

Rosane Schenkel de Aquino

Efeitos antinociceptivo e antiprurido do extrato bruto aquoso obtido das folhas da planta *Acca sellowiana* em camundongos.

Tese submetida ao Programa de Neurociências da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de doutor em Neurociências.

Orientador: Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos.

**Florianópolis
2018**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Aquino, Rosane Schenkel de
Efeitos antinociceptivo e antiprurido do extrato
bruto aquoso obtido das folhas da planta *Acca
sellowiana* em camundongos / Rosane Schenkel de
Aquino ; orientador, Prof. Dr. Adair Roberto Soares
dos Santos, 2018.
140 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de
Pós-Graduação em Neurociências, Florianópolis, 2018.

Inclui referências.

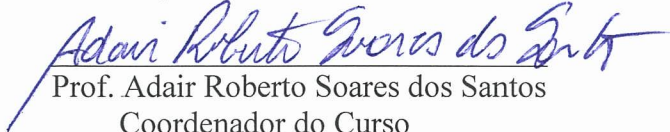
1. Neurociências. 2. *Acca sellowiana*. 3.
polifenóis. 4. antinociceptivo, antiprurido. 5. TRP,
PKC, AEW. I. Santos, Prof. Dr. Adair Roberto Soares
dos Santos. II. Universidade Federal de Santa Catarina.
Programa de Pós-Graduação em Neurociências. III.
Título.

ROSANE SCHENKEL DE AQUINO

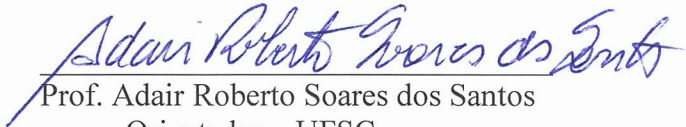
**“EFEITOS ANTINOCICEPTIVO E ANTIPRURIDO DO
EXTRATO BRUTO AQUOSO OBTIDO DAS FOLHAS DA
PLANTA ACCA SELLOWIANA EM
CAMUNDONGOS”**

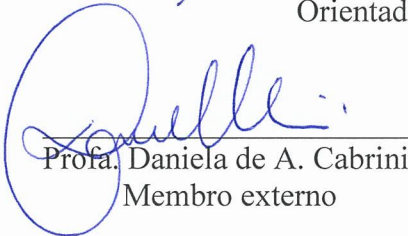
Esta tese foi julgada e aprovada para a obtenção do Grau de
Doutor em Neurociências na área de Neuropsicobiologia no
Programa de Pós-Graduação em Neurociências da Universidade
Federal de Santa Catarina

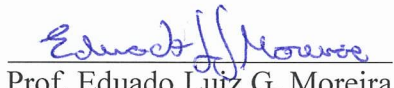
Florianópolis, 26 de fevereiro de 2018.

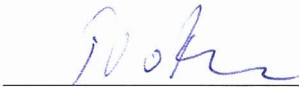

Prof. Adair Roberto Soares dos Santos
Coordenador do Curso

Banca Examinadora:


Prof. Adair Roberto Soares dos Santos
Orientador – UFSC


Profa. Daniela de A. Cabrini
Membro externo


Prof. Eduardo Luiz G. Moreira
Membro - UFSC


Prof. Juliano Ferreira
Membro – UFSC

DEDICATÓRIA

Este trabalho é dedicado aos meus filhos, Amanda e Arthur, e aos meus pais, Hélio e Eneita, companheiros de todas as horas.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Adair Roberto Soares dos Santos, por acreditar no meu projeto, ter me recebido em seu laboratório e por seus ensinamentos.

Ao IFSC pelo afastamento concedido para a realização do doutorado.

À equipe do LANDI, por todas as horas de apoio, de conversas, de discussões e de alegria dispensadas ao longo destes quatro anos. Ficarão guardados no meu coração.

Ao Aledson, Fernanda, Gleici e Rholi parceiros de experimentos, de biotério e AMIGOS.

Ao Marcos, Clécio e Marcelo que prontamente auxiliaram na minha reabilitação.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Neurociências, pela dedicação e a busca pela excelência em tudo que fazem.

Ao Nivaldo, pela ajuda, cordialidade e atenção com que trata os alunos.

Ao professor Dr. Louis Pergaud Sandjo e Fabiano Cleber Bertoldi, pela análise dos extratos.

Aos companheiros do LABDEF que ajudaram na realização deste trabalho.

As minhas amigas Camila e Karine, pelas risadas, cafés e desabafos.

Ao aluno Jefferson pela obtenção do extrato, dedicação e amizade.

Aos pesquisadores da EPAGRI, Murilo e Sadi pelo incentivo e colaboração para a realização deste trabalho.

Aos meus amigos Ana Paula e Michael, pelo incentivo e apoio em todas as horas.

Aos meus tios Ilena e Solon, aos primos Gabriel, Renata e Katize, pelo companheirismo e carinho.

Aos meus queridos e amados irmãos, Christian e Ronald, e as cunhadas Flavia e Mireli. Várias etapas foram vencidas nestes últimos quatro anos. Amo vocês!

Aos meus filhos, Amanda e Arthur pelo dia-a-dia e amor. Deixarei vocês por aqui, mas ainda seremos os “Três Mosqueteiros”.

Ao Alcir, pelo carinho, amor, companheirismo e dedicação. “*Você me faz tão bem....TÃO BEM!*”

Aos meus pais, Hélio e Eneita, pelo amor, confiança e apoio.

Mais uma etapa vencida e o mais importante, juntos!
À DEUS, minha fonte eterna de força e fé.

RESUMO

No Planalto Serrano de Santa Catarina, Brasil, chá de folhas de *Acca sellowiana* (Berg.) (Myrtaceae), conhecida como *Feijoa sellowiana* (Berg.) ou guava, é usado na medicina popular para o tratamento de dor de garganta, gastroenterite, diarreia e problemas estomacais. Este trabalho se propôs a investigar os componentes químicos, toxicidade, atividade antinociceptiva e antiprurido do extrato aquoso bruto das folhas de *Acca sellowiana* (EBAAs) proveniente da Fazenda Bela Vista (EBAAs-BV), Paineira, SC, e da Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina, Lages, SC (EBAAs-E). A análise química dos extratos mostrou que os mesmos são compostos por uma mistura de polifenóis e sesquiterpenos. Os testes toxicológicos dos extratos com *Artemia salina* e do EBAAs-E em camundongos Swiss segundo guia 407 da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) não demonstraram nenhuma toxicidade. O tratamento intragástrico (i.g.) com EBAAs-BV e EBAAs-E (1-30 mg/kg) reduziu significativamente a nocicepção causada pelo ácido acético em camundongos. A dose de 30 mg/kg, i.g. do EBAAs-BV foi capaz de diminuir a nocicepção causada por capsaicina, cinamaldeído e mentol, mas não por glutamato e salina ácida (agonista ASICs) bem como, de diminuir o prurido causado por histamina e tripsina. O tratamento de camundongos com o EBAAs-E (3-10 mg/kg, i.g.) diminuiu drasticamente o comportamento de coçar causado por substância P, tripsina e histamina. O tempo (30 min) e concentração de capsaicina (2.5 µg/site) e cinamaldeído (750 nmol/site) foram definidos como novos protocolos de prurido, nos quais EBAAs-E foi capaz de diminuir o comportamento de coçar dos animais. EBAAs-E reduziu o comportamento de coçar desencadeado por forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), um ativador de PKC. Assim, o efeito antiprurido deste extrato possivelmente envolva a ação do mesmo sobre receptores NK-1, PAR-2/PAR-4, H1/H4, TRPV1 e TRPA1 e, também de PKC. O tratamento agudo e de doses repetidas com o extrato EBAAs-E foi capaz de diminuir significativamente o prurido crônico induzido pelo modelo de pele seca. Citocinas (IL-10, IL-17), fator de crescimento neuronal (NGF), e a atividade das enzimas antioxidantes (superóxido dismutase, catalase, glutatona peroxidase e glutatona redutase), na pele e medula espinal não parecem estar associados ao efeito antiprurido do EBAAs-E no modelo de pele seca. O comportamento tipo depressivo está associado ao modelo de pele seca, mas não o tipo ansioso. Tratamento com doses repetidas de EBAAs-E não foi capaz de prevenir o

comportamento tipo depressivo no modelo de pele seca e induziu comportamento tipo ansioso em camundongos. Este é o primeiro trabalho mostrando a ação do EBAA sobre dor e prurido em camundongos e seus possíveis mecanismos de ação. Estas ações aliadas a ausência de toxicidade tornam a planta *Acca sellowiana* uma promessa no desenvolvimento de um novo fitoterápico e contribui na validação e valorização do conhecimento etnofarmacológico das plantas medicinais do Sul do Brasil.

Palavras chaves: *Acca sellowiana*, polifenóis, antinociceptivo, antiprurido, TRP, PKC, AEW.

ABSTRACT

Acca sellowiana (O. Berg) Burret (Myrtaceae), also known as *Feijoa sellowiana*, is used in folk medicine in the Serrano Plateau of Santa Catarina State, Brazil, for the treatment of sore throat, gastroenteritis, stomach cramps and diarrhea. The aim of this study was to investigate the chemical composition and use of the aqueous crude extract from *Acca sellowiana* (ACEAs) leaves as a potential therapeutic agent for pain and itch on mice Swiss. Leaves from Bela Vista farm (ACEAs-BV) and from Research and extension agricultural company (ACEAs-E) were sampled in 2015 January. The both ACEAs chemical analysis identified sesquiterpenes and polyphenols. Toxicological tests with *Artemia salina* did not present toxic effects for ACEAs-BV and ACEAs-E, and did not present toxic effects for ACEAs-E according to 407 guide from Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). ACEAs-BV and ACEAs-E (1-30 mg/kg) treatment alleviated the nocifensive behavior caused by acetic acid. ACEAs-BV (30 mg/kg) decrease the nocifensive behavior caused by capsaicin (TRPV1 agonist), cinnamaldehyde (TRPA1 agonist), and menthol (TRPM8 agonist), but not glutamate and acidified saline (ASICs agonist). ACEAs-BV abolished itching behavior triggered by trypsin and histamine. ACEAs-E treatment clearly diminished scratching behavior induced by SP, trypsin, histamine. The time (30 min) and concentration of capsaicin (2.5 µg/site) and cinnamaldehyde (750 nmol/site) were established as a new acute itch protocol, wherein ACEAs-E was effective in decreasing scratching behavior. Scratching behavior induced by phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), a PKC activator, was decreased by ACEAs-E. Based on results, the anti-scratching effect of EBAAs-E possibly involves the inhibition of NK-1, PAR-2/PAR-4, H1/H4, TRPV1 and TRPA1 receptors, as well as PKC. ACEAs drastically decreased the scratching behavior in the acetone/ether/water (AEW) dry skin model. Cytokines (IL-10, IL-17), NGF, antioxidant enzymes (superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and glutathione reductase), measured in the skin and spinal cord, and anxious- and depression-like behaviors were not clearly associated to ACEAs anti-scratching effect. This is the first report showing the action mechanisms of ACEAs in acute and chronic experimental models of itch in mice, which is a non-toxic potential source of new phytomedicines. Moreover, this work contribute in validation and valorization of ethnopharmacology knowledge of medicinal plants in southern Brazil.

Keywords: *Acca sellowiana*, polyphenols, antinociceptive, antiscratching, TRP, PKC, AEW.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Planta <i>Acca sellowiana</i>	29
Figura 2 – Ativadores de receptores de canais de potencial transitório (TRP).....	37
Figura 3 – Estímulos e receptores envolvidos na dor e prurido.....	39
Figura 4 - Vias de dor e prurido dependente e independente de histamina.	41
Figura 5 - Delineamento Experimental capítulo 1.	52
Figura 6 - Perfil cromatográfico do EBAAs-BV.	59
Figura 7 - Efeito do EBAAs no comportamento nocifensivo induzido por ácido acético.....	60
Figura 8 - Efeito do EBAAs-BV no comportamento nociceptivo induzido por capsaicina, cinamaldeído, mentol, glutamato e salina ácida.	61
Figura 9 - Efeito do EBAAs-BV no comportamento de coçar induzido por tripsina e histamina.	62
Figura 10 - Delineamento Experimental capítulo 2.	70
Figura 11 - Perfil cromatográfico do EBAAs-E em HPLC-DAD.....	79
Figura 12 - Ganho de peso corporal dos animais a cada 7 dias após 28 dias de tratamento com EBAAs-E ou salina.	81
Figura 13 - Efeito do tratamento com EBAAs-E sobre o comportamento de coçar induzido por SP, tripsina e histamina.	85
Figura 14 - Curva dose e tempo resposta do comportamento de coçar induzido por cinamaldeído.....	86
Figura 15 - Curva dose e tempo resposta do comportamento de coçar induzido pela capsaicina.....	87
Figura 16 - Efeito do tratamento de EBAAs-E no comportamento de coçar induzido por cinamaldeído e capsaicina.	88
Figura 17 - Efeito do tratamento do EBAAs-E sobre o comportamento de coçar induzido por PMA	89
Figura 18 - Curva tempo-resposta de EBAAs-E.	90
Figura 19 - Efeito do tratamento do EBAAs-E sobre o comportamento de coçar induzido por modelo de prurido crônico, pele seca (AEW).....	92
Figura 20 - Efeito do EBAAs-E sobre o comportamento tipo ansioso e depressivo e atividade locomotora no modelo crônico de prurido.....	94

Figura 21 - Concentração de citocinas em animais submetidos ao modelo de prurido crônico e tratados com doses repetidas de EBAAAs-E.....	96
Figura 22 - Atividade enzimática das enzimas SOD, catalase, Glutathione Peroxidase e Glutathione Redutase em animais submetidos ao modelo de prurido crônico e tratados com doses repetidas de EBAAAs-E.....	98

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Trabalhos científicos sobre a atividade biológica de extratos da planta <i>Acca sellowiana</i>	30
Tabela 2 - Perfil químico do EBAAs-BV. Compostos identificados por espectrometria de massas - UHPLC-MS/MS ESI-QTOF.....	58
Tabela 3 - Teste de toxicidade do EBAAs-BV e -E frente a nauplii de <i>Artemia salina</i>	63
Tabela 4 - Avaliação hematológica e bioquímica dos animais machos e fêmeas tratados com EBAAs-E (i.g.)	80
Tabela 5 - Consumo de água e ração de camundongos tratados com EBAAs-E por 28 dias.....	82
Tabela 6 - Avaliação da atividade motora e reatividade sensorial de animais machos e fêmeas tratados com EBAAs-E ou salina pela via intragástrica por 28 dias	83

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADR	Agência de Desenvolvimento Regional
AEW	Acetona – éter – água
AINES	Anti-inflamatório não esteroidal
ALT	Alanina aminotransferase
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ASICs	Canais detectores de íons ácidos
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Adenosina Trifosfato
BSA	Albumina de soro bovino
CAT	Catalase
CGRP	Peptídeo Relacionado ao Gene da Calcitonina (do inglês Calcitonin gene-related peptide)
COX	Ciclo-oxigenase
COX-1	Ciclo-oxigenase tipo 1
COX-2	Ciclo-oxigenase tipo 2
EA	Ácido elágico glicosídeo
EBAAs	Extrato Bruto Aquoso de Acca sellowiana
EBAAs - BV	Extrato Bruto Aquoso de Acca sellowiana – Bela Vista
EBAAs - E	Extrato Bruto Aquoso de Acca sellowiana - EPAGRI
EC	Epicatequina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EPAGRI	Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina
EPM	Erro padrão da média
ESI-	Modo de Ionização Negativa
ESI+	Modo de Ionização Positiva
GC	Galocatequina
GPCRs	Receptores acoplados a Proteína G
GPx	Glutationa peroxidase
GR	glutationa redutase
GRP	Peptídeo Liberador de Gastrina (do inglês Gastrin-

	releasing peptide)
HPLC – DAD	Cromatografia de Alta Performance – diiodo
IDHM	Índices de Desenvolvimento Humano Municipal
IFSC	Instituto Federal de Santa Catarina
IL-10	Interleucina 10
IL-13	Interleucina 13
IL-17	Interleucina 17
IL-31	Interleucina 31
IN	Instrução Normativa
IVS	Índice de Vulnerabilidade Social
Mrgprs	Receptores Mas relacionado acoplados a proteína G (do inglês Mas-related G protein–coupled receptors
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo fosfato
NGF	Fator de crescimento neuronal
NK-1	Receptor taquicinina do tipo 1
Nppb	Polipeptídeo Natriurético b (do inglês natriuretic peptide B)
OECD	Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAR	Receptores Ativados por Proteases (do inglês protease-activated receptor)
PAR-2	Receptores Ativados por Proteases do tipo 2
PAR-4	Receptores Ativados por Proteases do tipo 4
PIB	Produto Interno Bruto
PKA	Proteína cinase A
PKC	Proteína cinase C
PLC	Fosfolipase C
PMA	Forbol 12-miristato 13-acetato
PNPMF	Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
RDC	Resolução de Diretoria Colegiada
RENAFITO	Relação Nacional de Fitoterápico
RENAME	Relação Nacional de Medicamentos Essenciais

RENISUS	Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao Sistema Único de Saúde
ROS	Espécies reativas de oxigênio SNC Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
SOD	Superóxido dismutase
SP	Substância P
TRP	Receptores de Canais de Potencial Transitório
TRPA1	Receptores de Canais de Potencial Transitório Anquirina tipo 1
TRPM8	Receptores de Canais de Potencial Transitório Melastatina tipo 8
TRPV1	Receptores de Canais de Potencial Transitório Vanilóide tipo 1
TRPV4	Receptores de Canais de Potencial Transitório Vanilóide tipo 4
UDESC	Universidade do Estado de Santa Catarina
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
UHPLC/MS/MS	Cromatografia Líquida de Ultra-alta Performance/espectometria de massa

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	25
1.1 PLANTAS MEDICINAIS.....	25
1.2 <i>Acca Sellowiana</i>	27
1.3 TOXICIDADE DE PLANTAS MEDICINAIS	32
1.4 INFLAMAÇÃO, DOR E PRURIDO	34
2. JUSTIFICATIVA	45
3. OBJETIVOS	47
3.1 OBJETIVO GERAL	47
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	47
4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	49
5. CAPÍTULO 1 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA, TOXICIDADE E EFEITO ANTINOCICEPTIVO E ANTIPRURIDO DO EBAAS-BV. TOXICIDADE E EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO EBAAS-E	51
5.1 MATERIAIS E MÉTODOS	53
5.1.1 Obtenção do extrato bruto aquoso de <i>Acca sellowiana</i> (EBAAs)	53
5.1.2 Análise do EBAAs-BV em UHPLC	53
5.1.3 Análise espectrométrica de Massa - ESI-QTOF do EBAAs-BV	53
5.1.4 Parâmetros MS e MS2	54
5.1.5 Animais.....	54
5.1.6 Drogas e Tratamento.....	54
5.1.7 Nocicepção induzida por ácido acético	55
5.1.8 Nocicepção induzida por glutamato.....	55
5.1.9 Nocicepção induzida por substâncias ativadoras de canais TRPs e ASICs.....	55
5.1.10 Prurido induzido por tripsina e histamina.....	56
5.1.11 Teste de toxicidade - <i>Artemia salina</i>	56
5.1.12 Análise estatística.....	56
5.2 RESULTADOS.....	57
5.2.1 Composição química do extrato bruto aquoso de EBAAs-BV	57

5.2.2 Nocicepção causada pela injeção intraperitoneal de ácido acético.....	59
5.2.3 Nocicepção induzida por glutamato, capsaicina, cinamaldeído, mentol e salina ácida.....	60
5.2.4 Comportamento de coçar induzido pela tripsina e histamina.	61
5.2.5 Teste toxicidade com Artemia salina	63
5.3 DISCUSSÃO	63
6. CAPÍTULO 2 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA, TOXICIDADE, E OS POSSÍVEIS MECANISMOS ENVOLVIDOS NO EFEITO ANTIPRUDO DO EBAAS-E.....	69
6.1 MATERIAIS E MÉTODOS.....	71
6.1.1 Obtenção do extrato bruto aquoso de EBAAs-E.....	71
6.1.2 Análise do EBAAs-E em HPLC-DAD	71
6.1.3 Animais.....	71
6.1.4 Protocolo de toxicidade OECD	72
6.1.5 Testes comportamentais para verificação de efeitos de toxicidade no protocolo OECD	73
6.1.6 Drogas e tratamentos	74
6.1.7 Prurido induzido por SP, tripsina e histamina	75
6.1.8 Capsaicina e cinamaldeído como substâncias testes para o comportamento de coçar.....	75
6.1.9 Prurido induzido por forbol 12-miristato 13-acetato (PMA)..	75
6.1.10 Prurido crônico induzido pelo rompimento da barreira cutânea, modelo de pele seca (AEW).....	76
6.1.11 Análise das defesas antioxidantes na indução de prurido pelo modelo de pele seca (AEW).....	77
6.1.12 Dosagem de citocinas no modelo de pele seca (AEW).....	77
6.1.13 Avaliação dos animais no campo aberto após a indução de prurido crônico pelo modelo de pele seca (AEW) e tratamento com doses repetidas do EBAAs-E.....	78
6.1.14 Avaliação do comportamento do tipo depressivo no modelo AEW com doses repetidas do EBAAs-E	78
6.1.15 Análise estatística	78
6.2 RESULTADOS	79
6.2.1 Composição química do extrato bruto aquoso de Acca	

sellowiana (Myrtaceae)	79
6.2.2 OECD 407	79
6.2.3 Prurido induzido por SP, tripsina e histamina	83
6.2.4 Prurido induzido por cinamaldeído e capsaicina	85
6.2.5 Efeito do EBAAs-E no comportamento de coçar, induzido por cinamaldeído e capsaicina	88
6.2.6 Efeito do EBAAs-E no comportamento de coçar, induzido por PMA.....	89
6.2.7 Curva tempo-resposta do EBAAs-E	90
6.2.8 EBAAs-E diminui a resposta do comportamento de coçar induzido pela ruptura da barreira cutânea – modelo de pele seca (AEW).....	90
6.2.9 Efeito do EBAAs-E sobre a locomoção, o comportamento tipo ansioso e depressivo no modelo crônico de pele seca.....	92
6.2.10 Efeito do EBAAs-E sobre os níveis de citocina e fator de crescimento neuronal (NGF), na pele e medula espinal no modelo crônico de pele seca.	94
6.2.11 Efeito do EBAAs-E sobre a atividade enzimática de enzimas antioxidantes no modelo crônico de pele seca.....	97
6.3 DISCUSSÃO.....	99
6.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	104
7. CONCLUSÕES	107
REFERÊNCIAS	109
ANEXOS	129
ANEXO 1 – AUTORIZAÇÕES PARA REPRODUÇÃO DAS FIGURAS UTILIZADAS NESTA TESE.	130
ANEXO 2- CERTIFICADO DA CEUA	139

1. INTRODUÇÃO

1.1 PLANTAS MEDICINAIS

O uso de produtos naturais, principalmente de plantas com propriedades farmacológicas é uma forma tradicional de tratamento no mundo todo (DUTRA et al., 2016). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), (WHO, 2010) este tipo de tratamento inclui conhecimento, competência e práticas baseadas em teorias, crenças e experiência em diferentes situações. Utilizam-se plantas ou partes das mesmas, contendo substâncias ativas, capazes de preservar, modular ou ativar processos fisiológicos, com aplicação na prevenção, diagnóstico e tratamento de doenças físicas e/ou mentais (DUTRA et al., 2016; PLUSKAL; WENG, 2017; ZUNIC; SKRBO; DOBRACA, 2017). Tradicionalmente, os países orientais as utilizam por milênios, sendo que no ocidente, muitos países também já procuram na natureza o tratamento primário das enfermidades devido ao alto custo dos medicamentos e a baixa renda familiar, principalmente nos países em desenvolvimento como o Brasil, onde 66% da população não tem acesso a medicamentos industrializados (TROJAN-RODRIGUES et al., 2012; MAZZARI; PRIETO, 2014; ALONSO-CASTRO et al., 2017).

Na tentativa de comprovar a existência ou não das ações farmacológicas das plantas ditas medicinais utilizadas pela população, a sociedade científica tem se aproximado da sociedade em geral, tentando gerar dados que ajudem a corroborar o uso popular e promover a utilização de novas práticas de prevenção e tratamento das enfermidades que assolam o mundo atual (MEDEIROS; LADIO; ALBUQUERQUE, 2013; COLALTO, 2017; LUNDSTROM; PHAM; DINH, 2017). Assim, a partir de levantamentos etnobotânicos, as plantas são identificadas, suas partes vegetais e usos são conhecidos, divulgados para outras categorias de cientistas, que então as selecionam para objetos de pesquisa nas subáreas de atuação (HEINRICH, 2002; TROJAN-RODRIGUES et al., 2012). Várias plantas, ditas medicinais, já foram testadas e, a partir da comprovação dos seus efeitos biológicos se iniciaram estudos sobre suas substâncias ativas (HEINRICH, 2002; TROJAN-RODRIGUES et al., 2012; MEDEIROS; LADIO; ALBUQUERQUE, 2013; DUTRA et al., 2016). Diversas pesquisas estão sendo realizadas visando o entendimento das doenças e ao mesmo tempo em busca de novos fármacos que apresentem ações específicas com menor risco durante o tratamento (CORRÊA; MELO; COSTA,

2008; DE MORAIS LIMA et al., 2011; PANDA, 2014; SU et al., 2014; DUTRA et al., 2016).

A medicina tradicional no Brasil é influenciada pela enorme diversidade botânica junto a pluralidade étnica e cultural brasileira. O conhecimento indígena, a colonização africana, europeia, asiática e de outros povos latino-americanos introduziram novas cultivares medicinais e o conhecimento sobre o uso das mesmas (BALBANI, 2009; DUTRA et al., 2016). A migração urbana/rural/urbana também contribuiu para a diversidade de conhecimentos e perpetuação de conhecimentos populares sobre o uso das plantas medicinais (ABREU et al., 2015). O aspecto cultural de cada região é importante quando se trata de medicina tradicional/popular, pois é comum a variação de nomes, formas de preparação, partes das plantas a serem utilizadas e o uso de diferentes plantas para a mesma doença, pela população local (BALBANI; SILVA; MONTOVANI, 2009; MEDEIROS; LADIO; ALBUQUERQUE, 2013; FERREIRA JÚNIOR et al., 2016).

O DECRETO Nº 5.813, de 22 de junho de 2006, do governo federal do Brasil, aprovou e instituiu a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, a qual se constitui em parte essencial das políticas públicas de saúde, meio ambiente, desenvolvimento econômico e social como um dos elementos fundamentais de transversalidade na implementação de ações capazes de promover melhorias na qualidade de vida da população brasileira (MAZZARI; PRIETO, 2014).

As ações decorrentes da Política, manifestadas no Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) são imprescindíveis para: a melhoria do acesso da população aos medicamentos; à inclusão social e regional; ao desenvolvimento industrial e tecnológico; à promoção da segurança alimentar e nutricional, além do uso sustentável da biodiversidade brasileira e de sua valorização; e valorização e preservação do conhecimento tradicional associados às comunidades tradicionais e indígenas (BRASIL, 2009, p. 140). A relação nacional de plantas medicinais de interesse ao SUS (RENISUS) é fruto de ação desta política, pois promoveu a inserção dos fitoterápicos no SUS (OSHIRO et al., 2016). A RENISUS contém 71 espécies de plantas medicinais, a maioria não nativas do Brasil, as quais já eram utilizadas nos serviços de saúde estaduais e municipais, com comprovação de eficácia por meio de estudos etnofarmacológicos e estudos científicos (MAZZARI; PRIETO, 2014; OSHIRO et al., 2016). Esta relação objetiva o desenvolvimento de toda cadeia produtiva relacionada à regulamentação, cultivo, manejo, produção, comercialização e dispensação de plantas medicinais (em especial as

nativas) e fitoterápicos e orientar estudos e pesquisas que possam subsidiar a elaboração da RENAFITO (Relação Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos). Das 71 espécies de plantas presentes na RENISUS, 12 já integram a relação nacional de medicamentos essenciais (RENAME), fruto de pesquisas relacionadas a comprovação e sistematização de informações científicas e publicações na área de medicamentos e insumos estratégicos para o SUS (BRASIL, 2012). A RENAME é uma lista de medicamentos que deve atender às necessidades de saúde prioritárias da população brasileira. Essa seleção de medicamentos essenciais é proposta da OMS como uma das estratégias da sua política de medicamentos para promover o acesso e uso seguro e racional de medicamentos.

No bioma da floresta Atlântica e dos Pampas, espécies exóticas são mais utilizadas do que espécies nativas. Isto pode ser explicado pela colonização europeia nestes locais, bem como pela influência da escola europeia na formação acadêmica de nossos profissionais da saúde e dos pesquisadores ao longo da nossa história (MAZZARI; PRIETO, 2014; DE MEDEIROS et al., 2017). O Brasil é o país com a maior diversidade genética vegetal do mundo, estimado entre 20–22% de todas as espécies conhecidas (DUTRA et al., 2016). Em contrapartida, apenas 8% das espécies vegetais da flora brasileira foram estudadas em busca de compostos bioativos e o mercado de fitoterápicos representa menos de 5% do mercado de medicamentos no Brasil (SIMÕES, 2004; DUTRA et al., 2016). Estes dados demonstram claramente a necessidade de investimentos em pesquisa de fitoterápicos pertencentes às espécies da flora nacional, ditas nativas dos nossos biomas (CARVALHO et al., 2008; MIOTO, 2010). A região do Planalto Serrano Catarinense possui uma cultura muito rica em relação à utilização de plantas medicinais em seu cotidiano, porém ainda carecendo de estudos mais detalhados sobre suas aplicações, princípios ativos e mecanismos de ações (AMORIM, 2010).

1.2 *Acca Sellowiana*

No planalto serrano catarinense é comum o uso de plantas medicinais pela população local sendo conhecida como “medicina campeira”. Estudos sobre estas plantas e suas aplicações estão sendo desenvolvidos por instituições de ensino e pesquisa do estado com o objetivo de comprovar o seu uso medicinal e implantá-las em sistemas produtivos da região. A utilização das mesmas no desenvolvimento de sistemas produtivos de base ecológica é uma alternativa interessante

para o produtor do ponto de vista econômico, social e ambiental. Com o uso medicinal é possível agregar renda na produção, resgatar a cultura popular e preservar a biodiversidade regional. Entre as espécies com uso popular, que atende ao sistema produtivo da região, podemos citar a *Acca sellowiana*, utilizada na medicina campeira, mas sem comprovação dos efeitos biológicos da planta cultivada na região. A *Acca sellowiana* (goiaba serrana) pertence à família Myrtaceae. Grande parte das espécies pertencentes a esta família, apresenta atividade biológica comprovada, destacando-se as atividades anti-reumática, antidiabética, antimicrobiana, antiprurídica, analgésica, antioxidante, diurética e reguladora do sistema digestivo (FITZI et al., 2002; WALTON et al., 2004; SERAFIN et al., 2007; CHOI et al., 2012; AZEVEDO et al., 2016; RALI et al., 2016; ZUNTINI VISCARDI et al., 2017).

Esta planta foi descrita em 1859 a partir de um material encontrado em um herbário, coletado pelo botânico Friedrich Sellow, no Rio Grande do Sul, em 1819. Popularmente, é conhecida por goiabeira serrana, goiabeira do mato, goiabeira do campo, goiabeira-abacaxi, araçá do rio grande, goiaba-silvestre, “guayabo” e internacionalmente por feijoa (VELHO, 2009). É nativa do planalto meridional brasileiro e nordeste do Uruguai. No Sul do Brasil, a espécie mostra-se adaptada às condições de clima frio, ocorrendo com maior frequência em áreas com altitudes superiores a 800 m (AMARANTE; SANTOS, 2011). É uma árvore de baixo porte, com frutos de formato arredondados a oblongos, de casca de cor verde, de aspecto liso à rugoso, com polpa de cor gelo, de sabor doce-acidulada (Figura 1). A maturação da goiaba serrana se dá, na serra catarinense, entre fevereiro e maio (AMARANTE; SANTOS, 2011). Os frutos possuem grande potencial comercial, devido às suas propriedades organolépticas (WESTON, 2010; AMARANTE; SANTOS, 2011). O fruto da goiabeira serrana é rico em iodo, fibras, vitamina C, ácido cítrico e sais minerais (BOHNEBERGER, 2009; WESTON, 2010).

Figura 1 – Planta *Acca sellowiana*.



Legenda: Imagem do porte da árvore, aspecto das flores e folhas e frutos da planta *Acca sellowiana*.

Fonte: <http://noticias.ufsc.br/2007/03/ufsc-e-epagri-lancam-especies-melhoradas-da-goiabeira-serrana/>;

<http://www.viveirozimmer.com.br/produtosimagens.php?idIm=321>;

<http://institutoaraba.blogspot.com.br/2013/02/feijoa-e-recomendada-para-cidade.html>.

Acessada no dia 30/01/2018.

Há relatos do uso popular de folhas desta planta como antitussígeno na Índia, e na China como anti-inflamatório e agente hemostático, vasoconstritor (IHA et al., 2008). A população da serra catarinense cita o uso de infusão ou decocção das folhas da planta no combate de diarreias, infecção intestinal, feridas, hemorragias, dores de garganta, problemas de estômago e anemia (BOHNEBERGER, 2009; AMORIM, 2010; SOUZA et al., 2011).

Dentre os poucos trabalhos científicos existentes sobre a *A. sellowiana* e seus efeitos biológicos, destacam-se os que utilizam extratos metanólicos e cetônicos de frutos (principalmente) e de folhas, descritos na tabela abaixo:

Tabela 1 - Trabalhos científicos sobre a atividade biológica de extratos da planta *Acca sellowiana*.

Material planta	Substância extratora	Efeito Biológico	Referência bibliográfica
Fruto	Água	Antimicrobiano e antioxidante (bactérias gram positivas e negativas; leucócitos humanos)	VUOTTO, et al., 2000
Fruto	Acetona	Anticancerígeno (cultura de células)	BONTEMPO et al., 2007
Fruto	Acetona	Antiinflamatório (cultura de células)	ROSSI, et al., 2007
Fruto	Acetona	Antibacteriano e antifúngico (bactérias Gram positivas / negativas e leveduras)	BASILE et al., 2010
Fruto	Metanol	Hepatoproteção (fígado isolado)	KARAMI; SAEIDNIA; NOSRATI, 2013
Folhas	Metanol e água	Nefroproteção (camundongos albinos)	KARAMI et al., 2014
Fruto	Água	Antiinflamatória (ratos Wistar e neutrófilos humanos)	MONFORTE et al., 2014
Fruto e folhas	Metanol	Antidepressiva (camundongos albinos)	MAHMOUDI et al., 2015
Folhas	Aquoso	Antifúngica	MACHADO et al., 2016
Frutos	Acetona	Antioxidante e aumento atividade dissacaridases (células intestinais)	TURCO et al., 2016

Fonte: A autora (2018)

Estudos fitoquímicos destes extratos citam a presença de terpenos, saponinas e de compostos fenólicos (LAPČÍK et al., 2005; MACHADO et al., 2016). Estas substâncias são provenientes do metabolismo secundário das plantas, sendo as principais responsáveis pelas ações biológicas descritas no uso medicinal (RUBERTO; TRINGALI, 2004a; TUNCEL; YILMAZ, 2015; UPADHYAY; DIXIT, 2015; ALTEMIMI et al., 2017). Sabe-se que as condições climáticas regionais, tais como temperatura, luminosidade e altitude, aliadas às condições edáficas encontradas no solo, como pH, disponibilidade de nutrientes e umidade, influenciam no rendimento e na qualidade destas substâncias (BASER; BUCHBAUER, 2009; SILVA et al., 2014), justificando um trabalho

interdisciplinar nas pesquisas científicas e de desenvolvimento de novos produtos para a saúde (ROUFOGALIS; CONIGRAVE; STREHLER, 2013; ATANASOV et al., 2015; DUTRA et al., 2016; COLALTO, 2017; LUNDSTROM; PHAM; DINH, 2017).

Os compostos fenólicos, fenóis simples ou polifenóis, são os maiores constituintes de plantas e são consumidos por humanos em comidas e bebidas. Os fenóis livres parecem ser rapidamente absorvidos pelo trato gastrointestinal humano, contudo fenóis pouco solúveis ou insolúveis requerem maior metabolismo antes da absorção (MEYDANI, 2009). Considerados moléculas potentes, os polifenóis têm recebido destacada atenção por suas significantes funções biológicas, pois possuem vários alvos celulares e podem ser usados para o tratamento de diversas doenças, entre elas, doenças inflamatórias e pruridogênicas (ALTEMIMI et al., 2017; GANZERA; SHARMA et al., 2017; STURM, 2018).

A Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina (Epagri) e instituições de ensino da região serrana de Santa Catarina (Instituto Federal de Santa Catarina - IFSC, Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC e Universidade do Estado de Santa Catarina - UDESC) investem em pesquisas e projetos de extensão no resgate das tradições regionais através do levantamento etnobotânico e no incentivo ao cultivo das plantas nativas da serra catarinense. O cultivo da *Acca sellowiana* é um exemplo deste trabalho, onde a seleção genética de plantas de alta produtividade, frutos mais adocicados e plantas de menor altura foram destinadas a implementação de produção de pequena a média escala com o objetivo comercial e pulverização da produção além da região local. Em 2014, registrou-se 15 pequenos produtores destes frutos, os quais cultivaram 9,4 hectares de área total, com produção de 62.2 toneladas/ano, preço venda ponderado/Kg de R\$ 3,51 (GOULART JÚNIOR; MONDARDO; REITER, 2017). A agência de desenvolvimento regional (ADR) de Lages apresenta situação inferior à média do Estado de Santa Catarina, tanto em relação a índices de desenvolvimento humano municipal (IDHM) quanto ao índice de vulnerabilidade social (IVS). Tanto o produto interno bruto (PIB) per capita quanto a renda domiciliar per capita são inferiores às médias de Santa Catarina, ocupando a 27ª e 21ª posição, respectivamente, dentre as 36 regiões do estado (SECRETARIA DE PLANEJAMENTO DE SANTA CATARINA, 2016). Levando isso em consideração, o cultivo da *A. sellowiana*, pode ser mais uma alternativa de renda para pequenas e médias propriedades rurais desta região.

1.3 TOXICIDADE DE PLANTAS MEDICINAIS

A valorização do conhecimento popular sobre plantas medicinais e a busca da vida saudável, elevou em 10,5% o uso de fitoterápicos nos últimos cinco anos (TABACH; RAVASI, 2012). Ao mesmo tempo houve aumento do número de casos de reações adversas causado pelo consumo dos mesmos, já que as plantas medicinais são consideradas desprovidas de toxicidade (SILVEIRA; BANDEIRA; ARRAIS, 2008; MAZZARI; PRIETO, 2014). Apesar da sensação de segurança, os efeitos tóxicos apresentados pelas mesmas são tão graves quanto os causados pelos medicamentos convencionais, sendo considerado um problema de saúde pública.

Plantas medicinais podem desencadear efeitos indesejáveis devido a seus próprios constituintes, por presença de contaminantes químicos ou biológicos, interações com outros medicamentos ou alimentos, ou ainda relacionados a características intrínsecas ao paciente (idade, sexo, condições fisiológicas, características genéticas (WHO, 2004; ALONSO-CASTRO et al., 2017). Os principais efeitos tóxicos são: náuseas e vômitos, dermatite, queimadura de pele, gastrite, dor abdominal, hepatotoxicidade, diarreia severa, aborto, cardio e nefrotoxicidade, entorpecimento, tontura e alucinações (ALONSO-CASTRO et al., 2017). Outro risco associado ao uso das plantas medicinais é o uso do etanol como solvente, podendo trazer riscos à saúde quando utilizados em crianças, gestantes, lactantes, pacientes com distúrbios hepáticos e dependentes em álcool (ANVISA, 2009; BALBINO; DIAS, 2010).

Erros de diagnóstico, identificação incorreta de espécies de plantas medicinais e uso diferente da forma tradicional podem ser perigosos, levando a superdose, inefetividade terapêutica e reações adversas (WHO, 2002). Além disso, o desconhecimento médico sobre os efeitos e riscos de uso das plantas medicinais, aliados a descrença por parte da população do risco associado a este tratamento, dificultam a identificação dos eventos adversos das mesmas (BALBINO; DIAS, 2010). Um terço das notificações de eventos adversos refere-se a plantas medicinais ou seus derivados, sem registro na ANVISA, evidenciando a existência de uma ampla rede de distribuição de difícil controle e de conhecimento associado à população local (BALBINO; DIAS, 2010).

Após o reconhecimento do risco e do uso incontrolável das plantas medicinais em conjunto com outros medicamentos, a OMS, em 2004, publicou o “Guia de monitoramento seguro de plantas medicinais em sistemas de farmacovigilância” (do inglês “Guidelines on safety

monitoring of herbal medicines in pharmacovigilance systems”), o qual dá orientações sobre o registro das plantas medicinais em um sistema único facilitando a troca de informações entre os países membros da OMS (WHO, 2004; MAZZARI; PRIETO, 2014). Além disso, a OMS criou um guia estratégico de políticas públicas para o uso racional e integrado da medicina tradicional e medicina complementar/alternativa (WHO Traditional Medicine Strategy 2002–2005 e, mais recentemente, o WHO Traditional Medicine Strategy 2014–2023) objetivando a construção de conhecimento base para formulação de políticas nacionais, legislações que garantem segurança, qualidade e eficácia de medicamentos tradicionais e a integração da medicina tradicional no sistema de saúde (OSHIRO et al., 2016).

Seguindo esta linha e devido a escassez de pesquisas sobre a avaliação da segurança e controle da comercialização das plantas medicinais no Brasil (JUNIOR et al., 2005), a ANVISA publicou e atualizou uma série de resoluções de diretoria colegiada (RDC) sobre este item. Além da RDC nº 26/2014, outras normas complementam as orientações quanto ao registro de medicamentos fitoterápicos e produtos tradicionais fitoterápicos, tais como: a RDC nº 66/2014, alteração do Anexo IV da RDC nº 26/2014; a instrução normativa (IN) nº 02/2014, publicação da "Lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado" e da "Lista de produtos tradicionais fitoterápicos de registro simplificado", atualizada pela IN 10/14; a IN nº 04/2014, que determina a publicação do Guia de orientação para registro de Medicamento Fitoterápico e registro e notificação de Produto Tradicional Fitoterápico; a IN nº 05/2014 e RDC nº 38/2014, relacionada ao Histórico de Mudanças do Produto e o prazo de análise das petições pós-registro de medicamentos fitoterápicos e produtos tradicionais fitoterápicos (ANVISA, 2015) e, as RDC Nº 105, de 31 de agosto de 2016 e RDC Nº 93, de 12 de JULHO de 2016 que alteram a RDC nº 26/2014, no quesito análises de resíduos agrotóxicos ou produção orgânica e prazo de avaliações (ANVISA, 2016a, 2016b). Estas resoluções, tentam promover a entrada de medicamentos fitoterápicos ou drogas vegetais com segurança, eficácia e qualidade, no mercado brasileiro.

Aliado a existência de regulamentações e leis, treinamento dos profissionais de saúde, campanhas educativas e maior integração entre registro, inspeção e farmacovigilância são necessárias para minimizar os riscos do uso de plantas medicinais no Brasil. Além disso, é imprescindível que trabalhos científicos incluam dados quanto a toxicidade, auxiliando assim, na rede de informações sobre as plantas

medicinais brasileiras, trazendo segurança para os usuários e os profissionais da área da saúde.

1.4 INFLAMAÇÃO, DOR E PRURIDO

A inflamação é um processo imunológico complexo pelo qual o corpo responde a um estímulo por bactérias, vírus ou a agentes químicos ou físicos (CHIU, 2017; JULIER et al., 2017).

A ativação da resposta imune inata é mediada por fagócitos num processo finamente regulado. São os fagócitos teciduais que primeiro detectam qualquer perturbação imune através de seus receptores (GRAYFER; HODGKINSON; BELOSEVIC, 2014). A produção de uma cascata de eventos celulares locais e no Sistema Nervoso Periférico (SNP), incluem a ativação de vários tipos celulares tais como, linfócitos T, monócitos, células dendríticas, neutrófilos e mastócitos (GRAYFER; HODGKINSON; BELOSEVIC, 2014; JULIER et al., 2017), os quais liberam mediadores inflamatórios, neurotransmissores e neuropeptídios integrando o sistema nervoso periférico (SNP), através dos nervos periféricos/gânglio dorsal da medula espinal e sistema nervoso central (SNC) (WHITE; BHANGOO; MILLER, 2005; DINAKAR; STILLMAN, 2016), conduzindo a percepção de dor e prurido (DINAKAR; STILLMAN, 2016; LUO et al., 2015).

Dor e prurido são mecanismos vitais que ativam mecanismos de defesa mantendo a integridade do organismo que desencadeiam sensações nitidamente diferentes e de fácil distinção entre elas (MOORE et al., 2017). Ambos são aversivos, mas possuem comportamentos distintos: dor provoca uma resposta de isolamento, de quietude e o prurido provoca o desejo e uma resposta ativa de coçar (LUO et al., 2015; TSUDA, 2017).

A dor é a causa mais comum de queixa na clínica médica. Tanto a dor aguda quanto a crônica causam desajuste econômico e social. Perda de horas de trabalho, excedendo 50 milhões em faltas de dias de trabalho, geram perda de produtividade e aumento de custo de produção. O custo total direto e indireto da dor excede o custo das principais doenças: cardiovascular, neoplasia e intoxicação. É a causa mais comum de incapacidade e de muitas co-morbidades associadas a ela. Entre as co-morbidades estão o uso e abuso de opióides (dependência), depressão, escassas relações sociais e dificuldades financeiras (DINAKAR; STILLMAN, 2016).

Dor é definida pela Associação Internacional para o estudo da dor (International Association for the Study of Pain - IASP) como “uma

experiência sensorial e emocional desagradável associada com real ou potencial dano tecidual”. A dor é gerada em resposta a um estímulo tecidual danoso e é essencial para a manutenção ou integridade física (FOSTER et al., 2015). Sinais dolorosos gerados pelo dano tecidual são detectados por nociceptores, os quais conduzem os sinais para o SNC transmitindo a experiência sensorial e emocional desagradável (VALTCHEVA et al., 2015; DINAKAR; STILLMAN, 2016).

Prurido foi definido há mais de 340 anos pelo médico alemão Samuel Hafenreffer como "uma sensação desagradável que provoca o desejo ou reflexo de coçar", sendo válida até os dias atuais (HAN; DONG, 2014; LAMOTTE; DONG; RINGKAMP, 2014). O prurido é aliviado pelo ato de coçar e serve como auto-proteção contra algum agente externo, quando na forma aguda. Ela existe transversalmente entre as espécies, desde pássaros até humanos (KITAKA; TOMINAGA, 2017; KOCH; ACTON; GOULDING, 2018; PLUSKAL; WENG, 2017; TSUDA, 2017). Evidências recentes indicam a existência de circuitaria neuronal distinta no sistema nervoso central e periférico para dor e prurido (HAN; DONG, 2014; FOSTER et al., 2015; CHUQUILIN; ALGHALITH; FERNANDEZ, 2016; KOCH; ACTON; LAVERY et al., 2016; MEIXIONG; DONG, 2017; TSUDA, 2017; GOULDING, 2018).

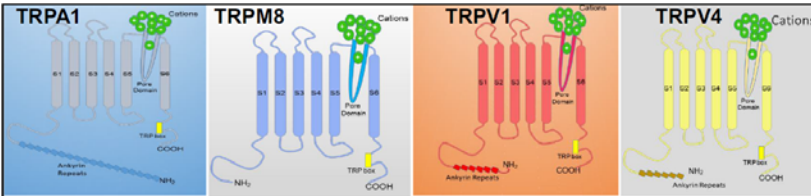
Os dois principais tipos de nociceptores que detectam sinais dolorosos e de prurido são fibras C não mielinizadas, com a presença de receptores Mas relacionado acoplado a proteína G (Mrgpr, do inglês Mas-related G protein-coupled receptors) e fibras A δ mielinizadas, com a presença do peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e/ou Substância P (SP) (HAN; SIMON, 2011; CHUQUILIN; ALGHALITH; FERNANDEZ, 2016; KOCH; ACTON; GOULDING, 2018). Estas fibras nervosas usam sinais elétricos, potenciais de ação, para conduzir informações nocivas rapidamente ao cérebro (CARSTENS; AKIYAMA, 2014; LAVERY et al., 2016). Os canais iônicos expressos nas fibras sensoriais são cruciais na condução da informação e integram várias modalidades sensoriais, tais como temperatura, osmolaridade, presença de prótons e de mediadores inflamatórios (LEVINE; ALESSANDRI-HABER, 2007). Dentre os canais iônicos destacam-se os receptores de canais de potencial transitório (TRP), através de seus representantes: TRPV1-4 (vanilóide), TRPA1 (anquirina) e TRPM8 (melastatina) (Figura 2), os quais têm papel fisiológico no calor, frio, dor, prurido e inflamação (DAI, 2016; HUANG et al., 2017). Além disso, também expressos nas fibras sensoriais, os canais de adenosina trifosfato (ATP) e canais detectores de íons ácidos (ASICs), também são cruciais e

integram várias modalidades sensoriais, tais como temperatura, mediadores inflamatórios, prótons e osmolaridade (LEVINE; ALESSANDRI-HABER, 2007). A abertura desses canais causa o influxo de cátions que despolariza neurônios sensoriais, disparando a sensação de dor e de prurido (LUCACIU; CONNELL, 2013; HUANG et al., 2017).

A transdução e geração de sensações de dor e prurido envolvem muitas moléculas, células e circuitos neurais periféricos, em diferentes níveis da medula espinal e no cérebro. Dinâmicas interações entre células residentes na pele (queratinócitos, células de Merkel, células do sistema imunológico inatas e adaptativas, etc.) e terminações nervosas sensoriais, influenciam os sentidos do tato, dor e prurido (LUO et al., 2015; CHUQUILIN; ALGHALITH; FERNANDEZ, 2016; GREEN; DONG, 2016). A atividade destas células e do SNC é controlado por um delicado equilíbrio entre eventos excitatórios e inibitórios que atuam em conjunto para a fina sintonia da transmissão da dor e do prurido no sistema nervoso central (SNC) (ZHAO et al., 2014a, 2014b). Isto se dá pela ativação dos canais iônicos de membrana, receptores acoplados a proteína G (GPCRs), receptores de citocinas e outros receptores tirosina cinase (HOON, 2015). GPCRs regulam a sinalização fosfolipase A₂, fosfolipase C (PLC) / Cálcio (Ca⁺²) / proteínas cinases C e A (PKC e PKA) e TRPs (Figura 2) (AKIYAMA; CARSTENS, 2013; GEPPETTI et al., 2015; VALTCHEVA et al., 2015; ZHANG, 2015).

A liberação de mediadores inflamatórios e outros mediadores derivados de células imunes epiteliais pode ativar prurido e dor pela ativação de nervos periféricos. Essas células aumentam a concentração de substâncias endógenas como histamina, triptases, serotonina e SP, responsáveis por eventos dolorosos e pruridogênicos (Figura 3) (KIDO-NAKAHARA et al., 2017). Neurônios sensoriais derivados de taquicininas são críticos na inflamação neurogênica, dor e prurido pela liberação de SP via SNP e SNC (AKASAKA et al., 2011).

Figura 2 – Ativadores de receptores de canais de potencial transitório (TRP)



	TRPA1	TRPM8	TRPV1	TRPV4
Roles in:	Universal chemo-irritant receptor Nociceptive Pain Inflammatory Pain Hereditary Episodic-Pain Syndrome Headaches/-Migraine Itch	Cold Sensor-menthol receptor Cold hypersensitivity Neuropathic Pain Orofacial Pain Headaches/-Migraine Itch	Noxious Heat Sensor Neuropathic Pain Inflammatory Pain Visceral Pain Itch	Osmo-mechano TRP-algo-pruriceptor TRP Mechanically-evoked pain Inflammatory pain Neuropathic pain Visceral pain Trigeminal pain (incl. headache/temporo-mandibular-joint) Itch
Agonists:	Mustard Oil Cinnamaldehyde Allicin 4Hydroxynonenal 2Chloroacetophenone	Menthol Icilin PUFAs LPC	<u>Pain:</u> Capsaicin Allicin LPA Anandamide <u>Itch:</u> Imiquimod Histamine IL-31	pro-pain prostanoid e.g. 5,6-EET, PGE2 endothelin serotonin histamine
Positive Regulation:	Bradykinin Chloroquine Endothelin Bile acid Serotonin TSLP LPA	Artemin NGF PLC PKC	PKA PKC NGF PLA2 MAPK PI3K	PKC PLC PI3K MAPK PAR-2

Legenda: Estímulos nocivos e temperaturas ativam receptores de canais de potencial transitório (TRPs). São apresentados os processos (*roles in*) de dor (*pain*) e prurido (*itch*) em que estes receptores estão envolvidos, bem como os agonistas (*agonists*) e as substâncias que os regulam positivamente (*positive regulation*).

Fonte: Adaptado de Moore, et al. (2017).

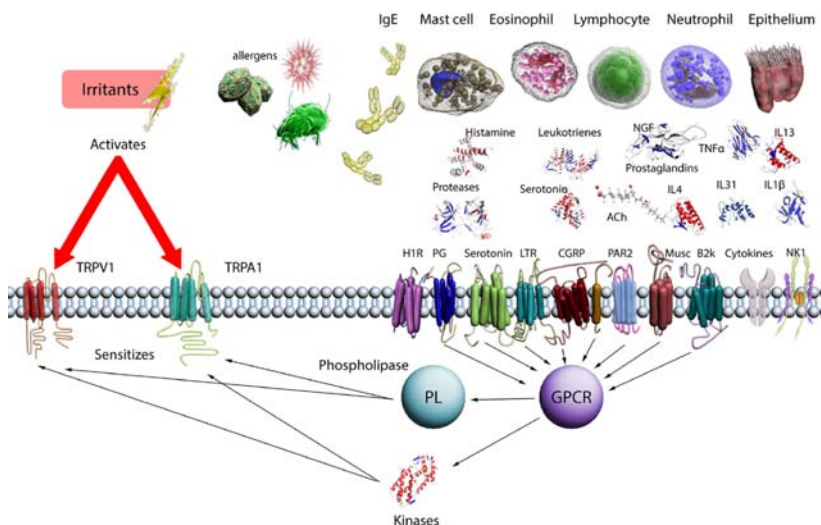
Receptores histaminérgicos H1 e H4 e, receptores ativados por proteases (PAR, do inglês protease-activated receptor) tipo 2 e tipo 4 ativam tipos distintos de fibra aferente que desencadeiam o prurido, chamadas de fibra histamina-dependente e histamina-independente, respectivamente (Figura 4) (COSTA et al., 2008; AKIYAMA; CARSTENS, 2013; KEMPKES et al., 2014). PAR são receptores ligados a proteína G e indutores conhecidos de processos inflamatórios, dolorosos e pruridogênicos (COSTA et al., 2008; PATRICIO et al., 2015; KIDO-NAKAHARA et al., 2017).

Histamina é uma monoamina indutora de inflamação, dor e prurido pela estimulação de fibras sensoriais do tipo C não mielinizadas. A maior parte do estoque da histamina provém de grânulos presentes em mastócitos. O receptor H1 ativado, estimula a via da fosfolipase A2, o qual sensibiliza/ativa TRPV1 (LUO et al., 2015, BENLY et al., 2015, SAJID et al., 2017).

PAR-2 é um dos principais indutores de dor e prurido, através de alterações dependentes de AMPc e ativação de canais TRPV1, TRPA1 e TRPV4 (LUO et al., 2015). Ele está presente em queratinócitos e neurônios pruriceptivos no gânglio da raiz dorsal (DRG) (COSTA et al., 2008; AZIMI; PATRICIO et al., 2015; XIA; LERNER, 2016; WONG; WU; LEE, 2017). Triptases liberadas de mastócitos, ligam-se a PAR-2 em neurônios e iniciam a cascata de sinalização via TRPV1/TRPV4, estimulando a liberação de CGRP o qual se liga aos seus receptores presentes em mastócitos, levando a degranulação dos mesmos, liberando histamina, proteases, triptases e serotonina, mediadores lipídicos, neuropeptídeos e várias citocinas (Figura 3), todos importantes mediadores de dor e prurido (LUO et al., 2015). Além desses receptores, os Mrgprs também são importantes receptores de nocicepção, sendo considerados sensores ambientais. Eles são expressos em neurônios sensoriais, mastócitos e gânglio da raiz dorsal. São ativados por histamina ou por proteases e SP pela via histamina-independente (AZIMI et al., 2017; TSUDA, 2017). Trabalhos tem mostrado que ativação de Mrgprs tem como alvo TRPA1 para a indução de prurido (LUO et al., 2015).

A ativação dos receptores NK-1 e Mrgpr por SP produz prurido pela liberação de histamina de mastócitos e, pela ativação desses mesmos receptores na medula espinal (HAN; DONG, 2014; LUO et al., 2015; AZIMI; XIA; LERNER, 2016). O receptor NK-1 está presente em mastócitos, queratinócitos e terminações nervosas e quando ativado libera mais mediadores indutores de dor e prurido, por sensibilização de TRPV1, provavelmente por fosforilação mediado por PKC ϵ (LUO et al., 2015; MOLLANAZAR; SMITH; YOSIPOVITCH, 2016).

Figura 3 – Estimulos e receptores envolvidos na dor e prurido.



Legenda: Há dois tipos de receptores envolvidos no prurido e dor, receptores acoplados a proteína G (GPCRs) e receptores de canais de potencial transitório (TRP). As células envolvidas incluem mastócitos (*mast cells*), eosinófilos (*eosinophils*), linfócitos (*lymphocytes*), neutrófilos (*neutrophils*) e células epiteliais (*epithelium*). Dentre as moléculas capazes de ativar estes receptores, estão histamina (*histamine*), proteases, serotonina (*serotonin*), leucotrienos (*leukotrienes*), fator de crescimento neuronal (NGF), prostaglandinas (*prostaglandins*), acetilcolina (ACh) e citocinas (TNF- α , IL-4, IL-31, IL-1 β , IL-13). A sensação de dor e prurido pode ser induzida pela ativação direta de ambos GPCR ou canais TRP. Além do mais, GPCRs podem ativar indiretamente canais TRP, via sistemas ligados a cinases (*kinases*) e/ou fosfolipases (*phospholipase*), resultando em sensibilização (*sensitizes*) o que reduz o limiar de ativação (*activates*) de TRPA1 e TRPV1 por irritantes (*irritants*) físicos, mecânicos endógenos e exógenos e, químicos exógenos.

Fonte: Adaptado de Mollanazar et al. (2016)

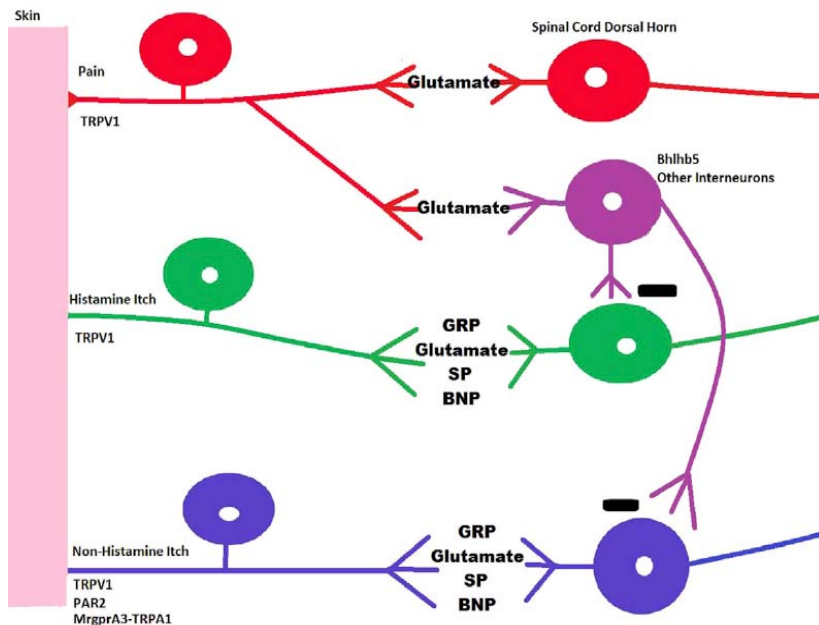
A via de prurido histaminérgica, tem como alvo direto o TRPV1, a via não histaminérgica o TRPA1 (Figura 4) (AKIYAMA; CARSTENS, 2013; KIDO-NAKAHARA et al., 2017; KITAKA; TOMINAGA, 2017). O TRPV1 e o TRPA1 são regulados por proteína cinase C (PKC) e proteína cinase A (PKA) (SPAHN; STEIN; ZÖLLNER, 2014; KITAKA; TOMINAGA, 2017; PETER et al., 2017). Os receptores TRPV1 são frequentemente encontrados em populações não neuronais de células da pele, mastócitos e fibras C e A δ na via sensorial

nociceptiva. É ativado por inúmeras moléculas envolvidas no dano tecidual e inflamação, como: bradicinina, prostaglandinas, espécies reativas de oxigênio (ROS) e tripsina (TÓTH et al., 2014; LUO et al., 2015; CATERINA; PANG, 2016). O TRPA1 está presente em nervos sensoriais, mastócitos e queratinócitos (ATOYAN; SHANDER; BOTCHKAREVA, 2009; CATERINA; PANG, 2016). Pode ser ativado ou modulado por muitas vias sinalizadoras, servindo como um mediador generalizado para moléculas indutoras de prurido como: endotelina-1, espécies reativas de oxigênio (ROS), linfopoetina estromal tímica, interleucina 31 (IL-31), interleucina 13 (IL-13), leucotrieno B4 e ácidos biliares (LUO et al., 2015) (Figura 3). A presença de receptores TRPV1 e TRPA1 além das fibras sensoriais indicam que os mesmos podem desencadear de forma direta a sensação de dor e de prurido.

O prurido pode ser inibido pelo estímulo doloroso, sendo dependente de glutamato (LUO et al., 2015; CHUQUILIN; ALGHALITH; FERNANDEZ, 2016). O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso de vertebrados. Está envolvido com indução de dor causada por estímulo térmico, mecânico, químico e prurido. Inibição de glutamato, leva a diminuição do estímulo doloroso, aumento exagerado de prurido por sensibilização de múltiplas vias com desenvolvimento de excessivo prurido espontâneo (LAGERSTRÖM et al., 2010; LIU et al., 2010; LUO et al., 2015). O ato de coçar alivia o prurido pela ação de receptores inibitórios dentro da medula espinal ou pela modulação descendente (do inglês downstream) da região supra espinal. Isto explica como o ato de coçar produz dor e isso leva ao alívio do prurido (SPIEGEL et al., 2017). Esse mecanismo parece estar ligado a ativação de interneurônios inibitórios pelo glutamato na medula espinal (Figura 4). Os neuropeptídeos, peptídeo liberador de gastrina (GRP) e polipeptídeo natriurético b (Nppb) são vitais na transmissão do estímulo pruridogênico (HUANG et al., 2017).

Também é possível que pruridos infecciosos e dores estejam anatomicamente intrincados, co-relacionados: invasão patogênica da epiderme pode levar ao prurido, enquanto infecções mais profundas ou viscerais podem produzir dor (TSUDA, 2017).

Figura 4 - Vias de dor e prurido dependente e independente de histamina.



Legenda: Ativação de receptores de dor (*pain*) e de prurido (*itch*) ativam as fibras sensoriais do tipo C e Aδ na condução de dor e prurido ao corno dorsal da medula espinhal através de vias próprias e independentes. O prurido pode ser conduzido pela via histaminérgica (*histamine itch*) ativando receptores de potencial transitório do tipo V1 (TRPV1) ou não histaminérgica (*non-histamine itch*), ativando receptores de potencial transitório do tipo A1 (TRPA1), TRPV1, receptores ativados por proteases (PAR-2) e receptor Mas relacionado e acoplado a proteína G (Mrgpr). Glutamato (glutamate) no corno dorsal da medula espinhal (*spinal cord dorsal horn*) ativa a transmissão do impulso de dor e ativa interneurônios inibitórios (*Bhlhb5 – other interneurons*) que inibem a transmissão do impulso das fibras sensoriais de prurido. Peptídeo liberador de gastrina (GRP), peptídeo natriurético B (BNP) e substância P (SP) participam da transmissão do impulso de prurido.

Fonte: Adaptado de Chuquilin, 2016

O prurido é o sintoma mais comum em dermatologia e afeta milhões de pessoas no mundo. Estima-se que mais de 1/3 desses pacientes apresente prurido crônico e que 1/5 da população tenha grande prejuízo da qualidade de vida (KANEHISA et al., 2017; PEREIRA; STÄNDER, 2017). O prurido crônico é entendido como uma experiência sensorial desagradável, persistente por mais de 6 semanas,

tendo várias causas como fatores desencadeantes (PEREIRA; STÄNDER, 2017), tais como, doenças da pele, doenças sistêmicas e disfunções metabólicas (IKOMA et al., 2006; LUO et al., 2015; KANEHISA et al., 2017; PEREIRA; STÄNDER, 2017; TSUDA, 2017). O prurido pode levar a ansiedade severa, depressão, prejuízo do sono, auto-mutilação e como consequência prejuízo total da qualidade de vida e comprometimento social, comparável com a dor crônica (LUO et al., 2015; VALTCHEVA et al., 2015; PEREIRA; STÄNDER, 2017). Enquanto o ato de coçar alivia o prurido agudo, o persistente ciclo prurido-coçar, aumenta o problema de pele e reduz a qualidade de vida (TSUDA, 2017).

Enquanto os custos gerados pela dor crônica são estimados em \$560–635 bilhões de dólares por ano nos Estados Unidos, o custo do prurido crônico não possui estimativa. O tratamento para dor e prurido crônico são ainda desafiadores. O tratamento para dor limita-se aos antiinflamatórios não esteroidais, esteroidais, opioides, antidepressivos e antiepiléticos (BRASIL, 2012, p. 140). Para o prurido crônico a situação é ainda pior, já que nenhum tratamento atual é universalmente aceito, embora alguns medicamentos tópicos ou sistêmicos sejam utilizados (AKIYAMA; CARSTENS, 2013). Os tratamentos utilizados limitam-se a anti-histamínicos, corticóides, antidepressivos ou antiepiléticos (AHUJA et al., 2011; LUO et al., 2015). Entretanto, a eficácia desses medicamentos é limitada além de severos efeitos colaterais associados ao uso de antidepressivos, antiepiléticos e corticóides (LUO et al., 2015; KANEHISA et al., 2017). Assim, tratamentos mais efetivos e seguros são necessários para a melhora da qualidade de vida destes pacientes. Normalmente, o uso de antihistamínicos no tratamento do prurido crônico são inefetivos. Isto sugere a participação de vias não-histaminérgicas (AHUJA et al., 2011; LUO et al., 2015; KANEHISA et al., 2017; ZHOU et al., 2017), através de TRPV1 e TRPA1 (LUO et al., 2015; ZHOU et al., 2017) no mecanismo que desencadeia esta enfermidade. Dentre os tratamentos alternativos destaca-se o uso das plantas medicinais, utilizadas por muito tempo no tratamento de prurido agudo e crônico, como exemplos citam-se: mentol, cânfora, camomila e *Aloe vera* (BROMMA et al., 1995; MILLIKAN, 2003; SHIM; OH, 2008; HAJHASHEMI et al., 2017).

O prurido crônico está associado com o espessamento da pele e o processo de liquenificação tardia, causada pela recorrente pressão e trauma da pele (MILLIKAN, 2003). Dentro dos modelos utilizados na pesquisa de mecanismos e drogas que atuam sobre o prurido crônico, o modelo da pele seca, acetona-éter-água (AEW), pode ser utilizado, já

que este mimetiza a xerose, indução da pele seca que desencadeia o ressecamento da pele levando a uma hiperplasia epidermal e paraqueratose, sem a típica inflamação dermal (MIYAMOTO et al., 2002). Além disso, mecanismos relacionados a receptores PAR-2, canais iônicos TRPV1, TRPV4 e TRPA1, ROS e ativação glial (LUO et al., 2015; HUANG et al., 2017; TSUDA, 2017; ZHOU et al., 2017) estão envolvidos neste modelo.

Trabalhos que colaborem para a compreensão dos mecanismos envolvidos na dor e prurido, sejam eles agudos ou crônico, bem como de novos agentes terapêuticos são desafiadores e necessários para o atendimento de uma grande parcela da população acometida por estas enfermidades, carentes de tratamento e alívio de sintomas.

2. JUSTIFICATIVA

A solução para os problemas de prevenção e tratamentos de saúde que assolam o nosso país podem estar nas fontes naturais. Muitos fármacos que hoje estão no mercado vieram destas fontes, principalmente de plantas. Apesar do Brasil ser um país rico em fontes naturais, proporcionalmente, pouco se investe ou se investiu até hoje no desenvolvimento de fármacos a partir das mesmas (DUTRA et al., 2016).

O DECRETO Nº 5.813, DE 22 DE JUNHO DE 2006, do governo federal sobre a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, é um movimento de reconhecimento da importância, do resgate dos tratamentos alternativos e do incentivo à continuidade das pesquisas com plantas medicinais no nosso país, já que as mesmas têm contribuído para a seleção e desenvolvimento de novos medicamentos para a saúde. Além disso, esta política vem ao encontro da disseminação de conhecimentos etnofarmacológicos e diminuição de potenciais riscos de toxicidade ligados a usos inadequados das plantas medicinais. Outra vantagem é a possibilidade de desenvolvimento de cadeias produtivas melhorando a qualidade de vida de agricultores de pequeno e médio porte (BRASIL, 2009, p. 140).

Terapias para o prurido e para dor ainda são um desafio para a saúde pública, pois a causa destes sintomas são multifatoriais, dificultando a escolha adequada do tratamento (MILLIKAN, 2003; PEREIRA; STÄNDER, 2017). Situação mais agravante é o tratamento do prurido, pois somente nas últimas décadas houve descobertas sobre os mecanismos envolvidos na indução do prurido. O desconhecimento das vias e mecanismos de prurido perpetuaram o tratamento inadequado, sem consenso sobre a abordagem terapêutica adequada dos pacientes acometidos por este sintoma. A primeira escolha no tratamento de prurido são os antagonistas de receptores H1, falhando na maioria das vezes e, corticóides os quais possuem grandes efeitos colaterais (CHOI et al., 2012; ZHOU et al., 2017). A falha no diagnóstico, aliado a poucas possibilidades de escolha de tratamento, aumentam os custos da saúde pública, causam sofrimento ao paciente e insolubilidade do problema, gerando um ciclo vicioso e sem solução. O aumento do conhecimento sobre os mecanismos envolvidos no prurido, aumentam a possibilidade de novas abordagens terapêuticas e para a padronização de um protocolo terapêutico adequado a estes pacientes.

Poucas drogas surgiram nas últimas décadas para o tratamento para dor e prurido o que aumenta o desafio e a busca de tratamentos

novos e alternativos para estas enfermidades. As plantas medicinais são uma ótima alternativa na busca de novas abordagens terapêuticas e possibilidade de desenvolvimento de novos medicamentos.

Considerando a diversidade de espécies presentes na flora brasileira, o baixo conhecimento sobre a mesma, em especial do Planalto Serrano Catarinense e o menor índice de IDH do estado de Santa Catarina estar nesta região, este trabalho propõe a pesquisa sobre a atividade biológica de plantas desta região utilizadas tradicionalmente na medicina campeira da região.

A maioria das espécies de plantas do Planalto Serrano Catarinense não tem, ainda, potencial de exploração econômica conhecido, embora já façam parte dos diversos usos para o tratamento de enfermidades na cultura local.

A utilização destas espécies no desenvolvimento de sistemas produtivos de base ecológica é uma alternativa interessante para o produtor, do ponto de vista econômico, social e ambiental; pois é possível agregar renda na produção, resgatar a cultura popular e preservar a biodiversidade regional (AMORIM, 2010). Além disso, o conhecimento de efeitos tóxicos e efeitos indesejados provenientes do uso de plantas da flora do Planalto Catarinense aumentam a segurança quanto ao uso adequado das mesmas. As condições climáticas regionais, tais como temperatura, luminosidade e altitude, aliadas às condições edáficas encontradas no solo, como pH, nutrientes e umidade, influenciam no rendimento e na qualidade dos metabólitos secundários das plantas, o que pode levar a variações de composição química e atividade biológica entre plantas de mesma espécie. Desta forma, este trabalho pretende avaliar as atividades analgésica e antiprurido da planta *Acca sellowiana*, provenientes de locais e controle produtivo diferentes contribuindo com a população local para a valorização dos seus conhecimentos etnofarmacológicos.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antinociceptiva e antiprurido da planta nativa do Planalto Serrano Catarinense *Acca sellowiana* em camundongos Swiss, bem como estudar seu possível mecanismo de ação.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar a composição química presente no extrato aquoso bruto aquoso das folhas da planta *Acca sellowiana* (EBAAs) coletada de dois locais da Serra Catarinense, fazenda Bela Vista, Painei, SC (EBAAs-BV) e da EPAGRI (EBAAs-E);
- Avaliar a atividade antinociceptiva dos EBAAs em modelo de nocicepção aguda;
- Avaliar a atividade anti-prurido dos EBAAs em modelo de prurido agudo e do EBAAs-E em modelo de prurido crônico e os possíveis mecanismos envolvidos;
- Avaliar o efeito do EBAAs-E em co-morbididades associada ao prurido crônico, tais como, depressão e ansiedade.
- Avaliar a toxicidade do EBAAs em modelo de *Artemia salina* e segundo o guia da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) 407.

4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Folhas da planta *Acca sellowiana* foram coletadas em janeiro de 2015 em dois pontos localizados na Serra Catarinense, Brasil. Um dos pontos está localizado na cidade do Paineal, na fazenda Bela Vista, planta sem qualquer controle produtivo. Outro ponto de coleta está localizado na cidade de Lages, SC, na EPAGRI, área de plantio de árvores de *Acca sellowiana*, destinada a pesquisa sobre produtividade, com rigoroso controle produtivo. As folhas foram processadas da mesma maneira para a obtenção do extrato bruto aquoso das folhas desta planta (EBAAs). O EBAAs da Bela Vista (EBAAs-BV), foi analisado por cromatografia líquida de ultra-alta performance/espectrometria de massa ESI-QTOF (UHPLC/MS/MS), na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). O EBAAs proveniente das folhas da EPAGRI (EBAAs-E), foi analisado por cromatografia de alta performance diodo (HPLC – DAD), na EPAGRI de Itajaí, SC. Testes de toxicidade com modelo de *Artemia salina* e segundo o guia 407 da Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OECD) foram realizados. Foram utilizados modelos comportamentais agudos de dor e prurido e modelo de prurido crônico em camundongos swiss machos e fêmeas. O tratamento dos animais com os extratos EBAAs-BV e -E foi realizado por via de administração intragástrica (i.g.), 1 hora antes dos testes comportamentais. Inicialmente, testou-se o EBAAs-BV e EBAAs-E frente ao modelo do ácido acético. Foram realizados testes com substâncias ativadoras de canais TRPs, receptores ASICs e glutamato para a confirmação de possíveis alvos de ação do EBAAs-BV. Para a avaliação do efeito antiprurido foram utilizados tripsina, histamina e Substância P (SP) como agentes indutores em modelo de prurido agudo.

Para a avaliação do efeito antiprurido do EBAAs-E sobre a ativação de canais TRPs, foram estabelecidas curvas de dose e tempo resposta para cinamaldeído e capsaicina, para posterior análise do efeito deste extrato frente a estas substâncias. Além disso, foi avaliada a ação do EBAAs-E sobre a atividade da proteína cinase C (PKC), usando o forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) como agente indutor do prurido. Curva de tempo-resposta do EBAAs-E foi obtida em animais machos e fêmeas após a indução do prurido por cinamaldeído.

Para avaliar a ação do EBAAs-E sobre o prurido crônico, o modelo de pele seca, também conhecido como AEW (acetona/éter/água), foi escolhido para a condução dos testes. Neste, avaliou-se a ação do modelo e do extrato quanto ao sexo dos animais. Ainda, foi utilizado o teste de campo aberto e de suspensão pela cauda para avaliação do

comportamento tipo ansioso e depressivo no modelo AEW e avaliação de atividade tipo ansiolítica e antidepressiva do extrato. Dosagem de citocinas e de atividade de enzimas antioxidantes também foram avaliados neste modelo.

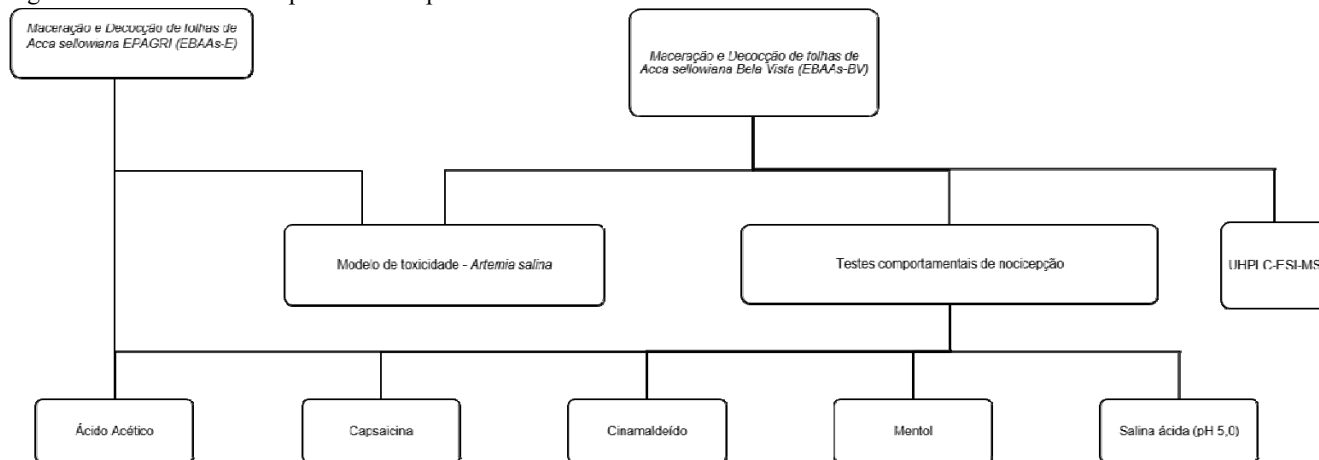
Os animais tratados com salina (veículo) foram usados como controle (C) e os tratados com diclofenaco de sódio, loratadina e dexametasona foram utilizados como controle positivos. Além disso, para os modelos agudos de prurido, os animais receberam salina na região interescapular e representam o comportamento natural dos animais, considerado valores basais do comportamento de coçar. Os animais foram aclimatados na sala de experimentação por, no mínimo, 30 minutos. Após este período, os animais foram tratados com o extrato e decorridos 30 minutos, os animais foram acondicionados individualmente em caixas de acrílico (13 x 13 x 8 cm), local dos testes, por mais 30 minutos. Daí, receberam a aplicação da substância indutora de dor ou prurido. Foram recolocados imediatamente ao mesmo local, para a avaliação destes comportamentos.

Esta tese está organizada em dois capítulos. No primeiro capítulo são apresentados os materiais, métodos e resultados do EBAAs-BV relacionados a composição química, toxicidade, efeito antinociceptivo e antiprurido. Também estão apresentados neste capítulo os resultados do EBAAs-E relacionado ao teste toxicológico e efeito antinociceptivo frente ao modelo de ácido acético.

O segundo capítulo apresenta os materiais, métodos e resultados do EBAAs-E quanto a composição química, toxicidade segundo o guia OECD 407, o efeito antiprurido em modelos agudos e crônico e os possíveis mecanismos envolvidos.

5. CAPÍTULO 1 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA, TOXICIDADE E EFEITO ANTINOCICEPTIVO E ANTIPRURIDO DO EBAAS-BV. TOXICIDADE E EFEITO ANTINOCICEPTIVO DO EBAAS-E.

Figura 5 - Delineamento Experimental capítulo 1.



Legenda: Representação gráfica dos tratamentos e testes realizados com EBAAs-BV e EBAAs-E na avaliação da composição química, dos efeitos toxicológico e analgésico descritos no capítulo 1.

Fonte: A autora (2018)

5.1 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1.1 Obtenção do extrato bruto aquoso de *Acca sellowiana* (EBAAs)

Folhas da *Acca sellowiana* (Myrtaceae) foram coletadas do pomar experimental da EPAGRI, Lages, SC (Lat 27°48'27,63''S; Long 50°19'46,13''O; Alt. 934m) e da Fazenda Bela Vista, Paineis SC (Lat 28°03'25,8''S; Long 50°04'20,3''O; Alt. 1287m), em janeiro de 2015. Até 24 horas após a coleta, as folhas foram secas em estufa, maceradas, diluídas em água (60g/800ml) e fervidas por 20 minutos. Depois, os extratos da Fazenda Bela Vista (EBAAs-BV) e da Epagri (EBAAs-E) foram filtrados e estocados em -20 °C até o momento de uso. As plantas foram identificadas e autenticadas pelo Dr. Murilo Dalla Costa (Departamento de Biotecnologia da EPAGRI – Lages, SC). Uma amostra de cada espécime foi depositada no Instituto Federal de Santa Catarina, campus Lages (IFSC), sob os números HBLGIFSC20150103 (EBAAs-BV) e HBLGIFSC20150104 (EBAAs-E).

5.1.2 Análise do EBAAs-BV em UHPLC

A análise cromatográfica do extrato foi realizada no laboratório de ciências farmacêuticas da UFSC. Separações cromatográficas foram realizadas num sistema Acquity UPLC classe H (Waters) equipado com detector PDA, amostra e solvente quaternário administradas em uma coluna BEH C18: 100 mm, 1.0 mm, tamanho de partícula 1.7 µm (Waters). As temperaturas da coluna foram 40 °C e 20 °C, respectivamente. O gradiente de fluxo empregado foi de 0.3 mL/min em 95% A (water/formic acid, 99.9/0.1 [v/v]) e 5% B (acetonitrila); 1–3 min, 70% de A; 3–6 min 55% de A; 6–10 min 45% de A; 10-13 min 10% de A; 13–14.95 min 10% de A; 15–20 min 5% de A. O volume de injeção foi de 5 µL.

5.1.3 Análise espectrométrica de Massa - ESI-QTOF do EBAAs-BV

Dados de espectrometria de massa foram obtidos com Xevo G2-S QToF (Waters) equipado com uma sonda eletrospray funcionando em modo de ionização positiva (ESI+) e negativa (ESI-) usando os seguintes instrumentos de definição: cone e gas nebulizador: nitrogênio; fluxo de gás 60 L/h; fluxo de gás de dessolvatização 1000 L/h; coleta de amostras cone 40 V; fonte 80 V; gás de colisão: argon.

5.1.4 Parâmetros MS e MS2

A dessolvação e temperatura da fonte foram 300°C e 90°C, respectivamente. O capilar de voltagem foi de 3 kV, enquanto todos os dados foram gravados entre 50 e 2000 Da, com um tempo de leitura a cada 1.0 sec durante 20 min. Análise LC-MS/MS foi realizada com energia de colisão de 30 eV para o modo negativo devido a sensibilidade exclusiva dos metabólitos neste modo de ionização. Dados foram obtidos e processados com software MassLynx V4.1 (Waters).

5.1.5 Animais

Foram utilizados 179 camundongos adultos Swiss machos (35–50 g, 2-3 meses de idade), provenientes do biotério central da Universidade Federal de Santa Catarina. Todos os animais foram acondicionados em no máximo 15 animais por caixa, aclimatizados em temperatura de 22 ± 1°C, 60 – 80% de umidade, ciclo claro/escuro de 12 h – 12 h, com livre acesso a comida e água. Uma hora antes dos testes os animais foram ambientados nas condições de trabalho do laboratório. Os testes foram realizados durante o dia. Os animais foram distribuídos aleatoriamente entre os grupos e utilizados uma vez. Os protocolos e procedimentos utilizados neste estudo foram previamente aprovados pelo Comitê de Ética para Pesquisa Animal da Universidade Federal de Santa Catarina (número de protocolo PP00745 e 8581050417), onde o estudo foi realizado. Foram seguidos os protocolos e procedimentos éticos estabelecidos no Guidelines Nacional para o uso de animais e Guidelines de cuidados e saúde animal (NIH publication N° 80-23). O número de animais usados e a intensidade de estímulo irritativo foi o mínimo necessário para a obtenção dos dados. No final dos experimentos os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical.

5.1.6 Drogas e Tratamento

Ácido hidrocloreídrico L-glutâmico (glutamato), capsaicina, cinamaldeído, mentol, histamina, tripsina e diclofenaco de sódio foram obtidos da Sigma–Aldrich (St. Louis, MO). Ácido acético e hidróxido de sódio foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Germany), tween 80 e etanol foram comprados da Vetec (Rio de Janeiro, Brazil). Todos os outros reagentes de grau analítico foram adquiridos de empresas comerciais padrão. Diluições de substâncias para teste e veículo: capsaicina (10% etanol/10% Tween 80 em 0.9% salina), cinamaldeído

(5% Tween 80 em salina), mentol (2% etanol/3% Tween 80 em salina), salina ácida (2% ácido acético em salina, pH 5), glutamato foi diluído em salina e neutralizado com NaOH. Animais tratados com salina, a qual foi usada para diluir o EBAAAs-BV e EBAAAs-E, foram utilizados como controle. Experimentos preliminares confirmaram que Tween 80 ou etanol nas concentrações de uso, e quando administradas sozinhas não produzem efeitos significativos nos testes comportamentais. Os animais foram tratados com EBAAAs-BV ou -E, uma hora antes dos testes. A administração das substâncias indutoras de nocicepção foi realizada no momento dos testes.

5.1.7 Nocicepção induzida por ácido acético

No momento do teste, os animais receberam injeção intraperitoneal (i.p) de ácido acético (0.6%, 450 µl), para a indução das contrações abdominais (COLLIER et al., 1968; CORRÊA et al., 1996; SANTOS; VEDANA; DE FREITAS, 1998). Os animais foram observados individualmente e o número de contrações abdominais e estiramento das pernas traseiras foram consideradas como indicativo de dor e inflamação. Por 20 minutos, este comportamento foi contado cumulativamente.

5.1.8 Nocicepção induzida por glutamato

Injeção intraplantar (i.pl.) de glutamato (20 µmol/sítio) foi administrada na superfície ventral da pata direita dos animais (MEOTTI; COELHO; SANTOS, 2010; CÓRDOVA et al., 2011). Após a injeção, cada animal foi observado individualmente por 15 minutos. O tempo em que cada animal lambeu ou mordeu a pata foi cronometrado e considerado comportamento indicativo de nocicepção.

5.1.9 Nocicepção induzida por substâncias ativadoras de canais TRPs e ASICs

Para entender os possíveis mecanismos envolvidos na ação do EBAAAs-BV foram utilizados testes com capsaicina (ativador de TRPV1), cinamaldeído (ativador de TRPA1), mentol (ativador de TRPM8) e salina ácida (ativador de canais ASICs). Os procedimentos utilizados foram similares aos descritos previamente (MEOTTI; COELHO; SANTOS, 2010; CÓRDOVA et al., 2011). Os animais receberam injeção na superfície ventral da pata direita dos animais (20

µL) de capsaicina (5,2 nmol/sítio), cinamaldeído (10 nmol/sítio), mentol (1,2 µmol/sítio) ou salina acidificada (pH 5,0). Cada animal foi colocado em uma câmara de acrílico e o tempo de mordida ou lambida da pata foi cronometrado por 5 minutos (capsaicina e cinamaldeído), 15 minutos (salina acidificada), ou 20 minutos (mentol). O tempo em que cada animal lambeu ou mordeu a pata foi considerado comportamento de nocicepção.

5.1.10 Prurido induzido por tripsina e histamina

Este modelo foi realizado conforme descrito anteriormente (COSTA et al., 2008; AKASAKA et al., 2011; OHTSUKA et al., 2001). O prurido foi induzido por injeção subcutânea (s.c.) na região interescapular dos animais (50 µL) com tripsina (300 µg/sítio), um ativador PAR-2, ou histamina (100 nmol/sítio). Imediatamente após a injeção, o comportamento de coçar atrás das orelhas foi contado por 40 minutos (tripsina) ou 30 minutos (histamina), e considerado como indicativo de prurido.

5.1.11 Teste de toxicidade - *Artemia salina*

O teste de toxicidade do EBAAsBV e -E contra *Artemia salina* (*A. salina*) nauplii (larva II) foi testado de acordo com método descrito previamente (MEYER et al., 1982; ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 2016). Ovos de *A. salina* foram incubados em água de mar reconstituída a 25 ± 2 ° C. Depois de 48 h de incubação, 10 nauplii de *Artemia salina* foram transferidas para frascos, cada qual contendo 10 mL de água de mar reconstituída ou 10 mL de diluições do EBAAs-BV ou EBAAs-E, nas concentrações de 50 - 1000mg/L. Os frascos foram incubados a 25 ± 2 °C, por 48h. Após 24 h e 48 h, o número de nauplii mortos foram contados. Dicromato de potássio ($K_2Cr_2O_7$; 45 mg/L) e água do mar reconstituída foram usados como controle positivo e negativo, respectivamente. Valor de CL_{50} maior que 1000 mg/L para o extrato de planta e frações foi considerado não tóxico, de acordo com Meyer, 1982. Os testes foram feitos em triplicatas.

5.1.12 Análise estatística

Os resultados foram apresentados como a média \pm erro padrão da média (E.P.M.) de 5 - 12 animais por grupo. No modelo de ácido acético foram utilizados 12 animais no grupo controle em decorrência dos testes

realizados em datas diferentes na construção da curva dose-resposta. As diferenças estatísticas entre os grupos foram detectadas por teste *t* - Student ou por ANOVA seguida, quando necessário, de teste *post hoc* Newman-Keuls. Valores de P menores que 0.05 foram considerados estatisticamente significativos. Para os testes estatísticos, foi utilizado o software Graph Pad Prism 6.0 (Graph Pad Software, Inc., La Jolla, CA).

5.2 RESULTADOS

5.2.1 Composição química do extrato bruto aquoso de EBAA-BV

O EBAA-BV foi sensível a análise do modo de ionização negativo. Dezesesseis compostos foram detectados. A figura 9 e a tabela 1 mostram a composição química obtida pela técnica hifenizada UHPLC-MS/MS ESI-QTOF.

A análise LC-MS² permitiu a detecção de dezesesseis metabólitos entre os quais as estruturas de nove foram relacionadas como segue: quatro ácidos elágicos glicosídicos, catequina, epicatequina, galocatequina e protocianidina B. Além disso, ácido quínico p-cumaroil foi identificado entre os compostos enquanto três outros, altamente oxigenados, foram identificados como ácido quínico, ácido cítrico e ácido gálico, baseado em considerações quimiotaxonômicas. Substâncias com valores de massa m/z 723.5, m/z 836.5 and m/z 949.6 não foram dissociadas mesmo com energia de colisão maior que 50 eV. Entretanto, a massa espectral tandem de ácido quínico p-cumaroil (m/z 337) forneceu fragmentos em m/z 191.0 e m/z 163, correspondente, respectivamente, a ácido quínico e ácido p-cumárico (Figura 6 e Tabela 1).

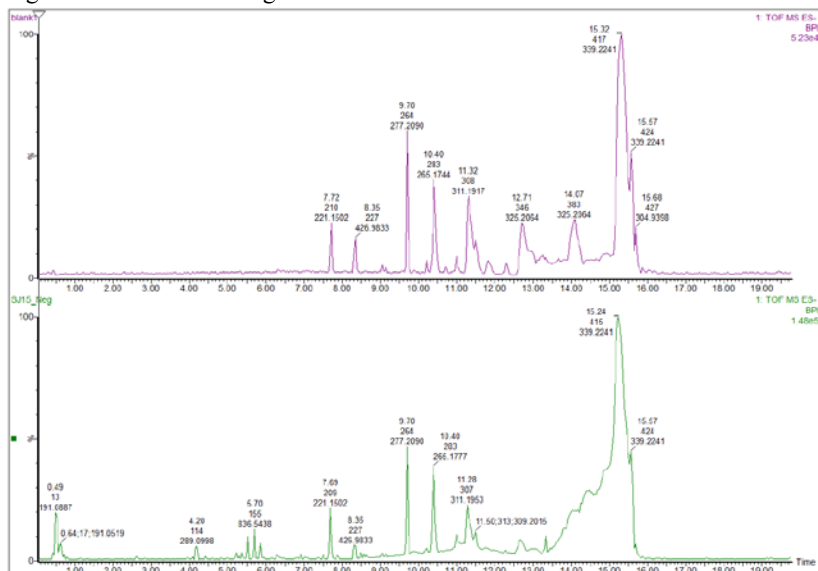
Compostos 10-13 revelaram em sua massa espectral a mesma aglicona (m/z 301.0) depois de perder respectivamente, um ácido urônico (176 Da), uma pentose (132 Da) e uma deoxihexose (146 Da) (Figura 6 e Tabela 1).

Tabela 2 - Perfil químico do EBAA-s-BV. Compostos identificados por espectrometria de massas - UHPLC-MS/MS ESI-QTOF.

Pico	t _R (min)	[M-H] ⁻ (m/z)	Composição elementar	Fragmento	Identificação	Referência
1	0,49	191,1	C ₇ H ₁₂ O ₆	-	Ác. quínico	
2	0,64	191,1	C ₆ H ₈ O ₇	-	Ác. cítrico	
3	0,79	169,0	C ₇ H ₆ O ₅	-	Ác. gálico	
4	2,62	337,1	C ₁₆ H ₁₈ O ₈	119,0; 155,0; 163,0; 173,0; 191,0	Ác. p-cumaroil quínico	Kasajima, 2008
5	2,84	289,1	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	271,1; 245,1; 221,1; 205,1; 203,1; 179,0; 151,0; 137,0; 125,0; 109,0	Catequina	
6	3,94	577,1	C ₃₀ H ₂₆ O ₁₂	425,1; 407,0; 339,1; 289,0; 245,1; 205,0; 161,0; 125,0	Protocianidina B	
7	4,09	305,0	C ₁₅ H ₁₄ O ₇	-	(+/-)-Galocatequiina	
8	4,20	289,1	C ₁₅ H ₁₄ O ₆	271,1; 245,1; 221,1; 205,1; 203,1; 179,0; 151,0; 137,0; 125,0; 109,0	Epicatequina	Magina, 2012
9	4,42	431,2	-	-	Não identificado	
10	4,82	477,1	C ₂₅ H ₁₈ O ₁₀	301,0, 300,0	Ác.elágico glucoronídeo	
11	5,23	433,1	C ₁₉ H ₁₄ O ₁₂	300,0; 271,0; 255,0; 179,0; 151,0	Ác. elágico 4-O-β-D-xilopiranosídeo	
12	5,30	433,1	C ₁₉ H ₁₄ O ₁₂	300,0; 271,0; 255,0; 227,0; 179,0; 151,0; 121,0	Ác. elágico xilofuranosídeo	
13	5,37	447,1	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	300,0; 271,0; 255,0; 243,0; 229,0; 211,0; 179,0; 151,0	Ác. elágico 4-O-α-L-ramnopiranosídeo	
14	5,52	723,5	-	-	Tanino	
15	5,70	836,5	-	-	Tanino	
16	5,85	949,6	-	-	Tanino	

Fonte: A autora (2018)

Figura 6 - Perfil cromatográfico do EBAAs-BV.



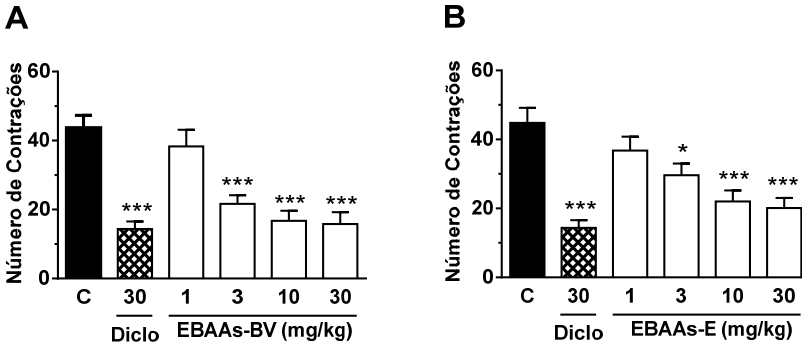
Legenda: Picos cromatográficos do EBAAs-BV obtidos por UHPLC-MS/MS ESI-QTOF em modo de ionização negativo. Compostos identificados estão nomeados de acordo com a tabela 1.

Fonte: A autora (2018)

5.2.2 Nociceção causada pela injeção intraperitoneal de ácido acético.

Injeção (i.p.) de ác. acético causou claro comportamento de dor nos animais do grupo controle, como pode ser observado na Figura 7. O tratamento (i.g.) dos animais com EBAA-BV ou EBAA-E, 3-30 mg/kg, reduziu significativamente, as contrações abdominais causadas pelo ácido acético, de forma dose dependente (Figura 7A e 7B). Para o EBAAs-BV (Figura 7A), o valor de DI_{50} (limite de confiança, 95%) foi de 5,0 (2,6 – 9,4) mg/kg e para o EBAAs-E (Figura 7B) foi de 14,3 (6,7 - 30,7). Os valores de inibição foram $12 \pm 11\%$, $50 \pm 6\%$, $62 \pm 7\%$ e $64 \pm 8\%$ para EBAAs-BV e para EBBAs-E foram de $11 \pm 1\%$, $28 \pm 8\%$, $47 \pm 8\%$ e $51 \pm 7\%$ nas doses de 1, 3, 10 e 30 mg/kg, respectivamente (Figura 7A e 7B). O fármaco de referência, diclofenaco de sódio (30 mg/kg, i.g.), reduziu significativamente o número de contrações abdominais em $64 \pm 6\%$ (EBAAs-BV) e $68 \pm 5\%$ (EBAAs-E) quando comparados com o grupo controle (Fig. 7A e 7B).

Figura 7 - Efeito do EBAAs no comportamento nocifensivo induzido por ácido acético.



Legenda: Os animais receberam EBAAs-BV ou -E (1-30 mg/kg, i.g.) ou diclofenaco de sódio (Diclo) (30 mg/kg, i.g.) uma hora antes da injeção intraperitoneal de ácido acético (0,6%, 450 μ L). (A) Animais tratados com EBAAs-BV e (B) animais tratados com EBAAs-E. As colunas em preto representam os animais tratados com veículo de EBAAs (salina, i.g.) e ácido acético (i.p.), grupo controle (N=10 e 12, respectivamente). As colunas com linhas cruzadas representam os animais tratados com diclofenaco de sódio (i.p.) e ácido acético (i.p.), controle positivo. As colunas em branco representam os animais tratados com EBAAs- BV ou EBAAs-E (i.g.) e ácido acético (i.p.). Os dados representam a média + E.P.M. (N=5-12). A significância é indicada por * $P < 0,05$, e *** $P < 0,001$ quando comparados com o grupo controle negativo (ANOVA uma via, seguida de teste *post hoc* Newman-Keuls).

Fonte: A autora (2018).

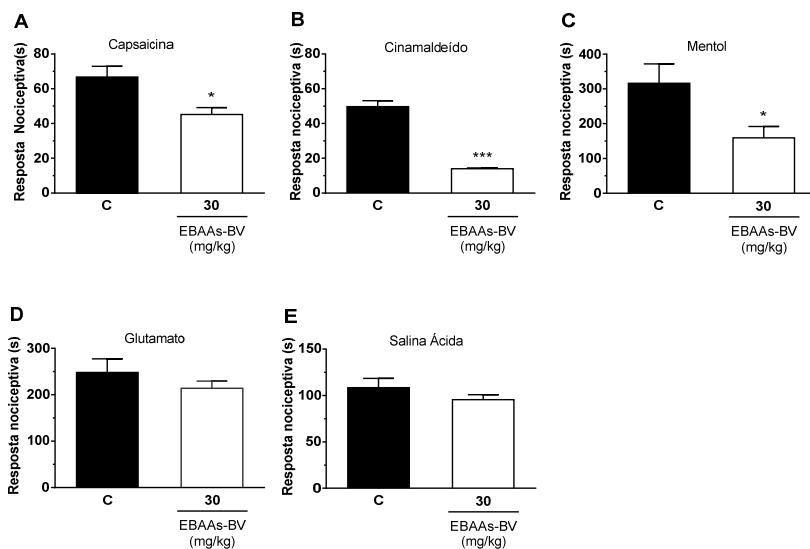
Devido ao efeito antinociceptivo do EBAAs-BV ser mais eficaz nas mesmas doses utilizadas que o EBAAs-E, escolheu-se utilizar o extrato -BV na dose de 30 mg/kg para pesquisar os possíveis alvos de ação quanto ao efeito antinociceptivo encontrado no mesmo. Esta mesma dose foi escolhida para avaliar o efeito do EBAAs-BV sobre o prurido.

5.2.3 Nociceção induzida por glutamato, capsaicina, cinamaldeído, mentol e salina ácida.

A figura 8, mostra a nociceção induzida por injeção de capsaicina (ativador de canal TRPV1); cinamaldeído (ativador de canal TRPA1); mentol (ativador de canal TRPM8) glutamato ou salina ácida (ativador de canais ASICs). EBAAs-BV (30 mg/kg), reduziu significativamente o comportamento nociceptivo induzido por

capsaicina (Figura 8A), cinamaldeído (Figura 8B) e mentol (Figura 8C), quando comparado ao grupo controle. A taxa de inibição foi de $32 \pm 6\%$, $72 \pm 1\%$ e $43 \pm 12\%$, respectivamente. O tratamento com EBAAAs-BV não alterou significativamente o comportamento nociceptivo induzido por glutamato (Figura 8D) e salina ácida (Figura 8E).

Figura 8 - Efeito do EBAAAs-BV no comportamento nociceptivo induzido por capsaicina, cinamaldeído, mentol, glutamato e salina ácida.



Legenda: Camundongos receberam injeção intraplantar de (A) capsaicina (5,2 nmol/sítio), (B) cinamaldeído (10 nmol/sítio), (C) mentol (1,2 μ mol/sítio), (D) glutamato (20 μ mol/sítio), ou (E) salina ácida (pH 5,0), uma hora após tratamento com EBAAAs-BV (30 mg/kg, i.g.), representadas pelas colunas brancas. As colunas pretas representam o grupo controle, animais tratados com veículo (salina) e os mesmos agentes indutores de nocicepção. Os dados representam a média + E.P.M. (N=5- 7). A significância é indicada por * $P < 0,05$ e *** $P < 0,001$ quando comparados com o grupo controle. Teste Student's *t* não pareado foi utilizado para análise dos dados.

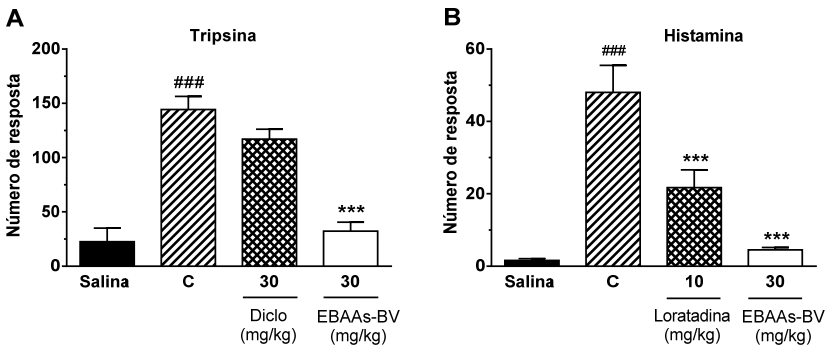
Fonte: A autora (2018).

5.2.4 Comportamento de coçar induzido pela tripsina e histamina

O comportamento de coçar foi induzido por injeção subcutânea de tripsina, um ativador de receptor PAR-2, ou histamina (Figura 9). O EBAAAs-BV (30 mg/kg, i.g.) praticamente aboliu o comportamento de

coçar quando comparado com o grupo controle. A inibição do prurido induzido por tripsina (Figura 9A) e histamina (Figura 9B) causada pela administração i.g. de EBAAs-BV foi de $89 \pm 6\%$ e $95 \pm 1\%$, respectivamente. O tratamento com loratadina (10 mg/kg, i.g.), um antagonista de receptor H_1 , inibiu $55 \pm 8\%$ o comportamento de coçar induzido por histamina (Figura 9B) sendo menos efetivo que o EBAAs-BV. Além disso, diclofenaco de sódio (30 mg/kg, i.g.), um anti-inflamatório não esteroidal, utilizado aqui como controle positivo para o teste com tripsina, produziu uma pequena redução (inibição de $19 \pm 6\%$) no comportamento de coçar (Figura 9A), não sendo estatisticamente significativo.

Figura 9 - Efeito do EBAAs-BV no comportamento de coçar induzido por tripsina e histamina.



Legenda: Camundongos foram tratados com EBAAs-BV 30 mg/kg (i.g.) ou loratadina 10mg/Kg (i.g.) uma hora antes da injeção subcutânea do agente irritativo. Diclofenaco de sódio (Diclo) 30mg/Kg (i.p) foi administrado 30 minutos antes da injeção de tripsina. (A) Tripsina (300 μ g/sítio). (B) Histamina (100 nmol/sítio). As colunas em preto representam os animais tratados com veículo do EBAAs-BV (salina, i.g.) e veículo do agente irritativo (salina, s.c.). Animais tratados com salina (i.g.) mais o agente irritativo (s.c.) representam o controle (C), colunas de linhas inclinadas. Os animais tratados com Diclo (i.g.) ou loratadina (i.g.) mais agente irritativo (s.c.) representam o controle positivo, colunas de linhas cruzadas. As colunas abertas (brancas) correspondem aos animais tratados com EBAAs-BV mais agente irritativo. Dados são representados pela média + E.P.M. (N=5-7). Diferenças estatísticas estão indicadas por ***P < 0.001 quando comparadas ao grupo controle, ou por ###P < 0.001 quando comparadas ao grupo salina.

Fonte: A autora (2018).

5.2.5 Teste toxicidade com *Artemia salina*

O EBAAs-BV e -E não apresentaram toxicidade sobre as nauplii de *A. salina* em concentrações de até 1000 mg/L. O teste foi realizado em triplicatas e visualizado em 24 e 48h. Quando nauplii de *A. salina* foram incubadas com solução de $K_2Cr_2O_7$, controle positivo do teste, todos morreram em 45 mg/ml em 48 h (Tabela 2).

Tabela 3 - Teste de toxicidade do EBAAs-BV e -E frente a nauplii de *Artemia salina*

Concentração de EBAAs-BV e -E (ppm)	Percentual de mortalidade EBAAs-BV (%)	Percentual de mortalidade EBAAs-E (%)
0 (Controle)	10	10
50	7	3
100	3	10
250	7	3
500	3	3
1000	3	0
Controle positivo $K_2Cr_2O_7$ (45 ppm)	100	100

Legenda: Porcentagem de naupliis mortos após 48 horas de avaliação, $DL_{50} > 1000$ mg/L.

Fonte: A autora (2018)

5.3 DISCUSSÃO

Apesar de dor e prurido serem sensações cruciais para proteção de uma variedade de estímulos dolosos ao organismo, eles evocam distintas experiências e comportamentos. Dor induz comportamento de quietude, de isolamento, enquanto o prurido induz uma resposta ativa, o ato de coçar. Contudo, dor e prurido não são completamente independentes. Ambos podem ativar os mesmos canais iônicos e receptores (HUANG et al., 2017). Nosso estudo indica que EBAAs-BV tem um potencial benéfico no tratamento de dor e de prurido. Primeiro, os extratos EBAAs-BV e o EBAAs-E inibiram o comportamento nocifensivo causado pelo ácido acético de forma similar ao diclofenaco de sódio, um medicamento anti-inflamatório não esteroideal (AINES), inibidor de ciclo-oxigenase (COX) - não seletivo, extensivamente utilizado para dor e inflamação. Além disso, EBAAs-BV inibiu o comportamento nocifensivo causado por ativadores de canais TRP, capsaicina, ativador

de TRPV1; cinamaldeído, ativador de TRPA1; e mentol, ativador de TRPM8. Contudo, tratamento com EBAAAs-BV foi ineficaz em diminuir o comportamento nocifensivo induzido por glutamato e salina ácida, a qual ativa de canais ASICs. Segundo, o EBAAAs-BV foi também capaz de reduzir o comportamento de coçar induzido por: 1) tripsina, onde o diclofenaco de sódio não reduziu significativamente o prurido. Este resultado era esperado, pois a ativação de COX-1 parece não estar envolvida com prurido, já que apenas inibidores seletivos de COX-2 são eficazes em reduzir o comportamento de coçar (COSTA et al., 2008); 2) histamina, quando EBAAAs-BV foi mais efetivo que a loratadina, um anti-histamínico de segunda geração, não sedativo, largamente utilizado no tratamento de prurido (CHURCH; CHURCH, 2013).

Há poucos estudos sobre a constituição química e atividade biológica de *Acca sellowiana*. Estudos recentes indicam a presença de metabólitos secundários em folhas e frutos desta planta, incluindo terpenos, taninos e fenóis (TRINGALI, 2004; RUBERTO; WESTON, 2010; NGUYËN; SAVAGE, 2013; MONFORTE et al., 2014). Salienta-se, que a biossíntese destes compostos é aumentada em situações de estresse biológico e ambiental (SARACINI et al., 2005). Esses compostos protegem as plantas contra predadores animais, de insetos e de infecções por microrganismos (GUO; YAMAZOE, 2004). Os compostos fenólicos estão disponíveis em nossa dieta através de frutas (por exemplo, *Acca sellowiana*), vegetais e castanhas, sendo atribuídos a eles importantes efeitos terapêuticos. Há uma variedade de potenciais mecanismos de ações dos polifenóis em prevenção de doenças, os quais podem ser independentes da convencional atividade antioxidante (D'ARCHIVIO et al., 2007; LANDETE, 2012).

Dados publicados sobre a planta *Acca sellowiana* mostram importantes propriedades terapêuticas, como antimicrobina, antioxidante, anti-inflamatória, anticâncer, nefro e hepatoprotetivo, e antidepressivo (ROSSI et al., 2007; KELES et al., 2012; KARAMI et al., 2014; MAHMOUDI et al., 2015; MACHADO et al., 2016; TURCO et al., 2016), apresentados na tabela 1.

Neste estudo, nós evidenciamos claramente que o tratamento de camundongos com EBAAAs- BV ou EBAAAs-E, inibiu a resposta induzida por ácido acético, um modelo de dor inflamatória visceral (COLLIER et al., 1968; VINEGAR et al., 1979). A habilidade do ácido acético em induzir dor depende da lesão tecidual causada e a liberação de mediadores endógenos locais, incluindo glutamato, bradicinina, citocinas e prostanóides, que atuam em neurônios sensoriais polimodais (COLLIER et al., 1968; VINEGAR et al., 1979; RIBEIRO et al., 2000;

IKEDA et al., 2001). Estes mediadores e o excesso de íon hidrogênio e a sua rápida difusão na cavidade peritoneal também levam a ativação de canais TRP e ASICs (CATERINA et al., 1997; IKEDA et al., 2001; JULIUS; BASBAUM, 2001; COUTAUX et al., 2005). Considerando que o pré-tratamento de camundongos com EBAA-BV e EBAA-E produz uma atenuação dose-dependente do comportamento nocifensivo causado pelo ácido acético, isto pode indicar que estes extratos poderiam agir diretamente ou indiretamente na ativação de canais TRP e na liberação de mediadores inflamatórios.

No presente estudo, nós mostramos, através de UHPLC-ESI-QTOF-MS, a presença de uma complexa mistura de polifenóis, incluindo ácido elágico glicosídeo (EA), catequina (flavan-3-ol), epicatequina (EC), galocatequina (GC), protocianidina B e ácido gálico (AG) no extrato EBAA-BV. Esses polifenóis podem ser responsáveis pelos efeitos antinociceptivos observados. De fato, estudos prévios indicam que polifenóis, presentes no EBAA-BV, tem atividade analgésica e anti-inflamatória em muitos modelos de dor e inflamação em roedores (ROGERIO et al., 2006; TANG; WEI; WANG, 2007; TAGHI MANSOURI et al., 2013, 2015; CORDEIRO et al., 2016; BENSAD et al., 2017). Ácido elágico, catequina, epicatequina, galocatequina são os principais metabólitos de polifenóis polihidroxifenil derivados do metabolismo secundário de ácido gálico em frutas e castanhas (QUIDEAU, 2006; ABE; LAJOLO; GENOVESE, 2012). Estes compostos são conhecidos por suas atividades anti-inflamatória e por serem substâncias antioxidantes. Agem diminuindo o dano tecidual decorrente de substâncias reativas de oxigênio, diminuindo a liberação de histamina de mastócitos, diminuindo a síntese de óxido nítrico (NO) e inibindo a secreção de enzimas lisossomais (QUINONES-BASTIDAS et al., 2017). São capazes de inibir a síntese de ácido araquidônico de membranas pela inibição de fosfolipase A2. Inibem o metabolismo do ácido araquidônico por atuarem sobre as enzimas lipoxigenase e ciclo-oxigenase (COX), responsáveis pela síntese de leucotrienos e lipoxinas, e de prostaglandinas, respectivamente. Isto pode reduzir a síntese e concentração de endoperoxidases, leucotrienos e prostaglandinas no local afetado, reduzindo o processo inflamatório e a ativação de vias nociceptivas (AOUEY et al.; 2016, ABD-ALLAH et al., 2018). Da mesma forma, os ácidos fenólicos, como o ácido elágico e gálico, diminuem a infiltração de neutrófilos na área afetada, reduzindo a liberação de citocinas pró-inflamatórias e de expressão de enzimas inflamatórias, tais como óxido nítrico sintase induzida (iNOS) e ciclo-oxigenase (COX-2) e de seus produtos óxido nítrico (NO) e

prostaglandina E₂ (PGE₂), além de seu conhecido efeito anti-oxidante. Além disso, diminuem a produção de TNF- α , IL-1 β e IL-6, substâncias pró-inflamatórias liberadas por macrófagos (MANSOURI, 2015; BENSADAD et al., 2017). Estes efeitos podem estar relacionados com o efeito antinocifensivo observado no modelo de ácido acético, já que o processo inflamatório e a ativação das vias nociceptivas estão relacionadas com o aumento da concentração destas substâncias no local afetado conduzindo o estímulo nocifensivo ao sistema nervoso central. Estes mediadores e citocinas pró-inflamatórias são capazes de estimular canais do tipo TRPV1, A1 e M8 propagando o estímulo nociceptivo pelas fibras sensoriais (MOLLANAZAR et al., 2016). Assim, a diminuição da concentração desses mediadores diminui a ativação destes canais, diminuindo a sensibilização das vias nociceptivas. Além disso, o ácido gálico é capaz de antagonizar a ação de TRPA1, induzido por cinamaldeído, diminuindo o influxo de cálcio (TREVISAN et al., 2014). Isto corrobora os resultados onde o tratamento com EBAA-BV (30 mg/kg) promoveu redução significativa da resposta nocifensiva causada por capsaicina, cinamaldeído e mentol, substâncias químicas capazes de ativar TRPV1, TRPA1 e TRPM8, respectivamente (MEOTTI; COELHO; SANTOS, 2010; CORDOVA et al., 2011). A ação deste extrato foi mais efetiva contra a nocicepção causada por cinamaldeído. A avaliação do efeito do EBAA-BV sobre o comportamento nociceptivo induzido por glutamato, principal neurotransmissor envolvido na condução do estímulo de nocicepção (WALKER et al., 2014) e, por e salina ácida, ativador de canais ASICs foi inefetiva. Baseado nestes resultados, conjecturou-se que o efeito analgésico do EBAA-BV pode ser explicado, ao menos em parte, pela inativação de TRPA1, TRPV1 e TRPM8. Entretanto, mais experimentos são necessários para corroborar esta hipótese.

Também investigamos o possível efeito do EBAA-BV sobre o comportamento de coçar. Esse comportamento foi induzido em camundongos, por tripsina e histamina. Ativação de receptores H1R e H4R estão envolvidos na indução do prurido por via fibras sensoriais histamina-dependente enquanto tripsina está envolvida na indução de prurido através de vias sensoriais histamina-independente (COSTA et al., 2008; AKIYAMA et al., 2015; MENG; STEINHOFF, 2016). Tripsina é um potente indutor de prurido, via estimulação de receptor-proteinase-ativado tipo 2 (PAR-2) e tipo 4 (PAR-4) presente em queratinócitos (GRANT et al., 2007; STÄNDER et al., 2010; AKIYAMA et al., 2015). Da mesma forma, os compostos fenólicos encontrados no EBAA-BV podem ser responsáveis pelo efeito antiprurido observado nos animais

pois a atividade anti-inflamatória destas substâncias descrita anteriormente, pode diminuir a liberação de histamina de mastócitos. Estudos mostram que epigalocatequina galato reduz a produção de histamina pela inibição da enzima histidina descarboxilase e estabiliza a membrana de mastócitos (YAMASHITA et al., 2000; RODRÍGUEZ-CASO et al., 2003), diminuindo assim, a sua degranulação. Estas ações, além de diminuir a concentração de histamina no local e por isso, diminuir a ativação de receptores H1 e H4, diminuem a liberação de proteases que podem estimular receptores PAR-2 e PAR-4, os quais são responsáveis pela condução do estímulo pruriginoso por via histamina independente. Além disso, catequinas podem reduzir a expressão de integrinas e quimiocinas em mastócitos, diminuindo a quimiotaxia, adesão e migração de mastócitos para o local afetado (MELGAREJO et al., 2007).

Um dos compostos ou a combinação desses podem ser responsáveis pela ação analgésica e antipruriginosa do EBAAs-BV. Mais estudos usando polifenóis presentes no extrato bruto aquoso de *Acca sellowiana*, são necessários para identificar o envolvimento desses compostos nas ações do EBAAs-BV. Assim, este trabalho mostra pela primeira vez, que o tratamento de EBAAs-BV (30 mg/kg), pode atenuar o comportamento de coçar induzido por injeção subcutânea de tripsina e histamina em camundongos. Estes dados suportam a ideia que o EBAAs-BV tem uma ação inibitória sobre a indução de prurido através das fibras sensoriais dependente e independente de histamina.

Um dos métodos alternativos ao uso de animais e amplamente utilizados para triagem de toxicidade de substâncias de origem vegetal é o que utiliza o microcústaceo *Artemia salina* (*A. salina*). Ele é considerado um bioindicador devido ao seu reduzido grau de tolerância e nítida resposta a pequenas variações ambientais (BAROSA et al., 2003). MEYER, et al. (1982) estabeleceu uma relação entre o grau de toxicidade e a concentração letal média, CL_{50} , de extratos de plantas sobre estes microcústaceos. Concentração de extrato igual ou acima de 1000 mg/L sem presença de morte acima de 50%, são considerados atóxicos. Este bioensaio é indicado e aceito por códigos de vigilância em vários países quanto a toxicidade de extratos de plantas frente ao sistema biológico, pois há semelhança dos limites dos efeitos tóxicos produzidos em *A. salina* com aqueles produzidos no ser humano (KLASSE et al., 2001). Neste trabalho, a ausência de toxicidade para nauplii de *A. salina* ($CL_{50} > 1000$ mg/L), mostra que os EBAAs-BV e -E podem ser bem tolerados quando utilizados em animais. Este teste é uma ótima ferramenta nos estudos com plantas medicinais, pois diminui o uso de animais na

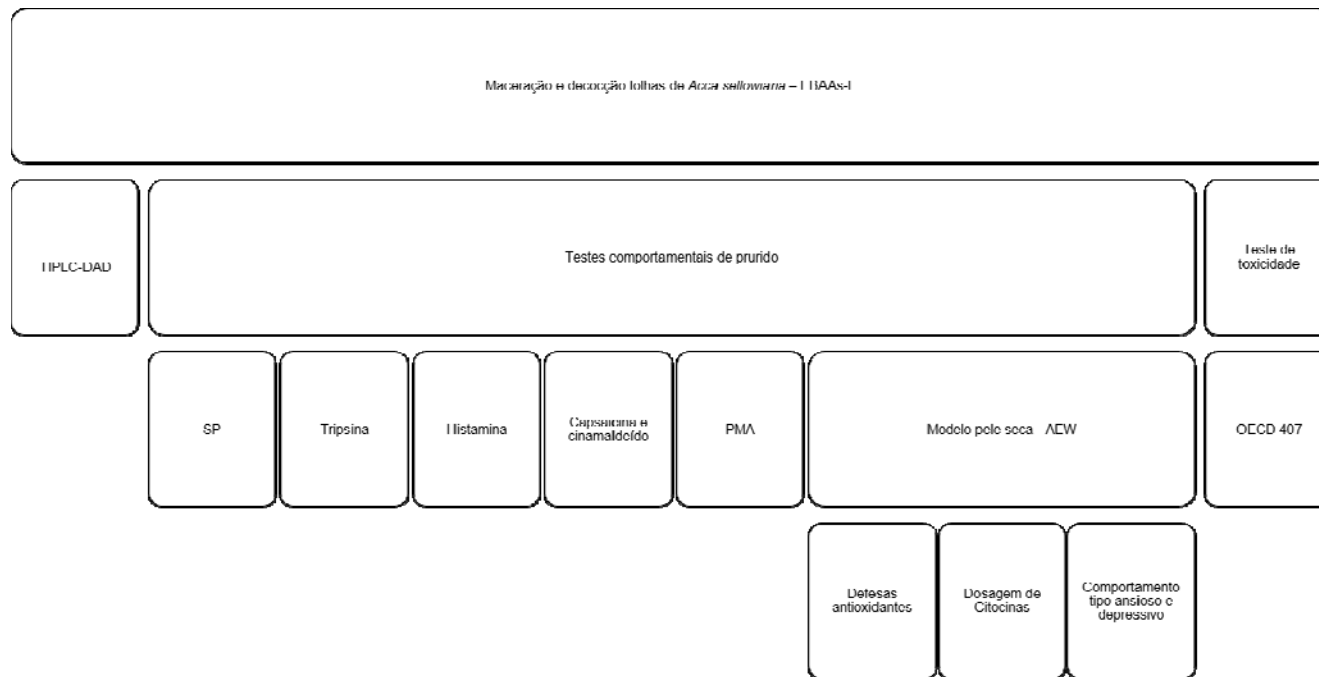
experimentação, atendendo ao princípio da experimentação animal “3R”: redução, substituição e refinamento.

Resumindo, neste capítulo, o presente estudo demonstrou, pela primeira vez, o efeito antinociceptivo e antiprurido em modelos animais de dor e prurido agudo, da planta *Acca sellowiana*. Foi evidenciada a capacidade do extrato desta planta em reduzir nocicepção e o comportamento de coçar causado por ácido acético, capsaicina (ativador TRPV1), cinamaldeído (ativador TRPA1), mentol (ativador TRPM8), tripsina (agonista PAR-2) e histamina em camundongos. Apesar de ainda não completamente desvendado o preciso mecanismo de ação pelo qual o extrato aquoso bruto das folhas da planta *Acca sellowiana* promove seus efeitos benéficos, nós sugerimos que este pode ser mediado, em parte, pela inibição de canais TRPV1, TRPA1, TRPM8 e de receptores de histamina H1 e H4, e de receptores ativados por proteases do tipo PAR-2 e PAR-4. Aliado ao resultado de ausência de toxicidade para *Artemia salina*, este estudo traz novas evidências científicas que sustentam a prática etnofarmacológica e comprova o potencial da planta *Acca sellowiana* no desenvolvimento de fitocosméticos e fitoterápicos com propriedades analgésicas e antiprurido.

6. CAPÍTULO 2 – COMPOSIÇÃO QUÍMICA, TOXICIDADE, E OS POSSÍVEIS MECANISMOS ENVOLVIDOS NO EFEITO ANTIPRUDO DO EBAAS-E.

Devido a ausência de toxicidade no modelo de *Artemia salina* e similaridade dos resultados obtidos no modelo de ácido acético com os extratos EBAAs-BV e EBAAs-E, optou-se em realizar a investigação dos possíveis mecanismos envolvidos no efeito antiprurido do EBAAs, utilizando o extrato proveniente da EPAGRI, já que neste local a produção da planta *Acca sellowiana* é cultivada para estudos relacionados a produção agrícola, em parceria com a UFSC, seguindo, portanto um rigoroso controle produtivo. Desta forma, há estabilidade produtiva desta planta, necessário para garantia de qualidade na obtenção do extrato.

Figura 10 - Delineamento Experimental capítulo 2.



Legenda: Representação gráfica dos tratamentos e testes realizados com EBAAs-E na avaliação toxicológica e os possíveis mecanismos envolvidos no efeito antiprurido deste extrato, em modelos agudos e crônico, descritos no capítulo 2.

Fonte: A autora (2018)

6.1 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1.1 Obtenção do extrato bruto aquoso de EBAA-s-E

Folhas da *Acca sellowiana* (Myrtaceae) foram coletadas de espécimes do pomar experimental da EPAGRI, Lages, SC (Lat 27°48'27,63''S; Long 50°19'46,13''O; Alt. 934m) em janeiro de 2015. Até 24 horas após a coleta, as folhas foram secas em estufa, maceradas, diluídas em água (60 g/800 ml) e fervidas por 20 minutos. Depois, o extrato foi filtrado e estocado em -20 °C até o uso. As plantas foram identificadas e autenticadas pelo Dr. Murilo Dalla Costa (Departamento de Biotecnologia da EPAGRI – Lages, SC). Uma amostra de cada espécime foi depositada no Instituto Federal de Santa Catarina, campus Lages (IFSC).

6.1.2 Análise do EBAA-s-E em HPLC-DAD

A análise em HPLC foi realizada como descrito previamente (DESCHAMPS; RAMOS, 2002), com poucas modificações. A análise foi realizada em um HPLC Agilent 1220 Infinity LC (Agilent Technologies, Waldbronn, Germany), equipado com uma bomba de gradiente binário, injetor automático com 10 µl de volume de amostra. Forno da coluna termostática foi definido em 40 °C, arraste do tipo diodo e detector de monitoramento em 200 - 400 nm. O HPLC foi equipado com coluna octadecil, Luna C-18 (4.6 mm x 150 mm, 3 µ) (Phenomenex, California, USA). A fase móvel consistiu em água: ácido acético: n-butanol (350:1:10 v/v) modo isocrático com taxa de fluxo de 0.9 mL/min. A quantificação de compostos fenólicos e flavonóides foi baseado em picos de áreas detectadas em 225 nm, e correlacionadas com as correspondentes curvas analíticas.

6.1.3 Animais

Foram utilizados quatrocentos e sessenta e quatro camundongos adultos Swiss machos e noventa e seis camundongos adultos Swiss fêmeas (30 – 45 g; média de 3 meses de idade), obtidos do biotério central da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil. Todos os animais foram acondicionados em caixas coletivas, com no máximo 15 animais por caixa, com livre acesso a comida e água. O ambiente foi mantido em 22 ± 1 °C e 60 – 80% de umidade num ciclo

claro/escuro de 12 horas (luzes acesas às 06:00 a.m.).

Uma hora antes dos testes, os animais foram ambientados nas condições do laboratório experimental. Todos os experimentos foram executados durante o dia. Animais foram distribuídos aleatoriamente em 5–12 animais por grupo de experimento. Procedimentos e protocolos utilizados foram previamente aprovados pelo comitê de ética de pesquisa em animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA #PP00745 and #8581050417), onde os testes foram realizados. Foram seguidos os protocolos e procedimentos éticos estabelecidos no Guidelines Nacional para o uso de animais e Guidelines de cuidados e saúde animal (NIH publication Nº 80-23). O número de animais usados e a intensidade de estímulo irritativo foi o mínimo necessário para a obtenção dos dados. No final dos experimentos os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical.

6.1.4 Protocolo de toxicidade OECD

O teste de toxicidade foi realizado conforme as orientações do guia OECD 407, estudo da toxicidade oral em roedores em doses repetidas por 28 dias (OECD, 2008).

Para isso, foram utilizados camundongos jovens fêmeas, nulíparas e não grávidas e, camundongos machos, de seis semanas de idade. Cinco grupos de cinco animais machos e cinco grupos de cinco animais fêmeas foram separados e acondicionados em caixas. Para cada dose testada, cinco animais de cada sexo foram utilizados. As doses de EBAs-E utilizadas foram: 10, 100, 300 e 1000 mg/Kg, por via de administração intragástrica. Além desses, cinco animais machos e cinco animais fêmeas foram tratados por via intragástrica com salina, 10 ml/kg, considerado o grupo controle (C) do experimento. Todos os animais foram tratados e observados quanto a morbidade e mortalidade durante 28 dias, para isso, ao menos uma vez por semana, uma detalhada observação clínica foi realizada, utilizando-se uma caixa de acondicionamento, observando-se um animal por vez. Alterações na pele, pelos, olhos, mucosas, ocorrência de secreções e excreções, atividades autonômicas (lacrimação, piloereção, tamanho da pupila e padrão respiratório) e alterações na marcha foram observados. Avaliação neuromuscular como postura e respostas durante o manuseio do animal foram avaliadas pelos testes de: força de preensão, teste do arame, geotropismo positivo, resposta pupilar e teste acústico. A ocorrência de movimentos clônicos, tônicos, estereotipados (ex. autolimpeza excessiva, movimento circular repetitivo) e bizarros (automutilação,

caminhar para trás) também foram observados.

6.1.5 Testes comportamentais para verificação de efeitos de toxicidade no protocolo OECD

O teste de apreensão foi realizado conforme descrito previamente (FOWLER et al., 2002; BOBINSKI et al., 2011). Para a medida de pico de força foram utilizados os membros anteriores. Foi registrada a força máxima exercida sobre um sistema de medida (Grip Strength Meters, Columbus Instruments, Columbus, OH, USA). Durante os testes, cada animal foi gentilmente contido para que o mesmo segurasse, com as patas dianteiras, a armação de rede (10 x 12 cm) anexado ao medidor de tensão. Os animais foram movidos em direção caudal até que as patas se soltassem. Três medidas de força de cada animal foram obtidas, o valor da média dessas medidas foi utilizado para análise estatística.

O teste do arame foi conduzido conforme descrito por Boissier, 1961. Os animais foram segurados pela cauda e suas patas anteriores foram posicionadas no arame (1 cm diâmetro x 15 cm comprimento x 20 cm altura). Quando as patas seguraram o arame, os animais foram posicionados horizontalmente e as suas caudas foram soltas. Foi registrado o tempo que o animal levou para segurar o arame com as patas traseiras. Os animais que levaram mais de três segundos para agarrarem o arame ou foram incapazes de segurarem o arame foram considerados inaptos.

O teste de geotropismo positivo foi realizado conforme descrito previamente (GAD, 1982). Os animais foram colocados numa superfície inclinada (aprox. 30°) com a cabeça voltada para baixo. Animais que giraram 180°, levando a cabeça para cima, foram considerados detentores de comportamento normal (neste caso, representado pelo símbolo “+”).

A resposta pupilar foi conduzida conforme descrito previamente (GAD, 1982). Um feixe de luz foi apontado para os olhos dos animais. Foi considerado comportamento normal quando houve constrição pupilar enquanto a luz estava apontada para os olhos dos animais e dilatação da pupila quando a luz foi desligada (neste caso, representado pelo símbolo “+”).

O teste de esconder bolas de vidro (*Marble burying test*) foi executado como descrito previamente (KEDIA; CHATTARJI, 2014). Roedores usam a maravalha para esconder objetos brilhosos e a inibição deste comportamento é considerado um comportamento ansiolítico ou preventivo de comportamento compulsivo. A maravalha foi

uniformemente distribuída na caixa (17.5 x 10 x 5.5 cm) a 5 cm de altura do assoalho da caixa. Vinte bolas de vidro (1.4 cm) foram espalhadas uniformemente (4 x 5) na superfície da maravalha. Cada animal foi colocado na caixa por 20min. Após este período o animal foi removido e o número de bolas escondidas (ao menos 2/3) foi registrado.

A audição foi testada pelo teste acústico do sobressalto (TUPPER; WALLACE, 1980; GAD, 1982). Numa sala silenciosa, cada animal foi colocado em uma caixa coberta com uma tampa de metal. Um objeto de metal foi solto sobre a tampa de uma altura de 60cm, produzindo um som alto. O recuo reflexivo, piscar de olhos, flexionar/extender as patas, ou arqueamento do corpo após o barulho repentino é considerado um padrão de resposta adequado.

6.1.6 Drogas e tratamentos

Tripsina, SP, histamina, capsaicina, cinamaldeído, PMA e diclofenaco de sódio foram obtidos da Sigma–Aldrich (St. Louis, MO). Loratadina foi obtida da EMS (São Paulo, Brazil) e dexametasona da Aché (São Paulo, Brazil). Todos os outros produtos químicos de grau analítico foram adquiridos de fornecedores comerciais. Diluições e veículo para as substâncias testes foram: capsaicina (10% etanol/10% Tween 80 em 0.9% salina), cinamaldeído (5% Tween 80 em salina), PMA (solução estoque diluído em álcool absoluto, solução de uso com no máximo 0,5% de etanol em salina), tripsina, SP e histamina foram dissolvidas em salina. Animais tratados com salina, a qual foi usada para diluir o EBAAs-E, estão descritos como controle. Quando tratados com diclofenaco de sódio, dexametasona ou loratadina foram considerados como controle positivo. Experimentos prévios validaram a ausência de efeito significativo sobre o comportamento dos animais, causado por Tween 80 ou etanol, quando administrados sozinhos nas concentrações de uso.

Os animais foram condicionados na câmara teste (13 x 13 x 8 cm) após 30 minutos do tratamento intragástrico (i.g.) com o EBAAs-E, salina ou loratadina. Após o tratamento com dexametasona ou diclofenaco de sódio, ambos com via de administração intraperitoneal (i.p.), os animais foram colocados imediatamente na câmara teste. Após 30 minutos de condicionamento na câmara teste, 50 µl de cada substância irritativa foi administrada subcutaneamente, na região interescapular dos animais ou, aplicadas sobre a mesma região. O ato de coçar atrás das orelhas foi considerado como comportamento pruridogênico (número de resposta).

6.1.7 Prurido induzido por SP, tripsina e histamina

Estes testes foram conduzidos conforme descritos previamente (OHTSUKA et al., 2001; COSTA et al., 2008; AKASAKA et al., 2011). O prurido foi estimulado por injeção subcutânea (s.c.) de SP (100 nmol/sítio), tripsina (300 µg/sítio) ou histamina (100 nmol/sítio). Imediatamente após a injeção, o ato de coçar atrás das orelhas foi contado por 30 minutos para SP ou histamina e 40 minutos para tripsina.

6.1.8 Capsaicina e cinamaldeído como substâncias testes para o comportamento de coçar.

Capsaicina e cinamaldeído são conhecidos ativadores de canais TRPV1 e TRPA1, respectivamente. Estas substâncias são largamente utilizadas para desvendar possíveis mecanismos de ação de substâncias bioativas com efeito analgésico ou para revelar vias sensoriais de condução de dor ou de prurido. No entanto, não há descrição na literatura sobre a utilização destas substâncias diretamente na região interescapular dos animais com o intuito de causar prurido. Assim, na tentativa de desvendar um possível mecanismo de ação do EBAAAs-E, capsaicina e cinamaldeído foram usados como agentes indutores de prurido. Para isso, curva de dose e tempo resposta (0 - 30 min) foram determinadas. A indução de prurido foi realizada por injeção subcutânea de 50 µL de capsaicina (0.75 – 7.5 µg/sítio) ou cinamaldeído (250 – 2500 nmol/sítio) na região interescapular dos animais. Imediatamente após a injeção, o ato de coçar atrás das orelhas foi registrado por 30 minutos.

Com base na curva de dose e tempo resposta, o prurido foi estimulado por injeção subcutânea (s.c.) na parte interescapular dos animais (50 µL) com capsaicina (2.5 µg/site), ou cinamaldeído (750 nmol/site). Imediatamente após a injeção destas substâncias, foi registrado o comportamento de coçar por 30 minutos.

6.1.9 Prurido induzido por forbol 12-miristato 13-acetato (PMA)

PMA (500 pmol/site), um ativador de PKC (BAGGIO et al., 2012), foi usado na tentativa de descobrir os mecanismos envolvidos na ação do EBAAAs-E, através da observação de uma possível ação de EBAAAs-E em inibir o prurido induzido por PKC. Imediatamente após a injeção de PMA, a ação de coçar atrás das orelhas foi considerado

indicativo de comportamento pruridogênico. Este comportamento foi registrado por 60 minutos.

6.1.10 Prurido crônico induzido pelo rompimento da barreira cutânea, modelo de pele seca (AEW)

Este modelo foi realizado conforme descrito previamente (MIYAMOTO et al., 2002). Os pelos da região interescapular dos animais foram depilados com máquina três dias antes do início do experimento. Gaze embebida em uma mistura de acetona e éter etílico (1:1) foi colocada sobre a região interescapular dos animais, por 15 segundos. Logo depois, outra gaze, agora embebida com água, foi colocada sobre a mesma região por 30 segundos. Este grupo corresponde ao grupo induzido ao comportamento espontâneo de coçar, grupo AEW. Em outro grupo de animais, gaze embebida com água foi colocada sobre a região interescapular dos animais por 45 segundos. Este grupo corresponde ao grupo ÁGUA, sem indução do comportamento de coçar, controle do modelo. Este tratamento foi realizado 2 vezes ao dia (8h e 15:30h), por 5 dias. No 6º dia os animais foram tratados com EBAAAs-E uma hora antes da aplicação da solução AEW ou água na região interescapular dos animais. Logo após a aplicação da solução, o comportamento de coçar foi registrado por 30 minutos.

Em outro grupo de animais, uma hora antes de cada aplicação de solução AEW ou água na região interescapular dos animais, os animais foram tratados com EBAAAs-E, durante 5 dias, duas vezes ao dia, tratamento de doses repetidas. No 6º dia, a solução AEW ou água foi aplicada sobre a região interescapular dos animais e, imediatamente após a aplicação, iniciaram-se as contagens da resposta pruridogênica. A ação de coçar atrás das orelhas foi considerado indicativo de comportamento pruridogênico. Este comportamento foi registrado por 30 minutos. Este tratamento foi realizado em animais machos e fêmeas.

Após a indução de prurido crônico com o modelo de pele seca e o tratamento de doses repetidas de EBAAAs-E, foram avaliados parâmetros de locomoção e de comportamento tipo ansioso ou depressivo dos animais. Amostras de pele e de medula foram coletadas para medir a atividade das enzimas ligadas a defesas antioxidantes, para dosagem de citocinas IL-10 e IL-17 e do fator de crescimento do neuronal (NGF). Estes testes foram realizados nos animais machos.

6.1.11 Análise das defesas antioxidantes na indução de prurido pelo modelo de pele seca (AEW)

Para a medida da atividade enzimática, as amostras de pele e medula foram homogeneizadas em 20 mM HEPES, pH 7,4 (1:10 w/w) e centrifugadas em 20.000 x g por 30 minutos. O sobrenadante foi usado para a medida da atividade enzimática, as quais foram determinadas por espectrofotômetro, em placa de leitura UV/Vis (Infinity 2000, Tecan). A atividade enzimática Superóxido dismutase (SOD) foi medida como descrito previamente (PAOLETTI et al., 1986). Este método é baseado na geração química de superóxido na presença de manganês e EDTA. A taxa de produção de superóxido foi monitorada pela oxidação de NADH em 340 nm. Uma unidade de SOD corresponde a quantidade de proteína necessária para inibir 50% de oxidação de NADH. A atividade enzimática catalase (CAT) foi medida pela taxa de consumo de H₂O₂ em 240 nm (AEBI, 1984). A atividade enzimática Glutathione peroxidase (GPx) foi medida em 340 nm através da taxa de consumo de NADPH na presença de glutathione redutase (GR), glutathione e hidroperóxido de cumeno (WENDEL, 1981). A medida da atividade enzimática Glutathione redutase foi realizada em 340 nm através do consumo de NADPH numa reação de redução da glutathione oxidada (Carlberg; Mannervik, 1985).

6.1.12 Dosagem de citocinas no modelo de pele seca (AEW)

Para a dosagem de citocinas as amostras de pele e medula foram homogenizadas em PBS (25 mM, pH 7,4) com coquetel de inibidor de proteases (1:10) e centrifugado em 3000 g por 10 min a 4 °C. Os sobrenadantes obtidos foram armazenados a -80 °C até a realização das análises. O conteúdo proteico total do sobrenadante foi mensurado pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976) utilizando uma curva padrão de calibração com albumina de soro bovino (BSA) (0,05 a 0,5 mg/mL). Os níveis de citocinas IL-17, IL-10 e do fator de crescimento neuronal (NGF), foram quantificados através da técnica de Elisa, utilizando-se para isso kits da R & D Systems (Minneapolis, MN, USA), seguindo as instruções do fabricante. As concentrações das citocinas foram mensurados pela interpolação de uma curva padrão por mensuração colorimétrica a 450 nm (corrigidas pela subtração da leitura a 550 nm) no leitor de placa (Infinity 2000, Tecan). Os valores finais foram expressos como pg/mg de proteína.

6.1.13 Avaliação dos animais no campo aberto após a indução de prurido crônico pelo modelo de pele seca (AEW) e tratamento com doses repetidas do EBAAs-E.

Este teste baseou-se na metodologia descrita e validada previamente (SIEGEL, 1946; ARCHER, 1973). Após a última aplicação de solução AEW ou água na região interescapular dos animais (6º dia de aplicação) os animais foram colocados no campo aberto (caixa de vidro 30 X 30 X 15 cm) e observados durante 5 minutos. Os parâmetros avaliados foram: número de cruzamentos, tempo de permanência no centro e distância percorrida no campo aberto. Para a realização do experimento, a sala foi iluminada com luz vermelha de 15w. Os dados foram avaliados pelo sistema ANY-maze.

6.1.14 Avaliação do comportamento do tipo depressivo no modelo AEW com doses repetidas do EBAAs-E

Este teste foi realizado conforme descrito previamente (STERU et al., 1985; CRYAN; MOMBÉREAU; VASSOUT, 2005). No dia do teste de prurido crônico (6º dia de aplicação de AEW ou água) os animais foram presos pela cauda com fita adesiva e permaneceram nesta posição por 6 min. Neste período foi registrado o período de latência, tempo inicial até o animal ficar imóvel e, também o tempo de imobilidade, tempo em que o animal permaneceu imóvel a partir do período de latência.

6.1.15 Análise estatística

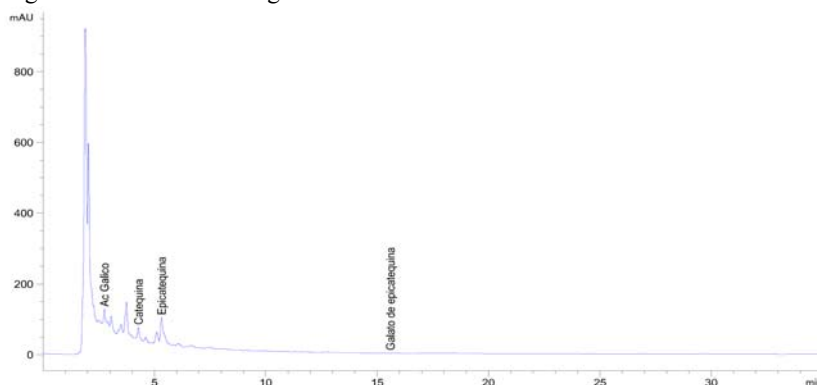
Os resultados foram apresentados com média \pm EPM de 4 a 15 camundongos por grupo. Para comparações múltiplas a análise estatística foi realizada por ANOVA uma ou duas vias, seguido de teste *pos hoc* Newmman-Keuls ou Bonferroni quando apropriado. Valores de P menores que 0.05 foram indicativos de significância. O software utilizado para análise foi o Graph Pad Prism 6.0 (Graph Pad Software Inc., La Jolla, CA).

6.2 RESULTADOS

6.2.1 Composição química do extrato bruto aquoso de *Acca sellowiana* (Myrtaceae)

O perfil químico do EBAAs-E foi obtido pela análise em HPLC-DAD em 225 nm (Figura 11). O cromatograma mostra picos correspondentes aos picos de compostos fenólicos com tempo de retenção de 2–8 min. Quando os picos obtidos foram comparados com as curvas de calibração foram identificados os seguintes compostos: ácido gálico (12,81 µg/mL), catequina (7,88 µg/mL) e epicatequina (31,15 µg/mL). Estes resultados confirmam os dados obtidos com a análise do EBAAs-BV em UHPLC-ESI-QTOF-MS, mostrando a similaridade dos extratos e que os mesmos são uma complexa mistura de polifenóis, incluindo ácido elágico glicosídeo, catequina (flavan-3-ol), epicatequina, galocatequina e protociandina B.

Figura 11 - Perfil cromatográfico do EBAAs-E em HPLC-DAD.



Legenda: Picos cromatográficos detectadas em 225 nm do EBAAs-BV obtidos por HPLC-DAD. Compostos identificados estão nomeados no gráfico, nos respectivos tempos de retenção.

Fonte: A autora (2018)

6.2.2 OECD 407

Os sinais clínicos dos animais foram observados antes do início dos experimentos e uma hora depois do tratamento com EBAAs-E. Os animais foram avaliados diariamente por vinte e oito dias. Nenhuma

variação estatisticamente significativa foi encontrada nas avaliações hematológicas quando comparados os grupos tratados com EBAAs-E e grupo controle (ANOVA duas vias, $P > 0,05$), apresentados na Tabela 4. Os fatores de interação foram: Leucócitos $F_{(4,23)} = 1,6$; Neutrófilos $F_{(4,35)} = 2,0$; Linfócitos $F_{(4,35)} = 2,0$; Monócitos $F_{(4,35)} = 0,2$; Eosinófilos $F_{(4,35)} = 1,8$. ALT $F_{(4,13)} = 0,2$; AST $F_{(4,13)} = 1,5$.

Em todos os grupos analisados, os eritrócitos, plaquetas e leucócitos mantiveram as características morfológicas (forma, tamanho e cor) após os 28 dias de tratamento, quando observados em microscopia ótica. Quanto a dosagem das enzimas séricas, alanina aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), não houve diferença significativa quando realizada análise estatística por ANOVA duas vias ($P > 0,05$), (Tabela 4) após 28 dias de tratamento com EBAAs-E ou salina.

Tabela 4 - Avaliação hematológica e bioquímica dos animais machos e fêmeas tratados com EBAAs-E (i.g.)

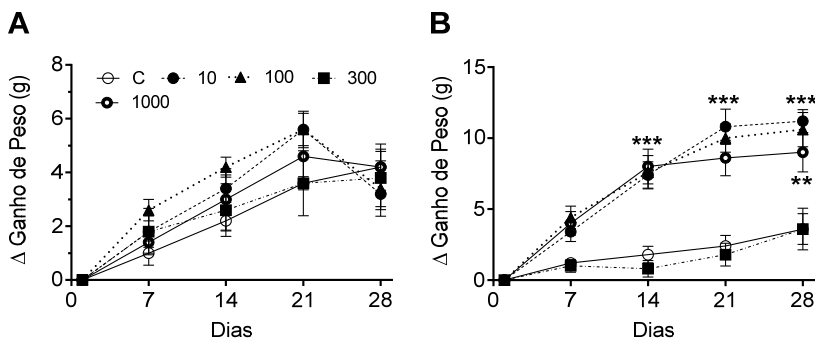
Parâmetros	Sexo	Grupos (mg/Kg)				
		0 (Controle)	10	100	300	1000
Contagem total de leucócitos (10^3 cells/ μ l)	F	4,9 \pm 0,7	4,2 \pm 0,2	4,6 \pm 0,9	5,8 \pm 0,3	5,5 \pm 0,8
	M	5,5 \pm 0,8	4,7 \pm 0,5	6,1 \pm 0,5	4,4 \pm 0,3	4,9 \pm 0,9
Neutrófilos (%)	F	18,4 \pm 2,5	16,0 \pm 2,8	17,4 \pm 5,3	13,5 \pm 1,3	23,0 \pm 1,5
	M	10,7 \pm 1,8	13,2 \pm 1,4	22,2 \pm 1,7	18,6 \pm 3,4	17,0 \pm 2,3
Linfócitos (%)	F	72,2 \pm 6	72,4 \pm 2,5	68,3 \pm 5,9	79,0 \pm 1,4	72,7 \pm 7,7
	M	77,7 \pm 0,9	80,2 \pm 1,4	66,4 \pm 1,6	73,4 \pm 4,0	77,6 \pm 1,9
Eosinófilos (%)	F	0,80 \pm 0,4	2,6 \pm 0,7	1,8 \pm 0,6	1,5 \pm 0,3	3,0 \pm 0,6
	M	1,3 \pm 0,3	1,4 \pm 0,5	2,0 \pm 0,6	1,8 \pm 0,2	1,4 \pm 0,2
Monócitos (%)	F	9,4 \pm 2,7	8,0 \pm 1,1	9,4 \pm 1,9	7,5 \pm 1,7	9,3 \pm 0,7
	M	8,0 \pm 1,2	7,8 \pm 1,1	7,4 \pm 1,3	6,4 \pm 0,8	9,8 \pm 1,1
Alanina aminotransferase (U/L)	F	35	18	21	27	21
	M	27	22	18	24	36
Aspartato aminotransferase (U/L)	F	53	56	56	41	42
	M	61	65	57	43	54

Legenda: Avaliação de parâmetros hematológicos e bioquímicos em camundongos fêmeas (F) e machos (M) após tratamento i.g. de salina (C) ou EBAAs-E nas doses de 10, 100, 300 e 1000 mg/kg, por 28 dias. Os valores representam a média \pm EPM (N=3-5). Diferenças entre o grupo controle, sexo e tratamento foram analisados por ANOVA duas vias ($P > 0,05$).

Fonte: A autora (2018).

O peso dos animais, consumo de água e de comida, foram monitorados uma vez por semana, no mesmo dia e período. Quando analisada por ANOVA duas vias, a diferença de ganho de peso corporal dos animais fêmeas quanto a dose não apresentou diferença significativa ($P > 0,05$) entre os grupos tratados com EBAA-s ou grupo controle (Figura 12A). O fator tempo apresentou ter efeito sobre o ganho do peso dos animais, com diferença significativa entre os grupos ($F_{(4,80)} = 72,23$, $P < 0,001$) (Figura 12A). Os animais machos apresentaram diferença estatística significativa quanto ao ganho de peso corporal, após análise por ANOVA duas vias (Figura 12B). A diferença encontrada foi com relação a dose ($F_{(4,80)} = 129,90$ $P < 0,001$), e ao tempo ($F_{(4,80)} = 14,22$ $P < 0,001$) do tratamento, com interação dose/tempo ($F_{(16,80)} = 9,28$, $P < 0,001$). A análise *pos hoc* Bonferroni mostrou que as diferenças encontradas são em relação as doses 10, 100 e 1000 mg/kg quando comparadas ao grupo controle correspondente, após 14 dias de tratamento (Figura 12B).

Figura 12 - Ganho de peso corporal dos animais a cada 7 dias após 28 dias de tratamento com EBAA-s-E ou salina.



Legenda: (A) Camundongos fêmeas e (B) camundongos machos. Cada ponto representa a média \pm EPM (N=5). Diferenças estatísticas estão indicadas por $**P < 0,01$ e $***P < 0,001$, quando comparados com o grupo controle correspondente (ANOVA duas vias seguido de teste *pos hoc* Bonferroni). As barras de EPM podem estar encobertas pelos símbolos.

Fonte: A autora (2018)

O consumo médio semanal de água e de ração não apresentaram diferenças estatísticas significativas entre os tratamentos, seja em animais machos ou fêmeas ($P > 0,05$; ANOVA uma via), apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 - Consumo de água e ração de camundongos tratados com EBAAAs-E por 28 dias.

Consumo	Sexo	Grupos (mg/kg)				
		0 (Controle)	10	100	300	1000
Comida (g/semana/animal)	F	38,9±2,9	38,4±2,7	38,1±1,2	38,4±1,8	42,1±2,9
	M	33,0±4,5	41,2±6,6	41,1±2,7	33,1±2,3	45,2±3,1
Água (mL/semana/animal)	F	49,5±2,3	48,5±4,9	48,5±3,0	49,5±2,3	54,8±9,5
	M	57,5±3,4	49,0±3,5	47,8±3,4	60,3±6,3	56,5±4,0

Legenda: Consumo médio de ração e água em animais fêmeas e machos após tratamento por 28 dias com EBAAAs-E (10, 100, 300 ou 1000 mg/kg) ou salina (controle). Os valores representam a média ± EPM (N=5).

Fonte: A autora (2018)

Os aspectos clínicos foram observados uma vez por semana, no mesmo dia e período. Nenhum animal tratado apresentou qualquer alteração de sinais clínicos ou morreu durante o período de avaliação. Pele e pelos, olhos e mucosas, secreções e excreções e atividade autonômica foram preservadas. Nenhuma mudança na marcha, postura, resposta no manuseio, presença de movimentos clônicos ou tônicos, estereotipados ou bizarros foram observados. Após 28 dias de tratamento com EBAAAs-E ou salina, a reatividade sensorial e atividade motora foram preservadas sem haver nenhuma diferença estatística significativa após comparação estatística por ANOVA duas vias ($P>0,05$). Estes dados mostram que o tratamento com EBAAAs-E nas doses até 1000 mg/Kg, por 28 dias, não causaram qualquer alteração na força ou coordenação motora dos animais (Tabela 6).

Tabela 6 - Avaliação da atividade motora e reatividade sensorial de animais machos e fêmeas tratados com EBAAAs-E ou salina pela via intragástrica por 28 dias

Testes	Sexo	Grupos (mg/kg)				
		0 (Controle)	10	100	300	1000
Teste de apreensão (g)	F	12,0±0,7	13,4±2,4	16,6±2,3	12,8±1,8	14,8±0,7
	M	15,2±0,9	13,4±1,6	14,0±0,4	14,6±0,7	16,8±0,9
Teste do Arame (segundos)	F	1,2±0,2	1,4±0,4	1,8±0,6	1,6±0,4	2,2±0,4
	M	1,2±0,2	2,0±0,3	1,6±0,4	1,4±0,2	2,6±0,2
Teste acústico (%)	F	100	100	100	100	100
	M	100	100	100	100	100
Teste de esconder esferas de vidros (média)	F	19,6±0,2	19,2±0,2	17±0,0	18,6±0,7	19±0,6
	M	17±0,4	18,8±0,4	18,8±0,4	16,3±0,6	18,2±1,1
Geotropismo positivo	F	+	+	+	+	+
	M	+	+	+	+	+
Marcha prejudicada	F	1	1	1	1	1
	M	1	1	1	1	1
Resposta pupilar	F	+	+	+	+	+
	M	+	+	+	+	+

Legenda: Avaliação neurocomportamental em animais fêmeas e machos após tratamento por 28 dias com EBAAAs-E (10, 100, 300, ou 1000 mg/kg) ou salina (veículo). Os valores representam a média ± EPM (N=5). Diferenças entre os grupos foram avaliadas por ANOVA 2 vias (P>0.05). (+ = teste positivo; 1 = prejuízo insignificante da marcha).

Fonte: A autora (2018)

6.2.3 Prurido induzido por SP, tripsina e histamina

Injeção (s.c.) de SP (100 nmol/site), tripsina (agonista de receptor PAR-2, 300 µg/site) ou histamina (100 nmol/site) causaram evidente aumento de prurido em camundongos quando comparados com o grupo salina. Curva dose-resposta de EBAAAs-E com SP, tripsina ou histamina estão apresentados na Figura 13, mostrando uma drástica redução do comportamento de coçar, mesmo em baixas doses do extrato. O efeito do EBAAAs-E sobre a indução de prurido por SP foi testado em animais machos (Figura 13A) e fêmeas (Figura 13B). Após o tratamento dos animais com EBAAAs-E nas doses de 0,3; 1; 3 e 10 mg/Kg os valores de inibição do prurido em animais machos foram de 33 ± 6%, 40 ± 10%, 88

$\pm 7\%$ e $83 \pm 10\%$, respectivamente. O valor médio da DI_{50} (95% de limite de confiança) foi de 1,4 (0,8–2,6) mg/kg (Figura 13A). Os valores de inibição para os animais fêmeas nas doses de 1, 3 e 10 mg/Kg foram de $17 \pm 6\%$, $65 \pm 7\%$, e $85 \pm 1\%$, respectivamente e o valor médio da DI_{50} (95% de limite de confiança) foi de 2,3 (1,6–3,5) mg/kg (Figura 13B). A análise estatística por ANOVA duas vias não identificou diferença estatística significativa influenciada pelo gênero dos animais ($P > 0,05$) (Figura 13). O efeito de EBAAAs-E em diminuir o comportamento de coçar causado por SP em fêmeas foi similar ao efeito observado em machos. Baseado nestes resultados, este trabalho foi conduzido em animais machos.

As doses de 3 e 10 mg/Kg foram mais efetivas do que o controle positivo tanto em animais machos quanto em fêmeas (Figura 13A e 13B). Os valores de inibição de dexametasona (0,5 mg/kg, i.p.) foram de $40 \pm 5\%$ em animais machos (Figura 13A) e $23 \pm 4\%$ em animais fêmeas (Figura 13B). Diclofenaco de sódio (30 mg/kg, i.p.) não foi capaz de diminuir o comportamento de coçar causado por SP, com valores de inibição de $23 \pm 3\%$ em animais machos e $2 \pm 3\%$ em fêmeas (Figura 13A e 13B).

No teste com tripsina, os valores de inibição obtidos após tratamento dos animais com EBAAAs-E nas doses de 0,3; 1; 3 e 10 mg/Kg ACEAs foram de $24 \pm 1\%$, $40 \pm 9\%$, $73 \pm 7\%$ e $76 \pm 7\%$, respectivamente, com valor médio de DI_{50} (95% de limite de confiança) de 2,3 (1,2–4,2) mg/kg (Figura 13C).

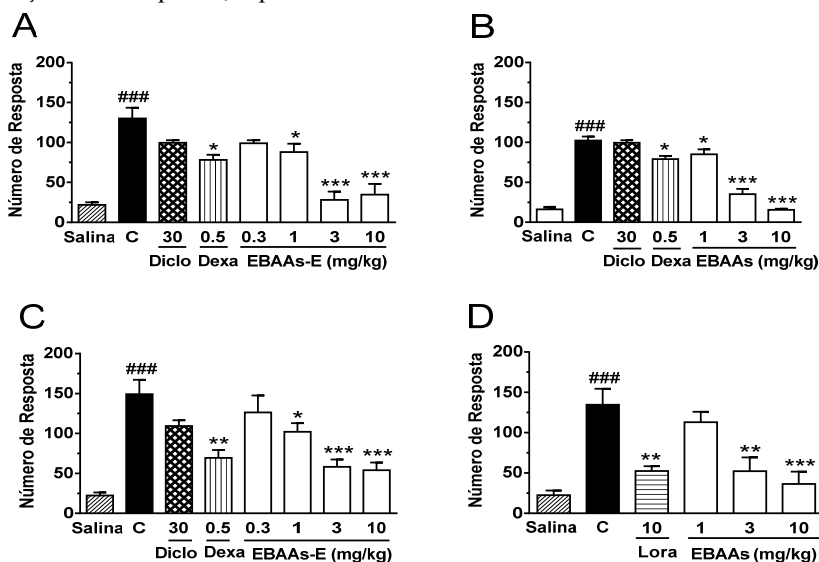
Para a histamina (Figura 13D) a redução do comportamento de coçar foi de $19 \pm 1\%$, $70 \pm 1\%$ e $82 \pm 1\%$ após tratamento com EBAAAs-E nas doses de 1, 3 e 10 mg/kg, respectivamente, com valor médio de DI_{50} de 5,0 (2,6–9,4) mg/kg (95% de limite de confiança).

Para comparar o tratamento do EBAAAs-E com conhecidos fármacos antipruridogênicos e anti-inflamatórios, dexametasona e diclofenaco de sódio foram utilizados como controles positivos nos testes com tripsina e, loratadina foi usada como controle positivo no teste com histamina. O valor de inibição da dexametasona foi de $53 \pm 7\%$ e do diclofenaco de sódio foi de $27 \pm 5\%$ sobre o comportamento de coçar no teste induzido por tripsina (Figura 13C). Loratadina, usada no teste com histamina, apresentou valor de inibição de $61 \pm 5\%$ (Figura 13D).

Como se pode observar na Figura 13, o EBAAAs-E foi mais eficaz na prevenção do comportamento de coçar do que os controles positivos utilizados. De acordo com estes resultados, aliando a menor dose utilizada com o maior efeito, a dose de 3 e 10 mg/kg de EBAAAs-E foi

escolhida para a continuidade dos experimentos.

Figura 13 - Efeito do tratamento com EBAAs-E sobre o comportamento de coçar induzido por SP, tripsina e histamina.



Legenda: Os animais receberam, EBAAs-E (i.g.) uma hora antes da injeção subcutânea de (A) SP (100 nmol/sítio) em animais machos, (B) SP em animais fêmeas, (C) tripsina (300 µg/sítio) or (D) histamina (100 nmol/sítio). As colunas de linhas inclinadas representam os animais tratados com salina (i.g.), veículo do EBAAs-E e veículo do agente irritativo (salina, s.c.). As colunas pretas representam o controle negativo, animais tratados com salina (i.g.) e agente irritativo (s.c.). Animais tratados com diclofenaco de sódio (Diclo 30 mg/Kg, i.p., colunas de linhas cruzadas), dexametasona (Dexa, 0,5 mg/Kg, i.p., colunas de linhas verticais) e loratadina (Lora, 10 mg/Kg, i.g., coluna de linhas horizontais) e agente irritativo, representam os controles positivo. As colunas brancas correspondem aos animais tratados com EBAAs-E e o agente irritativo. Os dados estão apresentados pela média + E.P.M. (N = 5-8). Diferenças estatísticas estão indicadas por ###P < 0,001 quando comparadas com o grupo salina e por *P < 0,05, **P < 0,01, ***P < 0,001 quando comparada ao grupo controle (C) (ANOVA uma via seguida de teste *pos hoc* Newman-Keuls test).

Fonte: A autora (2018)

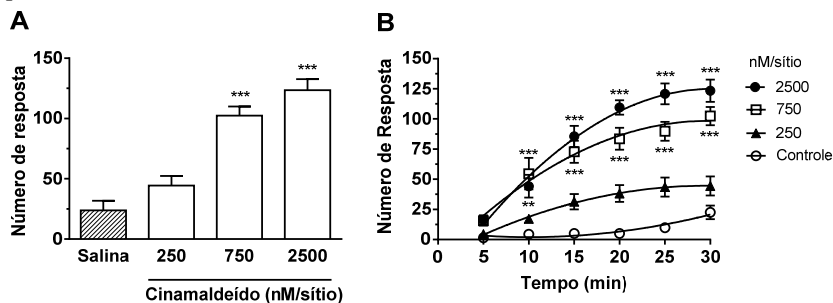
6.2.4 Prurido induzido por cinamaldeído e capsaicina

Cinamaldeído e capsaicina, ativadores de canais TRPA1 e TRPV1, respectivamente, foram usados como indutores de prurido.

Curva dose e tempo resposta foram feitas para encontrar a melhor concentração e tempo para a avaliação deste efeito (Figura 14 e 15).

Os animais que receberam injeção subcutânea, na região interescapular, de cinamaldeído apresentaram aumento do comportamento de coçar concentração-dependente. Nas doses de 750 e 2500 nmol/sítio, o comportamento de coçar aumentou de um valor basal de ~20 para 110 e 130, respectivamente (Figura 14A), com valor médio de DE_{50} de 467,2 (325,8 - 670,0) nM/sítio (95% de limite de confiança). A dose de 250 nM/sítio não aumentou o comportamento de coçar dos animais. Em todas as doses avaliadas, este aumento se deu em torno de 10 - 15 minutos, estabilizando após 20 - 30 minutos da injeção de cinamaldeído (Figura 14B). Baseado nestes resultados a dose de 750 nmol/sítio, s.c., de cinamaldeído foi escolhida para a indução de prurido. O tempo de observação escolhido foi de 30 min.

Figura 14 - Curva dose e tempo resposta do comportamento de coçar induzido por cinamaldeído.

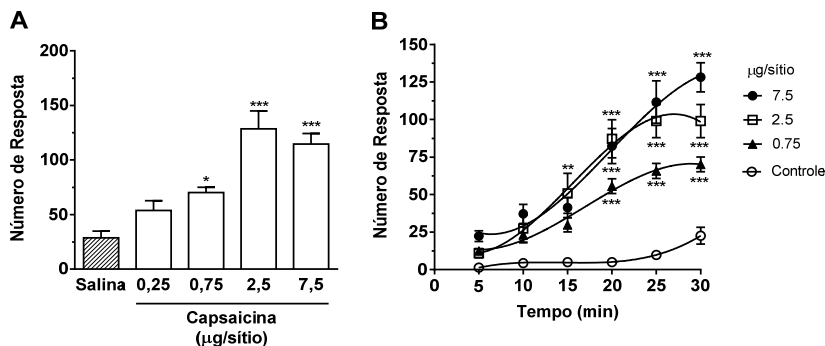


Legenda: A) Curva dose-resposta. A coluna de linhas inclinadas representa o grupo de animais que receberam veículo (salina, 50 μ l, s.c.), considerado grupo de comportamento basal. As colunas brancas correspondem ao grupo de animais que receberam injeção subcutânea de cinamaldeído (250 - 2500 nmol/sítio). Dados são representados pela média \pm E.P.M. (N = 5-8). Diferenças estatísticas estão indicadas por ***P < 0,001 quando comparados com o grupo salina (ANOVA uma via seguida de teste *post hoc* Newman-Keuls). B) Curva tempo - resposta. Cinamaldeído foi administrado por injeção s.c. (250 - 2500 nmol/sítio) e o número de resposta foi registrado por 30 minutos. Cada ponto representa a média \pm E.P.M. de 5 - 8 animais. Diferenças estatísticas estão indicadas por **P < 0,01 ou ***P < 0,001 quando comparadas com o grupo controle (injeção s.c. de salina) correspondente (ANOVA duas vias seguida de teste *post hoc* Newman-Keuls).

Fonte: A autora (2018)

Capsaicina (s.c., 50 μ L) 0,75; 2,5 e 7,5 μ g/sítio foi injetada na região interescapular dos camundongos para induzir o comportamento de coçar. Capsaicina nas doses de 0,75; 2,5 e 7,5 μ g/sítio aumentaram significativamente o comportamento de coçar (70 - 130), quando comparados ao grupo salina (grupo controle) com valor médio de DE₅₀ de 0,953 (0,594 - 1,530) μ g/sítio (95% de limite de confiança) (Figura 15A). A dose de 0,25 μ g/sítio não apresentou diferença estatística significativa quando comparado com o grupo salina. O comportamento de coçar aumentou em até 25 minutos com tendência de platô entre 25 - 30 minutos (Figura 15B). Com base nestes resultados, a concentração de capsaicina escolhida para induzir o comportamento de coçar foi de 2,5 μ g/sítio, com tempo total de observação de 30 minutos.

Figura 15 - Curva dose e tempo resposta do comportamento de coçar induzido pela capsaicina.



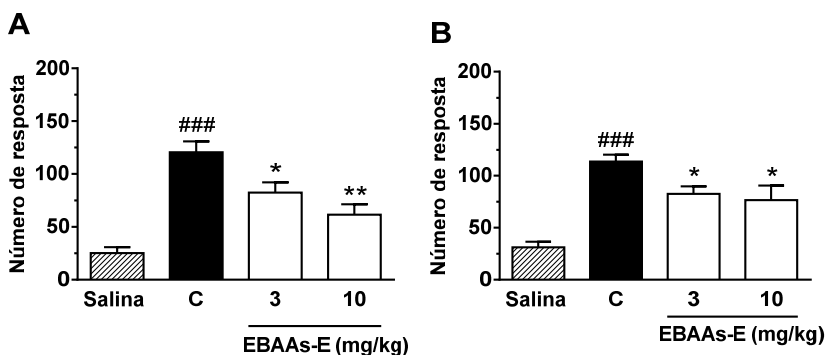
Legenda: A) Curva dose-resposta. A coluna de linhas inclinadas representa os animais que receberam veículo (salina, 50 μ L, s.c.), considerado grupo de comportamento basal. As colunas brancas representam os animais que receberam injeção de capsaicina (0,25 - 7,5 μ g, 50 μ L, s.c.). Dados são representados pela média \pm E.P.M. (N = 5-8). Diferenças estatísticas são indicadas por *P < 0,05 e ***P < 0,001, quando comparados ao grupo salina (ANOVA de uma via seguido de teste *post hoc* Newman-Keuls). B) Curva tempo resposta. Cada ponto representa a média \pm E.P.M. de 5-8 animais depois da injeção de capsaicina (0,75 - 25 μ g/50 μ L, s.c.). Diferenças estatísticas estão indicadas por *P < 0,05, **P < 0,01, or ***P < 0,001 quando comparadas ao grupo controle (ANOVA duas vias, seguido de teste *post hoc* Newman-Keuls test). Em alguns casos a linha de erro está escondida dentro dos símbolos.

Fonte: A autora (2018)

6.2.5 Efeito do EBAAs-E no comportamento de coçar, induzido por cinamaldeído e capsaicina

O estímulo ao comportamento de coçar causado pela injeção subcutânea de cinamaldeído (750nM/sítio) ou de capsaicina (2,5 µg/sítio) induziram cerca de 120 atos de coçar em camundongos, um valor muito maior do que o causado pelo grupo salina (~20) (Figura 16A e 16B). O tratamento intragástrico dos animais com EBAAs-E nas doses de 3 e 10 mg/Kg, uma hora antes da injeção de cinamaldeído ou de capsaicina, diminuíram o comportamento de coçar nos animais. As doses de 3 e 10 mg/Kg apresentaram valores de inibição de $40 \pm 10\%$ e $62 \pm 10\%$ para cinamaldeído (Figura 16A) e de $33 \pm 9\%$ e $45 \pm 17\%$ para capsaicina (Figura 16B), respectivamente.

Figura 16 - Efeito do tratamento de EBAAs-E no comportamento de coçar induzido por cinamaldeído e capsaicina.



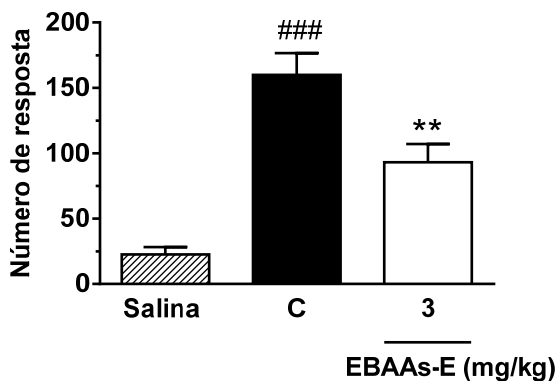
Legenda: Camundongos receberam EBAAs-E (3 e 10 mg/kg, i.g.) uma hora antes da injeção subcutânea de (A) cinamaldeído (750 nmol/site) ou (B) capsaicina (2,5 µg/sítio). As colunas com linhas inclinadas representam o grupo salina, animais que receberam veículo do EBAAs-E (salina, i.g.) e veículo do agente irritativo (salina, s.c.). As colunas pretas indicam os animais tratados com salina (i.g.) mais o agente irritativo (s.c.), considerado grupo controle. As colunas brancas correspondem aos animais tratados com EBAAs-E mais o agente irritativo. Dados estão representados pela média \pm E.P.M. (N = 5-7). Diferenças estatísticas estão indicadas por ###P < 0,001 quando comparadas com o grupo salina ou por *P < 0,05 e **P < 0,01 quando comparadas com o grupo controle (ANOVA uma via seguida de teste *post hoc* Newman-Keuls).

Fonte: A autora (2018)

6.2.6 Efeito do EBAAs-E no comportamento de coçar, induzido por PMA

Com a intenção de esclarecer o mecanismo de ação do efeito do EBAAs-E sobre o comportamento de coçar, PMA (500 pM), um ativador de proteína cinase C (PKC), foi utilizado na indução deste comportamento (Figura 17). Considerando os resultados obtidos no teste de capsaicina, a dose de 3 mg/Kg de EBAAs-E foi a escolhida para o experimento. A injeção subcutânea de PMA na região interescapular dos animais aumentou expressivamente o comportamento de coçar de ~20, níveis basais, para ~160. O EBAAs-E foi capaz de atenuar o efeito causado pelo PMA, com valor de inibição de $42 \pm 9\%$.

Figura 17 - Efeito do tratamento do EBAAs-E sobre o comportamento de coçar induzido por PMA



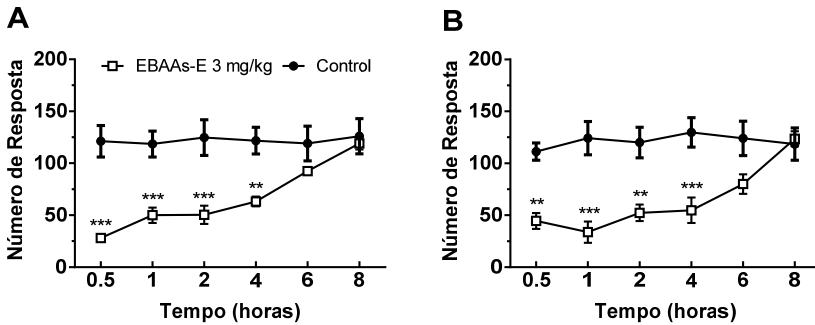
Legenda: Camundongos receberam EBAAs-E (i.g.) uma hora antes da injeção subcutânea de PMA, 500 pM/sítio. A coluna com linhas inclinadas representa o grupo salina, animais receberam veículo do EBAAs-E (salina, i.g.) e veículo do agente irritativo (salina, 50µl s.c.). A coluna preta indica os animais tratados com salina (i.g.) mais o agente irritativo (s.c.), considerado como grupo controle. A coluna branca corresponde aos animais tratados com EBAAs-E e PMA. Dados estão representados pela média \pm E.P.M. (N=5-7). Diferenças estatísticas estão indicadas por ###P < 0,001 quando comparadas com o grupo salina ou por ***P < 0,001 quando comparadas com o grupo controle (ANOVA uma via seguida de teste *post hoc* Newman-Keuls).

Fonte: A autora (2018)

6.2.7 Curva tempo-resposta do EBAAs-E

A duração do efeito do EBAAs-E (3 mg/Kg, i.g.) foi testado frente ao cinamaldeído, para a indução de prurido. O teste foi realizado em ambos os sexos, por oito horas (Figura 18). O efeito do tratamento com EBAAs-E foi efetivo desde a primeira avaliação, 30 minutos, e persistiu até quatro horas após o tratamento com o extrato. Isto demonstra que o extrato possui um efeito rápido e prolongado. Este efeito foi observado tanto em animais machos (Figura 18A) quanto em fêmeas (Figura 18B).

Figura 18 - Curva tempo-resposta de EBAAs-E.



Legenda: Camundongos foram tratados com EBAAs-E (3 mg/Kg, i.g.) ou salina (grupo controle) 0,5, 1, 2, 4, 6 e 8 horas, antes da injeção subcutânea de cinamaldeído (750 nmol/site). Cada ponto representa a média \pm E.P.M. de 4–6 animais. Diferença estatística do grupo controle estão indicadas por **P < 0,001 e ***P < 0,001 (ANOVA duas vias seguido de teste *post hoc* Newman-Keuls). Em alguns casos, as linhas de erro estão escondidas dentro dos símbolos.

Fonte: A autora (2018)

6.2.8 EBAAs-E diminui a resposta do comportamento de coçar induzido pela ruptura da barreira cutânea – modelo de pele seca (AEW).

O efeito do EBAAs-E foi testado frente ao modelo crônico de prurido, conhecido como modelo de pele seca (AEW) (Figura 19). Para isso, durante 5 dias, duas vezes ao dia, solução de acetona-éter-água (grupo AEW) foi aplicada na região interescapular dos animais, previamente depilada. Para controle do modelo outro grupo de animais recebeu aplicação de água pelo mesmo período e no mesmo local (grupo ÁGUA). A figura 19 mostra que a aplicação de AEW praticamente

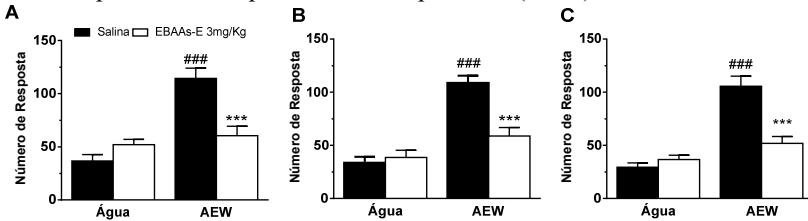
triplicou o ato de coçar dos animais. No sexto dia do teste, o tratamento agudo em dose única do EBAAs-E (3 mg/kg, i.g.), uma hora antes da última aplicação de solução AEW, revelou efeito nos grupos AEW ($F_{(1,19)} = 31,1$, $P < 0,001$), EBAAs-E ($F_{(1,19)} = 6,27$, $P < 0,05$), e a interação AEW/EBAAs-E ($F_{(1,19)} = 20,1$, $P < 0,001$), após a análise estatística por ANOVA duas vias (Figura 19A). O tratamento com EBAAs-E *per se* não apresentou efeito sobre o ato de coçar dos animais. O comportamento de coçar foi praticamente abolido pelo EBAAs-E, indicando um potente efeito antiprurido neste modelo.

Para testar uma possível ação preventiva do EBAAs-E sobre o prurido espontâneo induzido por este modelo, tratamento com EBAAs-E foi realizado durante 5 dias, duas vezes ao dia, uma hora antes de cada aplicação da solução AEW ou água. Novamente, a aplicação de solução AEW praticamente triplicou o ato de coçar dos animais, sejam eles machos (Figura 19B) ou fêmeas (Figura 19C). A análise estatística por ANOVA duas vias identificou efeito do grupo AEW ($F_{(1,19)} = 45,3$, $P < 0,001$), do tratamento com EBAAs-E ($F_{(1,19)} = 10,0$, $P < 0,01$) e a interação AEW/EBAAs-E ($F_{(1,19)} = 15,0$, $P < 0,001$) nos animais machos. Assim, o tratamento com EBAAs-E preveniu, de forma significativa, o comportamento de coçar induzido por AEW nestes animais (Figura 19B). O mesmo tratamento teve efeito similar em animais fêmeas (Figura 19C), quando os dados foram analisados por ANOVA duas vias. O efeito é dependente de AEW ($F_{(1,16)} = 50,4$, $P < 0,001$), de EBAAs-E ($F_{(1,16)} = 13,1$, $P < 0,01$) com interação AEW/EBAAs-E ($F_{(1,16)} = 22,4$, $P < 0,001$). O efeito anti prurido foi observado mesmo após 18 horas do último tratamento com o EBAAs-E, mostrando um efeito duradouro deste extrato quando utilizado o tratamento com doses repetidas. Nenhum efeito com relação ao gênero dos animais foi observado (Figura 19B e 19C).

Estes dados mostram a eficácia de tratamento oral de EBAAs-E no modelo crônico de pele seca, seja na inibição de prurido já instalado ou na prevenção do mesmo.

O grupo ÁGUA não apresentou nenhum efeito após análise estatística por ANOVA duas vias.

Figura 19 - Efeito do tratamento do EBAA-s-E sobre o comportamento de coçar induzido por modelo de prurido crônico, pele seca (AEW).



Legenda: Solução AEW (grupo AEW) ou água (grupo ÁGUA) foram aplicadas na região interescapular dos animais duas vezes ao dia, por 5 dias. (A) No sexto dia do teste, camundongos receberam EBAA-s-E (3 mg/kg, i.g.) ou salina (i.g.) uma hora antes da aplicação de solução de AEW ou água na região interescapular dos animais. (B) EBAA-s-E (3 mg/kg, i.g.) ou salina foram administrados 2 vezes ao dia, por 5 dias consecutivos, 1 hora antes da aplicação de solução AEW ou água na região interescapular de camundongos machos. No sexto dia, as soluções AEW e água foram aplicadas na região interescapular dos animais no momento do teste. As colunas pretas representam os animais que receberam veículo de EBAA-s-E (salina, i.g.). As colunas brancas indicam os animais tratados com EBAA-s-E (3 mg/Kg, i.g.). (C) Em camundongos fêmeas, EBAA-s-E (3 mg/kg, i.g.) ou salina (i.g.) foram administrados 2 vezes ao dia, por 5 dias consecutivos, 1 hora antes da aplicação de solução AEW ou água na região interescapular dos animais. No sexto dia, as soluções AEW e água foram aplicadas na região interescapular dos animais no momento do teste. As colunas pretas representam os animais que receberam veículo de EBAA-s-E (salina, i.g.). As colunas brancas indicam os animais tratados com EBAA-s-E (3 mg/Kg, i.g.). Dados estão representados pela média \pm E.P.M. (N = 5-7). Diferenças estatísticas estão indicadas por ####P < 0,001 quando comparado o grupo AEW e ÁGUA ou por ***P < 0,001 quando comparado os tratamentos do grupo AEW (ANOVA duas vias, seguido de teste post hoc Newman-Keuls test).

Fonte: A autora (2018)

6.2.9 Efeito do EBAA-s-E sobre a locomoção, o comportamento tipo ansioso e depressivo no modelo crônico de pele seca.

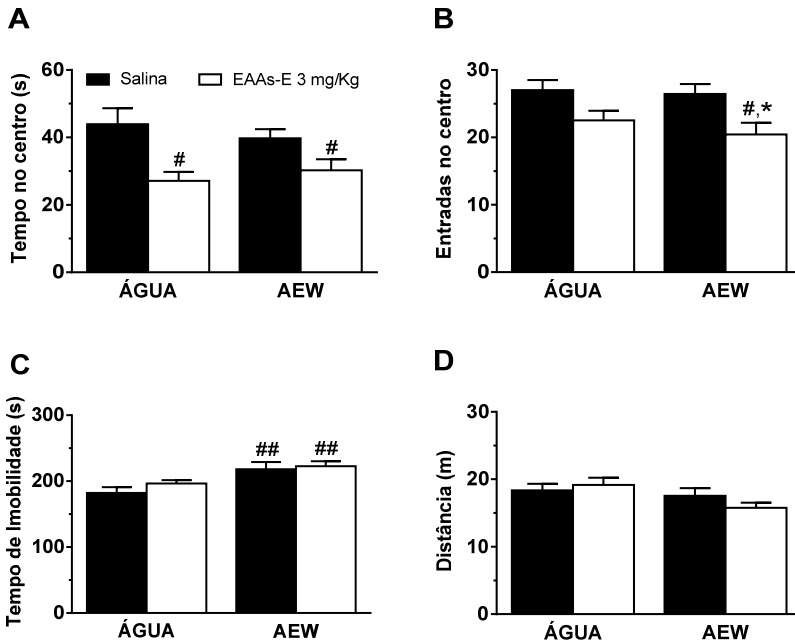
Os animais foram avaliados quanto ao comportamento tipo ansioso e a atividade locomotora no teste do campo aberto após a indução de prurido crônico pelo modelo de pele seca e tratamento de doses repetidas de EBAA-s-E durante 5 dias, duas vezes ao dia (Figura 20A, B e D). O tratamento com EBAA-s-E produziu comportamento tipo ansioso evidenciado pela análise ANOVA duas vias, onde o tempo de permanência no centro do campo aberto (Figura 20A) foi diminuído pelo

tratamento com EBAAs-E ($F_{(1,51)} = 13,2$, $P < 0,001$), mas não por AEW ou sua interação ($P > 0,05$) e, pela redução do número de entradas no centro do campo aberto (Figura 20B), ($F_{(1,51)} = 11,1$, $P < 0,01$), também sem efeito de AEW e sem interação EBAAs-E/AEW ($P < 0,05$). A distância de deslocamento total (Figura 20D) realizada pelos animais no campo aberto não foi alterada pela aplicação de AEW ou pelo tratamento com EBAAs-E (ANOVA duas vias, $P > 0,05$).

No teste de esconder esferas de vidro, a análise estatística por ANOVA duas vias não apresentou qualquer efeito da aplicação de AEW ou interação AEW/EBAAs-E ($P > 0,05$). O número de esferas de vidro escondidas pelos animais foram $19,0 \pm 0,52$ (ÁGUA/Salina), $19,5 \pm 0,34$ (Salina/AEW), ou $19,4 \pm 0,40$ (ACEAs/AEW) ($N=5-6$). Os animais tratados com diazepam 2mg/kg, grupo controle positivo (AEW/Salina/Diazepam) esconderam $2,40 \pm 1,17$ esferas de vidro, resposta esperada, já que o diazepam é uma droga ansiolítica.

O comportamento tipo depressivo foi avaliado no teste de suspensão pela cauda após a indução do prurido crônico pelo modelo AEW (Figura 20C). A análise dos dados por ANOVA duas vias mostrou efeito da aplicação de solução AEW ($F_{(1,54)} = 14,0$, $P < 0,001$), mas não do tratamento com EBAAs-E, sem interação AEW/EBAAs-E ($P > 0,05$). O tempo de imobilidade dos animais não foi afetado pelo tratamento *per se* do EBAAs-E. Assim, aplicação de AEW induziu um aumento do tempo de imobilidade, o qual não foi influenciado pelo co-tratamento com EBAAs-E. Este efeito não está relacionado a qualquer alteração da atividade normal dos animais, já que a locomoção dos mesmos não foi alterada por qualquer tratamento aplicado nos mesmos (Figura 20C).

Figura 20 - Efeito do EBAAs-E sobre o comportamento tipo ansioso e depressivo e atividade locomotora no modelo crônico de prurido.



Legenda: Tratamento dos animais com EBAAs-E (3 mg/kg, i.g.) uma hora antes de cada aplicação de solução AEW na região interescapular, 2 vezes ao dia, por 5 dias (AEW). Em outro grupo de animais água foi aplicada na região interescapular, controle do modelo. Os testes comportamentais foram avaliados após 18 horas da última dose de EBAAs-E. (A, B e D) Teste do campo aberto (N=11-15); (C) teste da suspensão pela cauda (N=14-15). Os dados foram representados pela média + E.P.M. Diferenças estatísticas estão indicadas por [#]P < 0,05, ^{##}P < 0,01 quando comparadas com o grupo ÁGUA/Salina, ou por ^{*}P < 0,05 quando comparados com AEW/Salina (ANOVA duas vias seguido de teste *post hoc* Newman-Keuls test).

Fonte: A autora (2018)

6.2.10 Efeito do EBAAs-E sobre os níveis de citocina e fator de crescimento neuronal (NGF), na pele e medula espinal no modelo crônico de pele seca.

Os níveis de citocina e de NGF foram analisados após a indução do prurido crônico pelo modelo AEW e tratamento de doses repetidas de

EBAAs-E durante 5 dias, duas vezes ao dia (Figura 21).

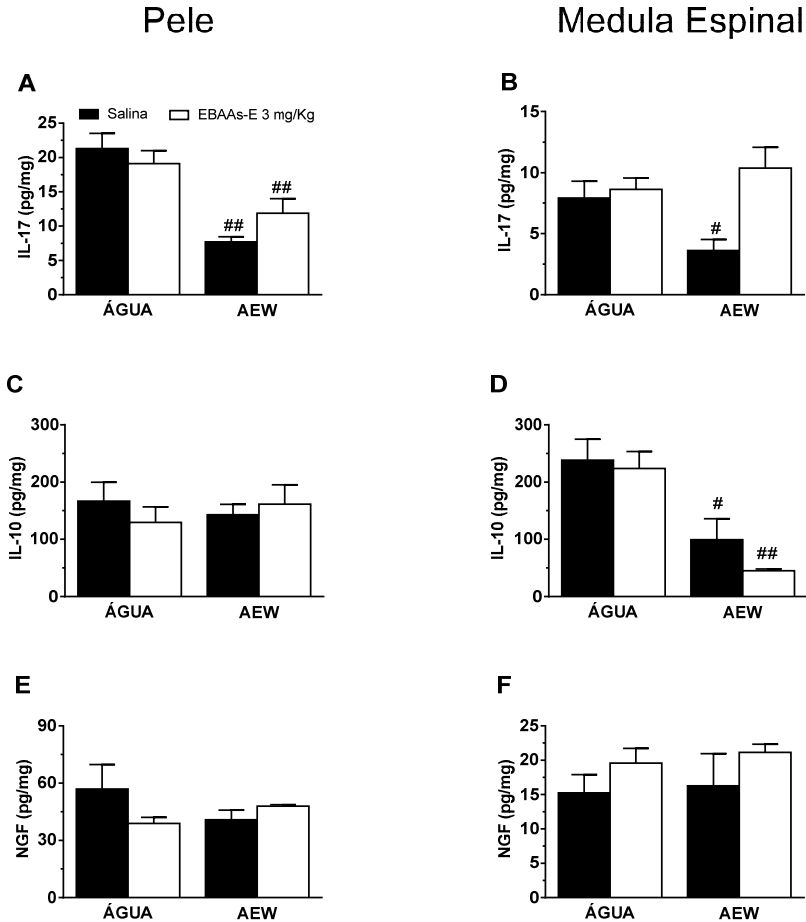
A avaliação estatística por ANOVA duas vias mostrou que a aplicação de AEW reduziu os níveis de IL-17 na pele ($F_{(1,14)} = 30,0$, $P < 0,001$) e que o tratamento com EBAAs-E, não previniu esta diminuição, não apresentando interação entre AEW/EBAAs-E ($P > 0,05$) (Figura 21A). Na medula espinal o tratamento com EBAAs-E evitou a diminuição da concentração de IL-17 ($F_{(1,13)} = 8,22$, $P < 0,05$) com interação entre EBAAs-E/AEW ($F_{(1,13)} = 5,35$, $P < 0,05$) (Figura 21B).

O tratamento com EBAAs-E ou a aplicação de solução AEW não alterou a concentração de IL-10 na pele (Figura 21C) (ANOVA 2 vias, $P > 0,05$). Já, na medula espinal houve diminuição da concentração de IL-10 após a aplicação de AEW, efeito de AEW ($F_{(1,15)} = 22,5$, $P < 0,001$) (Figura 21D), sem ser alterado pelo tratamento de doses repetidas com EBAAs-E, sem interação AEW/EBAAs-E (ANOVA duas vias, $P > 0,05$).

A concentração de NGF na pele ou na medula (Figura 21E e 21F) não foi modificada pelo tratamento concomitante de EBAAs-E e AEW (ANOVA duas vias, $P > 0,05$).

Os resultados também mostram que o tratamento *per se* de EBAAs-E não alterou significativamente a concentração de IL-17, IL-10, ou NGF na pele (Fig. 21A, C e E) ou na medula espinal (Figura 21B, D e F).

Figura 21 - Concentração de citocinas em animais submetidos ao modelo de prurido crônico e tratados com doses repetidas de EBAAAs-E.



Legenda: Os animais foram tratados com EBAAAs-E (3 mg/kg, i.g.) uma hora antes de cada aplicação de solução de AEW ou água na região interescapular dos animais, duas vezes ao dia, por 5 dias. As citocinas foram quantificadas após 18 horas do último tratamento com EBAAAs-E. Os dados estão representados pela média + S.E.M. (N=5-7). Diferenças estatísticas estão indicadas por #P < 0,05 ou ##P < 0,01 quando comparado com o grupo controle ÁGUA/Salina e por *P < 0,05 quando comparado com o grupo AEW/Salina (ANOVA duas vias seguido de teste *pos hoc* Newman-Keuls).

Fonte: A autora (2018)

6.2.11 Efeito do EBAAAs-E sobre a atividade enzimática de enzimas antioxidantes no modelo crônico de pele seca.

Baseado na análise fitoquímica do EBAAAs-E que revelou a presença de compostos fenólicos como ácido gálico, catequina e epicatequina, conhecidos pelas suas propriedades antioxidantes (LANDETE, 2012) a atividade das enzimas antioxidantes foram avaliadas na pele e medula espinal, após a indução de prurido crônico pelo modelo de pele seca e tratamento de doses repetidas do EBAAAs-E.

Neste modelo, cinco de oito variáveis analisadas sofreram alterações devido a aplicação de AEW: SOD, CAT e GR na pele e SOD e GPx na medula espinal (Figura 22).

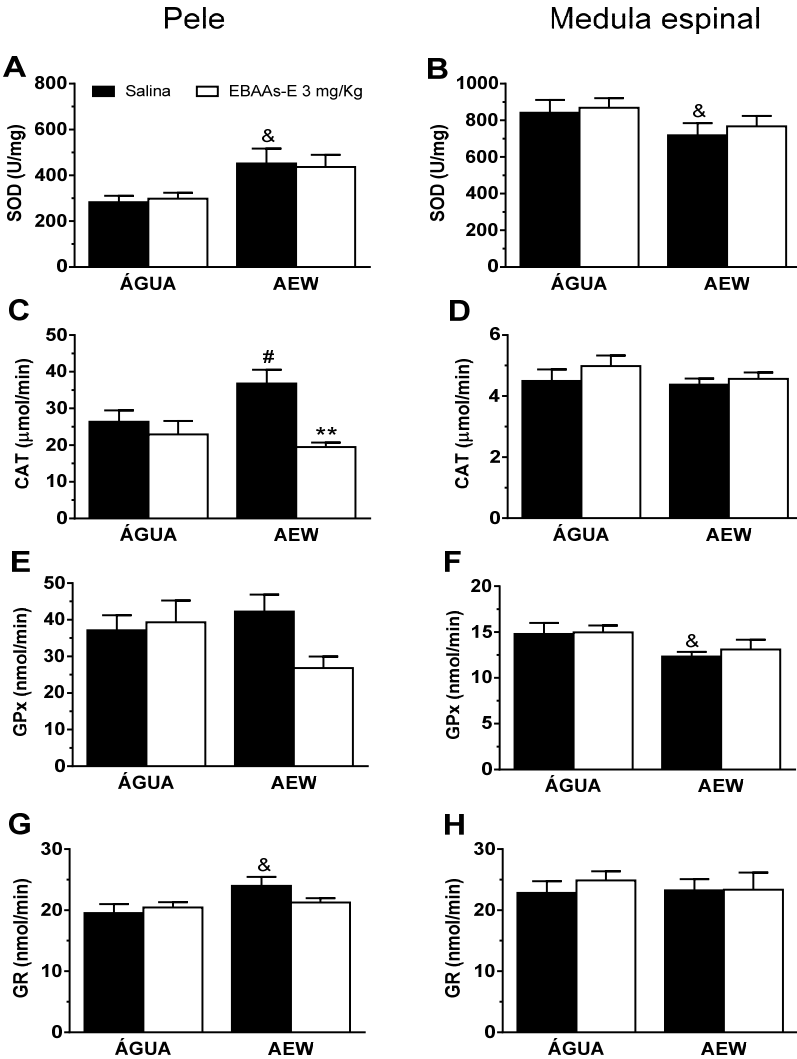
A aplicação de AEW aumentou significativamente a atividade SOD na pele ($F_{(1,35)} = 9,38$, $P < 0,01$) e diminuiu a atividade desta mesma enzima na medula espinal ($F_{(1,39)} = 4,25$, $P < 0,05$) (Figura 22A e 22B). Infelizmente, o teste *post hoc* não foi capaz de detectar as diferenças entre os grupos.

A atividade CAT, na pele, teve aumento significativo no grupo AEW, quando comparado com o grupo ÁGUA/salina. Este aumento foi evitado pelo tratamento com EBAAAs-E (Figura 22C) (ANOVA duas vias, $F_{(1,32)} = 14,7$, $P < 0,001$). O efeito não foi influenciado pela aplicação de AEW, sem interação entre AEW/EBAAAs-E (ANOVA duas vias, $P > 0,05$). A atividade CAT na medula espinal não foi alterada pelo tratamento com EBAAAs-E ou pela aplicação de AEW (ANOVA duas vias, $P > 0,05$).

Com relação a atividade GPx na pele (Figura 22E), a aplicação de AEW não foi um fator significativo (ANOVA duas vias, $P > 0,05$), mas foi significativo na medula espinal (Figura 23F; $F_{(1,39)} = 5,88$, $P < 0,05$). O tratamento com EBAAAs-E e a interação AEW/EBAAAs-E não foram significativos. Apesar do efeito significativo do grupo AEW na medula o teste *post hoc* não foi capaz de detectar as diferenças entre os grupos.

Na pele, o aumento da atividade GR foi estatisticamente significativo sob o efeito da aplicação de AEW ($F_{(1,35)} = 4,68$, $P < 0,05$), mas o EBAAAs-E não teve efeito sobre a mesma e não houve interação AEW/EBAAAs-E ($P > 0,05$). O teste *post hoc* não foi capaz de detectar diferenças entre os grupos. A atividade da GR na medula espinal não apresentou diferença estatística entre os grupos ($P > 0,05$) (Figura 22G e 22H).

Figura 22 - Atividade enzimática das enzimas SOD, catalase, Glutaciona Peroxidase e Glutaciona Redutase em animais submetidos ao modelo de prurido crônico e tratados com doses repetidas de EBAAAs-E.



Legenda: O EBAAAs-E (3 mg/kg, i.g.) foi administrado uma hora antes de cada aplicação de AEW ou água na região interescapular dos animais, duas vezes ao dia por cinco dias. A atividade enzimática das enzimas foram medidas dezoito horas após a última dose do EBAAAs-E. Dados estão representados pela média + E.P.M. (N=10-12). Diferenças estatísticas estão indicadas por [#]P < 0,05 quando

Continuação da Figura 22.

comparados com o grupo ÁGUA/Salina e $**P < 0,01$ quando comparado ao grupo AEW/Salina. & Indica um efeito significativo de AEW na análise estatística por ANOVA duas vias. Newman-Keuls foi usado como teste *post hoc*. Fonte: A autora (2018).

6.3 DISCUSSÃO

Muitos produtos naturais são utilizados no tratamento de prurido, mas pouco é conhecido sobre os mecanismos envolvidos neste efeito (PLUSKAL; WENG, 2017). A maior parte destes agentes provenientes de produtos naturais são de uso tópico, exemplos deles são: cânfora, mentol, icilina, cumarina prenilada, ostole, colibolideo (PLUSKAL; WENG, 2017). A quase inexistência de agentes antipruriginosos de administração oral e de tratamentos efetivos para o prurido, estimulou-nos a investigar a efetividade do EBAAs-E sobre o mesmo. Além disso, os dados mostrados no primeiro capítulo deste trabalho mostram que os efeitos do EBAAs-E e EBAAs-BV foram similares quando utilizado o modelo do ácido acético em camundongos. Isto nos incentivou a pesquisar se os efeitos do EBAAs-E sobre o prurido poderiam ser similares aos encontrados no EBAAs-BV.

Entre as substâncias bioativas presentes no EBAAs-E identificadas por HPLC-DAD estão, ác. gálico, catequina e epicatequina, substâncias também identificadas no extrato EBAAs-BV, utilizado nos testes descritos no capítulo 1 deste trabalho. Estas substâncias pertencem ao grupo dos compostos fenólicos, os quais são polifenóis presentes em muitos extratos de plantas que possuem propriedades bioativas, tais como: antioxidantes, analgésicas, anti-inflamatória e antipruriginosa (RICHARD et al., 2006; UPADHYAY; DIXIT, 2015; GANZERA; STURM, 2018).

Inicialmente, o efeito antipruriginoso do EBAAs-E foi caracterizado em modelos clássicos de prurido. Foram obtidas curvas de dose-resposta utilizando modelo agudo de prurido induzido por SP, tripsina e histamina, na tentativa de relacionar a liberação de histamina e proteases por mastócitos induzidas por SP. Além disso, através destes modelos pode-se avaliar a ação do EBAAs-E sobre as vias sensoriais histaminérgicas e não histaminérgicas de prurido.

A administração subcutânea de SP, estimula a degranulação de mastócitos na pele, o qual libera grânulos que possuem mediadores pruritogênicos, tais como, histamina, serotonina e proteases (COSTA et

al., 2008; YUN et al., 2011; POTENZIERI; UNDEM, 2012; HAN; DONG, 2014; GREEN; DONG, 2016). A habilidade de EBAAs-E em diminuir o comportamento de coçar induzido por SP pode diminuir a degranulação mastocitária, limitando a liberação destes mediadores e consequentemente o comportamento de coçar. O efeito do EBAAs-E pode estar relacionado a uma ação sobre receptores NK-1, presentes em mastócitos e em neurônios NK1-positivos na medula espinal (HAN; DONG, 2014).

Outra ação do EBAAs-E foi a diminuição do comportamento de coçar induzido por tripsina. Esta ação poderia estar relacionada com a menor liberação de proteases de mastócitos induzidas pela ação de SP, o que diminuiria a ativação de receptores PAR-2 e PAR-4, ou através de uma ação direta deste extrato sobre a ativação de PAR-2 e PAR-4 (COSTA et al., 2008; HAN; DONG, 2014; PATRICIO et al., 2015). Um estudo recente mostra que MrgprC11 está envolvido na indução de prurido por PAR-2 (MEIXIONG; DONG, 2017). A hipótese é que esta ação seja em decorrência da ativação de MrgprC11 por PAR2. Além disso, PAR2 é co-expresso com MrgprC11 em neurônios do gânglio dorsal DRG, estando também presente em células da pele (HAN; DONG, 2014; MEIXIONG; DONG, 2017). Isto também poderia explicar o efeito do EBAAs-E sobre a indução de prurido por tripsina. Neste contexto, EBAAs-E poderia diminuir a indução de prurido por proteases por agir diretamente sobre PAR-2 e PAR-4, e indiretamente sobre Mrpgr. Isto poderia explicar o efeito deste extrato após a aplicação de tripsina. A ação inibitória do EBAAs-E sobre a indução de prurido por tripsina demonstra a ação deste extrato sobre as vias não histaminérgicas de prurido.

A ação do EBAAs-E sobre SP e a possível diminuição da degranulação mastocitária, limita a liberação de histamina e consequentemente o comportamento de coçar induzido pela mesma através de receptores H1 e H4 (AKIYAMA; IODI CARSTENS; CARSTENS, 2010; MENG; STEINHOFF, 2016). Esta ação ou a ação direta do EBAAs-E sobre estes receptores de histamina poderiam explicar a diminuição do comportamento de coçar causado pelo EBAAs-E quando induzido por histamina. A inibição do comportamento de coçar induzido por histamina mostra uma ação inibitória do EBAAs-E sobre as vias histaminérgicas de prurido. As ações do EBAAs-E sobre histamina e tripsina observadas neste capítulo são idênticas as ações observadas pelo EBAAs-BV descritas no capítulo 1, mostrando a similaridade de ação destes dois extratos. Além disso, as substâncias identificadas nos dois extratos, catequina, epicatequina e ác. gálico, possuem mecanismos

de modulação sobre a ação da histamina, descritos no capítulo 1 deste trabalho e que podem justificar a eficaz e potente diminuição do comportamento de coçar dos animais quando tratados previamente com EBAAAs-E.

Sabendo do envolvimento de canais TRP's na indução de prurido e com a intenção de melhor entender os mecanismos envolvidos, testes utilizando capsaicina e cinamaldeído foram utilizados. Como não há protocolos animais descritos sobre a indução de prurido utilizando capsaicina e cinamaldeído, os mesmos foram estabelecidos neste trabalho. A indução de prurido por cinamaldeído foi significativa na dose de 750 nM/sítio, dose muito maior que a dose necessária para a indução de dor (10nM/sítio). Para a capsaicina a menor dose testada capaz de induzir o comportamento de coçar nos animais foi de 0,75 µg/sítio, com pico de indução na dose 2,5 µg/sítio, dose menor que a utilizada para a indução de dor (1,6 µg/sítio). Doses maiores de cinamaldeído são necessárias para a indução de prurido quando comparado com capsaicina. Mais experimentos são necessários para o entendimento destes mecanismos. Com relação ao tempo de observação, o comportamento de coçar é aumentado após 10 minutos, com efeito máximo de até 20 - 25 minutos após a aplicação de capsaicina ou cinamaldeído.

O EBAAAs-E foi capaz de reduzir o prurido induzido por capsaicina e cinamaldeído. Isto reforça que este extrato pode agir sobre vias sensoriais dependentes e independentes de histamina, as quais estão ligadas na sensibilização e ativação de canais TRPV1 e TRPA1, respectivamente (YUN et al., 2011; AZIMI et al., 2017; KITAKA; TOMINAGA, 2017). Canais TRP's são largamente distribuídos nos tecidos, podendo existir mais de um subtipo dos mesmos em uma única célula (TÓTH et al., 2014; CATERINA; PANG, 2016). Canais TRPV1 são encontrados em fibras C e Aδ, vias sensoriais nociceptivas. A ativação destes canais induz a liberação de SP que atua sobre receptores NK-1, o que poderia explicar a inibição de SP *downstream* (HAN; DONG, 2014; AZIMI et al., 2017). Neurônios sensoriais que expressam TRPA1 podem liberar neuropeptídeos inflamatórios tais como SP e CGRP (CATERINA; PANG, 2016), o qual reforça o comportamento de coçar. EBAAAs-E inibiu o comportamento de coçar induzido por cinamaldeído e capsaicina, demonstrando que TRPV1 e TRPA1 são alvos de ação deste extrato. A ação do extrato aquoso das folhas de *Acca sellowiana* sobre canais TRP, também foi evidenciada no capítulo 1 deste trabalho, quando estimulada a nocicepção em camundongos

também por cinamaldeído e capsaicina. Isto mostra que tanto EBAAs-E quanto EBAAs-BV parecem diminuir diretamente a ativação destes canais. Ainda, EBAAs-E pode prevenir a ativação de PKC. PKC pode ser ativada por receptores de SP (NK1), histamina (H1 e H4) e receptores ativados por proteases (PAR-2 e PAR-4) e daí ativar canais TRPV1 e A1. A inibição de PKC pode diminuir a ativação de TRPV1 e A1, diminuindo o comportamento de coçar. Além disso, canais TRPA1 são expressos em subgrupos de neurônios do gânglio da raiz dorsal que também expressam canais TRPV1 (UTA et al., 2010; SPAHN; STEIN; ZÖLLNER, 2014; PETER et al., 2017). Assim, ativação de TRPV1 pode ser um sinal ativador para TRPA1. Canais TRPA1 podem ser inativados pela ação do ácido gálico (TREVISAN et al., 2014), um dos compostos fenólicos identificados por HPLC-DAD no EBAAs-E.

O prurido crônico é um sintoma prevalente em várias doenças, tais como doenças da pele, doenças sistêmicas e disfunções metabólicas (IKOMA et al., 2006; LUO et al., 2015; KANEHISA et al., 2017; PEREIRA; STÄNDER, 2017; TSUDA, 2017) com poucos tratamentos efetivos. Nos últimos anos muitas pesquisas relacionadas aos mecanismos envolvidos e substâncias que possam aliviar este sintoma estão sendo desenvolvidas. Um dos modelos utilizados para o estudo de prurido crônico, é o modelo de pele seca, no qual se utiliza como agente indutor de prurido espontâneo uma solução de acetona:éter e água, por isso conhecido também como modelo AEW. Apesar de ser um efetivo modelo para o estudo de prurido crônico, pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos na indução de prurido por ele. Trabalhos recentes sobre os mecanismos deste modelo, mostram que não há envolvimento de mastócitos, mas há participação de espécies reativas de oxigênio (ROS), PAR-2, canais TRPA1 e TRPV1 (AKIYAMA; IODI CARSTENS; CARSTENS, 2010; YU et al., 2016; ZHOU et al., 2017). Zhou 2016, demonstrou que substâncias antioxidantes são capazes de diminuir a intensidade de prurido induzida por este modelo. O prurido crônico está associado a uma série de co-morbidades, como falta de sono, depressão e ansiedade reduzindo a qualidade de vida dos indivíduos (PEREIRA; STÄNDER, 2017). Este trabalho avaliou o modelo de pele seca no comportamento tipo ansioso e depressivo e as alterações na concentração de citocinas e das enzimas antioxidantes e, como estes parâmetros são afetados pelo tratamento com EBAAs-E. Este trabalho mostra que o modelo AEW não induz ao comportamento tipo ansioso avaliado nos testes de campo aberto e teste de enconder esferas de vidro, mas induz ao comportamento tipo depressivo avaliado no teste de suspensão pela cauda. O tratamento com o EBAAs-E não foi capaz

de inibir a indução do comportamento tipo depressivo dos animais do grupo AEW, não possuindo, portanto, ação antidepressiva quando avaliado neste modelo e na dose de 3 mg/Kg. Quanto ao comportamento tipo ansioso, quando avaliado no teste de campo aberto, os animais tratados com o EBAA-E, em doses repetidas, desenvolveram comportamento tipo ansioso. Concordando com estes dados o extrato não apresentou nenhum efeito tipo ansiolítico quando avaliado no teste de esconder esferas de vidro. Este efeito pode ser considerado um efeito indesejado e que precisa ser melhor avaliado e estudado através de outros modelos de comportamentos envolvidos com o SNC juntamente com doses e tempos de administração do extrato.

Embora IL-17 esteja envolvida no mecanismo de pele seca em dermatite atópica e psoríase, o real papel desta citocina em doenças alérgicas e da pele permanece indefinido (JIN et al., 2009; YANABA et al., 2013; CAMPA; MENTER, 2016). Assim, foi avaliada a concentração desta citocina no modelo de pele seca e o efeito do tratamento com EBAA-E sobre a mesma. O modelo de pele seca causou a diminuição de IL-17 na pele e na medula espinal. O tratamento com doses repetidas de EBAA-E preveniu esta diminuição na medula espinal, mas não na pele. O perfil de IL-10 na pele ou medula espinal no modelo de pele seca também não é conhecido. Os resultados mostraram diminuição desta interleucina na medula espinal, sem nenhuma ação do EBAA-E sobre este efeito. A ausência de aumento de IL-17, uma citocina inflamatória e a diminuição de IL-10, uma citocina imunoreguladora, parece estar coerente com os trabalhos que indicam que o modelo de pele seca não pode ser considerado um modelo de inflamação clássica. Além do mais, parece não haver envolvimento de mastócitos e de histamina na indução de prurido espontâneo observado neste modelo (MIYAMOTO et al., 2002; GRIMBALDESTON et al., 2007; NORTON et al., 2008; AKIYAMA; IODI CARSTENS; CARSTENS, 2010; POLUKORT et al., 2016; YU et al., 2016). Assim, os resultados apresentados indicam que não há envolvimento de IL-17 e IL-10 na indução de prurido no modelo de pele seca. Mais trabalhos complementares são necessários para o melhor entendimento da relação deste modelo, tratamento com EBAA-E e citocinas.

Há descrição de aumento da densidade de fibras nervosas na pele com o rompimento da barreira epidermal, como a que ocorre no modelo de pele seca (SAKAGUCHI et al., 2017). Os resultados deste trabalho não mostraram qualquer diferença significativa na concentração de NGF no modelo de pele seca. Da mesma forma, a concentração de NGF não foi afetada pelo tratamento com EBAA-E.

Um estudo recente mostrou que substâncias antioxidantes podem diminuir o comportamento de coçar induzido pelo modelo de pele seca (ZHOU et al., 2017). Desta forma, a atividade das enzimas antioxidantes da pele e medula foram medidas. O grupo AEW teve um fator significativo sobre SOD, CAT e GR na pele, e para SOD e GPx na medula espinal, indicando que a indução de prurido por AEW tem um fator relevante sobre a resposta antioxidante dos animais. Houve uma tendência de aumento da atividade enzimática na pele com sentido oposto na medula espinal. Apesar da relevância dos dados apresentados, maiores estudos devem ser feitos para o melhor entendimento deste modelo.

Exceto pela ação preventiva sobre o aumento de CAT causada pela aplicação de solução AEW, nenhum outro efeito do EBAAs-E foi observado com relação as mudanças induzidas pelo modelo de pele seca. Além disso, o tratamento com EBAAs-E não modificou a atividade de nenhuma enzima antioxidante estudada, indicando que o estresse oxidativo pode não ser a principal via de ação do EBAAs-E sobre o efeito de diminuir o comportamento de coçar dos animais no modelo de pele seca. Novas avaliações da atividade enzimática em relação ao tempo de medição das mesmas devem ser realizadas para averiguação deste possível mecanismo de ação.

O modelo de pele seca mostrou-se efetivo, já que houve evidente aumento do comportamento de coçar após 6 dias de aplicação de solução AEW. EBAAs-E, 3 mg/kg, praticamente aboliu o efeito deste modelo, seja no tratamento agudo, administração única, uma hora antes da última aplicação de AEW, ou em doses repetidas (2 vezes ao dia, por 5 dias) com a administração da última dose de EBAAs-E 18 horas antes da última aplicação de AEW. Este efeito foi similar em machos e fêmeas.

Os resultados da curva tempo resposta e do tratamento de doses repetidas mostram que o EBAAs-E possui um efeito de ação rápido e duradouro.

A nítida resposta do EBAAs-E em modelos de prurido agudo ou crônico incentiva uma pesquisa mais aprofundada deste efeito e apresenta uma alternativa em potencial no desenvolvimento de drogas antiprurido.

6.4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados da análise química de ambos os extratos identificaram a presença de compostos fenólicos na sua composição. Isto, aliado ao uso popular medicinal desta planta, instigou-nos a

pesquisar uma possível atividade biológica do EBAAs relacionado com ação anti-inflamatória, analgésica e antiprurido, já que, vários trabalhos mostram a relação destes compostos com os efeitos citados.

Muitos produtos naturais apresentam um complexo perfil farmacológico, ligando-se a um painel de receptores moleculares correlacionados ou não, dependendo das propriedades farmacocinética e farmacodinâmica destes compostos (PLUSKAL; WENG, 2017). Isto parece acontecer com o EBAAs-BV e EBAAs-E, já que os mesmos modulam o comportamento de nocicepção e de coçar em camundongos induzido por ácido acético, SP, histamina e tripsina. Isto parece ser explicado pela ação inibitória destes extratos sobre TRPV1, TRPA1 e TRPM8. A inibição de PKC pelo EBAAs-E limita a resposta de TRPV1 e TRPA1, diminuindo o comportamento de coçar em camundongos indicando a modulação do EBAAs-E nesta via de sinalização. O claro efeito antiprurido do EBAAs-E estimula estudos futuros na identificação de compostos ativos presentes neste extrato, além da investigação do mecanismo de ação envolvido neste efeito.

O evidente efeito antiprurido do EBAAs-E foi confirmado no modelo crônico de prurido, modelo pele seca. A ausência de resposta deste extrato sobre atividade antioxidante e sobre a concentração de citocinas indicam que este pode não ser o principal mecanismo de ação deste extrato. A ação do extrato quando utilizados animais machos e fêmeas, mostram que a eficácia do EBAAs é a mesma em ambos os sexos dos animais.

Além disso, devido a similaridade de composição química e de ação, sugere-se que a falta de ação do EBAAs-BV sobre a indução de dor por glutamato corrobora a ideia de que o extrato da planta *Acca sellowiana* tem uma forte ação antiprurido, desde que o glutamato inibe o prurido por ativar interneurônios inibitórios no corno dorsal da medula espinal, ativando a via nocicepetiva de dor (LIU et al., 2010; HAN; DONG, 2014; KIDO-NAKAHARA et al., 2017). Isto, aliado a escassa opção de tratamento disponíveis para prurido, e a ausência de toxicidade, abre caminho para novas pesquisas e caminhos na exploração da planta *Acca sellowiana* como uma promissora medicação antiprurido.

7. CONCLUSÕES

Este estudo demonstrou que os extratos EBAAs-Bv e -E apresentam compostos fenólicos na sua composição química, incluindo catequina, epicatequina e ácido gálico e que as suas ações biológicas não apresentam diferenças devido a condução produtiva.

Pela primeira vez, foi apresentado o efeito antinociceptivo e antiprurido em modelos animais. Estes parecem estar relacionados a ação moduladora dos EBAAs sobre canais iônicos do tipo TRPA1, TRPV1, TRPM8, bem como sobre a ativação de PKC. Isto justificaria a ação inibitória sobre a indução de dor e de prurido quando induzidos por ácido acético, SP, histamina e tripsina.

A inibição do comportamento de coçar no prurido crônico pode estar relacionado aos mesmos mecanismos envolvidos na inibição do prurido agudo, já que os níveis de citocinas e das defesas antioxidantes não foram alterados com o uso de EBAAs-E. Não apresenta toxicidade, mas parece apresentar um efeito indesejado importante, ansiogênico. Parece não apresentar atividade antidepressiva em baixas concentrações.

O modelo de prurido crônico de pele seca induz ao comportamento tipo depressivo e diminui os níveis de IL-10 e IL-17 na medula espinal e IL-17 na pele.

Estes resultados trazem novas evidências científicas que sustentam a prática etnofarmacológica e o potencial bioativo da planta *Acca sellowiana*. Além disso, reforçam a continuidade dos estudos dos efeitos desta planta para um possível desenvolvimento de fitocosméticos e fitoterápicos com propriedades antinociceptivas e antiprurido.

REFERÊNCIAS

ABD-ALLAH, A.A.M. et al. Mast cells and pro-inflammatory cytokines roles in assessment of grape seeds extract anti-inflammatory activity in rat model of carrageenan-induced paw edema. **Iranian Journal of Basic Medical Science**, v. 21, n. 1, p. 97-107, jan 2018.

ABE, L. T.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Potential dietary sources of ellagic acid and other antioxidants among fruits consumed in Brazil: jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg). **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 92, n. 8, p. 1679–1687, jun. 2012.

ABREU, D.B.O. et al. Medicinal plant knowledge in a context of cultural pluralism: a case study in Northeastern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.175, p. 124-130, dez. 2015.

AEBI, H. [13] Catalase in vitro. **Methods in Enzymology**, v. 105, p. 121–126, 1 jan. 1984.

AHUJA, R. B. et al. A comparative analysis of cetirizine, gabapentin and their combination in the relief of post-burn pruritus. **Burns**, v. 37, n. 2, p. 203–207, 1 mar. 2011.

AKASAKA, Y. et al. Glycyrrhetic acid prevents cutaneous scratching behavior in mice elicited by substance P or PAR-2 agonist. **European Journal of Pharmacology**, v. 670, n. 1, p. 175–179, 16 nov. 2011.

AKIYAMA, T. et al. Intradermal endothelin-1 excites bombesin-responsive superficial dorsal horn neurons in the mouse. **Journal of Neurophysiology**, v. 114, n. 4, p. 2528–2534, out. 2015.

AKIYAMA, T.; CARSTENS, E. Neural processing of itch. **Neuroscience**, v. 250, p. 697–714, 10 out. 2013.

AKIYAMA, T.; IODI CARSTENS, M.; CARSTENS, E. Enhanced scratching evoked by PAR-2 agonist and 5-HT but not histamine in a mouse model of chronic dry skin itch. **Pain**, v. 151, n. 2, p. 378–383, nov. 2010.

ALONSO-CASTRO, A. J. et al. Medicinal plants from North and Central America and the Caribbean considered toxic for humans: the other side of the coin. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine: eCAM**, v. 2017, 2017.

ALTEMIMI, A. et al. Phytochemicals: extraction, isolation, and identification of bioactive compounds from plant extracts. **Plants**, v. 6,

n. 4, p. 42, 22 set. 2017.

AMARANTE, C. V. T. DO; SANTOS, K. L. DOS. **Feijoa (Acca sellowiana)**. Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-29452011000100042>. Acesso em: 16 jan. 2017.

AMORIM, C. C. **Espécies vegetais utilizadas na “Medicina Campeira” na região da Coxilha Rica e estudo da erva-de-touro (Poiretia latifolia)**. Dissertação—Lages, SC, Brazil: UDESC, Universidade do Estado de Santa Catarina, 2010.

ANVISA. **RESOLUÇÃO-RDC Nº 47** -ANVISA, 8 set. 2009.

Disponível em:

<<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33836/2814380/RDC+47+09.pdf/c8e87008-a27d-435e-b137-f51e02e45858>>

ANVISA. **Consolidado de normas da COFID (Versão V) - Busca - Anvisa**. Disponível em:

<http://portal.anvisa.gov.br/web/guest/resultado-de-busca?p_p_id=101&p_p_lifecycle=0&p_p_state=maximized&p_p_mode=view&p_p_col_id=column-1&p_p_col_count=1&_101_struts_action=%2Fasset_publisher%2Fview_content&_101_assetEntryId=352144&_101_type=document&redirect=http%3A%2F%2Fportal.anvisa.gov.br>. Acesso em: 29 jan. 2018.

ANVISA. **RDC nº 93**. Disponível em:

<<http://portal.anvisa.gov.br/legislacao/?inheritRedirect=true#/visualizar/320391>>. Acesso em: 29 jan. 2018a.

ANVISA. **DOU 01/09/2016 | Diário Oficial da União de 01 de setembro de 2016 Jusbrasil Diários**. Disponível em:

<<https://www.jusbrasil.com.br/diarios/DOU/2016/09/01>>. Acesso em: 29 jan. 2018b.

ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: A review. **Animal Behaviour**, v. 21, n. 2, p. 205–235, 1º maio 1973.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. **NBR 16530: Ecotoxicologia aquática - Toxicidade aguda - Método de ensaio com Artemia sp (Crustacea, Brachiopoda)**: NBR. [s.l: s.n.]. . Acesso em: 29 dez. 2017.

ATANASOV, A. G. et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology**

advances, v. 33, n. 8, p. 1582–1614, dez. 2015.

ATOYAN, R.; SHANDER, D.; BOTCHKAREVA, N. V. Non-neuronal expression of transient receptor potential type A1 (TRPA1) in human skin. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 129, n. 9, p. 2312–2315, set. 2009.

AZEVEDO, L. F. et al. Evidence of anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Plinia edulis* leaf infusion. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 192, p. 178–182, 4 nov. 2016.

AZIMI, E. et al. Substance P activates Mas-related G protein–coupled receptors to induce itch. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 140, n. 2, p. 447–453.e3, 1 ago. 2017.

AZIMI, E.; XIA, J.; LERNER, E. A. Peripheral mechanisms of itch. **Current problems in dermatology**, v. 50, p. 18–23, 2016.

BAGGIO, C. H. et al. Antinociception of β -D-glucan from *Pleurotus pulmonarius* is possibly related to protein kinase C inhibition. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 50, n. 3, p. 872–877, 1 abr. 2012.

BALBANI, A. P.; SILVA, D. H.; MONTOVANI, J. C. Patents of drugs extracted from Brazilian medicinal plants. **Expert Opinion on Therapeutic Patents**, v. 19, n. 4, p. 461–473, 1 abr. 2009.

BALBINO, E. E.; DIAS, M. F. Farmacovigilância: um passo em direção ao uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 6, p. 992–1000, dez. 2010.

BAROSA, J et al. Teste de toxicidade do cobre para *Artemia salina* L. **Manual de Biologia Marinha e Pescas da Faculdade de Ciências do Mar e de Ambiente**, nov.2003.

BASER, K. H. C.; BUCHBAUER, G. **Handbook of essential oils: science, technology, and applications**. 1a edição ed. New York: CRC Press, 2009.

BASILE, A. et al. Antibacterial and antifungal properties of acetoniac extract of *Feijoa sellowiana* fruits and its effect on *Helicobacter pylori* growth. **Journal of Medicinal Food**, v. 13, n. 1, p. 189–195, fev. 2010.

BENSAAD, L. A. et al. Anti-inflammatory potential of ellagic acid, gallic acid and punicalagin A&B isolated from *Punica granatum*. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 17, n. 1, p. 17–47, 14 jan.

2017.

BOBINSKI, F. et al. Neuroprotective and neuroregenerative effects of low-intensity aerobic exercise on sciatic nerve crush injury in mice. **Neuroscience**, v. 194, p. 337–348, 27 out. 2011.

BOHNEBERGER, A. L. **Ocorrência do gorgulho *Conotrachelus psidii* (coleóptera: curculionidae) e manejo das principais doenças e pragas na goiabeira serrana *Acca sellowiana* com ênfase na homeopatia**. Lages, SC: Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agroveterinárias - UDESC-CAV, 2009.

BOISSIER, J. et al. Tentative de pharmacologie prévisionnelle dans le domain des neuroleptiques: actions sedative centrale et adrenolytique de la N(dimethoxy-3,4 phenetyl)N'(chloro-2 phenyl) piperazine. **Archieve International Pharmacodynamic Therapy**, v. 133, p. 29–32, 1961.

BONTEMPO, P. et al. Feijoa sellowiana derived natural flavone exerts anti-cancer action displaying HDAC inhibitory activities. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, n. 10, p. 1902–1914, 2007.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, n. 1, p. 248–254, 7 de maio 1976.

BRASIL. Ministério da Saúde. Projetos, Programas e Relatórios. **PNPMF** - Programa Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos. Seção Série C., p. 140. Brasília, 2009.

BRASIL. Ministério da Saúde Secretaria de Atenção à Saúde. **PORTARIA Nº 1083** - Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Dor Crônica. MS, 2012.
<http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2014/abril/02/pcdt-dor-cronica-2012.pdf>

BRASIL, P. **SUS tem fitoterápicos para doenças simples**. Notícia. Disponível em: <<http://www.brasil.gov.br/saude/2012/11/sus-tem-fitoterapicos-para-doencas-simples>>. Acesso em: 1 fev. 2018.

BROMMA, B. et al. Effects of menthol and cold on histamine-induced itch and skin reactions in man. **Neuroscience Letters**, v. 187, n. 3, p. 157–160, 10 mar. 1995.

CAMPA, M.; MENTER, A. A review of emerging IL-17 inhibitors in the

treatment of psoriasis focusing on preclinical through phase II studies. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, v. 25, n. 11, p. 1337–1344, 1 nov. 2016.

CAPRA, J. C. et al. Antidepressant-like effect of scopoletin, a coumarin isolated from *Polygala sabulosa* (Polygalaceae) in mice: evidence for the involvement of monoaminergic systems. **European Journal of Pharmacology**, v. 643, n. 2–3, p. 232–238, 25 set. 2010.

CARLBERG, I.; MANNERVIK, B. Glutathione reductase. **Methods in Enzymology**, v. 113, p. 484–490, 1985.

CARSTENS, E.; AKIYAMA, T. (EDS.). **Itch: mechanisms and treatment**. 1ª edição ed. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis, 2014.

CARVALHO, A. C. B. et al. Situation of herbal medicines register in Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 314–319, jun. 2008.

CATERINA, M. J. et al. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. **Nature**, v. 389, n. 6653, p. 816–824, 23 out. 1997.

CATERINA, M. J.; PANG, Z. TRP channels in skin biology and pathophysiology. **Pharmaceuticals**, v. 9, n. 4, p. 1–28, 14 dez. 2016.

CHIU, I. M. Infection, pain, and itch. **Neuroscience Bulletin**, p. 1–11, 31 jan. 2017.

CHOI, J. H. et al. Inhibitory effect of *Psidium guajava* water extract in the development of 2,4-dinitrochlorobenzene-induced atopic dermatitis in NC/Nga mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 8, p. 2923–2929, 1 ago. 2012.

CHUQUILIN, M.; ALGHALITH, Y.; FERNANDEZ, K. H. Neurocutaneous disease: Cutaneous neuroanatomy and mechanisms of itch and pain. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 74, n. 2, p. 197–212, fev. 2016.

CHURCH, M. K.; CHURCH, D. S. Pharmacology of antihistamines. **Indian Journal of Dermatology**, v. 58, n. 3, p. 219–224, 2013.

COLALTO, C. What phytotherapy needs: Evidence-based guidelines for better clinical practice. **Phytotherapy Research**, p. 1–13, 14 out. 2017.

COLLIER, H. O. et al. The abdominal constriction response and its

suppression by analgesic drugs in the mouse. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**, v. 32, n. 2, p. 295–310, fev. 1968.

CORDEIRO, K. W. et al. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of Croton urucurana Baillon bark. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 183, p. 128–135, 13 de maio 2016.

CÓRDOVA, M. M. et al. Further antinociceptive effects of myricitrin in chemical models of overt nociception in mice. **Neuroscience Letters**, v. 495, n. 3, p. 173–177, 20 de maio 2011.

CORRÊA, C. R. et al. Antinociceptive profile of the pseudopeptide B2 bradykinin receptor antagonist NPC 18688 in mice. **British Journal of Pharmacology**, v. 117, n. 3, p. 552–558, fev. 1996.

CORRÊA, M. F. P.; MELO, G. O. DE; COSTA, S. S. Natural products from plant origin potentially useful in the asthma therapy. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, p. 785–797, dez. 2008.

COSTA, R. et al. Evidence for the role of neurogenic inflammation components in trypsin-elicited scratching behaviour in mice. **British Journal of Pharmacology**, v. 154, n. 5, p. 1094–1103, jul. 2008.

COUTAUX, A. et al. Hyperalgesia and allodynia: peripheral mechanisms. **Joint, Bone, Spine: Revue Du Rhumatisme**, v. 72, n. 5, p. 359–371, out. 2005.

CRYAN, J. F.; MOMBÉREAU, C.; VASSOUT, A. The tail suspension test as a model for assessing antidepressant activity: Review of pharmacological and genetic studies in mice. **Neuroscience & Biobehavioral Reviews**, Animal Models of Depression and Antidepressant Activity. v. 29, n. 4, p. 571–625, 1 jan. 2005.

DAI, Y. TRPs and pain. **Seminars in Immunopathology**, v. 38, n. 3, p. 277–291, maio 2016.

D'ARCHIVIO, M. et al. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. **Annali dell'Istituto Superiore Di Sanita**, v. 43, n. 4, p. 348–361, 2007.

DE MEDEIROS, P. M. et al. Why do people use exotic plants in their local medical systems? A systematic review based on Brazilian local communities. **PLoS ONE**, v. 12, n. 9, p. 1–14, 27 set. 2017.

DE MORAIS LIMA, G. R. et al. Database survey of anti-inflammatory plants in South America: a review. **International Journal of Molecular**

Sciences, v. 12, n. 4, p. 2692–2749, 2011.

DESCHAMPS, F. C.; RAMOS, L. P. Method for phenolic acid determination in forage cell wall. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 31, n. 4, p. 1634–1639, jul. 2002.

DINAKAR, P.; STILLMAN, A. M. Pathogenesis of pain. **Seminars in Pediatric Neurology**, v. 23, n. 3, p. 201–208, ago. 2016.

DUTRA, R. C. et al. Medicinal plants in Brazil: pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 4–29, out. 2016.

FERREIRA JÚNIOR, W. S. et al. The role of local disease perception in the selection of medicinal plants: A study of the structure of local medical systems. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 181, n. Supplement C, p. 146–157, 2 abr. 2016.

FITZI, J. et al. Phytotherapy of chronic dermatitis and pruritus of dogs with a topical preparation containing tea tree oil (Bogaskin®). **Schweizer Archiv für Tierheilkunde**, v. 144, n. 5, p. 223–231, 1º maio 2002.

FOSTER, E. et al. Targeted ablation, silencing, and activation establish glycinergic dorsal horn neurons as key components of a spinal gate for pain and itch. **Neuron**, v. 85, n. 6, p. 1289–1304, 18 mar. 2015.

FOWLER, S. C. et al. Motor and associative deficits in D2 dopamine receptor knockout mice. **International Journal of Developmental Neuroscience: The Official Journal of the International Society for Developmental Neuroscience**, v. 20, n. 3–5, p. 309–321, ago. 2002.

GAD, S. C. A neuromuscular screen for use in industrial toxicology. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v. 9, n. 5–6, p. 691–704, jun. 1982.

GANZERA, M.; STURM, S. Recent advances on HPLC/MS in medicinal plant analysis—An update covering 2011–2016. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Review issue 2017. v. 147, n. Supplement C, p. 211–233, 5 jan. 2018.

GEPPETTI, P. et al. G protein-coupled receptors: dynamic machines for signaling pain and itch. **Neuron**, v. 88, n. 4, p. 635–649, 18 nov. 2015.

GONÇALVES, A. E. et al. The antidepressant-like effect of *Hedyosmum brasiliense* and its sesquiterpene lactone, podoandin in mice: Evidence

for the involvement of adrenergic, dopaminergic and serotonergic systems. **European Journal of Pharmacology**, 12 nov. 2011.

GOULART JÚNIOR, R.; MONDARDO, M.; REITER, J. M. W. **Documento 271 - Fruticultura em Números Safra 2014/15**EPAGRI - Centro de Socioeconomia e Planejamento Agrícola), maio 2017.

Disponível em:

<http://docweb.epagri.sc.gov.br/website_cepa/Fruticultura/Doc_271_Fruticultura_em_Numeros_2014_15.pdf>

GRANT, A. D. et al. Protease-activated receptor 2 sensitizes the transient receptor potential vanilloid 4 ion channel to cause mechanical hyperalgesia in mice. **The Journal of Physiology**, v. 578, n. Pt 3, p. 715–733, 1 fev. 2007.

GRAYFER, L.; HODGKINSON, J. W.; BELOSEVIC, M. Antimicrobial responses of teleost phagocytes and innate immune evasion strategies of intracellular bacteria. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 43, n. 2, p. 223–242, abr. 2014.

GREEN, D.; DONG, X. The cell biology of acute itch. **The Journal of Cell Biology**, v. 213, n. 2, p. 155–161, 25 abr. 2016.

GRIMBALDESTON, M. A. et al. Mast cell–derived interleukin 10 limits skin pathology in contact dermatitis and chronic irradiation with ultraviolet B. **Nature Immunology**, v. 8, n. 10, p. 1095–1104, out. 2007.

GUO, L.; YAMAZOE, Y. Inhibition of cytochrome P450 by furanocoumarins in grapefruit juice and herbal medicines. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 25, n. 2, p. 129–136, fev. 2004.

HAJHASHEMI, M. et al. The effect of Aloe vera gel and sweet almond oil on striae gravidarum in nulliparous women. **The Journal of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**, v. 0, n. 0, p. 1–6, 19 de maio 2017.

HAN, L.; DONG, X. Itch mechanisms and circuits. **Annual review of biophysics**, v. 43, p. 331–355, 6 de maio 2014.

HAN, S.-K.; SIMON, M. I. Intracellular signaling and the origins of the sensations of itch and pain. **Science Signaling**, v. 4, n. 185, p. pe38, 2 ago. 2011.

HEINRICH, M. **Ethnobotany and Natural Products: The Search for New Molecules, New Treatments of Old Diseases or a Better Understanding of Indigenous Cultures?** Disponível em:

<<http://www.eurekaselect.com/80946/article>>. Acesso em: 2 jan. 2018.

HOON, M. A. Molecular dissection of itch. **Current opinion in neurobiology**, v. 34, p. 61–66, out. 2015.

HUANG, C. et al. Trk3 function in the dorsal root ganglion is pivotal to itch and pain sensations. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 10, p. 205, 2017.

IHA, S. M. et al. Phytochemical study of guava (*Psidium guajava* L.) with potential antioxidant activity aiming at developing a phytocosmetic formulation. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 387–393, set. 2008.

IKEDA, Y. et al. Involvement of vanilloid receptor VR1 and prostanoids in the acid-induced writhing responses of mice. **Life Sciences**, v. 69, n. 24, p. 2911–2919, 2 nov. 2001.

IKOMA, A. et al. The neurobiology of itch. **Nature Reviews Neuroscience**, v. 7, n. 7, p. 535, jul. 2006.

JIN, H. et al. Animal models of atopic dermatitis. **The Journal of investigative dermatology**, v. 129, n. 1, p. 31–40, jan. 2009.

JULIER, Z. et al. Promoting tissue regeneration by modulating the immune system. **Acta Biomaterialia**, v. 53, n. Supplement C, p. 13–28, 15 abr. 2017.

JULIUS, D.; BASBAUM, A. I. Molecular mechanisms of nociception. **Nature**, v. 413, n. 6852, p. 203–210, 13 set. 2001.

JUNIOR, V. et al. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519–528, jun. 2005.

KANEHISA, K. et al. Specific activation of inhibitory interneurons in the spinal dorsal horn suppresses repetitive scratching in mouse models of chronic itch. **Journal of Dermatological Science**, v. 88, n. 2, p. 251–254, 1 nov. 2017.

KARAMI, M. et al. Nephroprotective effects of Feijoa *Sellowiana* leaves extract on renal injury induced by acute dose of ecstasy (MDMA) in mice. **Iranian Journal of Basic Medical Sciences**, v. 17, n. 1, p. 69–72, jan. 2014.

KEDIA, S.; CHATTARJI, S. Marble burying as a test of the delayed anxiogenic effects of acute immobilisation stress in mice. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 233, p. 150–154, ago. 2014.

KELES, H. et al. The effects of Feijoa sellowiana fruits on the antioxidant defense system, lipid peroxidation, and tissue morphology in rats. **Pharmaceutical Biology**, v. 50, n. 3, p. 318–325, mar. 2012.

KEMPKES, C. et al. Role of PAR-2 in neuroimmune communication and itch. In: CARSTENS, E.; AKIYAMA, T. (Eds.) **Itch: Mechanisms and Treatment**. Frontiers in Neuroscience. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis, 2014.

KIDO-NAKAHARA, M. et al. Itch in atopic dermatitis. **Immunology and Allergy Clinics of North America**, Allergic Skin Diseases. v. 37, n. 1, p. 113–122, 1 fev. 2017.

KITAKA, H.; TOMINAGA, M. The molecular and cellular mechanisms of itch and the involvement of TRP channels in the peripheral sensory nervous system and skin. **Allergology International**, v. 66, n. 1, p. 22–30, jan. 2017.

KLASSEN, C. O.; WATKINS, J. B. **Toxicologia, A Ciência Básica Dos Tóxicos de Casarett e Doull's**. 5ª Ed. McGraw-Hill de Portugal, Ltda., 2001.

KOCH, S. C.; ACTON, D.; GOULDING, M. Spinal circuits for touch, pain, and itch. **Annual Review of Physiology**, v. 80, n. 1, p. 3–29, 2018.

LAGERSTRÖM, M. C. et al. VGLUT2-dependent sensory neurons in the TRPV1 population regulate pain and itch. **Neuron**, v. 68, n. 3, p. 529–542, 4 nov. 2010.

LAMOTTE, R. H.; DONG, X.; RINGKAMP, M. Sensory neurons and circuits mediating itch. **Nature reviews. Neuroscience**, v. 15, n. 1, p. 19–31, jan. 2014.

LANDETE, J. M. Updated knowledge about polyphenols: functions, bioavailability, metabolism, and health. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 52, n. 10, p. 936–948, 2012.

LAPČÍK, O. et al. Identification of isoflavones in *Acca sellowiana* and two *Psidium* species (Myrtaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 33, n. 10, p. 983–992, out. 2005.

LAVERY, M. J. et al. Pruritus: an overview. What drives people to scratch an itch? **The Ulster Medical Journal**, v. 85, n. 3, p. 164–173, set. 2016.

LEVINE, J. D.; ALESSANDRI-HABER, N. TRP channels: targets for

the relief of pain. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1772, n. 8, p. 989–1003, ago. 2007.

LIU, Y. et al. VGLUT2-dependent glutamate release from nociceptors is required to sense pain and suppress itch. **Neuron**, v. 68, n. 3, p. 543–556, 4 nov. 2010.

LUCACIU, O. C.; CONNELL, G. P. Itch sensation through transient receptor potential channels: a systematic review and relevance to manual therapy. **Journal of Manipulative and Physiological Therapeutics**, v. 36, n. 6, p. 385–393, ago. 2013.

LUNDSTROM, K.; PHAM, H. T.; DINH, L. D. Interaction of plant extracts with central nervous system receptors. **Medicines**, v. 4, n. 1, p. 1–13, 23 fev. 2017.

LUO, J. et al. Molecular and cellular mechanisms that initiate pain and itch. **Cellular and molecular life sciences: CMLS**, v. 72, n. 17, p. 3201–3223, set. 2015.

MACHADO, G. DE et al. Reversal of fluconazole resistance induced by a synergistic effect with *Acca sellowiana* in *Candida glabrata* strains. **Pharmaceutical Biology**, v. 54, n. 11, p. 2410–2419, nov. 2016.

MAHMOUDI, M. et al. Antidepressant activities of *Feijoa sellowiana* fruit. **European Review for Medical and Pharmacological Sciences**, v. 19, n. 13, p. 2510–2513, jul. 2015.

MARIANO, G. R. C. **Avaliação da toxicidade pré-clínica aguda do extrato hidroalcoólico bruto das sementes de *Vatairea guianensis* (AUBLET)**. Dissertação–Macapá, AM: Universidade Federal do Amapá, 2012.

MAZZARI, A. L. D. A.; PRIETO, J. M. Herbal medicines in Brazil: pharmacokinetic profile and potential herb-drug interactions. **Frontiers in Pharmacology**, v. 5, 9 jul. 2014.

MEDEIROS, P. M. DE; LADIO, A. H.; ALBUQUERQUE, U. P. Patterns of medicinal plant use by inhabitants of Brazilian urban and rural areas: A macroscale investigation based on available literature. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 150, n. 2, p. 729–746, 25 nov. 2013.

MEIXIONG, J.; DONG, X. Mas-related G protein–coupled receptors and the biology of itch sensation. **Annual Review of Genetics**, v. 51, n. 1, p. 103–121, 2017.

MELGAREJO, E. et al. (-)-Epigallocatechin-3-gallate interferes with mast cell adhesiveness, migration and its potential to recruit monocytes. **Cellular and molecular life sciences: CMLS**, v. 64, n. 19–20, p. 2690–2701, out. 2007.

MENG, J.; STEINHOFF, M. Molecular mechanisms of pruritus. **Current Research in Translational Medicine**, Guerlain symposium – Biological repair mechanisms: the brain-skin connection. v. 64, n. 4, p. 203–206, 1 out. 2016.

MEOTTI, F. C.; COELHO, I. DOS S.; SANTOS, A. R. S. The nociception induced by glutamate in mice is potentiated by protons released into the solution. **The Journal of Pain: Official Journal of the American Pain Society**, v. 11, n. 6, p. 570–578, jun. 2010.

MEYDANI, M. Potential health benefits of avenanthramides of oats. **Nutrition Reviews**, v. 67, n. 12, p. 731–735, dez. 2009.

MEYER, B. N. et al. Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, v. 45, n. 05, p. 31–34, maio 1982.

MILLIKAN, L. E. Alternative therapy in pruritus. **Dermatologic Therapy**, v. 16, n. 2, p. 175–180, 1 jun. 2003.

MIOTO, R. Folha de São Paulo. **País deixa de gerar US\$5bi por ano com fitoterápicos**, 7 jun. 2010.

MIYAMOTO, T. et al. Itch-associated response induced by experimental dry skin in mice. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 88, n. 3, p. 285–292, mar. 2002.

MOLLANAZAR, N. K.; SMITH, P. K.; YOSIPOVITCH, G. Mediators of chronic pruritus in atopic dermatitis: getting the itch out? **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, v. 51, n. 3, p. 263–292, 1 dez. 2016.

MONFORTE, M. et al. Phytochemical composition and gastroprotective effect of Feijoa sellowiana Berg fruits from sicily. **Journal of Coastal Life Medicine**, v. 2, p. 14–21, 28 jan. 2014.

MOORE, C. et al. Regulation of pain and itch by TRP channels. **Neuroscience Bulletin**, p. 1–23, 27 dez. 2017.

NGUYỄN, H. V. Û H.; SAVAGE, G. P. Oxalate content of New Zealand grown and imported fruits. **Journal of food composition and analysis**,

v. 31, p. 180–184, 2013.

NORTON, S. K. et al. IL-10 suppresses mast cell IgE receptor expression and signaling in vitro and in vivo. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 5, p. 2848–2854, 1 mar. 2008.

OECD. **OECD Test No. 407: Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents**. Paris: Organisation for Economic Co-operation and Development, 2008.

OHTSUKA, E. et al. Roles of mast cells and histamine in mosquito bite-induced allergic itch-associated responses in mice. **Japanese Journal of Pharmacology**, v. 86, n. 1, p. 97–105, maio 2001.

OSHIRO, M. C. et al. A evolução do registro e prescrição de fitoterápicos no Brasil sob a perspectiva legal e sanitária. **Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia**, v. 4, n. 4, p. 116–122, 25 nov. 2016.

PANDA, S. K. Ethno-medicinal uses and screening of plants for antibacterial activity from Similipal Biosphere Reserve, Odisha, India. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 151, n. 1, p. 158–175, 2014.

PAOLETTI, F. et al. A sensitive spectrophotometric method for the determination of superoxide dismutase activity in tissue extracts. **Analytical Biochemistry**, v. 154, n. 2, p. 536–541, 1º maio 1986.

PAOLETTI, F.; MOCALI, A. Determination of superoxide dismutase activity by purely chemical system based on NAD(P)H oxidation. **Methods in Enzymology**, v. 186, p. 209–220, 1990.

PATRICIO, E. S. et al. Mechanisms Underlying the Scratching Behavior Induced by the Activation of Proteinase-Activated Receptor-4 in Mice. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 135, n. 10, p. 2484–2491, 1 out. 2015.

PEREIRA, M. P.; STÄNDER, S. Assessment of severity and burden of pruritus. **Allergology International**, v. 66, n. 1, p. 3–7, jan. 2017.

PETER, J. et al. Ankyrin-rich membrane spanning protein as a novel modulator of transient receptor potential vanilloid 1-function in nociceptive neurons. **European Journal of Pain**, v. 21, n. 6, p. 1072–1086, 1 jul. 2017.

PLUSKAL, T.; WENG, J.-K. Natural product modulators of human sensations and mood: molecular mechanisms and therapeutic potential.

Chemical Society Reviews, p. 1–46, 21 set. 2017.

POLUKORT, S. H. et al. IL-10 enhances IgE-mediated mast cell responses and is essential for the development of experimental food allergy in IL-10-deficient mice. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 196, n. 12, p. 4865–4876, 15 jun. 2016.

POTENZIERI, C.; UNDEM, B. J. Basic mechanisms of itch. **Clinical and experimental allergy : journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology**, v. 42, n. 1, p. 8–19, jan. 2012.

QUIDEAU, S. **Why bother with Polyphenols?** Disponível em: <<http://www.groupepolyphenols.com/the-society/why-bother-with-polyphenols/>>. Acesso em: 26 jan. 2018.

Quiñonez-Bastidas, G.N. Antinociceptive effect of (–)-epicatechin in inflammatory and neuropathic pain in rats. **Behavioural Pharmacology**, Maio de 2017, 10 p.

RALI, S. et al. Semisynthesis of derivatives of oleanolic acid from *zygium aromaticum* and their antinociceptive and anti-inflammatory properties. **Mediators of Inflammation**, v. 2016, p. 1–9, 2016.

RIBEIRO, R. A. et al. Involvement of resident macrophages and mast cells in the writhing nociceptive response induced by zymosan and acetic acid in mice. **European Journal of Pharmacology**, v. 387, n. 1, p. 111–118, 3 jan. 2000.

RICHARD, T. et al. Recognition characters in peptide-polyphenol complex formation. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 1760, n. 6, p. 951–958, jun. 2006.

RODRÍGUEZ-CASO, C. et al. Green tea epigallocatechin-3-gallate is an inhibitor of mammalian histidine decarboxylase. **Cellular and molecular life sciences: CMLS**, v. 60, n. 8, p. 1760–1763, ago. 2003.

ROGERIO, A. P. et al. Anti-inflammatory, analgesic and anti-oedematous effects of *Lafoensia pacari* extract and ellagic acid. **The Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 58, n. 9, p. 1265–1273, set. 2006.

ROSSI, A. et al. Inhibition of inducible nitric oxide synthase expression by an acetonic extract from *Feijoa sellowiana* Berg. fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, p. 5053–5061, 2007.

ROUFOGALIS, B. D.; CONIGRAVE, A. D.; STREHLER, E. E.

Introduction. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 16, n. 2, 2013.

RUBERTO, G.; TRINGALI, C. Secondary metabolites from the leaves of *Feijoa sellowiana* Berg. **Phytochemistry**, v. 65, n. 21, p. 2947–2951, nov. 2004a.

RUBERTO, G.; TRINGALI, C. Secondary metabolites from the leaves of *Feijoa sellowiana* Berg. **Phytochemistry**, v. 65, n. 21, p. 2947–2951, nov. 2004b.

SAJID, M. et al. Investigations on anti-inflammatory and analgesic activities of *Alnus nitida* Spach (Endl).stem bark in Sprague Dawley rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 198, p. 407–416, fev. 2017.

SAKAGUCHI, A. et al. Oral administration of milk-derived phospholipids inhibits penetration of cutaneous nerve fibres into epidermis in a mouse model of acute dry skin. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 42, n. 8, p. 890–894, 1 dez. 2017.

SANTOS, A. R.; VEDANA, E. M.; DE FREITAS, G. A. Antinociceptive effect of meloxicam, in neurogenic and inflammatory nociceptive models in mice. **Inflammation Research**, v. 47, n. 7, p. 302–307, jul. 1998.

SARACINI, E. et al. Simultaneous LC-DAD and LC-MS Determination of Ellagitannins, Flavonoid Glycosides, and Acyl-Glycosyl Flavonoids in *Cistus salvifolius* L. Leaves. **Chromatographia**, v. 62, n. 5–6, p. 245–249, 1 set. 2005.

SECRETARIA DE PLANEJAMENTO DE SANTA CATARINA. **Perfil Socioeconômico ADR Lages** Governo de Santa Catarina, , out. 2016. Disponível em: <<http://www.spg.sc.gov.br/visualizar-biblioteca/acoes/programa-de-desenvolvimento-e-reducao-das-desigualdades-regionais/784--103/file>>

SERAFIN, C. et al. Evaluation of the antimicrobial effects of *Plinia glomerata* (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 4, p. 578–582, dez. 2007.

SHARMA, A. et al. Therapeutic charm of quercetin and its derivatives: a review of research and patents. **Pharmaceutical Patent Analyst**, v. 7, n. 1, p. 15–32, 11 dez. 2017.

SHIM, W.-S.; OH, U. Histamine-induced itch and its relationship with pain. **Molecular Pain**, v. 4, p. 1–6, 31 jul. 2008.

SIEGEL, P. S. A Simple Electronic Device for the Measurement of the Gross Bodily Activity of Small Animals. **The Journal of Psychology**, v. 21, n. 2, p. 227–236, 1 abr. 1946.

SILVA, F. G. DA et al. **Stressing Conditions as Tools to Boost the Biosynthesis of Valuable Plant Natural Products**. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/119013/article>>. Acesso em: 3 jan. 2018.

SILVEIRA, P. F. DA; BANDEIRA, M. A. M.; ARRAIS, P. S. D. Pharmacovigilance and adverse reactions to the medicinal plants and herbal drugs: a reality. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 4, p. 618–626, dez. 2008.

SIMÕES, C. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5th ed. ed. [s.l.] Editora UFRGS/Editora UFSC, 2004.

SITE UFSC.COM. Imagem árvore da planta *Acca sellowiana*. 28/03/2007. Disponível em: <<http://noticias.ufsc.br/2007/03/ufsc-e-epagri-lancam-especies-melhoradas-da-goiabeira-serrana/>>. Acessado em 30/01/2018.

SITE VIVEIRO ZIMMER.COM.BR. Imagem das folhas e flores da planta *Acca sellowiana*. Disponível em: <<http://www.viveirozimmer.com.br/produtosimagens.php?idIm=321>> Acessado em 30/01/2018.

SITE ARABA.ECO.BR. Imagem dos frutos da planta *Acca sellowiana*. <http://institutoaraba.blogspot.com.br/2013/02/feijoa-e-recomendada-para-cidade.html>. Acessado em 30/01/2018.

SOUZA, C. T. et al. Plantas medicinais utilizadas na saúde da criança. **Enfermeria Global**, v. 24, p. 53–59, 2011.

SOUZA, G. H. ; MELLO, J. C. P.; LOPES, N. P. **Farmacognosia - coletânea científica**. Ouro Preto: UFOP, 2012.

SPAHN, V.; STEIN, C.; ZÖLLNER, C. Modulation of transient receptor vanilloid 1 activity by transient receptor potential ankyrin 1. **Molecular Pharmacology**, v. 85, n. 2, p. 335–344, 1 fev. 2014.

SPIEGEL, D. R. et al. The Role and Treatment Implications of Peripheral and Central Processing of Pain, Pruritus, and Nausea in Heightened Somatic Awareness: A Review. **Innovations in Clinical Neuroscience**, v. 14, n. 5–6, p. 11–20, jun. 2017.

STÄNDER, S. et al. Targeting the Neurokinin Receptor 1 with

Aprepitant: A Novel Antipruritic Strategy. **PLoS ONE**, v. 5, n. 6, 4 jun. 2010.

STERU, L. et al. The tail suspension test: a new method for screening antidepressants in mice. **Psychopharmacology**, v. 85, n. 3, p. 367–370, 1985.

SU, J. Q. et al. Functional metagenomic characterization of antibiotic resistance genes in agricultural soils from China. **Environment International**, v. 65, p. 9–15, abr. 2014.

TABACH, R.; RAVASI, J. PLANFAVI: SISTEMA DE FARMACOVIGILÂNCIA EM PLANTAS MEDICINAIS | Ricardo Tabach and Juliana Ravasi - Academia.edu. n. 23, set. 2012.

TAGHI MANSOURI, M. et al. Central and peripheral antinociceptive effects of ellagic acid in different animal models of pain. **European Journal of Pharmacology**, v. 707, n. 1–3, p. 46–53, 5 de maio 2013.

TAGHI MANSOURI, M. et al. A study of the mechanisms underlying the anti-inflammatory effect of ellagic acid in carrageenan-induced paw edema in rats. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 47, n. 3, p. 292–298, jun. 2015.

TANG, L.-Q.; WEI, W.; WANG, X.-Y. Effects and mechanisms of catechin for adjuvant arthritis in rats. **Advances in Therapy**, v. 24, n. 3, p. 679–690, jun. 2007.

TÓTH, B. I. et al. TRP channels in the skin. **British Journal of Pharmacology**, v. 171, n. 10, p. 2568–2581, maio 2014.

TREVISAN, G. et al. Gallic acid functions as a TRPA1 antagonist with relevant antinociceptive and antiedematogenic effects in mice. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 387, n. 7, p. 679–689, jul. 2014.

TROJAN-RODRIGUES, M. et al. Plants used as antidiabetics in popular medicine in Rio Grande do Sul, southern Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, n. 1, p. 155–163, 6 jan. 2012.

TSUDA, M. Modulation of pain and itch by spinal glia. **Neuroscience Bulletin**, p. 1–8, 7 abr. 2017.

TUNCEL, N. B.; YILMAZ, N. Optimizing the extraction of phenolics and antioxidants from feijoa (*Feijoa sellowiana*, Myrtaceae). **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 1, p. 141–150, 1 jan. 2015.

- TUPPER, D. E.; WALLACE, R. B. Utility of the neurological examination in rats. **Acta Neurobiologiae Experimentalis**, v. 40, n. 6, p. 999–1003, 1980.
- TURCO, F. et al. Acetonic extract from the Feijoa sellowiana Berg. fruit exerts antioxidant properties and modulates disaccharidases activities in human intestinal epithelial cells. **Phytotherapy research: PTR**, v. 30, n. 8, p. 1308–1315, ago. 2016.
- UPADHYAY, S.; DIXIT, M. Role of Polyphenols and Other Phytochemicals on Molecular Signaling. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2015, p. 504253, 2015.
- UTA, D. et al. TRPA1-expressing primary afferents synapse with a morphologically identified subclass of substantia gelatinosa neurons in the adult rat spinal cord. **The European Journal of Neuroscience**, v. 31, n. 11, p. 1960–1973, jun. 2010.
- VALTCHEVA, M. V. et al. Protein kinase C δ mediates histamine-evoked itch and responses in pruriceptors. **Molecular Pain**, v. 11, p. 1–10, 6 jan. 2015.
- VELHO, A. C. **Fisiologia e preservação da qualidade pós-colheita de goiaba serrana [Acca sellowiana (Berg.) Burret]**. Lages, SC: Universidade do Estado de Santa Catarina, Centro de Ciências Agrovetenárias - UDESC-CAV, 28 set. 2009.
- VINEGAR, R. et al. Antagonism of Pain and Hyperalgesia. In: VANE, D. J. R.; FERREIRA, D. S. H. (Eds.). **Anti-Inflammatory Drugs**. Handbook of Experimental Pharmacology. [s.l.] Springer Berlin Heidelberg, 1979. p. 209–222.
- VUOTTO, M. L. et al. Antimicrobial and antioxidant activities of Feijoa sellowiana fruit. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 13, n. 3, p. 197–201, jan. 2000.
- WALKER, A. K. et al. Neuroinflammation and comorbidity of pain and depression. **Pharmacological Reviews**, v. 66, n. 1, p. 80–101, jan. 2014.
- WALTON, S. F. et al. Acaricidal activity of Melaleuca alternifolia (tea tree) oil: in vitro sensitivity of Sarcoptes scabiei var hominis to terpinen-4-ol. **Archives of Dermatology**, v. 140, n. 5, p. 563–566, 1 maio 2004.
- WENDEL, A. Glutathione peroxidase. **Methods in Enzymology**, v. 77, p. 325–333, 1981.

WESTON, R. J. Bioactive products from fruit of the feijoa (*Feijoa sellowiana*, Myrtaceae): A review. **Food Chemistry**, v. 121, n. 4, p. 923–926, 15 ago. 2010.

WHITE, F. A.; BHANGOO, S. K.; MILLER, R. J. Chemokines: integrators of pain and inflammation. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 10, p. 834–844, 10 jan. 2005.

WHO. **WHO monographs on medicinal plants commonly used in the Newly Independent States (NIS)**. 1. ed. Geneva: World Health Organization, 2010.

WHO, W. H. O. **The Importance of Pharmacovigilance - safety monitoring of medicinal products**. Disponível em: <<http://apps.who.int/medicinedocs/en/d/Js4893e/>>. Acesso em: 9 jan. 2018.

WHO, W. H. O. **WHO guidelines on safety monitoring of herbal medicines in pharmacovigilance systems** World Health Organization, Geneva, , 2004. Disponível em: <<http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s7148e/s7148e.pdf>>

WONG, L.-S.; WU, T.; LEE, C.-H. Inflammatory and noninflammatory itch: implications in pathophysiology-directed treatments. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 7, p. 1–13, 10 jul. 2017.

YAMASHITA, K. et al. Epigallocatechin gallate inhibits histamine release from rat basophilic leukemia (RBL-2H3) cells: role of tyrosine phosphorylation pathway. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 274, n. 3, p. 603–608, 11 ago. 2000.

YANABA, K. et al. CD19 expression in B cells regulates atopic dermatitis in a mouse model. **The American Journal of Pathology**, v. 182, n. 6, p. 2214–2222, 1 jun. 2013.

YU, G. et al. Enhanced itch elicited by capsaicin in a chronic itch model. **Molecular Pain**, v. 12, 26 abr. 2016.

YUN, J.-W. et al. Antipruritic effects of TRPV1 antagonist in murine atopic dermatitis and itching models. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 131, n. 7, p. 1576–1579, 1 jul. 2011.

ZHANG, X. Targeting TRP ion channels for itch relief. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 388, n. 4, p. 389–399, 1 abr. 2015.

ZHAO, Z.-Q. et al. Cross-inhibition of NMBR and GRPR signaling maintains normal histaminergic itch transmission. **The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience**, v. 34, n. 37, p. 12402–12414, 10 set. 2014a.

ZHAO, Z.-Q. et al. Descending control of itch transmission by the serotonergic system via 5-HT_{1A}-facilitated GRP-GRPR signaling. **Neuron**, v. 84, n. 4, p. 821–834, 19 nov. 2014b.

ZHOU, F.-M. et al. Antioxidants Attenuate Acute and Chronic Itch: Peripheral and Central Mechanisms of Oxidative Stress in Pruritus. **Neuroscience Bulletin**, v. 33, n. 4, p. 423–435, 1 ago. 2017.

ZUNIC, L.; SKRBO, A.; DOBRACA, A. Historical Contribution of Pharmaceutics to Botany and Pharmacognosy Development. **Materia Socio-Medica**, v. 29, n. 4, p. 291–300, dez. 2017.

ZUNTINI VISCARDI, D. et al. Seed and peel essential oils obtained from *Campomanesia adamantium* fruit inhibit inflammatory and pain parameters in rodents. **PLoS ONE**, v. 12, n. 2, p. 1–15, 21 fev. 2017.

ANEXOS

ANEXO 1 – AUTORIZAÇÕES PARA REPRODUÇÃO DAS FIGURAS UTILIZADAS NESTA TESE.

ELSEVIER LICENSE TERMS AND CONDITIONS

Feb 16, 2018

This Agreement between Miss. Rosane Aquino ("You") and Elsevier ("Elsevier") consists of your license details and the terms and conditions provided by Elsevier and Copyright Clearance Center.

License Number	4290750326990
License date	Feb 16, 2018
Licensed Content Publisher	Elsevier
Licensed Content Publication	Journal of the American Academy of Dermatology
Licensed Content Title	Neurocutaneous disease Cutaneous neuroanatomy and mechanisms of Itch and pain
Licensed Content Author	Miguel Chuquillin,Yazan Alghalith,Kristen Helms Fernandez
Licensed Content Date	Feb 1, 2016
Licensed Content Volume	74
Licensed Content Issue	2
Licensed Content Pages	16
Start Page	197
End Page	212
Type of Use	reuse in a thesis/dissertation
Intended publisher of new work	other
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Format	both print and electronic
Are you the author of this Elsevier article?	No
Will you be translating?	Yes, without English rights
Number of languages	>10
Languages	Portuguese
Original figure numbers	Figure 1
Title of your thesis/dissertation	Efeitos analgésico e anti prurido do extrato da <i>Acca sellowiana</i>
Publisher of new work	UFSC
Author of new work	Adair Roberto Soares Santos
Expected completion date	Feb 2018
Estimated size (number of pages)	1
Requestor Location	Miss. Rosane Aquino Rua Pedro Vieira Vidal, 280;10673 Florianopolis, SC 88040010 Brazil Attn: Miss. Rosane Aquino
Publisher Tax ID	GB 494 6272 12
Billing Type	Invoice
Billing Address	Miss. Rosane Aquino Rua Pedro Vieira Vidal, 280;10673 Florianopolis, Brazil 88040010 Attn: Miss. Rosane Aquino
Total	0.00 USD
Terms and Conditions	

INTRODUCTION

1. The publisher for this copyrighted material is Elsevier. By clicking "accept" in connection with completing this licensing transaction, you agree that the following terms and conditions apply to this transaction (along with the Billing and Payment terms and conditions established by Copyright Clearance Center, Inc. ("CCC"), at the time that you opened your Rightslink account and that are available at any time at <http://myaccount.copyright.com>).

GENERAL TERMS

2. Elsevier hereby grants you permission to reproduce the aforementioned material subject to the terms and conditions indicated.
3. Acknowledgement: If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source, permission must also be sought from that source. If such permission is not obtained then that material may not be included in your publication/copies. Suitable acknowledgement to the source must be made, either as a footnote or in a reference list at the end of your publication, as follows:
"Reprinted from Publication title, Vol /edition number, Author(s), Title of article / title of chapter, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier [OR APPLICABLE SOCIETY COPYRIGHT OWNER]." Also Lancet special credit - "Reprinted from The Lancet, Vol. number, Author(s), Title of article, Pages No., Copyright (Year), with permission from Elsevier."
4. Reproduction of this material is confined to the purpose and/or media for which permission is hereby given.
5. Altering/Modifying Material: Not Permitted. However figures and illustrations may be altered/adapted minimally to serve your work. Any other abbreviations, additions, deletions and/or any other alterations shall be made only with prior written authorization of Elsevier Ltd. (Please contact Elsevier at permissions@elsevier.com). No modifications can be made to any Lancet figures/tables and they must be reproduced in full.
6. If the permission fee for the requested use of our material is waived in this instance, please be advised that your future requests for Elsevier materials may attract a fee.
7. Reservation of Rights: Publisher reserves all rights not specifically granted in the combination of (i) the license details provided by you and accepted in the course of this licensing transaction, (ii) these terms and conditions and (iii) CCC's Billing and Payment terms and conditions.
8. License Contingent Upon Payment: While you may exercise the rights licensed immediately upon issuance of the license at the end of the licensing process for the transaction, provided that you have disclosed complete and accurate details of your proposed use, no license is finally effective unless and until full payment is received from you (either by publisher or by CCC) as provided in CCC's Billing and Payment terms and conditions. If full payment is not received on a timely basis, then any license preliminarily granted shall be deemed automatically revoked and shall be void as if never granted. Further, in the event that you breach any of these terms and conditions or any of CCC's Billing and Payment terms and conditions, the license is automatically revoked and shall be void as if never granted. Use of materials as described in a revoked license, as well as any use of the materials beyond the scope of an unrevoked license, may constitute copyright infringement and publisher reserves the right to take any and all action to protect its copyright in the materials.
9. Warranties: Publisher makes no representations or warranties with respect to the licensed material.
10. Indemnity: You hereby indemnify and agree to hold harmless publisher and CCC, and their respective officers, directors, employees and agents, from and against any and all claims arising out of your use of the licensed material other than as specifically authorized pursuant to this license.
11. No Transfer of License: This license is personal to you and may not be sublicensed, assigned, or transferred by you to any other person without publisher's written permission.
12. No Amendment Except in Writing: This license may not be amended except in a writing signed by both parties (or, in the case of publisher, by CCC on publisher's behalf).
13. Objection to Contrary Terms: Publisher hereby objects to any terms contained in any purchase order, acknowledgment, check endorsement or other writing prepared by you, which terms are inconsistent with these terms and conditions or CCC's Billing and Payment terms and conditions. These terms and conditions, together with CCC's Billing and Payment terms and conditions (which are incorporated herein), comprise the entire agreement between you and publisher (and CCC) concerning this licensing transaction. In the event of any conflict between your obligations established by these terms and conditions and those established by CCC's Billing and Payment terms and conditions, these terms and conditions shall control.
14. Revocation: Elsevier or Copyright Clearance Center may deny the permissions described in this License at their sole discretion, for any reason or no reason, with a full refund payable to you. Notice of such denial will be made using the contact information provided by you. Failure to receive such notice will not alter or invalidate the denial. In no event will Elsevier or Copyright Clearance Center be responsible or liable for any costs, expenses or damage incurred by you as a result of a denial of your permission request, other than a refund of the amount(s) paid by you to Elsevier and/or Copyright Clearance Center for denied permissions.

LIMITED LICENSE

The following terms and conditions apply only to specific license types:

15. **Translation:** This permission is granted for non-exclusive world **English** rights only unless your license was granted for translation rights. If you licensed translation rights you may only translate this content into the languages you requested. A professional translator must perform all translations and reproduce the content word for word preserving the integrity of the article.
16. **Posting licensed content on any Website:** The following terms and conditions apply as follows: Licensing material from an Elsevier journal: All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image; A hyper-text must be

included to the Homepage of the journal from which you are licensing at <http://www.sciencedirect.com/science/journal/xxxxx> or the Elsevier homepage for books at <http://www.elsevier.com>; Central Storage: This license does not include permission for a scanned version of the material to be stored in a central repository such as that provided by Heron/XanEdu.

Licensing material from an Elsevier book: A hyper-text link must be included to the Elsevier homepage at <http://www.elsevier.com>. All content posted to the web site must maintain the copyright information line on the bottom of each image.

Posting licensed content on Electronic reserve: In addition to the above the following clauses are applicable: The web site must be password-protected and made available only to bona fide students registered on a relevant course. This permission is granted for 1 year only. You may obtain a new license for future website posting.

17. **For Journal authors:** the following clauses are applicable in addition to the above:

Preprints:

A preprint is an author's own write-up of research results and analysis, it has not been peer-reviewed, nor has it had any other value added to it by a publisher (such as formatting, copyright, technical enhancement etc.).

Authors can share their preprints anywhere at any time. Preprints should not be added to or enhanced in any way in order to appear more like, or to substitute for, the final versions of articles however authors can update their preprints on arXiv or RePEc with their Accepted Author Manuscript (see below).

If accepted for publication, we encourage authors to link from the preprint to their formal publication via its DOI. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help users to find, access, cite and use the best available version. Please note that Cell Press, The Lancet and some society-owned have different preprint policies. Information on these policies is available on the journal homepage.

Accepted Author Manuscripts: An accepted author manuscript is the manuscript of an article that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and editor-author communications.

Authors can share their accepted author manuscript:

- immediately
 - via their non-commercial person homepage or blog
 - by updating a preprint in arXiv or RePEc with the accepted manuscript
 - via their research institute or institutional repository for internal institutional uses or as part of an invitation-only research collaboration work-group
 - directly by providing copies to their students or to research collaborators for their personal use
 - for private scholarly sharing as part of an invitation-only work group on commercial sites with which Elsevier has an agreement
- After the embargo period
 - via non-commercial hosting platforms such as their institutional repository
 - via commercial sites with which Elsevier has an agreement

In all cases accepted manuscripts should:

- link to the formal publication via its DOI
- bear a CC-BY-NC-ND license - this is easy to do
- if aggregated with other manuscripts, for example in a repository or other site, be shared in alignment with our hosting policy not be added to or enhanced in any way to appear more like, or to substitute for, the published journal article.

Published journal article (JPA): A published journal article (JPA) is the definitive final record of published research that appears or will appear in the journal and embodies all value-adding publishing activities including peer review co-ordination, copy-editing, formatting, (if relevant) pagination and online enrichment.

Policies for sharing publishing journal articles differ for subscription and gold open access articles:

Subscription Articles: If you are an author, please share a link to your article rather than the full-text. Millions of researchers have access to the formal publications on ScienceDirect, and so links will help your users to find, access, cite, and use the best available version. Theses and dissertations which contain embedded JPAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

If you are affiliated with a library that subscribes to ScienceDirect you have additional private sharing rights for others' research accessed under that agreement. This includes use for classroom teaching and internal training at the institution (including use in course packs and courseware programs), and inclusion of the article for grant funding purposes.

Gold Open Access Articles: May be shared according to the author-selected end-user license and should contain a [CrossMark logo](#), the end user license, and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

Please refer to Elsevier's [posting policy](#) for further information.

18. **For book authors** the following clauses are applicable in addition to the above:

Authors are permitted to place a brief summary of their work online only. You are not

allowed to download and post the published electronic version of your chapter, nor may you scan the printed edition to create an electronic version. **Posting to a repository:** Authors are permitted to post a summary of their chapter only in their institution's repository.

19. Thesis/Dissertation: If your license is for use in a thesis/dissertation your thesis may be submitted to your institution in either print or electronic form. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. These requirements include permission for the Library and Archives of Canada to supply single copies, on demand, of the complete thesis and include permission for Proquest/UMI to supply single copies, on demand, of the complete thesis. Should your thesis be published commercially, please reapply for permission. Theses and dissertations which contain embedded PJAs as part of the formal submission can be posted publicly by the awarding institution with DOI links back to the formal publications on ScienceDirect.

Elsevier Open Access Terms and Conditions

You can publish open access with Elsevier in hundreds of open access journals or in nearly 2000 established subscription journals that support open access publishing. Permitted third party re-use of these open access articles is defined by the author's choice of Creative Commons user license. See our [open access license policy](#) for more information.

Terms & Conditions applicable to all Open Access articles published with Elsevier:

Any reuse of the article must not represent the author as endorsing the adaptation of the article nor should the article be modified in such a way as to damage the author's honour or reputation. If any changes have been made, such changes must be clearly indicated. The author(s) must be appropriately credited and we ask that you include the end user license and a DOI link to the formal publication on ScienceDirect.

If any part of the material to be used (for example, figures) has appeared in our publication with credit or acknowledgement to another source it is the responsibility of the user to ensure their reuse complies with the terms and conditions determined by the rights holder.

Additional Terms & Conditions applicable to each Creative Commons user license:

CC BY: The CC-BY license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article and to make commercial use of the Article (including reuse and/or resale of the Article by commercial entities), provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>.

CC BY NC SA: The CC BY-NC-SA license allows users to copy, to create extracts, abstracts and new works from the Article, to alter and revise the Article, provided this is not done for commercial purposes, and that the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, indicates if changes were made and the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. Further, any new works must be made available on the same conditions. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0>.

CC BY NC ND: The CC BY-NC-ND license allows users to copy and distribute the Article, provided this is not done for commercial purposes and further does not permit distribution of the Article if it is changed or edited in any way, and provided the user gives appropriate credit (with a link to the formal publication through the relevant DOI), provides a link to the license, and that the licensor is not represented as endorsing the use made of the work. The full details of the license are available at <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0>. Any commercial reuse of Open Access articles published with a CC BY NC SA or CC BY NC ND license requires permission from Elsevier and will be subject to a fee.

Commercial reuse includes:

- Associating advertising with the full text of the Article
- Charging fees for document delivery or access
- Article aggregation
- Systematic distribution via e-mail lists or share buttons

Posting or linking by commercial companies for use by customers of those companies.

20. Other Conditions:

v1.9

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

**SPRINGER NATURE LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Jan 25, 2018

This Agreement between Miss. Rosane Aquino ("You") and Springer Nature ("Springer Nature") consists of your license details and the terms and conditions provided by Springer Nature and Copyright Clearance Center.

License Number	4275871013129
License date	Jan 25, 2018
Licensed Content Publisher	Springer Nature
Licensed Content Publication	Clinical Reviews in Allergy and Immunology
Licensed Content Title	Mediators of Chronic Pruritus in Atopic Dermatitis: Getting the Itch Out?
Licensed Content Author	Nicholas K. Mollanazar, Peter K. Smith, Gil Yosipovitch
Licensed Content Date	Jan 1, 2015
Licensed Content Volume	51
Licensed Content Issue	3
Type of Use	Thesis/Dissertation
Requestor type	academic/university or research institute
Format	print and electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Will you be translating?	yes, without original language
Number of languages	1
Circulation/distribution	<501
Author of this Springer Nature content	no
Title	Efeitos analgésico e anti prurido do extrato da <i>Acca sellowiana</i>
Instructor name	Adair Roberto Soares Santos
Institution name	UFSC
Expected presentation date	Feb 2018
Portions	Figure 2
Specific Languages	Portuguese
Requestor Location	Miss. Rosane Aquino Rua Pedro Vieira Vidal, 280;106T3 Florianopolis, SC 88040010 Brazil Attn: Miss. Rosane Aquino
Billing Type	Invoice
Billing Address	Miss. Rosane Aquino Rua Pedro Vieira Vidal, 280;106T3 Florianopolis, Brazil 88040010 Attn: Miss. Rosane Aquino
Total	0.00 USD

Terms and Conditions

Springer Nature Terms and Conditions for RightsLink Permissions
Springer Customer Service Centre GmbH (the Licensor) hereby grants you a non-exclusive, world-wide licence to reproduce the material and for the purpose and requirements specified in the attached copy of your order form, and for no other use, subject to the conditions below:

1. The Licensor warrants that it has, to the best of its knowledge, the rights to license reuse of this material. However, you should ensure that the material you are requesting is original to the Licensor and does not carry the copyright of another entity (as credited in the published version).

If the credit line on any part of the material you have requested indicates that it was reprinted or adapted with permission from another source, then you should also seek permission from that source to reuse the material.

2. Where **print only** permission has been granted for a fee, separate permission must be obtained for any additional electronic re-use.

3. Permission granted **free of charge** for material in print is also usually granted for any electronic version of that work, provided that the material is incidental to your work as a whole and that the electronic version is essentially equivalent to, or substitutes for, the print version.
4. A licence for 'post on a website' is valid for 12 months from the licence date. This licence does not cover use of full text articles on websites.
5. Where **'reuse in a dissertation/thesis'** has been selected the following terms apply: Print rights for up to 100 copies, electronic rights for use only on a personal website or institutional repository as defined by the Sherpa guideline (www.sherpa.ac.uk/romeo/).
6. Permission granted for books and journals is granted for the lifetime of the first edition and does not apply to second and subsequent editions (except where the first edition permission was granted free of charge or for signatories to the STM Permissions Guidelines <http://www.stm-assoc.org/copyright-legal-affairs/permissions/permissions-guidelines/>), and does not apply for editions in other languages unless additional translation rights have been granted separately in the licence.
7. Rights for additional components such as custom editions and derivatives require additional permission and may be subject to an additional fee. Please apply to Journalpermissions@springernature.com/bookpermissions@springernature.com for these rights.
8. The Licensor's permission must be acknowledged next to the licensed material in print, in electronic form, this acknowledgement must be visible at the same time as the figures/tables/illustrations or abstract, and must be hyperlinked to the journal/book's homepage. Our required acknowledgement format is in the Appendix below.
9. Use of the material for incidental promotional use, minor editing privileges (this does not include cropping, adapting, omitting material or any other changes that affect the meaning, intention or moral rights of the author) and copies for the disabled are permitted under this licence.
10. Minor adaptations of single figures (changes of format, colour and style) do not require the Licensor's approval. However, the adaptation should be credited as shown in Appendix below.

Appendix — Acknowledgements:

For Journal Content:

Reprinted by permission from [the Licensor]: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication)]

For Advance Online Publication papers:

Reprinted by permission from [the Licensor]: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication), advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].)]

For Adaptations/Translations:

Adapted/Translated by permission from [the Licensor]: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication)]

Note: For any republication from the British Journal of Cancer, the following credit line style applies:

Reprinted/adapted/translated by permission from [the Licensor]: on behalf of Cancer Research UK: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication)]

For Advance Online Publication papers:

Reprinted by permission from The [the Licensor]: on behalf of Cancer Research UK: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication), advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM])]

For Book content:

Reprinted/adapted by permission from [the Licensor]: [Book Publisher (e.g. Palgrave Macmillan, Springer etc)] [Book Title] by [Book author(s)] [COPYRIGHT] (year of publication)

Other Conditions:

Version 1.0

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

**SPRINGER NATURE LICENSE
TERMS AND CONDITIONS**

Feb 04, 2018

This Agreement between Miss. Rosane Aquino ("You") and Springer Nature ("Springer Nature") consists of your license details and the terms and conditions provided by Springer Nature and Copyright Clearance Center.

License Number	4282211416103
License date	Feb 04, 2018
Licensed Content Publisher	Springer Nature
Licensed Content Publication	Neuroscience Bulletin
Licensed Content Title	Regulation of Pain and Itch by TRP Channels
Licensed Content Author	Carlene Moore, Rupali Gupta, Sven-Eric Jordt et al
Licensed Content Date	Jan 1, 2017
Type of Use	Thesis/Dissertation
Requestor type	academic/university or research institute
Format	print and electronic
Portion	figures/tables/illustrations
Number of figures/tables/illustrations	1
Will you be translating?	yes, without original language
Number of languages	1
Circulation/distribution	<501
Author of this Springer Nature content	no
Title	Efeitos analgésico e anti prurido do extrato da <i>Acca sellowiana</i>
Instructor name	Adair Roberto Soares Santos
Institution name	UFSC
Expected presentation date	Feb 2018
Portions	Figure 1
Specific Languages	Portuguese
Requestor Location	Miss. Rosane Aquino Rua Pedro Vieira Vidal, 280;106T3
	Florianopolis, SC 88040010 Brazil Attn: Miss. Rosane Aquino
Billing Type	Invoice
Billing Address	Miss. Rosane Aquino Rua Pedro Vieira Vidal, 280;106T3
	Florianopolis, Brazil 88040010 Attn: Miss. Rosane Aquino
Total	0,00 USD

Terms and Conditions

Springer Nature Terms and Conditions for RightsLink Permissions

Springer Customer Service Centre GmbH (the Licensor) hereby grants you a non-exclusive, world-wide licence to reproduce the material and for the purpose and requirements specified in the attached copy of your order form, and for no other use, subject to the conditions below:

1. The Licensor warrants that it has, to the best of its knowledge, the rights to license reuse of this material. However, you should ensure that the material you are requesting is original to the Licensor and does not carry the copyright of another entity (as credited in the published version).

If the credit line on any part of the material you have requested indicates that it was reprinted or adapted with permission from another source, then you should also seek permission from that source to reuse the material.

2. Where **print only** permission has been granted for a fee, separate permission must be obtained for any additional electronic re-use.
3. Permission granted **free of charge** for material in print is also usually granted for any electronic version of that work, provided that the material is incidental to your work as a whole and that the electronic version is essentially equivalent to, or substitutes for, the print version.

4. A licence for 'post on a website' is valid for 12 months from the licence date. This licence does not cover use of full text articles on websites.
5. Where 'reuse in a dissertation/thesis' has been selected the following terms apply: Print rights for up to 100 copies, electronic rights for use only on a personal website or institutional repository as defined by the Sherpa guideline (www.sherpa.ac.uk/romeo/).
6. Permission granted for books and journals is granted for the lifetime of the first edition and does not apply to second and subsequent editions (except where the first edition permission was granted free of charge or for signatories to the STM Permissions Guidelines <http://www.stm-assoc.org/copyright-legal-affairs/permissions/permissions-guidelines/>), and does not apply for editions in other languages unless additional translation rights have been granted separately in the licence.
7. Rights for additional components such as custom editions and derivatives require additional permission and may be subject to an additional fee. Please apply to Journalpermissions@springernature.com or bookpermissions@springernature.com for these rights.
8. The Licensor's permission must be acknowledged next to the licensed material in print. In electronic form, this acknowledgement must be visible at the same time as the figures/tables/illustrations or abstract, and must be hyperlinked to the journal/book's homepage. Our required acknowledgement format is in the Appendix below.
9. Use of the material for incidental promotional use, minor editing privileges (this does not include cropping, adapting, omitting material or any other changes that affect the meaning, intention or moral rights of the author) and copies for the disabled are permitted under this licence.
10. Minor adaptations of single figures (changes of format, colour and style) do not require the Licensor's approval. However, the adaptation should be credited as shown in Appendix below.

Appendix — Acknowledgements:

For Journal Content:

Reprinted by permission from [the Licensor]: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication)]

For Advance Online Publication papers:

Reprinted by permission from [the Licensor]: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication), advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM].)]

For Adaptations/Translations:

Adapted/Translated by permission from [the Licensor]: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication)]

Note: For any republication from the British Journal of Cancer, the following credit line style applies:

Reprinted/adapted/translated by permission from [the Licensor]: on behalf of Cancer Research UK: : [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication)]

For Advance Online Publication papers:

Reprinted by permission from The [the Licensor]: on behalf of Cancer Research UK: [Journal Publisher (e.g. Nature/Springer/Palgrave)] [JOURNAL NAME] [REFERENCE CITATION (Article name, Author(s) Name), [COPYRIGHT] (year of publication), advance online publication, day month year (doi: 10.1038/sj.[JOURNAL ACRONYM])]

For Book content:

Reprinted/adapted by permission from [the Licensor]: [Book Publisher (e.g. Palgrave Macmillan, Springer etc)] [Book Title] by [Book author(s)] [COPYRIGHT] (year of publication)]

Other Conditions:

Version 1.0

Questions? customercare@copyright.com or +1-855-239-3415 (toll free in the US) or +1-978-646-2777.

ANEXO 2- CERTIFICADO DA CEUA



Universidade Federal
de Santa Catarina

Comissão de Ética no
Uso de Animais



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação do efeito analgésico e antipruridogênico de *Acca sellowiana*, planta nativa do planalto catarinense", protocolada sob o CEUA nº 8581050417, sob a responsabilidade de **Adair Roberto Soares dos Santos e equipe; Rosane Schenkel de Aquino** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (CEUA/UFSC) na reunião de 05/05/2017.

We certify that the proposal "Evaluation of analgesic and anti-itch effect of *Acca sellowiana*, catarinense plateau native plant", utilizing 700 Heterogenics mice (males and females), protocol number CEUA 8581050417, under the responsibility of **Adair Roberto Soares dos Santos and team; Rosane Schenkel de Aquino** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Federal University of Santa Catarina (CEUA/UFSC) in the meeting of 05/05/2017.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **05/2017** a **12/2017**

Área: **Farmacologia**

Origem: **Biotério Central**

Espécie: **Camundongos heterogênicos**

sexo: **Machos e Fêmeas**

idade: **1 a 3 meses**

N: 700

Linhagem: **Mus musculus [] linhagem: Swiss**

Peso: **15 a 60 g**

Resumo: Dor e coceira estão intimamente relacionados. Ambas são aversivas, mas possuem comportamentos distintos: dor provoca uma resposta de isolamento, de quietude e a coceira provoca o desejo e uma resposta ativa de coçar (LUO et al., 2015). Dor é definida pela Associação Internacional para o estudo da dor (International Association for the Study of Pain - IASP) como [uma experiência sensorial e emocional desagradável associada com real ou potencial dano tecidual]. Coceira foi definida há mais de 340 anos pelo médico alemão Samuel Hafeffer como "uma sensação desagradável que provoca o desejo ou reflexo de coçar", sendo válida até os dias atuais. Elas são iniciadas por ativação de neurônios sensoriais primários por peptídeos, neurotransmissores e citocinas e envolvem canais iônicos em comum, tais como os receptores de potencial transitórios (TRPs). Transdução e geração de sensações de dor e coceira envolvem muitas moléculas, células e circuitos neurais em inúmeros níveis da periferia para a medula espinhal e o cérebro. Os mecanismos e mediadores envolvidos na dor e prurido têm sido alvo de muitos estudos, bem como substâncias que diminuem, inibam a condução destes estímulos nociceptivos. Entre esses estudos, destacam-se as substâncias naturais, como as plantas, que são utilizadas por milênios no tratamento de enfermidades, com ou sem comprovação científica. Contudo, muitos compostos naturais testados ainda não foram considerados substâncias ideais devido aos efeitos adversos causados ou, por sua limitada efetividade. O Planalto Serrano Catarinense, apesar da intensa exploração por madeiras, possui uma flora nativa diversificada e pouco explorada (Lorenzini, 2006). Dentre as plantas citadas por Amorim, 2010, a goiaba serrana (*Acca sellowiana*), é um exemplo de espécie ainda pouco explorada entre as plantas nativas subsistentes e que são utilizadas popularmente no tratamento de enfermidades da população local. Sendo assim, esta pesquisa tem por finalidade verificar se o extrato bruto aquoso da planta *Acca sellowiana*, possui atividade analgésica e antipruridogênica (antinoceceptiva) utilizando para isto, modelos e testes comportamentais clássicos de dor e prurido. Além disso, realizar testes bioquímicos na tentativa de entender o mecanismo de ação deste extrato. Palavras-chave: Plantas medicinais; *Acca sellowiana*, dor, prurido, coceira, TRP's, Proteína cinase C, ASICs, tripsina, histamina, substância P.

Local do experimento: Laboratórios do LANDI e LAMEB

Florianópolis, 05 de junho de 2017



Universidade Federal
de Santa Catarina

UFSC

Prof. Dr. Carlos Rogério Tonussi
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina

Comissão de Ética no
Uso de Animais



Maria Alcina Martins de Castro
Vice-Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais
Universidade Federal de Santa Catarina