*, 1975-1979.

Valério, D. R., Cunha, T. M., Arakawa, N. S., Lemos, H. P., Da Costa, F. B., Parada, C., Ferreira, S. H., Cunha, F. Q., Verri, W. Jr. 2007. Anti-inflammatory and analgesic effects of the sesquiterpene lactone budlein A in mice: Inhibition of cytokine production-dependent mechanism. *European Journal of Pharmacology*. 562, 155-163.

Valverde, A.L., Cardoso, G.L., Pereira, N.A, Silva, A.J., KUSTER, R.M. 2001. Analgesic and antiinflammatory activities of vernonioside B2 from *Vernonia condensata*. *Phytotherapy research* : PTR, 15, 3, 263-4.

Verri Jr, W.A., Cunha, T.M., Magro, D.A., Domingues, A. C., Vieira, S.M., Souza, G.R., Liew, F.Y., Ferreira, S.H., Cunha, F.Q. Role of IL-18 in overt pain-like behaviour in mice. 2008. *European Journal of Pharmacology* 588, 207-212.

Verri, W. A. JR., Cunha, T. M., Parada, C. A., Poole, S., Cunha, F. Q., Ferreira, S. H. 2006. Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development? *Pharmacology & Therapeutics*. 112, 1, 116-138.

Zarpelon, A. C., Cunha, T. M., Alves-Filho, J. C., Pinto, L. G., Ferreira, S. H., McInnes, I. B., Xu, D., Liew, F.Y., Cunha, F.Q., Verri, W. A. Jr. 2013. Interleukin-33/ST2 signalling contributes to carrageenin-induced innate inflammation and inflammatory pain: role of cytokines, endothelin-1 and prostaglandin E2. *British Journal of Pharmacology*. 169, 90-101.

5 CONCLUSÕES GERAIS

Tanto a boldina quanto a fração polar do extrato aquoso das folhas da *Vernonia condensata* BAKER administradas oralmente foram capazes de induzir efeito antinociceptivo e anti-inflamatório principalmente por mecanismos periféricos de redução do recrutamento de células do sistema imunológico e inibição de mediadores inflamatórios como o TNF- α e a IL1- β .

REFERÊNCIAS

- AFONSO, S.; MATOS, A. C. DE; MARENGO, V. A.; et al. Seasonal Effects on HPLC-DAD-UV and UPLC-ESI-MS Fingerprints and Analgesic Activities of. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 00, n. 00, p. 1–9, 2014.
- ALMEIDA, E.R.; MELO, A.M.; XAVIER, H. Toxicological Evaluation of the Hydro-alcohol Extract of the Dry Leaves of *Peumus boldus* and Boldine in Rats. **Phytotherapy Research**. 14, 99–102, 2000.
- ALONSO, J.R. Tratado de fitomedicina – bases clínicas e farmacológicas. 1998. Disponível em http://www1.londrina.pr.gov.br/dados/images/stories/Storage/sec_saude/fitoterapia/publicacoes/boldo_chile2.pdf acesso em 22/01/2016
- ALVES, V.F.G.; NEVES, L.J. Anatomia foliar de *Vernonia polyanthes* Less (Asteraceae). **Revista da Universidade Rural – Série Ciências da Vida**, v. 22, p 1–8, 2003.
- BACKHOUSE, N.; DELPORTE, C.; GIVERNAU, M.; et al. Anti-inflammatory and antipyretic effects of boldine. **Agents and actions**, v. 42, n. 3-4, p. 114–7, 1994.
- BANNACH, R.; VALENZUELA, A.; CASSELS, B. K.; NFLNEZ-VERGARA, L. J.; SPEISKY, H. Cytoprotective and antioxidant effects of boldine on tert-butyl hydroperoxide- induced damage to isolated hepatocytes. **Cell Biology and Toxicology**, v. 12, p. 89–100, 1996.
- BARROS NETO B; SCARMINIO IS; BRUNS RE. **Como fazer experimentos: pesquisa e desenvolvimento na ciência e na indústria**. 3ª ed., Campinas: Editora UNICAMP, 2007.
- BARS, D.; GOZARIU, M.; CADDEN, S. W. Animal Models of Nociception. **Pharmacological reviews**, v. 53, n. 4, p. 597–652, 2001.
- BRADLEY, P. P.; PRIEBAT D. A.; CHRISTENSEN, R. D.; ROTHSTEIN, G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker, **Journal of Investigative Dermatology**, v. 78, n. 3, p. 206–209, 1982.
- BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. P.; COUTO, R. D.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. QUÍMICA E FARMACOLOGIA DE QUIMIOTERÁPICOS ANTINEOPLÁSICOS DERIVADOS DE PLANTAS. **Química Nova**, v. 33, n. 6, p. 1359–1369, 2010.
- BRESOLIN TMB, CHECHINEL-FILHO V. **Ciências Farmacêuticas: Contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos**. Itajaí: Univali, 2003.
- BRUNS RE; SCARMINIO IS; NETO BB. **Statistical design-Chemometrics**. Elsevier Amsterdam, 2006.
- BUTTAR HS, JONES KL. What do we know about the reproductive and developmental risks of herbal and alternate remedies? **Birth Defects Research (Part B)**, v. 68, p. 492–3, 2003.
- CALIXTO J B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 179 – 189, 2000.

CHULIA, S.; MOREAU, J.; NALINE, E.; et al. The effect of S- (+) -boldine guinea-pig aorta on the alpha1-adrenoceptor of the guinea-pig aorta. **British journal of pharmacology**, v. 119, p. 1305–1312, 1996.

CUNHA, T. M., VERRI JR. W.A., SCHIVO, I.R., NAPIMOGA, M.H., PARADA, C.A., POOLE, S., TEIXEIRA, M.M., FERREIRA, S.H., CUNHA, F.Q. Crucial role of neutrophils in the development of mechanical inflammatory hypernociception. **Journal of Leukocyte Biology**. 83, 824 –832, 2008.

CUNHA, T. M.; VERRI, W. A.; SILVA, J. S.; et al. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 102, n. 5, p. 1755–1760, 2005.

CUNHA, T. M.; VIVANCOS, G. G.; MOREIRA, I. F.; et al. An electronic pressure-meter nociception paw test for mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, p. 401–407, 2004.

DIAZ-PEREZ, J. L.; GOLDYNE, M. E.; WINKELMANN, R. K. Prostaglandins and chemotaxis: Enhancement of polymorphonuclear leukocyte chemotaxis by prostaglandin F2 alpha. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 66, p. 149–152, 1976.

DUARTE, I. D. G.; FERREIRA-ALVES, D.L.; NAKAMURA-CRAIG, M. Possible participation of endogenous opioid peptides on the mechanism involved in analgesia induced by vouacapan. **Life Science Journal**. 50, 891-897, 1992.

DUNHAM, N. W.; MIYA, T. S. A note on a simple apparatus for detecting neurological deficit in rats and mice. **Journal of the American Pharmacists Association**, v. 46, p. 208–209, 1957.

DURBADAL, O.; MUKHERJEE, H.; MONDAL, S.; JENA, A.; DWIVEDI, V.P.; MONDAL, K.C.; MALHOTRA, B.; SAMANTA, A.; CHATTOPADHYAY, D. Anti-Inflammatory Activity of *Ocimum sanctum* Roxb, an Indian Folk Remedy, through Inhibition of Toll-Like Receptor 4 Signaling Pathway. **Plosone**. 9, 104939, 2014.

DUTRA, R.C.; TAVARES, C.Z.; FERRAZ, S.O.; SOUSA, O.V.; PIMENTA, D.S. Investigação das atividades analgésica e antiinflamatória do extrato metanólico dos rizomas de *Echinodorus grandiflorus*. **Brazilian Journal Pharmacognosy**. 16, 469-474. 2006.

ESTELLÉS, R.; MILIAN, L.; NABAH, Y. N. A.; et al. Effect of boldine, secoboldine, and boldine methine on angiotensin II-induced neutrophil recruitment in vivo. **Journal of leukocyte biology**, v. 78, n. 3, p. 696–704, 2005.

Fao Corporate Document Repository, Disponível em:
<<http://www.fao.org/docrep/field/003/AB730E/AB730E03.htm>>. Acesso em 10 de Janeiro de 2016.

FRUTUOSO VS, GURJÃO MRR, CORDEIRO RSB, MARTINS MA. Analgesic and anti-ulcerogenic effects of a polar extract from leaves of *Vernonia condensata*. **Planta Medica**, v.60, n.1, p.21-25, 1994.

GADDI, P. J.; CRANE, M. J.; KAMANAKA, M.; et al. IL-10 mediated regulation of liver inflammation during acute murine cytomegalovirus infection. **PloS one**, v. 7, n. 8, p. e42850, 2012.

GARCIA CM. **Determinação da atividade antimicrobiana e caracterização físico-química e biológica de *Phyllanthus niruri* e *Phyllanthus tenellus* Roxb.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2000.

GERHARDT, D.; HORN, A. P.; GAELZER, M. M.; et al. Boldine: a potential new antiproliferative drug against glioma cell lines. **Investigational new drugs**, v. 27, n. 6, p. 517–25, 2009.

GOTTERLAND, M.; JIMENEZ, I.; BRUNSER, O.; GUZMAN, L.; ROMERO, S.; CASSELS, B. K.; SPEISKY, H. Protective effect of boldine in experimental colitis. **Planta Medica**, 63, 311-315, 1997.

HAN-PIN, K., HORNG-CHYUAN L.; KOU-HSIUNG H.; CHUN-HUA, W.; LING-CHUAN, L. Lipopolysaccharide Enhances Substance P-mediated Neutrophil Adherence to Epithelial Cells and Cytokine Release. **American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine**. 162, 1891–1897, 2000.

HORINOUCI, C. D., MENDES, D.A., SOLEY BDA, S. Combretum leprosum Mart.(Combretaceae): potential as an antiproliferative and anti-inflammatory agent. **Journal of Ethnopharmacology**. 145, 1, 311–319, 2013.

HUBER, J. D.; CAMPOS, C. R.; MARK, K. S.; DAVIS, T. P. Alterations in blood-brain barrier ICAM-1 expression and brain microglial activation after -carrageenan-induced inflammatory pain. **American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology**. v. 85721, p. 732–740, 2006.

IGANCI, J. R. V.; BOBROWSKI, V. L.; HEIDEN, G.; STEIN, V. C.; ROCHA, B. H. G. EFEITO DO EXTRATO AQUOSO DE DIFERENTES ESPÉCIES DE BOLDO. , v. 73, n. 1, p. 79–82, 2006.

JIMÉNEZ, I.; GARRIDO, A.; BANNACH, R.; GOTTELAND, M.; SPEISKY, H. Protective effects of boldine against free radical-induced erythrocyte lysis. **Phytotherapy research : PTR**, v. 14, n. 5, p. 339–43, 2000.

KANG, J.-J.; CHENG, Y.-W.; FU, W.-M. Studies on Neuromuscular Blockade by Boldine in the Mouse Phrenic Nerve-Diaphragm. **The Japanese Journal of Pharmacology**, v. 76, p. 207–212, 1998.

KENJI, W.; MIYAZAWA, R.; ZARPELON, A.C.; PINHO-RIBEIRO, F.A.; PAVÃO-DE-SOUZA, G.F.; CASAGRANDE, R.; VERRI-JR., W.A. Vinpocetine Reduces Carrageenan-Induced Inflammatory Hyperalgesia in Mice by Inhibiting Oxidative Stress, Cytokine Production and NF- κ B Activation in the Paw and Spinal Cord. **Plosone**. 10, 2015.

KONRATH, E. L.; SANTIN, K.; NASSIF, M.; et al. Antioxidant and pro-oxidant properties of boldine on hippocampal slices exposed to oxygen-glucose deprivation in vitro. **Neurotoxicology**, v. 29, n. 6, p. 1136–40, 2008. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18590764>>. Acesso em: 14/5/2014.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; BEER, E. DE. Acetic acid for analgesic screening. **Federation Proceedings**, v. 18, p. 412–430, 1959.

KRINGSTEIN, P.; CEDERBAUM, A. I. BOLDINE PREVENTS HUMAN LIVER MICROSOMAL LIPID PEROXIDATION AND INACTIVATION OF CYTOCHROME P4502E1. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 18, n. 3, p. 559–563, 1995.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. **Robbins Basic Pathology**. 9^a ed. 2013.

LANHERS, M. C.; JOYEUX, M.; SOULIMANI, R.; FLEURENTIN, J.; SAYAG, M.; MORTIER, F.; YOUNOS, C. Hepatoprotective and anti-inflammatory effects of a traditional medicinal plant of chile, *Peumus boldus*. **Planta Medica**. 57, 110-115, 1991.

LAU, Y. S.; TIAN, X. Y.; HUANG, Y.; et al. Boldine protects endothelial function in hyperglycemia-induced oxidative stress through an antioxidant mechanism. **Biochemical pharmacology**, v. 85, n. 3, p. 367–75, 2013. Elsevier Inc. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23178655>>. Acesso em: 14/5/2014.

LORENZI, H., MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: Nativas e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.

MAGRO, D.A.C., HOHMANN, M.S.N., MIZOKAMI, S.S., CUNHA, T.M., ALVES-FILHO, J.C., CASAGRANDE, R., FERREIRA, S.H., LIEW, F.Y., CUNHA, F.Q., VERRI JR, W.A. An interleukin-33/ST2 signaling deficiency reduces overt pain-like behaviors in mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. 46, 601-606, 2013.

MANCHOPE, M.F., CALIXTO-CAMPOS, C., COELHO-SILVA, L., ZARPELON, A.C., PINHO-RIBEIRO, F.A., GEORGETTI, S.R., BARACAT, M.M., CASAGRANDE, R., VERRI JR., W.A. Naringenin Inhibits Superoxide Anion-Induced Inflammatory Pain: Role of Oxidative Stress, Cytokines, Nrf-2 and the NO–cGMP–PKG–KATP Channel Signaling Pathway. **Plos One**, 1-20. 2016.

MILIÁN, L.; ESTELLÉS, R.; ABARCA, B.; et al. Reactive oxygen species (ROS) generation inhibited by aporphine and phenanthrene alkaloids semi-synthesized from natural boldine. **Chemical & pharmaceutical bulletin**, v. 52, n. 6, p. 696–9, 2004. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15187389>>. .

MONTEIRO, M. H.; GOMES-CARNEIRO, M. R.; FELZENSZWALB, I.; CHAHOUD, I.; PAUMGARTTEN, F. J. Toxicological evaluation of a tea from leaves of *Vernonia condensata*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 74, n. 2, p. 149–57, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11167033>>. .

MOREIRA, R. R.; CARLOS, I. Z.; VILEGA, W. Release of intermediate reactive hydrogen peroxide by macrophage cells activated by natural products. **Biological & pharmaceutical bulletin**, v. 24, n. 2, p. 201–4, 2001.

MORELLO, A.; CASSELS, B. K.; SPEISKY, H.; ALDUNATE, J.; REPETTO, Y. Trypanocidal effect of boldine and related alkaloids upon several strains of *Trypanosoma cruzi*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 107, n. 3, p. 367–371, 1994.

O'BRIEN, P.; CARRASCO-POZO, C.; SPEISKY, H. Boldine and its antioxidant or health-promoting properties. **Chemico-biological interactions**, v. 159, n. 1, p. 1–17, 2006.

PANERAI, A. E.; LOCATELLI, L.; SACERDOTE, P. Inhibitory effect of NSAIDs on the chemotaxis induced by substance P on human monocytes and polymorphonuclear cells. **Ann Ist Super Sanità**, v. 29, n. 3, p. 375–377, 1993.

RISSE, W. E.; SCARMINIO, I. S.; MOREIRA, E. G. Antinociceptive and acute toxicity evaluation of *Vernonia condensata* Baker leaves extracted with different solvents and their mixtures. , v. 48, n. August, p. 811–816, 2010.

RUIZ, A.L.T.G.; TAFARELLO, D.; SOUZA, V.H.S.; CARVALHO, J.E. Farmacologia e Toxicologia de *Peumus boldus* e *Baccharis genistelloides*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v. 2 n.18 p. 295-300, 2008.

RUIZ-MIYAZAWA, K. W.; PINHO-RIBEIRO, F. A., ZARPELON, A. C., STAURENGO-FERRARI, L.; SILVA, R. L.; ALVES-FILHO, J. C.; CUNHA, T. M.; CUNHA, F. Q.; CASAGRANDE, R.; WALDICEU A. V. JR. Vinpocetine reduces lipopolysaccharide-induced inflammatory pain and neutrophil recruitment in mice by targeting oxidative stress, cytokines and NF-Kb. **Chemico-Biological Interactions**, v. 237, p. 9-17, 2015.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G.; RODRIGUEZ, J. A.; THEODULOZ, C.; et al. Free-radical Scavengers and Antioxidants from *Peumus boldus* Mol. ("Boldo"). **Free Radical Research**, v. 37, n. 4, p. 447–452, 2003.

SELLOUM, L.; BOURICHE, H.; TIGRINE, C.; BOUDOUKHA, C. Anti-inflammatory effect of rutin on rat paw oedema, and on neutrophils chemotaxis and degranulation. **Experimental and Toxicologic Pathology**, v. 54, p. 313-318, 2003.

SHIBATA, M.; OHKUBO, T.; TAKAHASHI, H.; INOKI, R. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response, **Pain**, v. 38, n. 3, p. 347–352, 1989.

SILVA, J. B. DA; TEMPONI, V. D. S.; FERNANDES, F. V.; et al. New Approaches to Clarify Antinociceptive and Anti-Inflammatory Effects of the Ethanol Extract from *Vernonia condensata* Leaves. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 12, p. 8993–9008, 2011.

SI, Y.-X.; JI, S.; WANG, W.; FANG, N.-Y.; JIN, Q.-X.; PARK, Y.-D.; QIAN, G.-Y.; LEE, J.; HAN, H.-Y.; YIN, S.-J. Effects of boldine on tyrosinase: Inhibition kinetics and computational simulation. **Process Biochemistry**. 48 (1), 152–161. 2013.

SPEISKY, H.; CASSELS, B. K. Boldo and boldine: an emerging case of natural drug development. **Pharmacological research : the official journal of the Italian Pharmacological Society**, v. 29, n. 1, p. 1–12, 1993. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8202440>>. .

SPEISKY, H.; CASSELS, B. K.; EDUARDO, A. L.; VIDELA, L. A. ANTIOXIDANT PROPERTIES OF THE ALKALOID BOLDINE IN SYSTEMS UNDERGOING LIPID PEROXIDATION AND ENZYME INACTIVATION. **Biochemical pharmacology**, v. 41, n. 11, p. 1575–1581, 1991.

TAVARES, D.C.; TAKAHASHI, C.S. Evaluation of the genotoxic potential of the alkaloid boldine in mammalian cell system in vitro and in vivo. **Mutation. Research.** 321, 139-145. 1994.

TJOLSEN, A.; BERGE, O.-G.; HUNSKAAR, S.; ROSLAND, J. H.; HOLE, K. "The formalin test: an evaluation of the method," **Pain**, v. 51, n. 1, p. 5–17, 1992.

TOYANG, N. J.; VERPOORTE, R. A review of the medicinal potentials of plants of the genus *Vernonia* (Asteraceae). **Journal of ethnopharmacology**, v. 146, n. 3, p. 681–723, 2013. Elsevier. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23395623>>. Acesso em: 12/1/2016.

VANE, J.; BOTTING, R. Inflammation and the mechanism of action of anti-inflammatory drugs. **The Federation of American Societies for Experimental Biology Journal**, v. 1, p. 89–96, 1987.

VALÉRIO, D. A. R.; CUNHA, T. M.; ARAKAWA, N. S.; et al. Anti-inflammatory and analgesic effects of the sesquiterpene lactone budlein A in mice: inhibition of cytokine production-dependent mechanism. **European journal of pharmacology**, v. 562, n. 1-2, p. 155–63, 2007.

VALÉRIO, D. A.; GEORGETTI, S. R.; MAGRO, D. A.; et al. Quercetin Reduces Inflammatory Pain : Inhibition of Oxidative Stress and Cytokine Production. **Journal of Natural Products**, v. 72, p. 1975–1979, 2009.

VALÉRIO, D. A.; FERREIRA, F. I.; CUNHA, T. M.; ALVES-FILHO, J. C.; LIMA, F. O.; DE OLIVEIRA, J. R.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q.; QUEIROZ, R. H.; VERRI, W. A. JR. Fructose-1,6-bisphosphate reduces inflammatory pain-like behaviour in mice: role of adenosine acting on A1 receptors. **British Journal of Pharmacology**, v. 158, n. 2, p. 558-568, 2009.

VARELLA, P. P. V; FORTE, W. C. N. Citocinas : revisão. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia.** v. 244, 2014.

VERRI, W. A., JR.; CUNHA, T. M.; FERREIRA, S. H.; WEI, X.; LEUNG, B. P.; FRASER, A.; MCINNES, I. B.; LIEW, F. Y.; CUNHA, F. Q. IL-15 mediates antigen-induced neutrophil migration by triggering IL-18 production. **European Journal Immunology.** 37, 3373–3380, 2007.

VERRI, W. A.; GUERRERO, A. T. G.; FUKADA, S. Y.; VALERIO, D. A.; CUNHA, T. M.; XU, D.; FERREIRA, H.; LIEW, F. Y.; CUNHA, F. Q. IL-33 mediates antigen-induced cutaneous and articular hypernociception in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences.** 105 (7), 2723–2728, 2008.

VALVERDE, A L.; CARDOSO, G. L.; PEREIRA, N. A; SILVA, A J.; KUSTER, R. M. Analgesic and antiinflammatory activities of vernonioside B2 from *Vernonia condensata*. **Phytotherapy research : PTR**, v. 15, n. 3, p. 263–4, 2001. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11351366>>. .

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

VERRI, W. A.; MOLINA, R. O.; SCHIVO, I. R. S.; et al. Nociceptive Effect of Subcutaneously Injected Interleukin-12 Is Mediated by Endothelin (ET) Acting on ET B Receptors in Rats. , v. 315, n. 2, p. 609–615, 2005.

YU, B. The Aporphine Alkaloid Boldine Induces Adiponectin Expression and Regulation in 3T3-L1 Cells 1. , v. 12, n. 5, p. 1074–1083, 2009.

YUAN, G.; WAHLQVIST, M. L.; HE, G.; YANG, M. Natural products and anti-inflammatory activity. , v. 15, n. March, p. 143–152, 2006.

YUNES RA, CALIXTO JB, **Plantas medicinais: sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos Editora Universitária, 2001.

ZARPELON, A. C., CUNHA, T. M., ALVES-FILHO, J. C., PINTO, L. G., FERREIRA, S. H., MCINNES, I. B., XU, D., LIEW, F.Y., CUNHA, F.Q., VERRI, W. A. JR. Interleukin-33/ST2 signalling contributes to carrageenin-induced innate inflammation and inflammatory pain: role of cytokines, endothelin-1 and prostaglandin E2. **British Journal of Pharmacology**. 169, 90-101, 2013.

ZHAO, Q.; ZHAO, Y.; WANG, K. Antinociceptive and free radical scavenging activities of alkaloids isolated from *Lindera angustifolia* Chen. **Journal of ethnopharmacology**, v. 106, n. 3, p. 408–13, 2006.

**ANEXO A: Guia para autores – Journal of Natural Products e Pharmacology
Biochemistry and Behavior**

VER IMPRESSO.