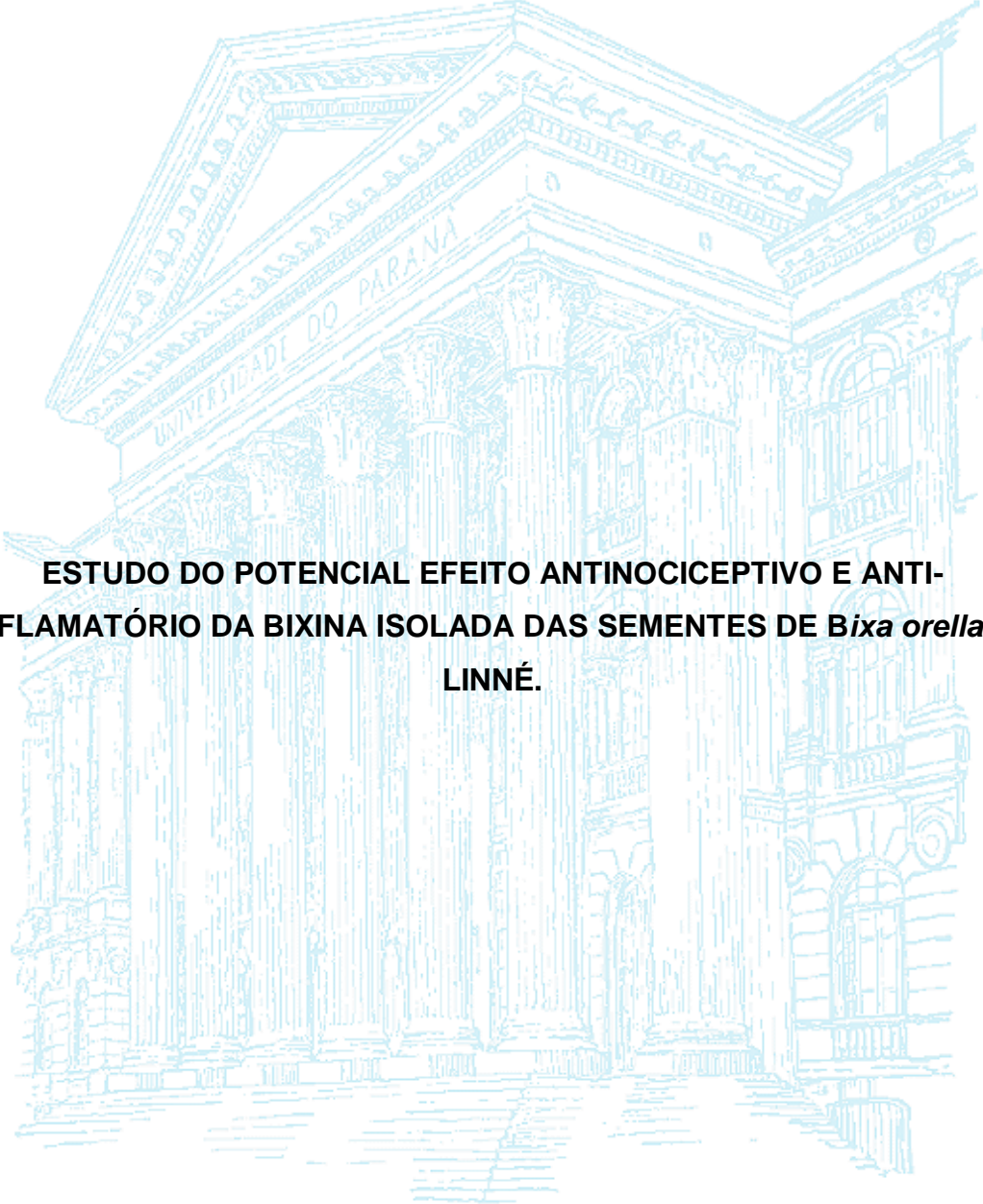


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ALÉXIA THAMARA GASPARIN



**ESTUDO DO POTENCIAL EFEITO ANTINOCICEPTIVO E ANTI-
INFLAMATÓRIO DA BIXINA ISOLADA DAS SEMENTES DE *Bixa orellana*
LINNÉ.**

CURITIBA

2018

ALÉXIA THAMARA GASPARIN

**ESTUDO DO POTENCIAL EFEITO ANTINOCICEPTIVO E ANTI-
INFLAMATÓRIO DA BIXINA ISOLADA DAS SEMENTES DE *Bixa orellana*
LINNÉ**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Graduação em Biologia, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito à obtenção do título de Bacharel em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Joice Maria da Cunha.

Co-Orientadora: M^a. Samanta Dalina Golin Pacheco.

CURITIBA

2018

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar a Deus, por todas as oportunidades de vida, bênçãos e proteções. Agradeço também, de forma muito especial, a minha querida Nossa Senhora por todas as interceções.

A toda minha família, que propiciou todo o suporte necessário para que meus objetivos pudessem ser alcançados, e que me ensinaram a nunca desistir.

Ao meu amor, Lenard Kmita, por todo carinho, incentivo e compreensão.

Aos meus amigos de graduação, Gustavo, Juliana, Carol, Sara, mas especialmente à Larissa Gonzaga Santos e Isabela Coroliano Augusto, que sempre encheram meus dias de alegria e companheirismo.

A minha querida orientadora, Prof^a Dr^a Joice Maria da Cunha, pelo incentivo, suporte e, especialmente, pelo imenso carinho pelo qual trata seus alunos.

A todos do laboratório da Dor do departamento de farmacologia da UFPR, mas, especialmente a Bruna, Evelize, Priscila, Natália, Daiany e Carlos por me acolherem e me ensinarem tanto sobre farmacologia e amizade.

A minha querida Co-orientadora, Samanta Daliana Golin, pelo convite, companheirismo e parceria nessa jornada.

Enfim, a todos aos amigos e colaboradores que, embora não citados nominalmente, foram importantes para realização desse trabalho.

"Se vi mais longe foi por estar de pé sobre ombros de gigantes."

Isaac Newton

RESUMO

Produtos medicinais derivados de plantas exibem grande contribuição para assistência médica, apresentando amplo uso terapêutico e grande aceitação pela população. A espécie *Bixa orellana* Linné, conhecida popularmente como urucum, é um arbusto nativo da região tropical das américas, amplamente utilizado na medicina tradicional para tratar diversas doenças, como asma e diarreia. A bixina é o principal pigmento extraído das sementes do urucum, representando mais de 80% de seus carotenoides totais. Estudos realizados com a bixina isolada já evidenciaram seu potencial efeito protetor sobre células e tecidos, entretanto, apesar do alto potencial biológico, são escassos os estudos que descrevam as propriedades farmacológicas da mesma. Com base no exposto, o objetivo do trabalho foi investigar o potencial efeito anti-inflamatório e antinociceptivo da bixina em modelos pré-clínicos de inflamação e nocicepção. O potencial antinociceptivo da bixina foi avaliado nos testes de contorção abdominal induzido por ácido acético, formalina e placa quente. O tratamento com a bixina, nas duas doses testadas (15 ou 30 mg/kg, via oral), diminuiu significativamente o número de *flinches* induzidos pela formalina, nas duas fases do teste, e o número de contorções abdominais induzidas pelo ácido acético. Somente a dose de 30 mg/Kg promoveu um aumento significativo no tempo de latência na placa quente. O potencial anti-inflamatório da bixina foi avaliado pelo edema de pata induzido por carragenina e pela atividade da enzima mieloperoxidase (MPO). A maior dose de bixina (30 mg/Kg) promoveu tanto a diminuição significativa do edema de pata induzido pela carragenina, quanto a diminuição da atividade da MPO. O teste do campo aberto foi realizado para avaliar a atividade locomotora espontânea dos animais, entretanto, não houve diferença significativa entre os grupos. Esses resultados sugerem que a bixina possui efeitos anti-nociceptivos e anti-inflamatórios em modelos pré-clínicos de nocicepção e inflamação, e estes não parecem estar relacionados a déficit locomotor dos animais tratados.

Palavras-chave: Plantas medicinais. Urucum. Carotenoides. Apocarotenoides.

ABSTRACT

Medicinal products derived from plants exhibit great contribution to medical care, presenting wide therapeutic use and great acceptance by the population. The species *Bixa orellana* Linné, popularly known as annatto, is a shrub native to the tropical region of the Americas, widely used in traditional medicine to treat various diseases, such as asthma and diarrhea. Bixin is the main pigment extracted from annatto seeds, accounting for more than 80% of its total carotenoids. Studies with isolated bixin have already demonstrated its potential protective effect on cells and tissues. However, despite the high biological potential, studies describing the pharmacological properties of bixin are scarce. Based on this, the aim of the study was to investigate potential anti-inflammatory and antinociceptive effects of bixin. The antinociceptive potential of bixin was evaluated in abdominal writhing induced by acetic acid and formalin tests and in the hot plate. Treatment with bixin at the both tested doses (15 or 30 mg/kg) significantly decreased the number of formalin-induced flinches in the two test phases and the number of abdominal writhes induced by acetic acid. Only the 30 mg/kg dose promoted a significant increase in the latency time on the hot plate. The anti-inflammatory potential of bixin was assessed by carrageenan-induced paw edema and the myeloperoxidase (MPO) activity. The higher dose of bixin (30 mg/kg) promoted a significant decrease in carrageenan-induced total paw edema and a decrease in the MPO activity after administration of carrageenan. The open field test was performed to evaluate the animals' spontaneous locomotor activity, however, there was no significant difference between the groups. These results suggest that bixin has anti-nociceptive and anti-inflammatory effects in pre-clinical models of nociception and inflammation, which does not appear to be related to locomotor deficits in animals.

Keywords: Medicinal plants. Urucum. Carotenoids. Apocarotenoids.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – O PROCESSO DE DIAPEDESE.....	11
FIGURA 2 – CARACTERÍSTICAS MORFOLÓGICAS GERAIS DA ESPÉCIE <i>Bixa Orellana</i> L.....	15
FIGURA 3 – ESTRUTURA QUÍMICA DA BIXINA.....	18
FIGURA 4 – VIA DE BIOSÍNTESE DA BIXINA.....	18
FIGURA 5 – EFEITO DO TRATAMENTO ORAL COM BIXINA (27 OU 53 mg/Kg) NO TESTE DE CONTORÇÃO ABDOMINAL INDUZIDO POR ÁCIDO ACÉTICO (AA) EM CAMUNDONGOS.....	26
FIGURA 6 – EFEITO DO TRATAMENTO ORAL COM BIXINA NO TESTE DA FORMALINA EM RATOS.....	27
FIGURA 7 – EFEITO DO TRATAMENTO ORAL COM BIXINA NO TESTE DA PLACA QUENTE EM RATOS.....	28
FIGURA 8 – EFEITO DO TRATAMENTO ORAL COM BIXINA NO TESTE DO CAMPO ABERTO EM RATOS.....	29
FIGURA 9 – EFEITO DO TRATAMENTO ORAL COM BIXINA NO EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA EM RATOS.....	31
FIGURA 10 – EFEITO DO TRATAMENTO ORAL COM BIXINA SOBRE A ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE EM RATOS.....	32

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	5
1.1 JUSTIFICATIVA.....	7
1.2 OBJETIVOS.....	8
1.2.1 Objetivo Geral	8
1.2.2 Objetivos Específicos	8
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	9
2.1 INFLAMAÇÃO.....	9
2.1.1 Mieloperoxidase.....	12
2.1.2 Dor	13
2.1.3 Anti-inflamatórios não esteroidais (AINES).....	14
2.3 <i>Bixa orellana</i> L.	15
2.3.1 Bixina	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1 ORIGEM DO MATERIAL BOTÂNICO	20
3.2 ANIMAIS	21
3.2 TRATAMENTO	21
3.3 TESTES COMPORTAMENTAIS	21
3.3.1 Contorção Abdominal Induzida Por Ácido Acético.....	22
3.3.2 Teste Da Formalina	22
3.3.3 Teste Da Placa Quente.....	23
3.3.4 Teste Do Campo Aberto	23
3.3.5 Edema De Pata Induzido Por Carragenina.....	23
3.3.6 Avaliação Da Atividade Da Mieloperoxidase.....	24
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	25
4. RESULTADOS.....	25
4.1 EFEITO DO TRATAMENTO ORAL COM A BIXINA SOBRE A CONTORÇÃO ABDOMINAL INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO EM CAMUNDONGOS	25
4.2 EFEITO DO TRATAMENTO ORAL COM A BIXINA SOBRE O TESTE DA FORMALINA EM RATOS.....	27
4.3 EFEITO DO TRATAMENTO ORAL COM A BIXINA SOBRE O TESTE DA PLACA QUENTE EM RATOS	28

4.4	EFEITO DO TRATAMENTO ORAL COM A BIXINA SOBRE O TESTE DO CAMPO ABERTO EM RATOS	29
4.5	EFEITO DO TRATAMENTO ORAL COM A BIXINA SOBRE O EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA EM RATOS	30
4.6	EFEITO DO TRATAMENTO ORAL COM A BIXINA SOBRE ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE EM RATOS	32
5.	DISCUSSÃO.....	34
6.	CONCLUSÕES.....	38
7.	REFERÊNCIAS	39
8.	ANEXO I - CEUA/BIO - UFPR #1087	477

1. INTRODUÇÃO

A dor é a principal razão pela qual pacientes acometidos por doenças inflamatórias procuram atendimento médico, e a terapêutica medicamentosa mais comum para o tratamento dessa condição clínica, é utilização de antiinflamatórios não esteroidais (AINEs), como ibuprofeno. Esses medicamentos desempenham seu papel farmacológico principalmente pela inibição das isoformas da enzima cicloxigenase (COX), e são conhecidos por sua ação anti-inflamatória, analgésica e antipirética (OKUSE, 2007; FELDMAN & MCMAHON, 2000). Os principais fatores limitantes na utilização dos AINEs são seus efeitos colaterais, que vão desde problemas gastrointestinais até hemorragia severa, e são especialmente restritivos quando prescritos para uso contínuo e/ou pacientes idosos (FELDMAN & MCMAHON, 2000). Nesse sentido, torna-se crescente o interesse de grandes indústrias farmacêuticas em buscar, especialmente nos produtos naturais, compostos bioativos eficazes, mas especialmente mais seguros, com menores efeitos adversos (VERPOORTE, 1998).

As plantas são utilizadas para aliviar sintomas e curar doenças desde milhares de anos antes de Cristo. A *Papaver somniferum*, por exemplo, conhecida popularmente como papoula, dá origem a opiáceos como a morfina e tem sido utilizada para fins medicinais há pelo menos 4 mil anos. Atualmente, mesmo com grandes avanços na medicina moderna, produtos medicinais derivados de plantas apresentam grande contribuição para assistência médica e geram um mercado global estimado em 20 bilhões de dólares por ano, especialmente porque esses produtos apresentam amplo uso terapêutico e grande aceitação pela população. Por esses e outros motivos, dentre os produtos naturais, há um grande interesse no estudo de plantas superiores, com o objetivo de investigar novas estruturas em potencial e desenvolver novos medicamentos (CALIXTO, 2000; DUTRA et al., 2016; STROHL, 2000).

As plantas medicinais estão distribuídas por todo o globo, mas podem ser encontradas em maior quantidade nos países tropicais. Dentre estes, o Brasil destaca-se por apresentar a maior biodiversidade do planeta, contando com aproximadamente 20% do total das plantas superiores existentes no mundo, o que representa mais de 45.000 espécies, e conseqüentemente um

alto potencial econômico e de desenvolvimento para o país (CALIXTO, 2003; DUTRA et al., 2016) A espécie *Bixa orellana* Linné, pertence à família Bixaceae, gênero *Bixa* e ordem Malvales. Conhecida popularmente como urucum, é um arbusto nativo da região tropical das Américas, ocorrendo em países como Brasil, Peru e México (JOLY, 2002). Caracterizada pela tonalidade avermelhada de suas sementes, apresenta como principais pigmentos os apocarotenoides bixina e norbixina, comumente utilizados para proporcionar cores atrativas a alimentos de consumo diário, como queijos e manteiga (RODRIGUEZ et al., 2014). A semente é a maior responsável pelo interesse comercial da planta, sendo amplamente utilizada no Brasil e no mundo para diversos fins, como farmacêuticos, têxteis e cosméticos, mas principalmente como matéria prima de corantes alimentícios naturais. Rica em carotenoides, mais de 24 substâncias já foram isoladas da semente do urucum. Dentre estas, as mais conhecidas são a bixina e a norbixina, mas o beta-caroteno, a luteína, o triptofano e o componente oleoso geranilgeraniol, também se destacam como constituintes importantes e de grande interesse econômico (OLIVEIRA, 2005; VILAR et al., 2014)

A bixina ($C_{25}H_{30}O_4$) é o principal pigmento do urucum, representando mais de 80% de seus carotenoides totais. Com coloração avermelhado-alaranjada, confere a tonalidade característica das sementes e atualmente é considerada o segundo corante natural mais utilizado do mundo (REHBEIN et al., 2007). Apresenta alta solubilidade em solventes orgânicos e é utilizada em uma ampla gama de produtos, desde geleias e refrigerantes à cosméticos e produtos têxteis, especialmente por sua fácil mistura em soluções lipossolúveis, utilizados para consumo ou uso humano (VILAR et al., 2014).

Na medicina tradicional, o extrato de *Bixa orellana* L. é amplamente utilizado para tratar doenças como asma, diarreia, queimaduras, constipação, febre, gonorreia e como antídoto para venenos de algumas cobras (VENUGOPALAN et al., 2011). Já estudos com a bixina isolada, têm evidenciado seu potencial efeito protetor sobre células e tecidos, com ação antioxidante, antimieloma, de antigenotoxicidade e anticlastogenicidade (XU & KONG, 2017).

1.1 JUSTIFICATIVA

Os AINEs, estão entre as classes de drogas mais prescritas e utilizadas no mundo, indicados para combater a febre e para alívio da dor aguda ou crônica. Entretanto, podem apresentar efeitos adversos consideráveis, como problemas gástricos, insuficiência renal, toxicidade hepática, alergias, e problemas pulmonares. Alguns destes efeitos, podem ser atenuados e suprimidos com a utilização de AINEs seletivos para COX-2, entretanto, além de custos muito elevados, estes apresentam alta incidência de complicações cardiovasculares, especialmente em pacientes idosos (GADDI et al., 2004; HILÁRIO et al., 2006). Dessa forma, a busca por drogas mais seguras, capazes de atenuar sintomas como a dor e inflamação, são a principal razão pela qual grandes indústrias procuram especialmente nas plantas, novos compostos bioativos. No Brasil, aproximadamente 80% da população busca nas plantas, sua fonte principal ou única de recurso terapêutico. Entretanto, apesar do país possuir uma extensa biodiversidade e apresentar um número considerável de publicações científicas relacionadas a produtos medicinais derivados de plantas nativas, estes representam menos de 5% dos medicamentos comercializados no país (DUTRA et al., 2016; VIEGAS et al., 2006), e apenas um fitoterápico brasileiro se encontra entre os vinte principais produtos do mercado, sendo o restante importado de países europeus e africanos (DUTRA et al., 2016).

Atualmente o Brasil detêm a maior produção mundial de sementes e corantes de urucum. Diversos estudos, utilizando o extrato metanólico da folha de *Bixa orellana* L., já demonstraram sua atividade anticonvulsivante, analgésica, antidiarreica e antimicrobiana em modelos murinos, além de sua eficácia em diminuir o estresse oxidativo (CHISTÉ et al., 2011; FLEISCHER et al., 2003; SHILPI et al., 2006). Já a bixina isolada é considerada um neutralizador biológico de oxigênio reativo, com relevante efeito protetor em células e tecidos, e tem sido utilizada como fitoterápico para o tratamento de doenças cardiovasculares, constipação intestinal, hemorragias, e outras (SILVA et al., 2001). Entretanto, apesar dos promissores efeitos farmacológicos e do amplo potencial biológico, são escassos os estudos que descrevam as propriedades farmacológicas da bixina.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Investigar o potencial anti-inflamatório e antinociceptivo da bixina, um carotenoide isolado das sementes de *Bixa orellana* L.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a atividade antinociceptiva *in vivo* da bixina no modelo de nocicepção induzida por formalina em ratos;
- Avaliar a atividade antinociceptiva *in vivo* da bixina no modelo de nocicepção induzida por ácido acético em camundongos;
- Avaliar o efeito da bixina sobre o comportamento nociceptivo no modelo de placa quente, em ratos;
- Avaliar o efeito da bixina sobre a atividade locomotora no teste de campo aberto em ratos.
- Avaliar a atividade anti-inflamatória *in vivo* da bixina isolada da semente da *Bixa orellana* L. através da avaliação do efeito da mesma sobre o modelo de edema de pata induzido por carragenina, em ratos;
- Avaliar a atividade anti-inflamatória *in vivo* da bixina através da avaliação do efeito da mesma sobre o recrutamento de neutrófilos (atividade de mieloperoxidase) induzido por carragenina, em ratos;

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 INFLAMAÇÃO

O processo inflamatório pode desenvolver-se mediante lesão e necrose tecidual, em resposta a agentes patológicos ou a reações imunológicas. Apresenta como objetivo central restaurar a condição de homeostase tecidual, possuindo assim um importante caráter protetor associado (HIGGINS, LEES, 1984). Considerando as manifestações externas da inflamação, Aulus Cornelius Celsus (30 a.C – 50 a.C) a descreveu como um processo caracterizado por 4 sinais, a dor, o calor, o rubor e o edema, os quais foram denominados como “sinais cardinais da inflamação”. Posteriormente, Cláudio Galeno (138 d.C – 201 d.C) propôs a “perda de função” como um quinto sinal, que surge como consequência dos anteriores (SILVA & MOTA, 2003). O reconhecimento do agente ou estímulo nocivo pelo sistema imune, promove a ativação de células e a liberação de mediadores químicos de forma local e sistêmica. Ambos serão responsáveis por desencadear a resposta inflamatória e posteriormente restaurar a função fisiológica do tecido lesado (VANEGAS & SCHAIBLE, 2004).

A inflamação pode ser classificada, de forma geral, como crônica ou aguda, dependendo de aspectos como a duração do processo e componentes celulares associados. A inflamação aguda, é resultante da ação de um estímulo químico ou físico, e caracteriza-se por apresentar início rápido e curta duração. Neste caso, após esse estímulo, macrófagos e mastócitos residentes nos tecidos, atuam como células sentinelas e, pela liberação de mediadores químicos, iniciam processos como recrutamento de leucócitos e aumento da permeabilidade vascular. Didaticamente, a inflamação aguda pode ser dividida em 3 estágios principais: o primeiro, caracterizado pela ocorrência de diferentes alterações vasculares; o segundo pela migração celular, especialmente de leucócitos e fagócitos; e o terceiro e último estágio, pelo crescimento celular e regeneração tecidual (KOLACZKOWSKA & KUBES, 2013; SUZUKI et al., 2003; KUMAR et al., 2013).

No primeiro estágio da inflamação aguda, predominam os eventos de vasodilatação, com consequente aumento do fluxo sanguíneo, e aumento da

permeabilidade vascular, muito importantes para facilitar o deslocamento de células e proteínas para o local da lesão. Tanto a vasodilatação quanto o aumento da permeabilidade vascular, ocorrem em resposta a liberação de diversos mediadores químicos, como prostaglandinas, cininas, histaminas, e outros. Como consequência do processo de expansão vascular e liberação de mediadores, desenvolvem-se o rubor e o calor característicos do processo inflamatório. Além disso, o aumento da permeabilidade vascular promove o extravasamento de líquido rico em proteínas para o meio extravascular e, como resultado desse exsudato, há edema local, o qual facilita a amplificação da resposta inflamatória por estimular a liberação de diversos mediadores químicos no local da lesão (MONTANHER, 2006; KUMAR et al., 2013).

No segundo estágio, há migração de leucócitos e fagócitos para o sítio da inflamação, o qual comumente está situado no meio extravascular (Figura 1). Para que ocorra a passagem dessas células sanguíneas para o local da lesão, a liberação de diversos mediadores químicos (por exemplo, citocinas, especialmente as quimioaderentes), e a ativação do sistema do complemento, são cruciais para que o processo de quimiotaxia ocorra. Nesse processo, inicialmente os leucócitos e fagócitos, mediados por selectinas, são atraídos para a periferia do vaso e rolam sobre esse endotélio vascular. A seguir, ocorre adesão dos leucócitos às células endoteliais, por meio da interação entre integrinas, presentes na superfície dos leucócitos, e receptores na superfície celular do endotélio, ocorrendo posterior diapedese. Já no tecido conjuntivo, ocorre a migração dos leucócitos em direção ao estímulo quimiotático (quimiocinas), foco do processo inflamatório agudo, a partir do gradiente químico gerado (MONTANHER, 2006; KUMAR et al., 2013).

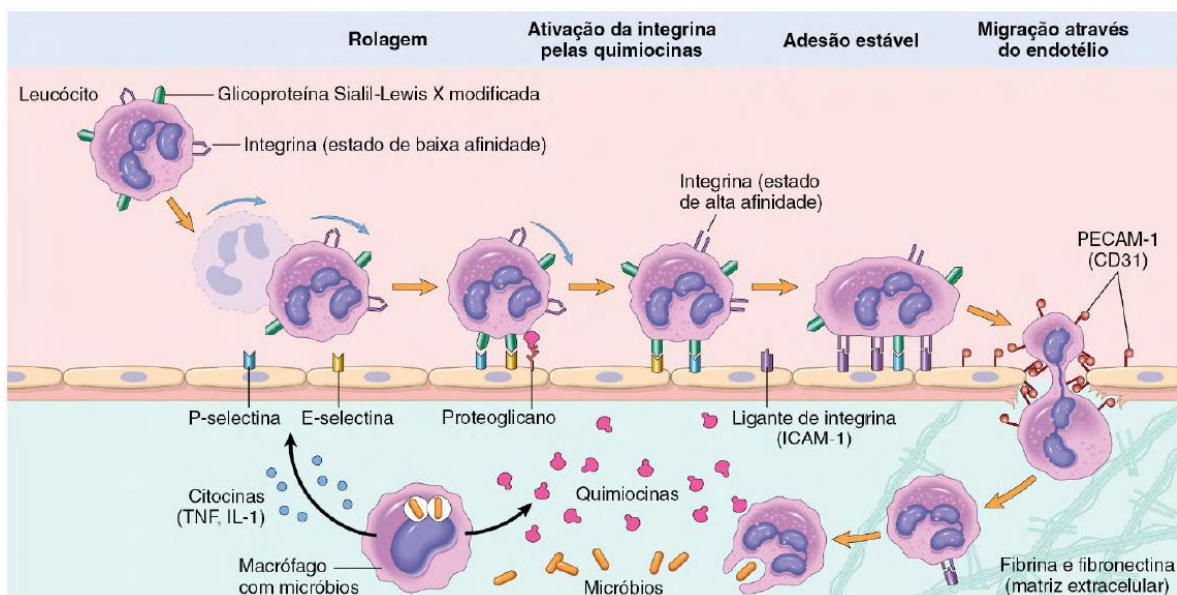


Figura 1: O processo de diapedese. FONTE: Kumar et al., 2013.

Na maior parte das inflamações agudas, o tipo celular predominante nas primeiras 6 a 24 horas, são os neutrófilos (KUMAR et al., 2013). Estes, também chamados de leucócitos polimorfonucleares, são os leucócitos mais abundantes do sangue, e tipicamente os primeiros glóbulos brancos a serem recrutados durante uma inflamação aguda. Capazes de eliminar patógenos por meio de múltiplos mecanismos de ação, são classificados como células fagocíticas, as quais possuem núcleo segmentado e citoplasma rico em grânulos e vesículas. Durante o período de maturação do neutrófilo, três tipos de grânulos são formados: os grânulos primários, chamados de azurófilos, são conhecidos por possuírem uma enzima chamada de mieloperoxidase; Os grânulos secundários, contêm a glicoproteína lactoferina, e são conhecidos como “específicos” e os grânulos terciários chamados de “gelatinase”, são conhecidos pela presença de gelatinase B (também chamada de MMP₉). As vesículas citoplasmáticas dos neutrófilos contêm proteínas derivadas do plasma, como a albumina, e servem como reservatório para diversas moléculas utilizadas durante a migração desse tipo celular (AMULIC ET AL., 2012.; KOLACZKOWSKA & KUBES, 2013).

Na membrana celular dos neutrófilos existem diversos tipos de receptores, os quais permitem o reconhecimento de diferentes estímulos extracelulares, cruciais para que ocorra a ativação do neutrófilo após sua migração até o local da inflamação. A chamada “ativação leucocitária” pode promover muitas funções celulares como fagocitose de microorganismos e partículas, degranulação (exocitose de produtos granulares), produção de mediadores químicos, que amplificam a resposta inflamatória, e outros. Entretanto, os neutrófilos possuem um tempo de meia vida curto e aproximadamente 24 horas após o início do processo inflamatório são, em grande parte, substituídos pelos macrófagos. Quando a resposta inflamatória aguda é terminada, há liberação de mediadores químicos específicos que estimulam a proliferação celular e posterior cicatrização, no intuito de restaurar a integridade tecidual local (AMULIC ET AL., 2012.; KOLACZKOWSKA & KUBES, 2013; KUMAR et al., 2013).

2.1.1 Mieloperoxidase

A mieloperoxidase (MPO) é uma enzima heme catiônica, expressa em grande quantidade em promielócitos, mas, a medida que ocorre a diferenciação nas linhagens celulares subsequentes, há diminuição da expressão dessa proteína. Dessa forma, é encontrada majoritariamente nos grânulos primários de neutrófilos e, em menor quantidade, nos lisossomos primários de monócitos. A medida em que ocorre a diferenciação de monócitos á macrófagos, esse conteúdo enzimático é perdido (ARATANI, 2018; KLEBANOFF et al., 2013).

No processo inflamatório, a MPO exerce um importante papel sobre os leucócitos. Durante a fagocitose, após ativação celular, há fusão entre o fagossomo e o lisossomo, de forma que os microorganismos são expostos a diversas moléculas, dentre elas os grânulos citoplasmáticos dos neutrófilos. Esse processo estimula a célula a ativar o metabolismo oxidativo, também chamado de “*Burst* respiratório”, o qual promove uma cascata de eventos celulares, que culminam no expressivo aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO). Essas, atuam como radicais livres sobre os patógenos e, por ativação enzimática, estimulam a produção de peróxido pela célula. Na presença de MPO e algum halóide, como íon cloreto, há conversão do peróxido em radical hipocloroso (HOCl), um agente antimicrobiano e oxidante muito mais potente do que o peróxido de hidrogênio sozinho (CRUZ, 2011; KUMAR et al., 2013; KLEBANOFF et al., 2013).

Dessa forma, a principal função fisiológica da enzima mieloperoxidase é potencializar a destruição e degradação dos microorganismos fagocitados pelos neutrófilos, já que em sua ausência, além de ocorrer a produção limitada de peróxido, insuficiente para morte da maioria dos microorganismos, não há produção de radical hipocloroso. Já foram descritos na literatura, também, alguns efeitos sinalizadores da enzima com papel na imunomodulação, resultado de produtos gerados a partir do HOCl (CRUZ, 2011; GAUT, et al. 2001; KLEBANOFF et al., 2013).

Durante um processo infeccioso, a quantidade de neutrófilos presentes na pele pode ser considerada uma medida da intensidade do processo inflamatório agudo. Entretanto, a falta de medidas e técnicas que permitam

quantificar o número total de neutrófilos presentes no tecido lesionado como um todo, dificultam a avaliação da quantidade desses leucócitos presentes no tecido inflamado. A partir disso, desenvolveu-se a técnica da avaliação da atividade da mieloperoxidase, em que relaciona-se de forma diretamente proporcional a quantidade total da enzima extraída do tecido, com o número de neutrófilos presentes no mesmo. Desta forma, a MPO é considerada um marcador tecidual de neutrófilos no tecido lesado, sendo a técnica muito utilizada para avaliar a infiltração desses leucócitos polimorfonucleares no tecido inflamado (DE YOUNG et al., 1989; BRADLEY et al., 1982).

2.1.2 Dor

A dor, principal razão pela qual pacientes procuram atendimento médico, especialmente quando apresenta um componente inflamatório associado (OKUSE, 2007), é definida segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP, *International Association for the Study of Pain*) como “uma experiência sensitiva e emocional desagradável, associada ou relacionada a lesão real ou potencial dos tecidos, ou descrita em termos de tal dano”.

Considerada um dos cinco sinais cardinais da inflamação, a dor aguda possui um importante caráter protetor associado, sendo caracterizada por ser autolimitante. É considerada uma sensação subjetiva de cada indivíduo, resultado tanto da nocicepção, ou seja, o processamento e codificação do estímulo nocivo pelas células nervosas, quanto do processamento cognitivo e emocional pelo sistema nervoso central (VANEGAS & SCHAIBLE, 2004). Os receptores para dor estão localizados nas terminações nervosas de fibras C e A δ . Essas transduzem os estímulos nocivos periféricos, suficientemente intensos, de origem química, térmica ou mecânica, em estímulos elétricos. Esses neurônios sensoriais primários terminam no corno dorsal da medula e então podem ativar tanto uma resposta reflexa pela medula espinal, quanto ativar as vias ascendentes. Essa informação é então transmitida a interneurônios, ou neurônios secundários, os quais realizam sinapse com neurônios do sistema nervoso central, mais especificamente do tálamo e

depois no córtex cerebral, onde a informação será interpretada como dor (ROCHA et al., 2007; VANEGAS & SCHAIBLE, 2004).

A dor aguda é uma resposta adaptativa que pode acontecer em decorrência de diversos estímulos como danos teciduais, sintoma de diferentes doenças, entre outros. Quando ocasionada por dano tecidual, ocorre o desenvolvimento do processo inflamatório e a liberação de diversos mediadores químicos como as cininas, prostaglandinas, substância P, e diversas outras substâncias algogênicas. Essas, sensibilizam os nociceptores (fibras C e A δ), diminuindo seu limiar de excitabilidade, promovendo a “sensibilização periférica” da dor. Dessa forma, um estímulo considerado inócuo em condições normais, durante o processo inflamatório pode ativar as fibras nociceptivas e causar dor, sendo esse processo chamado de alodinia. Além disso, um estímulo considerado nocivo, em condições normais, durante a inflamação pode promover uma resposta de dor exacerbada, em relação a condição de homeostase tecidual, sendo esse processo chamado de hiperalgesia (RADNOVICH et al., 2015; ROCHA et al., 2007).

Durante o processo inflamatório ocorre também o recrutamento de nociceptores silenciosos, os quais não respondem a estímulos mecânicos ou térmicos durante a homeostase tecidual, mas passam a fazê-lo após sensibilização pelos mediadores inflamatórios. Tanto no processo de sensibilização das fibras C e A δ , quanto dos nociceptores silenciosos, esses mediadores atuam sobre receptores específicos presentes na membrana das fibras nervosas, promovendo a formação de segundos mensageiros. Estes, promovem uma cascata de eventos celulares, que culminam em ações sobre diferentes canais iônicos, e conseqüentemente em modificações sobre o potencial de membrana dos neurônios, que levam a redução do limiar necessário para que ocorra disparo ou ativação da fibra nervosa (ROCHA et al., 2007; VANEGAS & SCHAIBLE, 2004).

2.1.3 Anti-inflamatórios não esteroidais (AINES)

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) estão entre a classe de medicamentos mais prescritos pelos médicos para o tratamento da dor, especialmente quando esta é acompanhada de um componente inflamatório

(KUMMER & COELHO, 2002). Durante o processo inflamatório, o estímulo nocivo promove a ativação da enzima fosfolipase A, a qual libera ácido araquidônico no citoplasma, pela hidrólise dos fosfolípidos de membrana. O ácido araquidônico, por sua vez, é utilizado como substrato pelas enzimas COX (ciclo-oxigenase), produzindo prostaglandinas e tromboxano, e também pela enzima LOX (lipo-oxigenase), produzindo leucotrienos e outros compostos. Os AINES atuam principalmente sobre as duas isoformas da enzima COX (COX-1, constitutiva e COX-2, induzida durante inflamações), bloqueando-as. Assim, durante o período de administração desses anti-inflamatórios, de forma geral, há baixíssima conversão de ácido araquidônico em prostacilinas pela enzima, às quais exerceriam um importante papel no desenvolvimento dos sinais cardinais da inflamação (KUMMER & COELHO, 2002; BATLOUNI, 2009; GADDI, CICERO, PEDRO, 2004).

Apesar dos promissores efeitos dos AINES, principalmente sobre o alívio da dor, inflamação e febre, esses medicamentos podem causar efeitos colaterais severos, que vão desde problemas gastrointestinais até ao infarto do miocárdio. Isso ocorre porque as enzimas COX também desempenham importantes papéis durante a homeostasia tecidual, por exemplo, produzindo tromboxano A₂ nas plaquetas (COX-1), o qual promove agregação plaquetária, prostacilina nas células endoteliais (COX-2) com importante ação vasodilatadora, prostacilina na mucosa gástrica (COX-1) com ação protetora sobre o tecido, entre outros (BATLOUNI, 2009; FELDMAN & MCMAHON, 2000; KUMMER & COELHO, 2002).

Nesse sentido, atualmente há grande interesse das indústrias farmacêuticas, em se buscar compostos bioativos que sejam eficazes, mas, especialmente mais seguros, com efeitos adversos atenuados. Levando em consideração que os principais medicamentos atualmente utilizados como analgésicos, são derivados de plantas, ou foram sintetizados a partir de componentes presentes em produtos naturais, há um grande potencial no estudo de princípios ativos presentes em plantas superiores (DUTRA et al., 2016; VERPOORTE, 1998).

2.3 *Bixa orellana* L.

A espécie *Bixa orellana* L. (Figura 2), conhecida popularmente como “Urucum”, “Achiote”, “Bixa”, “Anatto” e outros, é nativa do Brasil, mas ocorre também em outros países tropicais e neotropicais, como Peru e México. É considerada um arbusto ou árvore de rápido crescimento, podendo atingir um comprimento de 2 a 10 metros de altura, e apresenta como características principais os tricomas de coloração marrom-avermelhada sobre seus ramos, frutos do tipo cápsula, deiscentes, recobertos por espículos maleáveis pardos, sementes capsuladas com sarcotesta avermelhada, e a produção de flores e frutos durante o ano inteiro (RIBEIRO & LOIOLA, 2017; VENUGOPALAN et al., 2011).

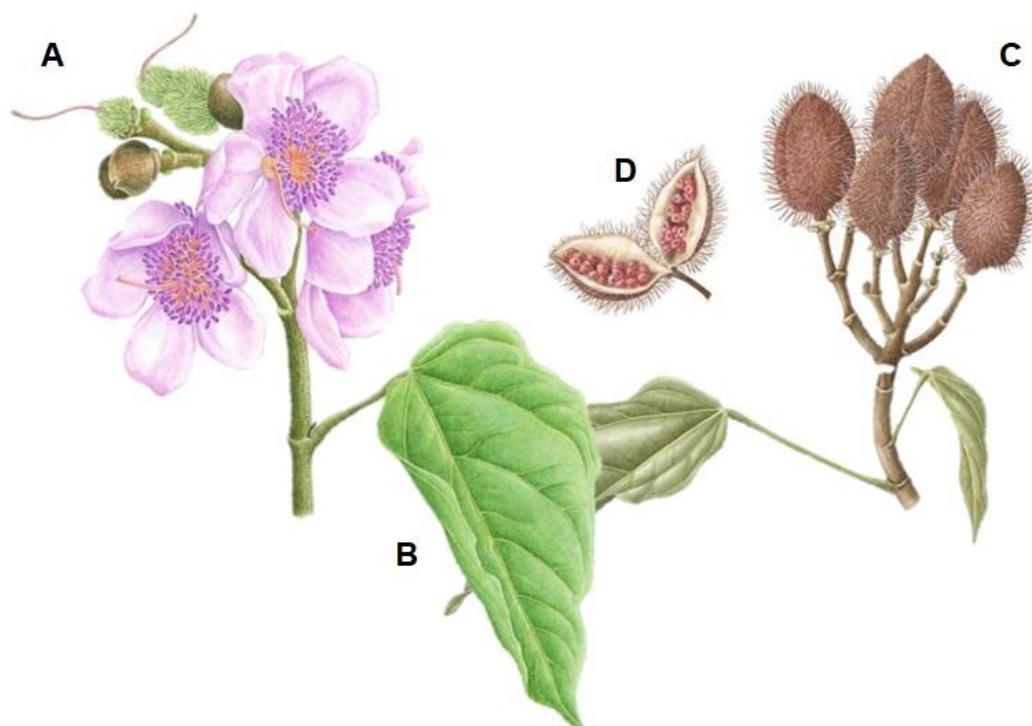


Figura 2: Características morfológicas gerais da espécie *Bixa orellana* L. FONTE: Felipe, 2012. Nota: A: Aspecto geral do ramo florífero; B: Folha; C: Fruto; D: Fruto cortado longitudinalmente, com sementes no interior.

Diversas indústrias utilizam a semente do urucum como insumo para diversos fins comerciais, como farmacêuticos, têxteis e cosméticos, mas principalmente como corante alimentício natural. Considerando o alto potencial carcinogênico e mutagênico de corantes sintéticos, e a proibição da comercialização de alguns desses em países como Estados Unidos e Japão, há grande interesse da indústria nesse insumo, especialmente por apresentar

baixo custo de produção, alto perfil de segurança para o consumo humano (tanto para uso tópico como sistêmico), e por ser biodegradável (VENUGOPALAN et al., 2011; VILAR et al., 2014).

Por esses e outros motivos, A *Bixa orellana* L. apresenta alta importância econômica mundial, com uma alta demanda tanto interna quanto externa. Atualmente o Brasil detém a maior produção mundial de sementes e corantes de urucum, apresentando altas taxas de exportação, especialmente pelo alto teor de bixina presente nas sementes (VENUGOPALAN et al., 2011; CARVALHO, 2018). Segundo Neves e Mansim (2018), essa qualidade superior das sementes nacionais pode ser atribuída ao prosseguimento do “Projeto Urucum Brasil”, especialmente pelo desenvolvimento do cultivar denominado “Anã 17”, o qual possui alta produtividade e sementes com até 6% de bixina, muito superior a média mundial de 2,5%.

Além disso, o urucum apresenta ainda uma importância cultural e histórica, especialmente para os índios da América do sul e central, os quais utilizam a coloração das sementes para cobrir o corpo, realizar cerimônias festivas, e para uso na medicina tradicional (VENUGOPALAN et al., 2011). Segundo Vilar e colaboradores (2014), índios da América do Sul tradicionalmente já utilizavam extratos de folhas, raízes e sementes do urucum para fins medicinais, tratando doenças como asma e diarreia. Tribos colombianas, utilizavam especialmente o arilo, substância que recobre as sementes, para o tratamento de queimaduras, constipação, febre, gonorreia, e até como antídoto para venenos de algumas cobras, há muitas décadas (VENUGOPALAN et al., 2011).

A semente de urucum apresenta em sua composição uma mistura de 8 corantes do grupo dos carotenoides, os quais lhe conferem sua coloração característica. Dentre estes, a bixina é considerada seu pigmento principal, entretanto, mais de 24 substâncias já foram isoladas das sementes de *Bixa orellana* L, e mais de 100 compostos voláteis, dos extratos aquosos da planta. Dentre as substâncias isoladas nas sementes do urucum destaca-se a presença de compostos como a norbixina, o componente oleoso geranilgeraniol, alfa e beta-caroteno, orelina, flavonoides, luteína, ácido salicílico, fenilalanina e triptofano. Essa riqueza de substâncias conferem a planta um alto potencial farmacológico, sendo sua eficácia terapêutica diversas

vezes atribuída especialmente aos altos níveis de carotenoides (VILAR et al., 2014; VENUGOPALAN et al., 2011; SHAHID-UL-ISLAM et al., 2016). Além disso, o tratamento com extrato metanólico de urucum parece ser seguro para o consumo humano uma vez que não promove nenhum efeito tóxico sobre células e tecidos após tratamentos crônicos e subcrônicos além de não promover toxicidade reprodutiva ou carcinogenicidade em modelos animais (BAUTISTA et al., 2004; STOHS, 2014).

O extrato metanólico de *Bixa orellana* L. já foi descrito como eficaz para o tratamento e prevenção de diversas condições patológicas. O extrato exibe ação gastro e hepatoprotetora, atividade anti-hipertensiva e um amplo espectro de ação antimicrobiana, o qual justifica sua utilização para dores de garganta, por exemplo. Além disso, já foram demonstrados na literatura os efeitos antioxidante, anticoagulante, anti-inflamatório, antimalárico e protetor contra danos do DNA, além da sua eficácia no tratamento da gonorreia, febre, verminoses e convulsões. O extrato também é utilizado para o tratamento de pacientes diabéticos (especialmente do tipo 2), devido a propriedade hipoglicemiante que o mesmo pode apresentar, dependendo da parte da planta utilizada para sua preparação, e do solvente utilizado, por exemplo. (VENUGOPALAN et al., 2011; ULBRICHT et al. 2012; ZHAI et al. 2014).

2.3.1 Bixina

A bixina ($C_{25}H_{30}O_4$ - Figura 3) é um diapocarotenoide lipossolúvel, com grande destaque entre os carotenoides naturais, especialmente por apresentar a conformação cis, incomum entre os carotenoides, e pela presença de 2 grupos carboxílicos em sua estrutura química, o que a torna mais polar do que a maioria dos carotenoides disponíveis no mercado. É considerada o principal pigmento das sementes de *Bixa orellana* L., correspondendo a aproximadamente 80% dos carotenoides totais presentes em seu pericarpo, sendo assim, a maior responsável por conferir a tonalidade avermelhada-alaranjada, característica das sementes (VILAR et al., 2014; SILVA et al., 2001).

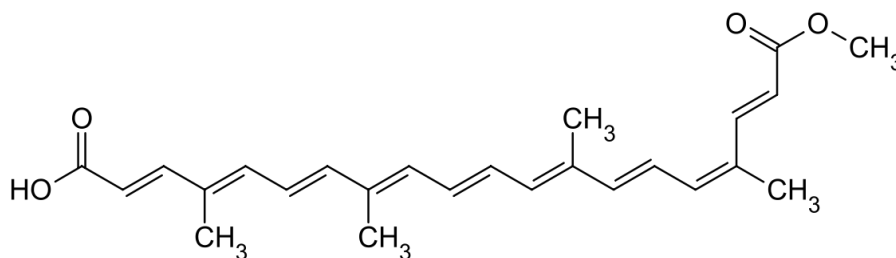


Figura 3: Estrutura química da bixina. FONTE: Merck Index, 1989.

O mecanismo de biossíntese de apocarotenoides, como a bixina, não está completamente elucidado, entretanto, acredita-se que estes sejam derivados da clivagem oxidativa e enzimática de diferentes carotenoides. Estudos publicados na literatura suportam a hipótese de que a clivagem enzimática do lycopeno (C₄₀H₅₆), e sua extensa remodelagem oxidativa, dê origem a molécula da bixina (BOUVIER et al., 2003; CÁRDENAS-CONEJO et al. 2015), sendo sua provável via de biossíntese, descrita na figura 4.

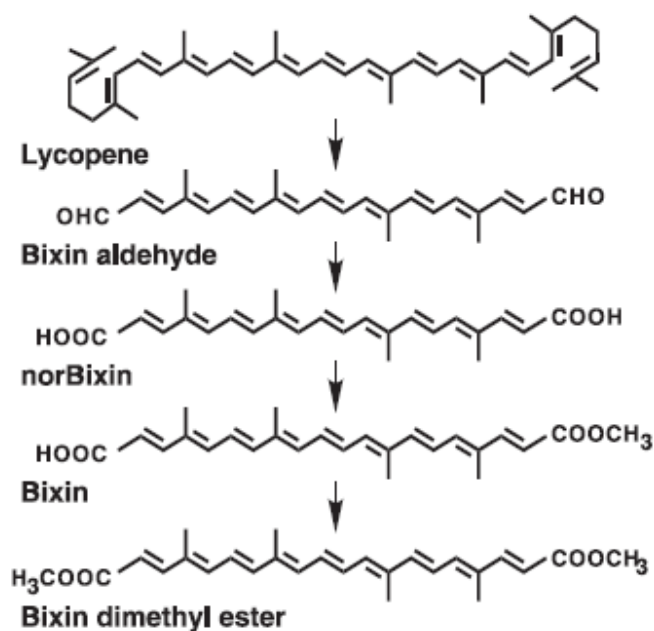


Figura 4: Via de biossíntese da bixina. FONTE: Bouvier, Dogbo & Camara, 2003.

Poucos trabalhos foram publicados a respeito da farmacocinética da bixina, apesar disso, em humanos, Levy e colaboradores (1997) já demonstraram que duas horas após a ingestão oral de uma única dose de bixina, ocorre seu pico de absorção. Além disso, na própria corrente sanguínea

e especialmente durante o processo digestivo, há conversão parcial da bixina em norbixina, majoritariamente por enterases intestinais, assim como uma isomerização parcial cis-trans, da molécula. Já em modelos animais, Park e colaboradores^{ab} (2016) demonstraram que o pico de absorção da bixina é mais rápido, ocorrendo uma hora após a administração oral da mesma, e que a molécula possui um tempo de meia vida de três e duas horas em cães e gatos, respectivamente. Os níveis de bixina presentes no plasma, tornam-se indetectáveis 8h após a ingestão oral de uma única dose da mesma. Carotenóides, de forma geral, após absorção pela mucosa intestinal, são transportados para o fígado e são posteriormente armazenados e/ou transportados no sangue via lipoproteínas plasmáticas. A seguir são metabolizados e excretados pelas fezes e urina (OLSON, 1994).

Outra característica importante da bixina é seu alto perfil de segurança, não produzindo alterações clínicas, histológicas ou necroscópicas em ratos, machos e fêmeas, submetidos a tratamento subcrônico de 13 semanas (^bBAUTISTA et al., 2004). Além disso, a bixina exerce um efeito protetor contra agentes carcinogênicos e mutagênicos, sobre células e tecidos, efeito este intimamente associado ao potencial indutor da molécula sobre algumas enzimas metabolizadoras, como a CYP1A1/2 e CYP1B1/2, as quais desencadeiam a rápida inativação desses compostos (MATUO et al., 2013; SANTOS et al., 2016).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 ORIGEM DO MATERIAL BOTÂNICO

O material botânico foi coletado no Instituto Agronômico do Paraná, Estação experimental de Morretes (EST.: Morretes/ CÓD.: 02548038/ LAT.: 25°30'S/ LONG.: 48°49'W/ ALT.: 59 m). A extração da bixina isolada foi realizada no setor de Ciências Farmacêuticas, campus III Jardim Botânico, Universidade Federal do Paraná.

2.2 ANIMAIS

Os procedimentos experimentais conduzidos no presente estudo utilizaram ratos da variedade Wistar (*Ratus norvegicus*, pesando de 180 a 220 g) ou camundongos da variedade Swiss (*Mus musculus*, pesando de 18 a 35 g) machos, provenientes no Biotério Central do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná. O emprego dessas espécies está amplamente padronizado, sendo aceito na literatura a utilização dos testes mencionados a seguir para *screening* de propriedades anti-inflamatórias e antinociceptivas de compostos naturais. Os animais permaneceram no mínimo dois dias no biotério do Departamento de Farmacologia, sob condições de temperatura e ciclo claro/escuro controlados, com livre acesso à ração padrão e água potável, antes de terem sido submetidos aos ensaios. Estes, foram alojados em número máximo de cinco (ratos) ou sete (camundongos) por caixa, com trocas de maravalha três vezes por semana. Todos os experimentos comportamentais foram conduzidos no ciclo claro (das 8 às 17 h), em acordo com as normas e legislações estabelecidas pelo Comitê de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da UFPR, sob aprovação do CEUA/BIO – UFPR protocolo #1087.

3.2 TRATAMENTO

Após um jejum de 12 h, os animais receberam veículo (óleo de milho; 1 mL/Kg, para ambos os modelos animais, rato e camundongo) ou bixina por via oral (gavagem), nas doses de 15 ou 30 mg/Kg para ratos, ou 27 e 53 mg/Kg para camundongos (doses calculadas de acordo com a taxa metabólica basal dos camundongos, a partir do método proposto por Freitas & Carregaro, 2013). Uma hora após o tratamento, foi administrada a substância indutora da nocicepção/inflamação, e ao final do período de observação dos testes comportamentais, todos os animais foram imediatamente eutanasiados.

3.3 TESTES COMPORTAMENTAIS

3.3.1 Contorção Abdominal Induzida Por Ácido Acético

Para a investigar o possível efeito antinociceptivo, avaliou-se o efeito do tratamento agudo com a bixina sobre o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético. Para isso, cinquenta minutos após o tratamento por via oral com veículo ou bixina, nas doses de 27 ou 53 mg/Kg, os camundongos foram colocados no aparato de teste da contorção abdominal, o qual consiste de um funil de vidro invertido de 280 mm de largura e 400 mm de altura, para aclimatação por 10 minutos. Em seguida, cada animal recebeu uma injeção intraperitoneal de ácido acético (0,6%; volume de 0,1 mL /10 g) e as contorções abdominais, caracterizadas por uma sequência de contorções abdominais, algumas vezes acompanhada por torções do tronco e extensão dos membros posteriores do animal, foram contabilizadas durante os 30 minutos subsequentes, divididos em períodos de 5 minutos (adaptado de Deraedt e colaboradores, 1980).

3.3.2 Teste Da Formalina

Para avaliar o possível efeito anti-nociceptivo da bixina em outro modelo de nocicepção aguda, realizou-se o teste da formalina, de acordo com Tjølsen (1992), com modificações. Para isso, cinquenta minutos após o tratamento oral com veículo ou bixina, nas doses de 15 ou 30 mg/Kg, os ratos foram colocados no aparato de teste da formalina, o qual consiste de um funil de vidro invertido de 280 mm de largura e 400 mm de altura, para aclimatação por 10 minutos. Em seguida, cada animal recebeu uma injeção única de formalina (2,5%; 50 µL por pata) no dorso de uma das patas traseiras. O número de comportamentos nociceptivos de chacoalhar ou lambear a pata traseira ipsilateral de ratos (chamados de “*flinches*”) após a administração do agente algogênico, foi quantificado durante os 60 minutos subsequentes, divididos em períodos de 5 minutos. Durante esse teste, são observadas três fases distintas de comportamentos nociceptivos, sendo a primeira fase compreendida no período de 0-5 minutos pós-injeção, seguida pelo período quiescente (de 6 a 15 minutos pós-injeção) e então pela segunda fase (de 15 a 60 minutos).

3.3.3 Teste Da Placa Quente

Para a avaliar um possível efeito anti-nociceptivo central da bixina, realizou-se o teste da placa quente. Nesse teste, os ratos são colocados individualmente em contato com uma superfície metálica aquecida a uma temperatura de $50 \pm 1^\circ\text{C}$, e avalia-se o tempo de resposta (em segundos) necessário para que o animal apresente uma resposta típica (como saltar da superfície ou sacudir e/ou lambe as patas traseiras), frente ao estímulo térmico. Esse tempo é cronometrado e marcado como índice de latência de resposta térmica. Inicialmente avaliou-se o tempo de latência basal dos animais, sem nenhum tratamento anterior e ao final desse procedimento, os animais receberam veículo ou bixina (15 ou 30 mg/Kg), e uma hora após o tempo de latência foi reavaliado. Utilizou-se 30 segundos como tempo de corte, no intuito de prevenir possíveis danos teciduais (adaptado de Mothana e colaboradores, 2012).

3.3.4 Teste Do Campo Aberto

Para excluir a possibilidade de que o tratamento com a bixina pudesse promover um prejuízo no desempenho locomotor dos animais, avaliou-se a atividade locomotora espontânea dos ratos no teste de campo aberto, como descrito por Meotti e colaboradores (2006), com modificações. O aparato consiste de uma caixa de madeira medindo 40 x 50 x 63 cm, sendo o fundo dividido em 9 quadrantes idênticos. Uma hora após o tratamento com veículo ou bixina (15 ou 30mg/kg), os ratos foram individualmente colocados no quadrante central do aparato e o número total de quadrantes, cruzados com as quatro patas de cada animal, foi contabilizado durante os 5 minutos subsequentes.

3.3.5 Edema De Pata Induzido Por Carragenina

O potencial efeito da bixina na inflamação aguda foi avaliada no modelo de edema de pata induzido por carragenina, de acordo com método

descrito anteriormente por Winter e colaboradores (1962) com modificações. Uma hora após tratamento com veículo, bixina (15 ou 30 mg/Kg) ou dexametasona (1 mg/Kg; injeção subcutânea; controle positivo), os animais receberam, via injeção intraplantar, a carragenina (200 µg/pata em 0,1 mL de solução salina) em uma das patas traseiras. A pata contralateral foi utilizada como controle e nessa foi administrada o volume equivalente de solução salina (0,1 ml/pata). A espessura da pata foi mensurada com auxílio de paquímetro digital antes da administração de carragenina/salina/tratamentos (medidas basais) e novamente nos intervalos de 1, 2, 3 e 4 horas após a injeção de carragenina ou salina. A inflamação foi avaliada como o aumento na espessura da pata (edema) em cada intervalo de tempo em relação à medida basal.

3.3.6 Avaliação Da Atividade Da Mieloperoxidase

Para avaliar a atividade da enzima mieloperoxidase (MPO), inicialmente foram realizados os mesmos procedimentos experimentais descritos para indução de edema de pata via carragenina. Entretanto, 3h após a injeção de carragenina/Salina, segmentos da região sub-plantar das patas posteriores direita e esquerda, foram coletados, pesados, armazenados em eppendorfs e estocados a -80°C. Posteriormente realizou-se a determinação da atividade da MPO conforme metodologia descrita por De Young e colaboradores (1989), com modificações. As amostras de tecido foram homogeneizadas em 1,5 mL de tampão fosfato de sódio (80 mM, 0,5% HTAB, pH 5,4) durante 15 segundos a 0°C. O homogenato foi então centrifugado a 11.200xg em temperatura de 4°C durante 20 minutos. Em seguida, triplicatas de 30 µL do sobrenadante foram transferidas para placas de 96 poços, os quais previamente receberam 200 µL de solução peróxido (100 µL tampão fosfato de sódio 80mM, 85 µL tampão fosfato de sódio 0,22mM, 15 µL peróxido de hidrogênio 0,017%). A reação foi iniciada com a adição de 20 µL de solução TMB (18,4 nM dissolvidos em dimetilformamida aquosa a 8%). A placa foi então transferida para estufa por 3 minutos a 37°C e posteriormente a reação foi interrompida pela adição de 30 uL de acetato de sódio (1,46 M) em cada poço. A atividade enzimática foi avaliada pelo método colorimétrico por meio de leitor de placas (Bio-Tek Ultra Microplate reader EL808), com comprimento de onda de 620 nm. A média

amostral foi anotada e esse valor dividido pelo peso da respectiva amostra, sendo o resultado expresso como DO/peso.

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram representados como média \pm EPM de 6 a 14 animais por grupo experimental. Os dados foram analisados por meio de ANOVA de uma ou duas vias, com ou sem medidas repetidas. Caso observado alguma diferença entre os grupos, o teste de *post-hoc* de Bonferroni foi realizado para comparações entre os grupos experimentais. Em todas as análises o nível de significância foi de $p \leq 0,05$. Utilizou-se o GraphPad Prism 6.0 (San Diego, Califórnia) como software para realização dos gráficos e análises.

4. RESULTADOS

4.1 EFEITO DO TRATAMENTO ORAL COM A BIXINA SOBRE A CONTORÇÃO ABDOMINAL INDUZIDA POR ÁCIDO ACÉTICO EM CAMUNDONGOS

Os camundongos foram submetidos ao teste de contorção abdominal induzida por ácido acético, uma hora após tratamento com bixina (nas doses de 27 ou 53 mg/Kg) ou veículo, e durante os trinta minutos subsequentes avaliou-se o número de contorções realizadas pelos animais (Figura 5). Analisando a frequência de contorções abdominais no decurso temporal do teste (Painel A), ANOVA de duas vias demonstrou um efeito significativo nos grupos experimentais [$F_{(2, 30)} = 10,92$; $p < 0,0001$], no tempo [$F_{(5, 150)} = 239,8$; $p < 0,0001$], e interação [$F_{(10, 145)} = 11,72$; $p < 0,0001$]. A análise do *post-hoc* de Bonferroni demonstrou uma diferença significativa entre os grupos tratados com bixina (nas doses de 27 e 53 mg/Kg) e veículo 15, 20, 25 e 30 minutos após a injeção de ácido acético ($p < 0,05$) (Figura 5A; 5 minutos: VEH= $10,18 \pm 1,94$, BIX 27= $1,77 \pm 0,72$; BIX 53= $4,09 \pm 0,61$; 10 minutos: VEH= $30,45 \pm 3,15$, BIX 27= $10,66 \pm 1,95$, BIX 53= $18,36 \pm 2,25$; 15 minutos: VEH= $49,00 \pm 3,73$, BIX 27= $19,22 \pm 2,40$, BIX 53= $30,45 \pm 2,83$; 20 minutos: VEH= $65,00 \pm 3,89$, BIX 27= $27,66 \pm 2,97$, BIX 53= $39,63 \pm 3,20$; 25 minutos: VEH= $81,00 \pm$

4,76, BIX 27= 34,66 ± 3,87; BIX 53= 50,18 ± 3,73; 30 minutos: VEH= 92,27 ± 5,02, BIX 27= 41,77 ± 4,87, BIX 53= 59,18 ± 3,85).

Analizando o número total de contorções abdominais realizadas durante o tempo total do teste (Painel B), ANOVA de uma via demonstrou um efeito significativo nos grupos experimentais [$F_{(2, 26)} = 41,59$; $p < 0,05$]. A análise do *post-hoc* de Bonferroni demonstrou que os grupos tratados com bixina (nas doses de 27 e 53 mg/Kg) apresentaram uma diminuição significativa no número de contorções, em comparação com o grupo tratado com veículo ($p < 0,05$) (Figura 5B; VEH= 95,22 ± 3,72, BIX 27= 41,78 ± 4,87, BIX 53= 59,18 ± 3,68). Dessa forma, o tratamento com a bixina (nas duas doses testadas) apresentou um significativo efeito anti-nociceptivo sobre o número de contorções abdominais induzidas por ácido acético em camundongos. Os grupos tratados com bixina não exibiram diferença significativa entre si ($p > 0,05$).

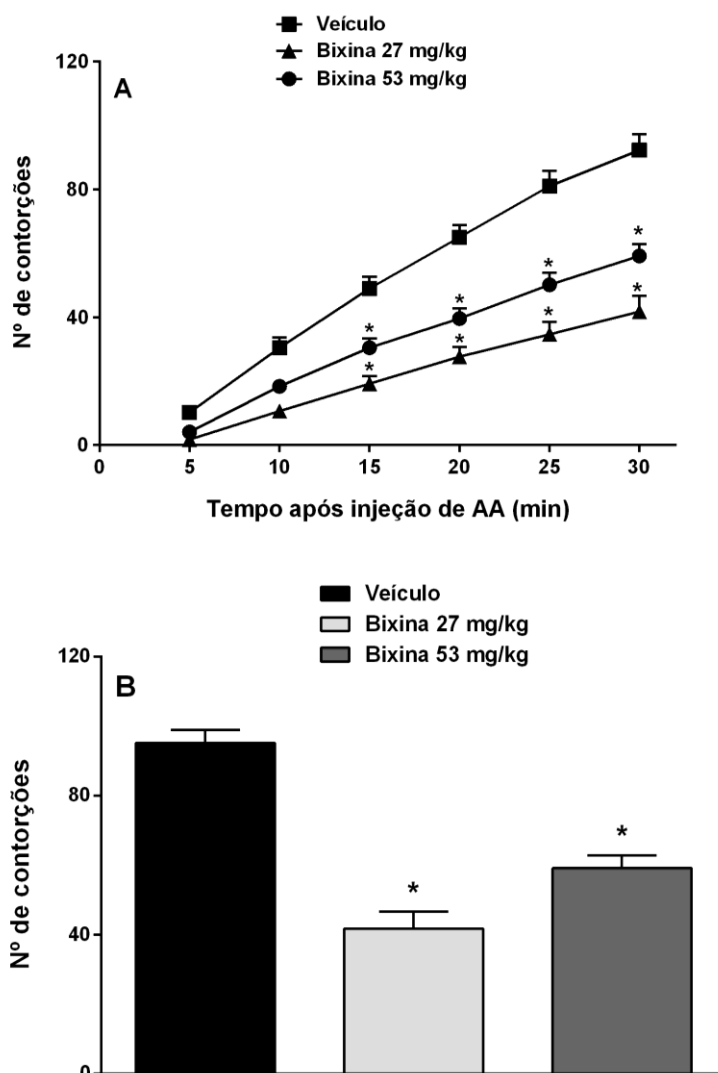


Figura 5: Efeito do tratamento oral com bixina (27 ou 53 mg/Kg) no teste de contorção abdominal induzido por ácido acético (AA) em camundongos. Painel A apresenta o número de contorções induzidas por AA durante 30 minutos, contados cumulativamente a cada 5 minutos. Painel B mostra o número total de contorções durante os 30 minutos. Dados são expressos como a média \pm EPM de 10-11 animais/grupo experimental. (*) indica $p < 0,05$ em comparação com o grupo tratado com veículo. ANOVA de duas vias com medidas repetidas (Painel A) ou ANOVA de uma via (Painel B) seguido pelo *post-hoc* de Bonferroni.

4.2 EFEITO DO TRATAMENTO ORAL COM A BIXINA SOBRE O TESTE DA FORMALINA EM RATOS

Os ratos foram submetidos ao teste da formalina, uma hora após o tratamento com bixina (nas doses de 15 ou 30 mg/Kg) ou veículo, e durante os 60 minutos subsequentes a injeção intraplantar de formalina, avaliou-se o número de *flinches* realizados pelos animais (Figura 6). Analisando a frequência de *flinches* realizados no decurso temporal do teste (painel A), ANOVA de duas vias demonstrou um efeito significativo nos grupos experimentais [$F_{(2, 22)} = 105,3$; $p < 0,0001$], no tempo [$F_{(11, 242)} = 300,4$; $p < 0,0001$], e interação [$F_{(22, 242)} = 30,26$; $p < 0,0001$]. O teste de *post-hoc* de Bonferroni demonstrou uma diferença significativa entre os grupos tratados com bixina (nas doses de 15 e 30 mg/Kg) e veículo, em todos os tempos analisados após a injeção de formalina ($p < 0,05$).

Analisando o número de *flinches* total, durante a primeira e a segunda fase do teste (painel B), ANOVA de uma via demonstrou um efeito significativo nos grupos experimentais [$F_{(2, 27)} = 26,61$; $p < 0,05$], [$F_{(2,26)} = 26,77$; $p < 0,05$]. O teste de *post-hoc* de Bonferroni mostrou que os grupos tratados com bixina (nas doses de 15 e 30 mg/Kg), apresentaram uma significativa redução no número de *flinches* realizados pelos ratos, nas duas fases do teste e no período quiescente, quando comparado ao grupo tratado com veículo ($p < 0,05$) (1ª fase: VEH= 113,1 \pm 13,63, BIX 15= 51,27 \pm 3,62, BIX 30= 38,2 \pm 2,22; 2ª fase: VEH= 477,9 \pm 32,76, BIX 15= 271,1 \pm 24,76, BIX 30= 193,9 \pm 25,13). Assim, o pré tratamento com bixina (nas duas doses testadas), foi capaz de diminuir significativamente o número de *flinches* induzidos pela formalina em comparação ao grupo tratado com veículo, tanto na primeira quanto na

segunda fase do teste. Os grupos tratados com bixina não exibiram diferença significativa entre si ($p > 0,05$).

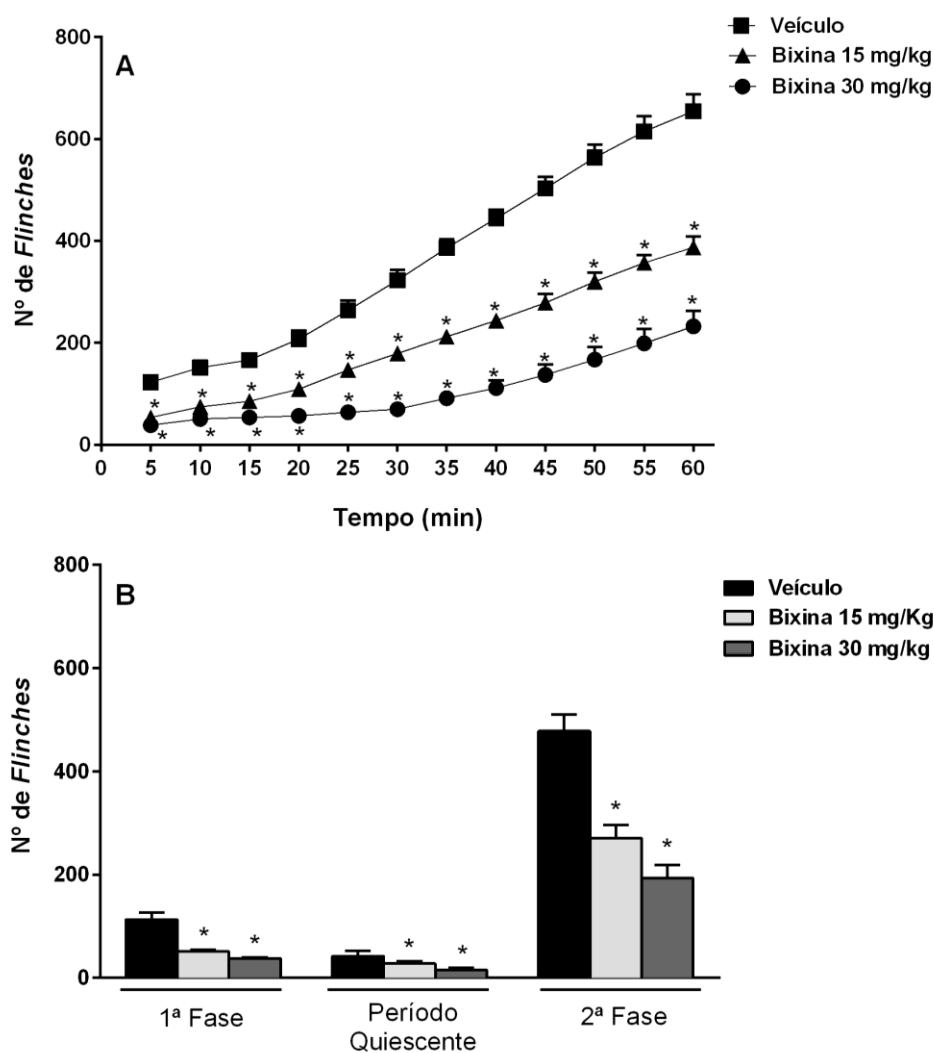


Figura 6: Efeito do tratamento oral com bixina no teste da formalina em ratos. Paineis A e B mostram o número de *flinches* induzidos por formalina em ratos sob diferentes condições de tratamento e fases do teste. Paineis A e B mostram o número de *flinches* induzidos por formalina em ratos sob diferentes condições de tratamento e fases do teste. Dados são expressos como a média \pm EPM de 9-11 animais/grupo experimental. (*) indica $p < 0,05$ em comparação com o grupo tratado com veículo. ANOVA de duas vias com medidas repetidas (Painel A) ou ANOVA de uma via (Painel B) seguido pelo *post-hoc* de Bonferroni.

4.3 EFEITO DO TRATAMENTO ORAL COM A BIXINA SOBRE O TESTE DA PLACA QUENTE EM RATOS

Os ratos foram submetidos ao teste da placa quente, uma hora após o tratamento com bixina (nas doses de 15 ou 30 mg/Kg) ou veículo, e avaliou-se o tempo de latência dos animais, em segundos, frente ao estímulo térmico (Figura 7). Ao realizar os testes estatísticos, ANOVA de uma via demonstrou a presença de um efeito significativo nos grupos experimentais [$F_{(2, 37)} = 4.061$; $p < 0.05$]. O teste de *post-hoc* de Bonferroni mostrou que o grupo tratado com bixina, somente na dose de 30 mg/Kg, apresentou um significativo aumento no tempo de latência quando comparado ao grupo tratado com veículo ($p < 0,05$) (Figura 7; VEH= $6,99 \pm 0,32$, BIX 15= $8,17 \pm 0,30$, BIX 30= $8,48 \pm 0,52$).

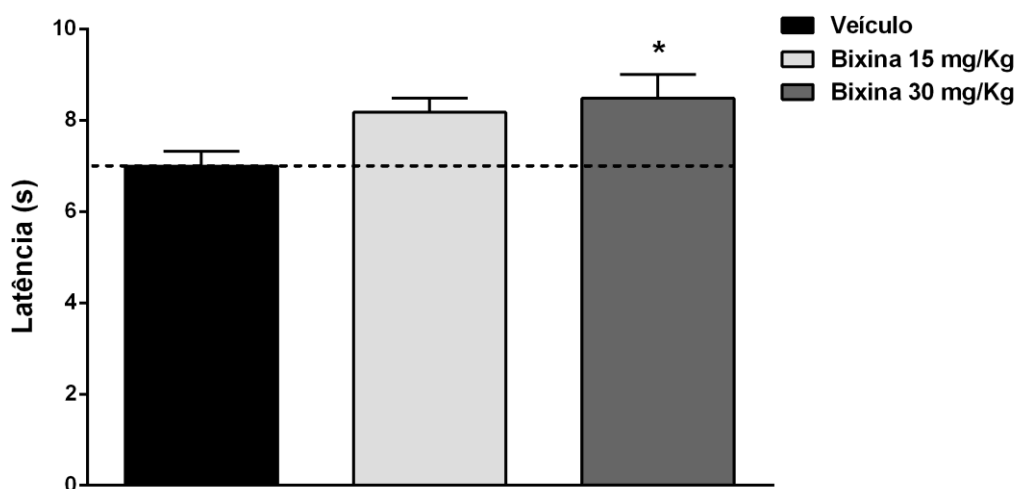


Figura 7: Efeito do tratamento oral com bixina no teste da placa quente em ratos. O tempo de latência total foi mensurado uma hora após o tratamento com bixina (15 ou 30 mg/Kg) ou veículo. Dados são expressos como a média \pm EPM de 13-14 animais/grupo experimental. (*) indica $p < 0,05$ em comparação com o grupo tratado com veículo. ANOVA de uma via seguido pelo *post-hoc* de Bonferroni.

4.4 EFEITO DO TRATAMENTO ORAL COM A BIXINA SOBRE O TESTE DO CAMPO ABERTO EM RATOS

Os ratos foram submetidos ao teste do campo aberto, uma hora após o tratamento com bixina (nas doses de 15 ou 30 mg/Kg) ou veículo e, durante os 5 minutos subsequentes, avaliou-se o número de cruzamentos efetuados pelos animais, com as quatro patas (Figura 8). Ao realizar testes estatísticos, ANOVA de uma via não mostrou efeito significativo nos grupos experimentais [$F_{(2, 16)} = 0.3298$; $p > 0.05$], de forma que os grupos tratados com bixina (em ambas as

doses), não diferiram estatisticamente do grupo tratado com veículo, em relação ao número de cruzamentos realizados (Figura 8; VEH= 62,33 ± 4,8, BIX 15= 68,33 ± 6,22, BIX 30= 66,57 ± 4,71).

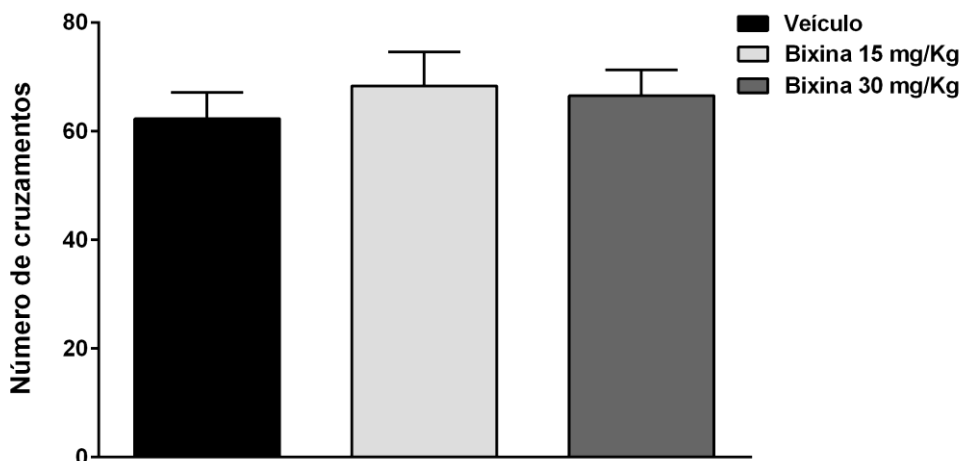


Figura 8: Efeito do tratamento oral com bixina no teste do campo aberto em ratos. O número total de cruzamentos realizados durante 5 minutos foi mensurado uma hora após o tratamento com bixina (15 ou 30 mg/Kg) ou veículo. Dados são expressos como a média ± EPM de 6-7 animais/grupo experimental. (*) indica $p < 0,05$ em comparação com o grupo tratado com veículo. ANOVA de uma via seguido pelo *post-hoc* de Bonferroni.

4.5 EFEITO DO TRATAMENTO ORAL COM A BIXINA SOBRE O EDEMA DE PATA INDUZIDO POR CARRAGENINA EM RATOS

Os ratos foram submetidos ao teste do edema de pata induzido pela carragenina (Cg), uma hora após o tratamento com bixina (nas doses de 15 ou 30 mg/Kg), veículo ou dexametasona (dose de 1 mg/Kg) – Figura 9. Analisando o aumento na espessura da pata durante o decurso temporal do teste (painel A), ANOVA de duas vias demonstrou um efeito significativo nos grupos experimentais [$F_{(4, 35)} = 16.74$; $p < 0,0001$], no tempo [$F_{(4, 140)} = 146.0$; $p < 0,0001$], e interação [$F_{(16, 140)} = 8,669$; $p < 0,0001$]. O teste de *post-hoc* de Bonferroni demonstrou que houve diferença significativa entre todos os grupos que receberam a injeção de carragenina, em relação ao grupo tratado com solução salina/veículo ($p < 0,05$). Dessa forma, é possível observar que a injeção intraplantar de carragenina (200 µg/pata) promove significativo aumento no edema de pata em relação a injeção de solução salina, e que ocorre a

formação de edema de pata máximo duas e três horas após a injeção de carragenina. Além disso, o pré tratamento com dexametasona reduziu significativamente a formação de edema, quando comparado com o grupo Cg/veículo, duas, três e quatro horas após a injeção de carragenina, como demonstrado pelo teste de *post-hoc* de Bonferroni ($p < 0,05$). O teste demonstrou também que o grupo tratado com Cg/bixina 15 mg/Kg é significativamente diferente do grupo Cg/veículo, uma hora após a injeção intraplantar, e o grupo Cg/bixina 30 mg/Kg é estatisticamente diferente, uma e duas horas após a injeção, sendo assim efetivos em reduzir o edema de pata nos tempos citados.

Analisando o edema de pata total durante as 4 horas do teste, por meio da área sob a curva (AUC – do inglês *area under the curve*; Painel B), ANOVA de uma via demonstrou um efeito significativo nos grupos experimentais [$F_{(4, 35)} = 15.87$; $p < 0.05$]. O teste de *post-hoc* de Bonferroni mostrou uma diferença significativa entre os grupos Cg/dexametasona e Cg/bixina 30 mg/Kg, em relação ao grupo Cg/veículo ($p < 0,05$), mas não houve diferença significativa entre si ($p > 0,05$). (Figura 9B; Sal/VEH= $20,14 \pm 0,29$, Cg/VEH= $24,90 \pm 0,67$, Cg/BIX 15= $23,78 \pm 0,53$; Cg/BIX 30= $22,31 \pm 0,36$, Cg/DEXA= $21,90 \pm 0,28$).

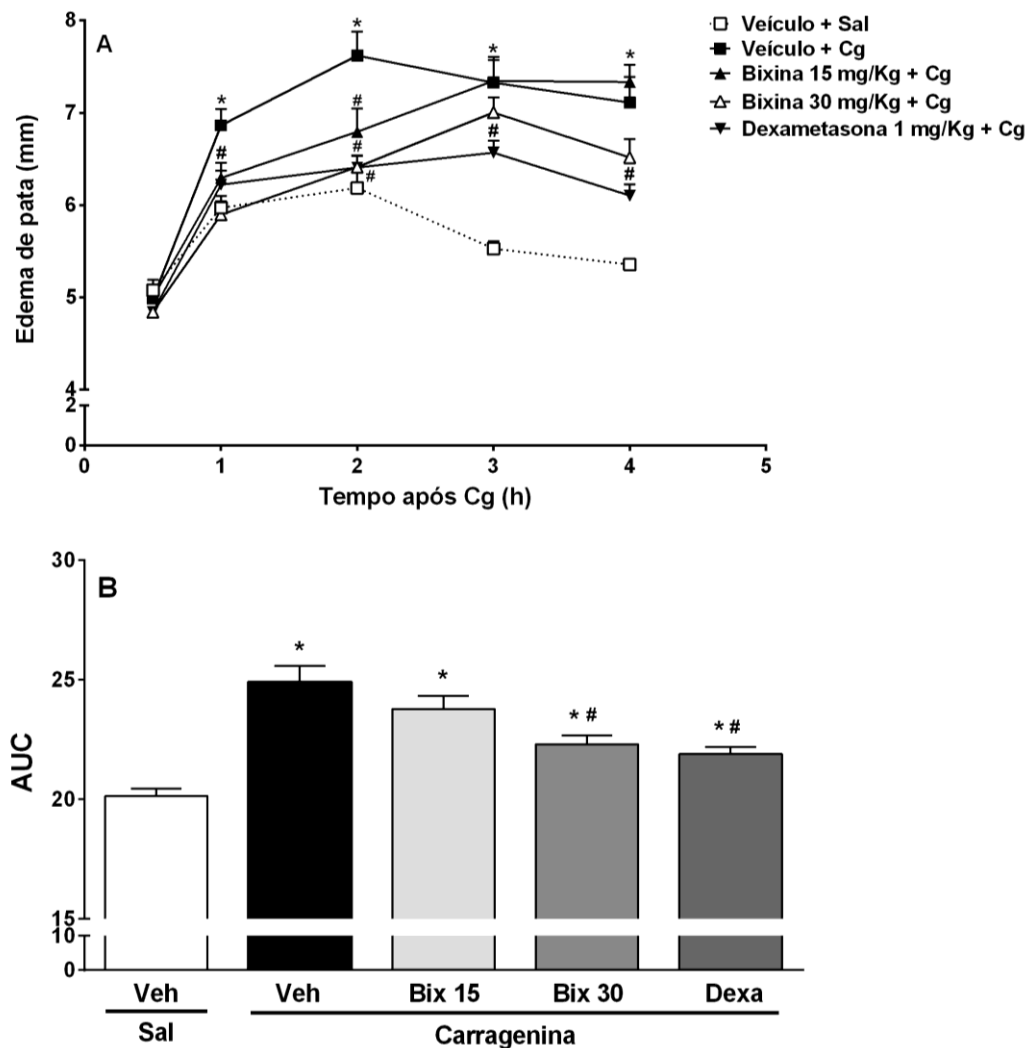


Figura 9: Efeito do tratamento oral com bixina no edema de pata induzido por carragenina em ratos. Painel A mostra o aumento no edema de pata (em mm) mensurado 0, 1, 2, 3 e 4 horas após injeção de carragenina (Cg) ou de solução salina (Sal). Painel B mostra a área sob a curva (AUC, em unidades arbitrárias – AU) do edema total durante as 4 horas, após os tratamentos. Dados são expressos como a média \pm EPM de 8 animais/grupo experimental. (*) indica $p < 0,05$ em comparação com o grupo tratado com solução salina/veículo. (#) indica $p < 0,05$ em comparação com o grupo tratado com carragenina/veículo. ANOVA de duas vias com medidas repetidas (Painel A) ou ANOVA de uma via (Painel B) seguido pelo teste de *post-hoc* de Bonferroni.

4.6 EFEITO DO TRATAMENTO ORAL COM A BIXINA SOBRE ATIVIDADE DA MIELOPEROXIDASE EM RATOS

Ao avaliar o efeito do tratamento oral com a bixina (nas doses de 15 ou 30 mg/Kg), veículo ou dexametasona (dose de 1 mg/Kg) sobre a atividade da

mieloperoxidase (MPO) - Figura 10 – ANOVA de uma via demonstrou um efeito significativo nos grupos experimentais [$F_{(7, 48)} = 22.87$; $p < 0.05$]. O teste de *post-hoc* de Bonferroni mostrou uma diferença significativa entre todos os grupos que receberam a injeção de carragenina, em relação ao grupo tratado com salina/veículo ($p < 0,05$). Dessa forma, é possível observar que a injeção de carragenina promove um aumento na atividade da enzima MPO, em comparação com o grupo tratado com solução salina. Além disso, o teste de Bonferroni mostrou uma diferença significativa entre os grupos tratados com Cg/bixina (na dose de 30 mg/Kg) e Cg/dexametasona em relação ao grupo tratado com Cg/veículo ($p < 0,05$), mas não houve diferença significativa entre si ($p > 0,05$) (Figura 10; Sal/VEH= $1,96 \pm 0,47$, Sal/BIX 15= $1,54 \pm 0,48$, Sal/BIX 30= $1,18 \pm 0,20$, Sal/DEXA= $0,81 \pm 0,15$, Cg/VEH= $8,82 \pm 0,92$, Cg/BIX 15= $8,37 \pm 0,95$, Cg/BIX 30= $4,74 \pm 1,82$; Cg/DEXA = $3,29 \pm 0,89$).

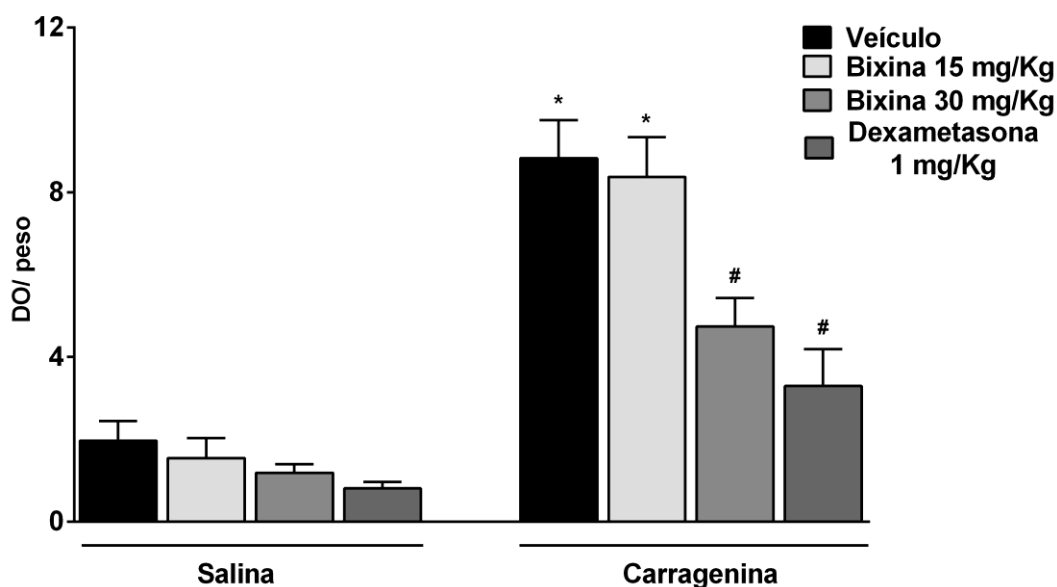


Figura 10: Efeito do tratamento oral com bixina sobre a atividade da mieloperoxidase em ratos. A atividade da mieloperoxidase foi avaliada 4 horas após o tratamento com a bixina (nas doses de 15 e 30 mg/kg), dexametasona ou veículo. Todos os tratamentos foram administrados uma hora antes da aplicação de carragenina (Cg) ou solução salina (Sal). Dados são expressos como a média \pm EPM de 7-8 animais/grupo experimental. (*) indica $p < 0,05$ em comparação com o grupo tratado com solução salina/veículo. (#) indica $p < 0,05$ em comparação com o grupo tratado com carragenina/veículo. ANOVA de uma via seguido pelo teste de *post-hoc* de Bonferroni.

5. DISCUSSÃO

Tendo em vista o uso da bixina na medicina tradicional (SHAHID-UL-ISLAM et al., 2016; ULBRICHT et al., 2012), os principais achados deste trabalho foram a determinação da capacidade antinociceptiva da mesma e a validação da sua atividade anti-inflamatória, já descrita anteriormente (TAO et al., 2015, 2016). A propriedade anti-inflamatória foi comprovada pela sua capacidade em reduzir a atividade enzimática da MPO e por diminuir do edema de pata total induzido pela carragenina. Pela primeira vez na literatura e utilizando os testes da formalina, placa quente e contorção abdominal foi possível demonstrar sua propriedade antinociceptiva, a qual parece não envolver comprometimento motor, uma vez que não o tratamento com bixina não alterou o comportamento no teste do campo aberto.

O teste da contorção abdominal é um método simples, rápido e sensível para avaliar a atividade de drogas com potencial antinociceptivo. A administração intraperitoneal de ácido acético induz a hiperalgesia por promover a liberação de substâncias endógenas nocivas, como citocinas, prostaglandinas (PGs), substância P e bradicinina, as quais são responsáveis pela sensibilização das terminações nervosas dos nociceptores (BERKENKOPF & WEICHMAN, 1988; RIBEIRO et al., 2000). Murata e colaboradores (1997), demonstraram que entre os prostanóides, as prostaciclina foram consideradas as principais responsáveis por causar a nocicepção após administração de agentes algogênicos, como o ácido acético. Após esse estímulo nocivo, grandes quantidades de diversas prostaglandinas são produzidas por células polimorfonucleares (granulócitos), especialmente neutrófilos, aumentando a biossíntese e liberação das mesmas na cavidade peritoneal (DERAEDT et al., 1980; TOLONE, 1977). Poucos estudos estão disponíveis na literatura utilizando testes nociceptivos com a bixina, entretanto, Shilpi e colaboradores (2006), ao realizarem um screening farmacológico do extrato metanólico foliar de *Bixa orellana* L., de forma similar ao presente estudo, observaram uma diminuição do número de contorções abdominais, promovida pelo tratamento. Drogas com propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes já foram descritas por Deraedt e colaboradores (1980), como sendo eficazes em diminuir os comportamentos nociceptivos e os níveis de

PGs na cavidade peritoneal, no teste de contorção abdominal induzida por ácido acético. Dessa forma, o efeito antinociceptivo da bixina observado, pode estar ocorrendo devido a sua capacidade de modular negativamente a produção de prostaglandinas pela cicloxigenase (COX; discutida a seguir), e por possuir propriedades anti-inflamatória e antioxidante (XU & KONG, 2017).

Considerando que o modelo de nocicepção induzido pelo ácido acético não é sensível o bastante para indicar se a atividade antinociceptiva é proveniente de uma ação central ou periférica, por exemplo, testes de nocicepção mais específicos foram realizados, a fim de tentar elucidar os mecanismos de ação envolvidos na ação analgésica da bixina.

O teste da formalina é um modelo de nocicepção muito utilizado para se estudar drogas com potencial anti-nociceptivo e anti-inflamatório. Este promove duas fases distintas de comportamentos nociceptivos (TJØLSEN et al., 1992). Segundo Dubuisson & Dennis (1977) a primeira fase, chamada neurogênica, começa logo após a injeção de formalina, permanecendo até 3/5 min, e ocorre devido a estimulação química dos nociceptores pelo formaldeído. Logo após, ocorre um período quiescente (6 - 15 min), e então inicia-se a segunda fase (15 - 60 min). Esta, chamada de inflamatória, é caracterizada pelo retorno dos comportamentos nociceptivos e pelo envolvimento de mediadores inflamatórios periféricos, os quais sensibilizam neurônios sensoriais primários e espinais, desencadeando a ativação dos nociceptores. As diferentes propriedades de ambas as fases permitem que esse teste seja amplamente utilizado como uma ferramenta para indicar possíveis mecanismos de ação para drogas em teste, partindo do pressuposto de que drogas de ação periférica, como inibidores da COX, comumente atenuam apenas a segunda fase da formalina, e medicamentos de ação central, ambas (MALMBERG & YAKSH, 1992). Realizando testes *in vitro*, Reddy e colaboradores (2005) já demonstraram o potencial da bixina em reduzir a atividade das duas isoformas da enzima COX, responsáveis pela produção de prostaglandinas. Dessa forma, com base nos resultados obtidos, pode-se pressupor que a bixina exerce seu efeito antinociceptivo por meio de um mecanismo de ação periférico e central, com uma possível atividade anti-inflamatória, já que a molécula foi efetiva em atenuar tanto a primeira quanto a segunda fase do teste.

Para confirmar a presença de um mecanismo de ação central da bixina, realizou-se o teste da placa quente. Considerando que fármacos de ação exclusivamente periférica, como inibidores da COX, são irresponsáveis a este teste, a placa quente é um experimento amplamente utilizado para avaliar drogas com potencial ação sobre o sistema nervoso central (BALLOU et al., 2000). Como a bixina, somente na dose de 30 mg/Kg, foi efetiva em aumentar significativamente o tempo de latência dos animais na placa quente, é possível inferir que mecanismos centrais participem do efeito antinociceptivo exercido pela bixina.

Para avaliar se o tratamento com a bixina, ao promover sua ação anti-nociceptiva, propiciaria juntamente algum déficit locomotor nos animais, realizou-se o teste do campo aberto. Atualmente, está estabelecido na literatura que drogas estimulantes do sistema nervoso central promovem aumento do número de cruzamentos nesse teste, enquanto que drogas depressoras, como relaxantes musculares e sedativos, promovem uma diminuição (PRUT & BELZUNG, 2003). No estudo referido anteriormente, realizado por Shilp e colaboradores (2006), o extrato metanólico das folhas de *Bixa orellana* L. promoveu uma diminuição da locomoção nesse teste comportamental, entretanto, não há na literatura estudos avaliando o efeito locomotor do tratamento com a bixina isolada. No presente trabalho, demonstrou-se que o tratamento com a bixina não alterou significativamente a taxa de locomoção dos animais testados e, dessa forma, os dados sugerem que a atividade anti-nociceptiva da bixina isolada, diferentemente do extrato metanólico de *Bixa orellana* L., não esteja associada a um efeito sedativo.

Diversos estudos na literatura sugerem a ação anti-inflamatória tanto do extrato de *Bixa orellana* L., quanto da bixina isolada. Já foi demonstrado, por exemplo, que o extrato aquoso das folhas de *Bixa orellana* L. possui efeito antihistamínico e anti-bradicinina sobre diferentes modelos animais de inflamação aguda. Sabe-se ainda que o extrato é capaz de reduzir a migração de leucócitos e a permeabilidade vascular, por promover menor expressão de mediadores bioquímicos, como óxido nítrico (YOKE KEONG et al., 2011; YONG et al. 2013). Somacal e colaboradores (2015) já demonstraram também que o tratamento com a bixina isolada diminui os níveis de marcadores inflamatórios, como interleucina 6 e fator alfa de necrose tumoral, entretanto, a

maior parte dos estudos com a bixina, é feito por meio de testes *in vitro* (DE LA VEGA et al., 2017; REDDY et al., 2005; TAO et al., 2016). Com o intuito de avaliar o potencial efeito anti-inflamatório da bixina em modelos murinos, foram realizados os testes descritos a seguir.

O edema de pata induzido pela carragenina é um modelo de inflamação aguda, amplamente utilizado para o estudo de novas drogas com potencial anti-inflamatório. De acordo com Di Rosa e colaboradores (1971), a injeção de carragenina, assim como ocorre durante o processo inflamatório, promove aumento da permeabilidade vascular, infiltração de células inflamatórias (especialmente neutrófilos), e a liberação de diversos mediadores inflamatórios. Inicialmente, ocorre a liberação substâncias como histamina, serotonina e bradicinina, e concomitantemente ocorre aumento da produção e liberação de prostaglandinas, especialmente 60 minutos após a injeção de carragenina, momento em que há a expressão máxima de COX-2 (NANTEL et al., 1999; VINEGAR et al., 1968). A infiltração tecidual de neutrófilos que ocorre frente a administração de carragenina, contribui tanto para o aumento da liberação de mediadores, quanto para o aumento da produção de radicais livres derivados de oxigênio, produzidos a partir da mieloperoxidase. Dessa forma, o nível de mieloperoxidase tecidual é considerado um marcador tecidual da infiltração de neutrófilos no local da lesão, e conseqüentemente da severidade do processo inflamatório (FANTONE & WARD, 1982).

O tratamento com a bixina, na dose de 15 mg/Kg, promoveu uma diminuição significativa do edema de pata, na primeira hora após administração de carragenina. Já a dose de 30 mg/Kg, diminuiu significativamente o edema de pata na primeira e na segunda hora após a injeção intraplantar, e o edema de pata total promovido pela carragenina, em relação ao grupo tratado com veículo, o que evidencia a atividade anti-inflamatória da molécula nesse teste comportamental. A diminuição do edema de pata observada na terceira e na quarta hora, nos grupos tratados com bixina (ambas as doses), não foi significativamente diferente do grupo tratado com veículo/Carragenina. Isso pode ter ocorrido devido a farmacocinética da bixina, a qual possui pico de absorção uma hora após a administração oral da mesma, e um tempo de meia vida de aproximadamente 3 horas (Park et al., 2016^{ab}).

Ao avaliar a atividade da mieloperoxidase, foi observado como esperado que a administração de carragenina inziu um significativo aumento da atividade de MPO quando comparado aos grupos tratados com salina. A bixina, somente na dose de 30 mg/Kg promoveu uma diminuição significativa da atividade enzimática de MPO, indicando indiretamente uma menor infiltração de neutrófilos, e conseqüentemente uma menor liberação de mediadores inflamatórios, no tecido lesado (BRADLEY et al., 1982). Além disso, considerando que os neutrófilos são os principais responsáveis pela liberação de prostaglandinas na cavidade peritoneal durante o teste de contorção abdominal, pode-se pressupor ainda que o resultado obtido avaliando o teste de contorção abdominal esteja relacionado ao efeito da bixina sobre o recrutamento de neutrófilos.

O efeito anti-inflamatório da bixina, pode estar relacionado ainda a outras propriedades da molécula. Takahashi e colaboradores (2009) já demonstraram que a bixina possui ação agonista sobre receptores PPARs (*peroxissome proliferator-activated receptor*) alfa e gama os quais, dentre outras ações, promovem a diminuição da produção de citocinas inflamatórias e a inibição da ativação de macrófagos. Além disso, já foi evidenciado na literatura que a bixina promove a inibição da via de sinalização TLR4/MyD88/NF- κ B, modulando negativamente a fosforilação de NF- κ B, reprimindo assim a transcrição de diversos genes pró inflamatórios (XU & KONG, 2017).

6. CONCLUSÕES

O tratamento agudo com a bixina se mostrou efetivo em:

- ✓ diminuir significativamente os comportamentos nociceptivos promovidos pelo teste de contorção abdominal induzido por ácido acético, em camundongos;
- ✓ diminuir significativamente os comportamentos nociceptivos promovidos pelas duas fases do teste da formalina, em ratos;
- ✓ aumentar significativamente o tempo de latência sobre a placa quente, em ratos (maior dose);

- ✓ diminuir significativamente o edema de pata total induzido pela injeção intraplantar de carragenina, em ratos (maior dose);
- ✓ diminuir significativamente a atividade da mieloperoxidase na região subplantar de ratos, após injeção de carragenina/solução salina (maior dose);

Dessa forma, pela primeira vez na literatura, foi demonstrado que a bixina isolada possui uma atividade anti-nociceptiva possivelmente mediada por mecanismos periféricos e centrais. A atividade anti-inflamatória da bixina também foi evidenciada, corroborando estudos acerca das propriedades anti-inflamatórias dos carotenoides de forma geral. Esses efeitos não parecem estar relacionados a sedação dos animais, como evidenciado pelo teste do campo aberto. Estudos futuros são necessários para elucidar os mecanismos de ação envolvidos com essas respostas.

7. REFERÊNCIAS

AMULIC B., CAZALET C., HAYES G. L., METZLER K. D., ZYCHLINSKY A. Neutrophil Function: From Mechanisms to Disease. **Annual Review of Immunology**, v. 30, p. 459–89, 2012.

ARATANI, Y. Myeloperoxidase: Its Role for Host Defense, inflammation, and Neutrophil Function. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 640, p. 47–52, 2018.

BALLOU, L. R., BOTTING R. M., GOORHA S., ZHANG, J., VANE J. R.. Nociception in Cyclooxygenase Isozyme-Deficient Mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.17, p. 10272–76, 2000.

BATLOUNI, M. Anti-inflamatórios Não esteróides: Efeitos Cardiovasculares, Cérebro vasculares e Renais. **Sociedade Brasileira de Cardiologia**, v. 94, n. 4, p. 556-63, 2010.

^aBAUTISTA, A. R., MOREIRA E. L. T., BATISTA M. S., MIRANDA M. S., GOMES I. C. S. Subacute Toxicity Assessment of Annatto in Rat. **Food and Chemical Toxicology**, v. 42, p. 625–629, 2004.

^bBAUTISTA, A. R. P., MIRANDA M. S., BATISTA M. S, MOREIRA E. L. T., SILVA I. M., GOMES I. C. S. Oral Toxicity Assessment of Annatto in Rats [Avaliação Da Toxicidade Oral Subcrônica Da Bixina Para Ratos]. **Revista Brasileira de Ciencias Farmaceuticas/Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 2, p. 229–33, 2004.

BERKENKOPF, J. W., BARRY M. W. Production of Prostacyclin in Mice Following Intraperitoneal Injection of Acetic Acid, Phenylbenzoquinone and Zymosan: Its Role in the Writhing Response. **Prostaglandins**, v. 36, p. 693–709, 1988.

BOUVIER, F., DOGBO O., CAMARA B. Biosynthesis of the Food and Cosmetic Plant Pigment Bixin (Annatto). **Science**, v. 300, p. 2089–91, 2003.

BRADLEY, P. P., PRIEBAT, D. A., CHRISTENSEN, R. D., ROTHSTEIN, G. Measurement of Cutaneous Inflammation: Estimation of Neutrophil Content with an Enzyme Marker. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 78, n. 3, p. 206-09, 1982.

CALIXTO, J. B. Efficacy, Safety, Quality Control, Marketing and Regulatory Guidelines for Herbal Medicines (Phytotherapeutic Agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 179–89, 2000.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade Como Fonte de Medicamentos.” **Ciência e Cultura**, v. 200, p. 37–39, 2003.

CÁRDENAS-CONEJO, Y., UICAB V. C., LIEBERMAN M., ESPINOSA M. A., COMAI L., MADRID R. R. De Novo Transcriptome Sequencing in Bixa Orellana to Identify Genes Involved in Methylerythritol Phosphate, Carotenoid and Bixin Biosynthesis.” **BMC Genomics**, v. 16, p. 877-95, 2015.

CARVALHO, P. R. N. Urucum - Histórico, Situação Atual e Perspectivas. Março 2018. Disponível em: <www.ourucum.com.br>. Acesso em: 31 setembro 2018.

CHISTÉ, R. C., MERCADANTE A. Z., GOMES, A., FERNANDES, E., LIMA J. L., BRAGAGNOLO N. In Vitro Scavenging Capacity of Annatto Seed Extracts against Reactive Oxygen and Nitrogen Species. **Food Chemistry**, v. 27, p. 419–26, 2011.

CRUZ, W. A. S.. **Atividade de Mieloperoxidase e Produção de Oxigênio Singlete Em Neutrófilos e Células Monocíticas**. 60f. Tese (Mestrado em Farmácia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

DERAEDT, R., JOUQUEY S., DELEVALLÉE F., FLAHAUT M. Release of Prostaglandins E and F in an Allogenic Reaction and Its Inhibition. **European Journal of Pharmacology**, v. 61, p. 17–24, 1980.

RADNOVICH R., CHAPMAN R., GUDIN J. A., PANCHAL S. J., WEBSTER L. R., PERGOLIZZI J. V. Acute Pain: Effective Management Requires Comprehensive Assessment Acute Pain: Effective Management Requires Comprehensive Assessment. **Postgraduate Medicine**, v. 126, n. 4, p. 59-72, 2015.

DUBUISSON, D., DENNIS S. G. The Formalin Test: A Quantitative Study of the Analgesic Effects of Morphine, Meperidine, and Brain Stem Stimulation in Rats and Cats.” **Pain**, v. 4, p. 161–74, 1977.

DUTRA, R. C., CAMPOS M. M., SANTOS A. S., CALIXTO J. B. Medicinal Plants in Brazil: Pharmacological Studies, Drug Discovery, Challenges and Perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 4–29, 2016.

FANTONE, J. C. & WARD, P. A. Role of Oxygen-derived Free Radicals and Metabolites in Leucocyte-Dependent Inflammatory Reactions. **American Association of Pathologists**, v. 107, n. 3, p. 395-418, 1982.

FELDMAN, M. & MCMAHON, A. T. Do cyclooxygenase-2 inhibitors provide benefits similar to those of traditional nonsteroidal anti-inflammatory drugs, with less gastrointestinal toxicity?. **Ann Intern Med**, v. 132, n. 2, p. 134-43, 2000.

FLEISCHER, T. C., AMEADE E. P. K., MENSAH M. L. K., SAWER I. K. Antimicrobial Activity of the Leaves and Seeds of *Bixa Orellana*. **Fitoterapia**, v. 74, n. 1–2, p. 136–38, 2003.

FREITAS, G. C. & CARREGARO, A. B. Aplicabilidade da extrapolação alométrica em protocolos terapêuticos para animais selvagens. **Ciência Rural**, v. 43, n. 2, p. 297-304, 2013.

GADDI, A., CICERO A. F. G., PEDRO E. J. Clinical Perspectives of Anti-Inflammatory Therapy in the Elderly : The Lipoxigenase (LOX)/ Cycloxigenase (COX) Inhibition Concept. **Science Direct**, v. 38, p. 201–12, 2004.

GAUT, J. P., YE H. G. C., TRAN H. D. BYUN J., HENDERSON J. P., RICHTER G. M., BRENNAM M. L., LUSIS A. J., BELAAOUAJ A., HOTCHKISS R. S., HEINECK J. W. Neutrophils Employ the Myeloperoxidase System to Generate Antimicrobial Brominating and Chlorinating Oxidants during Sepsis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 21, p. 11961-66, 2001.

HILÁRIO, M. O. E., TERRERI, M. T., LEN, C. A. Nonsteroidal Anti-Inflammatory Drugs : Cyclooxygenase 2 Inhibitors. **Jornal de Pediatria**, v. 82, n. 5, p. 06–12, 2006.

HIGGINS, A. J., LEES P. The Acute Inflammatory Process , Arachidonic Acid Metabolism and the Mode of Action of Anti- Inflammatory Drugs. **Equine Veterinary Journal**, v. 16, p. 163–75, 1984.

HIROTA, B. C. K., PAULA C. S., OLIVEIRA V. B., CUNHA, J. M., SCHREIBER A. K., OCAMPOS F. M. M., BARISON A., MIGUEL G. O., MIGUEL M. D. Phytochemical and Antinociceptive, Anti-Inflammatory, and Antioxidant Studies of *Smilax Larvata* (Smilacaceae). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 16, p. 1-12, 2016.

INTERNATIONAL ASSOCIATION OF PAIN (IASP). Disponível em: <<http://www.iasp-pain.org/Education/Content.aspx?ItemNumber=1698#Pain> >. Acesso em: 15 ago. 2018.

JOLY, A. B. **Botânica**: introdução à taxonomia vegetal. São Paulo: Companhia Editora Nacional, 2002.

KEONG, Y. Y, ARIFAH, A. K., SUKARDI, S., ROSLIDA, A. H., SOMCHIT, M. N., ZURAINI, A. Bixa Orellana Leaves Extract Inhibits Bradykinin-Induced Inflammation through Suppression of Nitric Oxide Production. **Medical Principles and Practice**, v. 20, n. 2, p. 142–46, 2011.

KUMMER, C. L. & COELHO, T. C. R. B. Antiinflamatórios não Esteróides Inibidores da Ciclooxygenase-2 (COX-2): Aspectos Atuais. **Revista Brasileira de anesthesiologia**, v. 52, n. 4, p. 498-512, 2002.

KLEBANOFF, S. J., KETTLE, A. J., ROSEN, H., WINTERBOURN, C. C., NAUSEFF, W. M. Myeloperoxidase: a front-line defender against phagocytose microorganisms. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 93, n. 2, p. 185-198, 2013.

KOLACZKOWSKA, E., KUBES P. Neutrophil Recruitment and Function. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, n. 3, p. 159–75, 2013.

KUMAR V., ABBAS A. K., ASTER J. C. Patologia básica. 9ª edição. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.

DE LA VEGA, M. R., KRAJISNIK, A., ZHANG, D. D., WONDRAK, G. T. Targeting NRF2 for Improved Skin Barrier Function and Photoprotection: Focus on the Achiote-Derived Apocarotenoid Bixin. **Nutrients**, v. 9, n. 12, p. 1-16, 2017.

LEVY, L. W., REGALADO E., NAVARRETE S., WATKINS R. H. Bixin and Norbixin in Human Plasma: Determination and Study of the Absorption of a Single-Dose of Annatto Food Color. **Analyst**, v. 122, n. 9, p. 977–80, 1997.

MALMBERG, A. B., YAKSH, T. L. Antinociceptive Actions of Spinal Nonsteroidal Anti-Inflammatory Agents on the Formalin Test in the Rat. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 263, n. 1, p. 136–46, 1992.

MATUO, M. C. S., TAKAMOTO, R. T. O., KIKUCHI, I. S., PINTO, T. J. A. Effect of Bixin and Norbixin on the Expression of Cytochrome P450 in Hepg2 Cell Line. **Cell Biology International**, v. 37, n. 8, p. 843–48, 2013.

MEOTTI, F. C., LUIZ A. P., PIZZOLATTI, M. G, KASSUYA, C. A. L., CALIXTO, J. B., SANTOS, A. R. S . Analysis of the Antinociceptive Effect of the Flavonoid Myricitrin: Evidence for a Role of the L-Arginine-Nitric Oxide and Protein Kinase C Pathways. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 316, n. 2, p. 789–96, 2006.

MOTHANA, R. A. A., AL-SAID, M. S., AL-REHAILY, A. J., THABET, T. M., AWAD, N. A., LALK, M., LINDEQUEST, U. Anti-Inflammatory, Antinociceptive, Antipyretic and Antioxidant Activities and Phenolic Constituents from *Loranthus Regularis* Steud. Ex Sprague. **Food Chemistry**, v. 130, n. 2, p. 344–49, 2012.

MURATA, T., USHIKUB, F., MATSOUKA, T., HIRATA, M., YAMASAKI, A., SUGIMOTO, Y., ICHIKAWA A., AZE, Y., TANAKA, T., YOSHIDA, N., UENO, A., OH-ISHI, S., NARUMIYA, S. Altered Pain Perception and Inflammatory Response in Mice Lacking Prostacyclin Receptor. **Nature**, v. 388(6643), p.

678–82, 1997.

NANTEL, F., DENIS, D., GORDON, R., NORTHEY A., CIRINO, M., METTERS, K. M., CHAN, C. C. Distribution and Regulation of Cyclooxygenase-2 in Carrageenan-Induced inflammation. **British Journal of Pharmacology**, v. 128, p. 853–59, 1999.

NEVES, A. P. & MANSIM, P. P. Projeto Urucum do Brasil A História do Urucum Piave. Maio 2018. Disponível em: <www.ourucum.com.br>. Acesso em: 31 setembro 2018.

OKUSE, KENJI. Pain Signalling Pathways : From Cytokines to Ion Channels. **Science Direct**, v. 39, p. 490–96, 2007.

OLIVEIRA, J. S. de. **Caracterização, Extração e Purificação Por Cromatografia de Compostos de Urucum (Bixa Orellana L.)**. 215 f. Tese (Doutorado em Engenharia Química) – Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2005.

OLSON, JAMES ALLEN. Absorption , Transport , and Metabolism of Carotenoids in Humans. International Union of Pure and Applied Chemistry, v. 66, n. 5, p. 1011–16, 1994.

^aPARK, J. S., MATHISON, B. D., CHEW, B. P. Uptake and Immunomodulatory Role of Bixin in Dogs. **Journal of Animal Science**, v. 94, n. 1, p. 135–43, 2016.

^bPARK, J. S., MATHISON, B. D., ZAWLOCKI, B. M. CHEW, B. P. Bixin Uptake and Antioxidative Effect and Role in Immunoregulation in Domestic Cats. **Journal of Animal Science**, v. 94, n. 1, p. 125–34, 2016.

PRUT, L. & BELZUNG, C. The Open Field as a Paradigm to Measure the Effects of Drugs on Anxiety-like Behaviors: A Review. **European Journal of Pharmacology**, v. 463, n. 1–3, p. 3–33, 2003.

RADNOVICH, R., CHAPMAN, R., GUDIN, J. A., PANCHAL, S. J., WEBSTER, L. R., PERGOLIZZI, J. V. Acute Pain: Effective Management Requires Comprehensive Assessment. **Postgraduate Medicine**, v. 126, n. 4, p. 59-72, 2015.

REDDY, M. K., LINDO, K. L. A., NAIR, M. G. Relative Inhibition of Lipid Peroxidation, Cyclooxygenase Enzymes, and Human Tumor Cell Proliferation by Natural Food Colors. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 23, p. 9268–73, 2005.

REHBEIN, J., DIETRICH, B., GRZYBAUM, M. D., HENTSCHEL, P., HOLTIN, K., KUEHNLE, M. ALBERT, K. Characterization of Bixin by LC-MS and LC-NMR. **Journal of Separation Science**, v. 30, n. 15, p. 2382–90, 2007.

RIBEIRO, R. A, VALE, M. L., THOMAZZI S. M., PASCHOALATO, A. B. P., POOLE, S., FERREIRA, S. H., CUNHA, F. Q. 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.111–18, 2000.

RIBEIRO, T. M. R. & LOIOLA, M. I. B. Flora Do Ceará, Brasil: Bixaceae. **Rodriguesia**, v. 68, n. 4, p. 1313–22, 2017.

DI ROSA, M., GIROUD, J. P., WILLOUGHBY, D. A. Studies of the Mediators of the Acute Inflammatory Response Induced in Rats in Different Sites by Carrageenan and Turpentine. **The Journal of Pathology**, v. 104, n. 1, p. 15–29, 1971.

ROCHA, A. P. C., KRAYCHETE, D. C., LEMONICA. L., CARVALHO, L. R., BARROS, G. A. M., GARCIA, J. B. S., SAKATA, R. K. Dor: Aspectos Atuais da Sensibilização Periférica e Central. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 57, n. 1, p. 94-105, 2007.

RODRIGUES, L. M., ALCÁZAR-ALAY, S. C., PETENATE, A. J., & MEIRELES, M. A. A. Bixin extraction from defatted annatto seeds. **Comptes Rendus Chimie**, v. 17, n. 3, p. 268–283, 2014

SANTOS, G. C., ALMEIDA, M. R., ANTUNES, L. M. G., BIANCHI, M. L. P. Effect of Bixin on DNA Damage and Cell Death Induced by Doxorubicin in HL60 Cell Line. **Human & Experimental Toxicology**, v. 35(12), p. 1319–27, 2016.

SHAHID-UL-ISLAM, RATHER, L. J., MOHAMMAD, F. Phytochemistry, Biological Activities and Potential of Annatto in Natural Colorant Production for Industrial Applications - A Review. **Journal of Advanced Research**, v. 7, n. 3, p. 499–514, 2016..

SHILPI, J. A., TAUKEF-UR-RAHMAN, UDDIN, S. J., ALAM, S., SADHU, S. K., SEIDEL, V. Preliminary Pharmacological Screening of Bixa Orellana L. Leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 108, n. 2, p. 264–71, 2006.

SILVA, C. R., ANTUNES L. M. G., BIANCHI, M. L. P. Antioxidant Action of Bixin against Cisplatin-Induced Chromosome Aberrations and Lipid Peroxidation in Rats. **Pharmacological Research**, v. 43, n. 6, p. 561–66, 2001.

SILVA W. D., MOTA I. **Imunologia básica e aplicada**. 5ª edição. Rio de Janeiro : Guanabara Koogan, 2003.

SOMACAL, S., FIGUEIREDO, C. G., QUATRIN, A., RUVIARO, A. R., CONTE, L., AUGUSTI, P. R., ROEHRS, M., DENARDIN, I. T., KASTEN, J., VEIGA, M. L., DUARTE, M. M. F., EMANUELLI, T. The Antiatherogenic Effect of Bixin in Hypercholesterolemic Rabbits Is Associated to the Improvement of Lipid Profile and to Its Antioxidant and Anti-Inflammatory Effects. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 403, n. 1–2, p. 243–53, 2015.

STOHS, SIDNEY J. Safety and Efficacy of *Bixa Orellana* (Achiote, Annatto) Leaf Extracts. **Phytotherapy Research**, v. 28, n. 7, p. 956–60, 2014.

STROHL, WILLIAM R. The Role of Natural Products in a Modern Drug Discovery Program. **Drug Discovery Today**, v. 5, n. 2, p. 39–41, 2000.

SUZUKI, Y., ORTEGA, M. R., LORENZO, O., RUPEREZ, M., ESTEBAN, V.,

EGIDO, J. Inflammation and Angiotensin II. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 35, p. 881–900, 2003.

TAKAHASHI, N., GOTO, T., TAIMATSU, A., EGAWA, K., KATOH, S., KUSUDO, T., SAKAMOTO, T., OHYANE C., LEE, J-Y., KIM, Y-I., UEMURA, T., HIRAI, S., KAWADA, T. Bixin Regulates MRNA Expression Involved in Adipogenesis and Enhances Insulin Sensitivity in 3T3-L1 Adipocytes through PPAR γ Activation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v. 390, n. 4, p. 1372–76, 2009.

TAO, S., DE LA VEGA, M. R., QUIJADA, H., WONDRAK, G. T., WANG, T., GARCIA, J. G. N., ZHANG, D. D. Bixin Protects Mice against Ventilation-Induced Lung Injury in an NRF2-Dependent Manner. **Scientific Reports**, v. 6, p. 1–13, 2016.

TAO, S., PARK, S. L., DE LA VEGA, M. R., ZHANG, D. D., WONDRAK, G. T. Systemic Administration of the Apocarotenoid Bixin Protects Skin against Solar UV-Induced Damage through Activation of NRF2. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 89, p. 690–700, 2015.

TJØLSEN, A., ODD-GEIR B., HUNSKAAR, S., ROSLAND, J. H., HOLE, K. The Formalin Test: An Evaluation of the Method. **Pain**, v. 51, n. 1, p. 5–17, 1992.

TOLONE, G., BONASERA, M., BRAI, M., TOLONE, C. Prostaglandin Production by Human Polymorphonuclear Leucocytes during Phagocytosis in Vitro. **Specialia**, v. 519, p. 961–62, 1977.

ULBRICHT, C., WINDSOR, R. C., BRIGHAM, A., BRYAN, J. K., CONQUER, J., COSTA, D., GIESE, N., GUILFORD, J., HIGDON, E. R. B., HOLMES, K., ISAAC, R., JINGST, S., KATS, J., PEERY, L., RUSIE, E., SAVINAINEN, S., SCHOEN, T., STOCK, T., COLUCCI, S., & WEISSNER, W. An Evidence-Based Systematic Review of Annatto (Bixa Orellana L.) by the Natural Standard Research Collaboration. **Journal of Dietary Supplements**, v. 9, n. 1, p. 57–77, 2012.

VANEGAS, H. & SCHAIBLE, H. G. Descending Control of Persistent Pain: Inhibitory or Facilitatory?. **Brain Research Reviews**, v. 46, n. 3, p. 295–309, 2004.

VENUGOPALAN, A., GIRIDHAR, P., RAVISHANKAR, G. A. Food, Ethanobotanical and Diversified Applications of Bixa Orellana L.: A Scope for Its Improvement Through Biotechnological Mediation. **Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences**, v. 1, n. 4, p. 2231–59, 2011.

VERPOORTE, ROB. Exploration of Nature's Chemodiversity: The Role of Secondary Metabolites as Leads in Drug Development. **Perspective**, v. 3, n. 5, p. 232–38, 1998.

VIEGAS, C., BOLZANI, V. S., BARREIRO, E. J. Os Produtos Naturais e a Química Medicinal Moderna. **Quimica Nova**, v. 29, n. 2, p. 326–37, 2006.

VILAR, D. A., VILAR, M. S. A., MOURA, T. F. A. L., RAFFIN, F. N., OLIVEIRA, M. R., FRANCO, C. F. O., ATHAYDE-FILHO, P. F., DINIZ, M. F. F., BARBOSA-FILHO, J. M. Traditional Uses, Chemical Constituents, and Biological Activities of *Bixa Orellana* L.: A Review. **The Scientific World Journal**, v. 2014, p. 1–11, 2014.

VINEGAR, R., SCHREIBER, W., HUGO, R. Biphasic Development of Carrageenin edema in rats. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 166, n. 1, p. 96-103, 1968.

XU, Z., & KONG, Z. Q. Bixin Ameliorates High Fat Diet-Induced Cardiac Injury in Mice through Inflammation and Oxidative Stress Suppression. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 89, p. 991–1004, 2017.

WINTER, C. A., RISLEY, E. A., NUSS G. W. Carrageenin-Induced Edema in Hind Paw of the Rat as an Assay for Antiinflammatory Drugs. **Antiinflammatory Assay**, v. 111, p. 544-47, 1962.

YONG, Y. K., SULAIMAN, N., HAKIM, M. N., LIAN, G. C., ZAKARIA, Z. A., OTHMAN, F., YONG, Z. A. Suppressions of Serotonin-Induced Increased Vascular Permeability and Leukocyte Infiltration by *Bixa Orellana* Leaf Extract. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1-7, 2013.

DE YOUNG, L. M., KHEIFETS, J. B., BALLARON, S. J., YOUNG, J. M. Edema and Cell Infiltration in the Phorbol Ester-Treated Mouse Ear Are Temporally Separate and Can Be Differentially Modulated by Pharmacologic Agents. **Agents and Actions**, v. 26, n. 3–4, p. 335–41, 1989.

ZHAI, B., CLARK, J., LING, T., CONNELLY, M., MEDINA-BOLIVAR, F., RIVAS, F. Antimalarial Evaluation of the Chemical Constituents of Hairy Root Culture of *Bixa Orellana* L. **Molecules**, v. 19, n. 1, p. 756–66, 2014.

8. ANEXO I - CEUA/BIO - UFPR #1087



Ministério da Educação
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
Setor de Ciências Biológicas
Comissão de Ética no Uso de Animais
(CEUA)



Nº 1087

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná (CEUA/BIO – UFPR), instituída pela Resolução Nº 86/11 do Conselho de Ensino Pesquisa e Extensão (CEPE), de 22 de dezembro de 2011, **CERTIFICA** que os procedimentos utilizando animais no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com a Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais para fins Científicos e Didáticos (DBCA) estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e com as normas internacionais para a experimentação animal.

STATEMENT

The Ethics Committee for Animal Use from the Biological Sciences Section of the Federal University of Paraná (CEUA/BIO – UFPR), established by the Resolution Nº 86/11 of the Teaching Research and Extension Council (CEPE) on December 22nd 2011, **CERTIFIES** that the procedures using animals in the research project specified below are in agreement with the Brazilian Guidelines for Care and Use of Animals for Scientific and Teaching purposes established by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA) and with the international guidelines for animal experimentation.

PROCESSO/PROCESS: 23075.192413/2017-90

APROVADO/APPROVAL: 15/08/2017 – R.O. 07/2017

TÍTULO: Efeito do potencial efeito antinociceptivo e anti-inflamatório da bixina isolada das sementes de *Bixa orellana* Linné.

TITLE: Study of the potential antinociceptive and antiinflammatory effect of bixin isolated from *Bixa orellana* Linné seeds.

AUTORES/AUTHORS: Joice Maria da Cunha, Carlos Henrique Alves Jesus, Daiany Darlly Bello Redivo, Samanta Daliana Golin Pacheco.

DEPARTAMENTO/DEPARTMENT: Farmacologia

Prof. Dra. Katya Naliwaiko
Coordenadora da CEUA