

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ROSA HELENA MORAES SILVA

**ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DE *Borreria verticillata* (L.) G. Mey. E
MODO DE INTERAÇÃO COM A CICLOXIGENASE-2 (COX-2) E
RECEPTOR N-metil-D-aspartato (NMDA)**

São Luís

2016

ROSA HELENA MORAES SILVA

**ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DE *Borreria verticillata* (L.) G. Mey. E
MODO DE INTERAÇÃO COM A CICLOXIGENASE-2 (COX-2) E
RECEPTOR N-metil-D-aspartato (NMDA)**

Dissertação apresentada ao Mestrado de
Ciências da Saúde como requisito para
obtenção do título de Mestre em Ciências da
Saúde.

Orientador: Prof. Dr. João Batista Santos
Garcia

Co-orientador (a): Prof. Dr. Maria do Socorro de
Sousa Cartágenes

São Luís
2016

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Silva, Rosa Helena Moraes.

Atividade antinociceptiva de *Borreria verticillata* L.
G. Mey. e modo de interação com a cicloxigenase COX-2 e
receptor N-metil-D-aspartato NMDA / Rosa Helena Moraes
Silva. – 2016.

42 p.

Coorientador(a): Maria do Socorro de Sousa Cartágenes.

Orientador(a): João Batista Santos Garcia.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-graduação em
Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão,
São Luís, 2016.

1. *Borreria verticillata*. 2. COX-2. 3. Docagem
molecular. 4. Receptor NMDA. 5. Simulações de dinâmica
molecular. I. Cartágenes, Maria do Socorro de Sousa. II.
Garcia, João Batista Santos. III. Título.

ROSA HELENA MORAES SILVA

**ATIVIDADE ANTINOCICEPTIVA DE *Borreria verticillata* (L.) G. Mey. E
MODO DE INTERAÇÃO COM A CICLOXIGENASE-2 (COX-2) E
RECEPTOR N-metil-D-aspartato (NMDA)**

Dissertação apresentada ao Mestrado de
Ciências da Saúde como requisito para
obtenção do título de Mestre em Ciências da
Saúde.

São Luís, ____ de _____ de 2016.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. João Batista Santos Garcia
Universidade Federal do Maranhão-UFMA
Orientador

Prof. Dr. Denise Fernandes Coutinho
Universidade Federal do Maranhão-UFMA

Prof. Dr. Wanderson Silva Pereira
Universidade Federal do Maranhão-UFMA

Prof. Dr. João Nogueira Neto
Hospital Universitário da Universidade
Federal do Maranhão-HUUFMA

São Luís
2016

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu pai, José Ribamar C. Silva (*in memoriam*), por todo seu amor, carinho e incentivo. Sei que estava cansado, mas lutamos e ficamos juntos até o fim. Conto os minutos e segundos....

AGRADECIMENTOS

Primeiro agradeço a Deus e Nossa Senhora pelas oportunidades, ajuda, conforto, consolo e por todos os objetivos alcançados.

Aos meus pais, Roselia Maria e José Ribamar (*in memoriam*), pela vida, criação, ajuda, compreensão, amizade, paciência e seu amor. Sou eternamente grata a vocês.

Em especial ao meu paivô, Paulo da Trindade (*in memoriam*), por todo carinho, momentos felizes e oportunidades.

Ao prof. João Batista Santos Garcia pela oportunidade, confiança, ensinamentos, ajuda e paciência em todos os momentos.

A Prof. Maria do Socorro de S. Cartágenes pela oportunidade, confiança, ajuda, compreensão, paciência e amizade. Obrigada por interceder e estender a mão em todos os momentos, inclusive os pessoais.

A todos que fazem e fizeram parte do Laboratório de Estudo Experimental da Dor (LEED), em especial a minha querida amiga Nathália de Fátima Melo Lima por todo seu esforço, ajuda e momentos ao meu lado.

Aos “loucos e insanos”, Alberto Lopes, Cleydlenne Costa, José Wilson, Ludmila Santos e Ricardo Martins por fazerem parte e tornarem tudo isso possível. Ricardo, obrigada por fazer parte deste trabalho. Wil e Ludy, obrigada pela gentileza e por estarem sempre aptos a ajudar. Alberto e Cley, obrigada por terem adicionado química, estruturas em 3D, esforço, incentivo, loucura e dedicação.

Aos meus amigos, Alanna Nascimento, Hana Pinheiro, Emily Silva, Sílvia Regina e Kerlisson Igor pelos melhores anos de brincadeiras, estudos, palavras amigas, choros e risos.

A Rafael da Cruz Santana por todos os anos de união, amizade, companheirismo e amor.

A todos que direta e indiretamente fizeram parte dessa conquista.

MUITO OBRIGADA!

*“Para realizar grandes conquistas, devemos não apenas agir, mas também sonhar;
não apenas planejar, mas também acreditar”*

Anatole France.

“Tudo o que sou, desejo que a vós pertença....

Eu hoje vos dou meu coração....

Como filha e propriedade vossa, Amém “

Consagração de Nossa Senhora

RESUMO

Borreria verticillata (L.) G. Mey espécie conhecida como vassourinha apresenta atividade antibacteriana, antimalárica, hepatoprotetora, antioxidante, analgésica e anti-inflamatória, entretanto sua atividade antinociceptiva é pouco estudada. O objetivo deste trabalho foi avaliar atividade antinociceptiva do extrato hidroalcoólico bruto (EHBv) e fração acetato de etila (FAc) de *B. verticillata* realizando estudos *in vivo* e *in silico*. Para avaliação *in vivo*, foram utilizados os testes do edema de pata, contorções abdominais, formalina e tail flick. Ratos Wistar e camundongos Swiss foram tratados via oral e divididos em 6 grupos: controle-NaCl 0.9%(CTL), memantina 10 mg/Kg (MEM), indometacina 10 mg/Kg (INDO), EHBv 500 mg/kg (EHBv 500), FAc 25 mg/Kg (FAc 25), FAc 50 mg/Kg (FAc 50). O tratamento com EHBv 500, FAc 25 e 50 apresentou efeito antiedematogênico e antinociceptivo periférico. Para avaliação *in silico* os compostos identificados na FAc foram submetidos a docagem molecular, o melhor composto foi selecionado para simulações de dinâmica e testado *in vivo* molecular. O ácido ursólico apresentou melhores parâmetros de afinidade com COX-2, GluN1a e GluN2B durante a docagem molecular. Nas simulações por dinâmica molecular, o ácido ursólico apresentou alta frequência de contatos com Arg120 e Glu524 do local ativo da COX-2 e com o domínio LBD da Glun1a e GluN2B podendo com isso, impedir a ativação da COX-2 e do receptor NMDA. O tratamento com ácido ursólico 10mg/Kg (AU) apresentou efeito antinoceceptivo periférico e central. Sugere-se que o efeito antinociceptivo periférico de *B. verticillata* pode ser atribuído predominantemente à ação de compostos com ação anti-inflamatória. O ácido ursólico é o principal composto ativo, sendo um composto promissor para o desenvolvimento de fármacos inibidores da COX-2 e antagonistas dos receptores NMDA.

Palavras-chaves: *Borreria verticillata*. COX-2. Receptor NMDA. Docagem molecular. Simulações de dinâmica molecular.

ABSTRACT

Borreria verticillata (L.) G. Mey species known as broom vassourinha has antibacterial, antimalarial, hepatoprotective, antioxidative, analgesic and anti-inflammatory activities; however, its antinociceptive action still demands more thorough investigation. The present study was to assess the antinociceptive activity of *B. verticillata* crude hydroalcoholic extract (EHBv) and the ethyl acetate fraction (FAC) by means of *in vivo* and *in silico* studies. *In vivo* assessment included the paw edema test, the writhing test, the formalin test and the tail flick test. Wistar rats and Swiss mice were divided into 6 groups and given the following treatments oral: 0.9% NaCl control group (CTL), 10 mg/kg memantine (MEM), 10 mg/kg indomethacin (INDO), 500 mg/kg EHBv (EHBv 500), 25 mg/kg FAC (FAC 25), 50 mg/kg and FAC (FAC 50). EHBv, FAC 25 and 50 treatments exhibited anti-edematous and peripheral antinociceptive effects. For *in silico* assessment, compounds found in FAC were subjected to molecular docking, and the leading compound was selected for molecular dynamics (MD) simulations. Ursolic acid exhibited better affinity parameters with the enzyme COX-2 and the NMDA receptor subunits GluN1a and GluN2B on molecular docking. In MD simulations, AU exhibited highly frequent interactions with residues Arg120 and Glu524 in the COX-2 active site and NMDA, whereby it might prevent COX-2 and NMDA receptor activation. Treatment with ursolic acid 10mg / Kg (AU) showed peripheral and central antinociceptive effect. The antinociceptive effect of *B. verticillata* might be predominantly attributed to peripheral actions, including the participation of anti-inflammatory components. Ursolic acid is the main active component and seems to be a promising source of COX-2 inhibitors and NMDA receptor antagonists.

Keywords: *Borreria verticillata*. COX-2. NMDA receptor. Molecular docking. Molecular dynamics simulations.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Referencial teórico

Figura 1. Espécie vegetal <i>Borreria verticillata</i> (L.) G. Mey.....	17
---	----

Artigo científico

Fig 1. Edema de pata induzido pela administração subplantar de carragenina 1% em camundongos tratados via oral com NaCl 0.9%, indometacina 10 mg/kg, memmanatina 10 mg/Kg, EHBv 500 mg/Kg e FAc (25mg/kg e 50 mg/Kg).....	27
Fig 2. Contorções abdominais induzidas pela administração intraperitoneal de ácido acético 0.8% (10 ml/Kg) em camundongos tratados via oral com NaCl 0.9%, indometacina 10 mg/kg, memantina 10 mg/Kg, EHBv 500 mg/Kg e FAc (25mg/kg e 50 mg/Kg).....	27
Fig 3. Teste da formalina induzido pela administração de formalina subplantar em camundongos tratados via oral com NaCl 0.9%, indometacina 10 mg/kg, memantina 10 mg/Kg, EHBv 500 mg/Kg e FAc (25mg/kg e 50 mg/Kg).....	28
Fig 4. Tail flick teste em ratos tratados via oral com NaCl 0.9%, indometacina 10 mg/kg, memantina 10 mg/Kg, EHBv 500 mg/Kg e FAc (25mg/kg e 50 mg/Kg).....	28
Fig 5. Conformação espacial obtida por docagem molecular do ácido ursólico (amarelo) e indometacina (azul) com a enzima COX-2 (PDB: 1DDX).....	29
Fig 6. Conformação espacial obtida por docagem molecular dos ligantes ácido ursólico (amarelo) e memantina (verde) com o receptor N-metil-D-aspartato (NMDA).....	29
Fig 7. Frequência de contatos hidrofóbicos (verde) e pontes de hidrogênio (laranja) entre ácido ursólico + COX-2 (A) e indometacina + COX-2 (B).....	30
Fig 8. Frequência de contatos hidrofóbicos (verde) e pontes de hidrogênio (laranja) entre ursólico + GluN1a (A), ácido ursólico + GluN2B (B), memantina + GluN1a (C) memantina + GluN2B (D).....	31
Fig 9. Edema de pata induzido pela administração subplantar de carragenina 1% em camundongos tratados via oral com NaCl 0.9%, indometacina 10 mg/kg, memmanatina 10 mg/Kg e ácido ursólico 10 mg/Kg.....	32

Fig 10. Tail flick teste em ratos tratados via oral com NaCl 0.9%, indometacina 10 mg/kg, memantina 10 mg/Kg, EHBv 500 mg/Kg e e ácido ursólico 10 mg/Kg

..... 32

Fig S1. Sobreposição da estrutura cristalográfica código PDB 4RUT (COX-2 complexada com o ácido araquidônico) com o último frame da simulação por DM do ácido ursólico com a COX-2. (A) Modo de ligação do ácido ursólico (amarelo) e ácido araquidônico (verde) na COX-2. COX-2 representada por superfície molecular transparente. (B) Expansão do modo de ligação dos ácidos ursólico e araquidônico com resíduos do local ativo Arg120 (azul), Gly524 (vermelho), Ser530 (laranja) e Tyr385 (roxo) representados em varetas..... 34

LISTA DE TABELAS

Artigo científico

Tabela 1. Interações por docagem molecular da indometacina, memantina e compostos identificados na FAc com COX-2, GluN1a e GluN2B.....	26
Tabela 2. Interações do ácido ursólico, memantina e indometacina para as conformações escolhidas por docagem molecular.....	26
Tabela S1. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV-Vis) dos constituintes identificados no extrato hidrolacoólico (EHBv) e fração acetato de etila (FAc) de <i>B. verticillata</i>	33
Tabela S2. Identificação dos constituintes presentes a fração acetato de etila (FAc) de <i>B. verticillata</i>	33

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA	Ácido araquidônico
AINES	Anti-inflamatórios não esteroidais
AlCl ₃	Cloreto de alumínio
BSTFA/TMCS	Bis-(trimetilsilil) trifluoroacetamida com trimetilclorossilano
AMPA	Receptor α -amino-3-hidroxi-5-metilsoxazol-4-propiónico
ATD	Domínio amino-terminal
ATP	Trifosfato de adenosina
Ca ²⁺ í	Íon cálcio
CB ₂	Receptores canabinóides
CGRP	Peptídeo relacionado com o gene da calcitonina
CG-MS	Cromatografia gasosa acoplado ao espectro de massas
CENAPAD/UFC	Centro Nacional de Processamento de Alto Desempenho da Universidade Federal do Ceará
CLAE-UV-Vis	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de ultravioleta visível
COX	Cicloxigenase
COX-1	Cicloxigenase 1
COX-2	Cicloxigenase 2
CTD	Domínio carboxi-terminal
CTL	Controle
DM	Dinâmica molecular
DL ₅₀	Dose letal
EBV	Extrato hidroalcoólico bruto
FAc	Fração acetato de etila
GABA _A	Receptor ácido gama amino-butírico A
GluN1	Subunidade 1 do receptor NMDA
GluN2	Subunidade 2 do receptor NMDA
H ⁺	Íons hidrogênio
HTS	<i>High Through Put Screening</i>
IFN- γ	Interferon gama
IGluR	Receptor ionotrópicos
IL-1	Interleucina 1

IL-1 β	Interleucinas 1 β
IL-2	Interleucina 2
IL-6	Interleucina 6
IL-10	Interleucina 10
INDO	Indometacina
i-NOS	Óxido nítrico sintase induzível
KA	Receptor ácido cainato
K ⁺	Íon potássio
LOX-5	Lipoxogenase 5
LBD	Domínio de ligação extracelular
MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitógeno
MAR	Herbário do Maranhão
MPO	Mieloperoxidase
MEM	Memantina
MGLuR	Receptores metabotrópicos
Mg ²⁺	Íon magnésio
Na ⁺	Íon sódio
NaCl	Cloreto de sódio
Na ₂ SO ₄	Sulfato de sódio
NF- $\kappa\beta$	Fator de nuclear kappa- β
NMDA	Receptor N-metil-D-aspartato
NO	Óxido nítrico
OMS	Organização Mundial da Saúde
PDB	Protein Data Bank
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
PGG ₂ -	Prostaglandina G ₂
PGH ₂	Prostaglandina H ₂
PGI ₂	Prostaciclina
pH	Potencial hidrogeniônico
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
PKA	Proteinocinase A
PKC	Proteinocinase C
PNPIC	Política de Práticas Integrativas e Complementares
PNPMF	Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos

RMN	Ressonância magnética nuclear
ROs	Espécies reativas de oxigênio
SNC	Sistema nervoso central
SUS	Sistema Único de Saúde
TCF	Teor de compostos fenólicos
TFD	Teoria do Funcional da Densidade
TFT	Teor de flavonóides totais
TMD	Domínio transmembrana
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
TRPV1	Receptor vanilóide de potencial transitório tipo 1
t-ACBD	Ácido trans-1-aminociclobutano-1,3-dicarboxílico
UFMA	Universidade Federal do Maranhão
VS	<i>Virtual Screening</i>
3D	Três dimensões
5-HT ₃	Receptor de serotonina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	13
2	REFERENCIAL TEÓRICO	15
2.1	Uso de plantas medicinais.....	15
2.2	<i>Borreria verticillata</i> (L.) G. Mey.....	16
2.3	Métodos experimentais para estudo da atividade analgésica e anti-inflamatória	18
2.4	Ciclooxigenase 2 (COX-2) e receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) na dor	19
2.5	Estudo <i>in silico</i>	21
3	OBJETIVOS	25
3.1	Geral	25
3.2	Específicos.....	25
	REFERÊNCIAS.....	26
	Artigo: Atividade antinociceptiva de <i>Borreria verticillata</i> : estudo <i>in vivo</i> e <i>in silico</i>	34
4	CONCLUSÃO.....	35
	ANEXO A- INSTRUÇÕES PARA SUBMISSÃO “PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA.....	36
	ANEXO B- SUBMISSÃO DO ARTIGO.....	42

1. INTRODUÇÃO

A dor representa um sistema importante para alertar o organismo sobre um dano tecidual a partir da sinalização mediada por receptores periféricos de alto limiar, os denominados nociceptores (NICKEL et al., 2012).

Seu mecanismo fisiopatológico envolve diversos componentes biológicos dentre os quais, estão a ativação da cicloxigenase-2 (COX-2) e dos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA). A COX-2 contribui para a hipersensibilidade através da produção de prostaglandinas E_2 que são responsáveis pela ativação e sensibilização de neurônios sensoriais periféricos e centrais (RICCIOTTI; FITZGERALD, 2011). O receptor NMDA desempenha papel importante na sensibilização central através da amplificação nociceptiva na medula, aumento da condutância e excitabilidade (ARONOFF, 2016; PHANG; TAN, 2013).

Várias classes de medicamentos são amplamente utilizadas para o controle da dor. Entre elas estão os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) que inibem a enzima COX, reduzindo assim a produção das prostaglandinas e os antagonistas dos receptores NMDA que inibem a sensibilização central (BASHIR; COLVIN, 2013; PHANG; TAN, 2013). Entretanto, efeitos adversos nos sistemas nervoso, gastrointestinal, renal, cardíaco e hepático limitam a utilização dessas classes de medicamentos (DWIVEDI et al., 2015).

O uso de plantas medicinais tem sido uma prática comum utilizada como alternativa para o tratamento de doenças. Estima-se que o mercado mundial de medicamentos derivados de plantas esteja em torno de bilhões de dólares por ano. Diante disso, novas abordagens tecnológicas têm sido empregadas para avaliar as propriedades farmacológicas de extratos e princípios ativos derivados de espécies vegetais (DUTRA et al., 2016).

Abordagens computacionais como a docagem e dinâmica moleculares são exemplos desse avanço tecnológico. A docagem molecular é uma técnica computacional utilizada para prever a orientação mais favorável de um ligante flexível ligado a um receptor rígido (CHEN, 2014). Entretanto, os receptores são biologicamente flexíveis, sendo capazes de alterar sua conformação em resposta a mudanças no pH, concentração de íons e quando ligados a agonistas e antagonistas, devido modulações alostéricas (SNEHA; DOSS, 2016). Como

conseqüência, usa-se a dinâmica molecular que pode atribuir flexibilidade ao receptor e ligante (VERLI, 2014).

Contudo, para aplicação dessas técnicas torna-se necessário o conhecimento das conformações dos alvos macromoleculares em três dimensões (3D). Para obtenção das estruturas em 3D, utilizam-se técnicas como a cristalografia de raios-X e ressonância magnética nuclear (RMN). Apesar de avanços nessas técnicas, limitações persistem e por vezes inviabilizam a utilização de estruturas cristalográficas em diversos estudos, tornando a modelagem por homologia uma ferramenta alternativa eficiente na predição de estruturas 3D. A técnica é baseada na semelhança das macromoléculas, onde a estrutura 3D da molécula de interesse é construída com base na estrutura de seus homólogos (KALYAANAMOORTHY; CHEN, 2014).

A bioinformática fornece informações importantes para o processo de descoberta de fármacos permitindo predizer interações de moléculas presente em plantas medicinais e alvos de interesse. Além disso, apresentam boa concordância com ensaios farmacológicos, contribuindo para o direcionamento experimental pré-clínico. Ainda, levando-se em consideração os fatores que colaboram para os mecanismos e prevalência da dor, além do uso de plantas medicinais como alternativa analgésica, este trabalho objetivou avaliar atividade farmacológica do extrato hidroalcoólico bruto e da fração acetato de etila de *Borreria verticillata* (L.) G. Mey, e a predição de compostos isolados através da docagem e dinâmica moleculares em relação à enzima ciclooxygenase-2 (COX-2) e receptor N-metil-D-aspartato (NMDA).

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Uso de plantas medicinais

A Organização Mundial da Saúde (OMS) considera que as plantas medicinais são importantes instrumentos da assistência farmacêutica e expressa sua posição a respeito da necessidade de valorização da sua utilização no âmbito sanitário ao observar que 70% a 90% da população nos países em desenvolvimento dependem delas no que se refere à Atenção Primária à Saúde (WHO, 1993; 2011).

No Brasil, o uso de plantas medicinais tem um papel importante nos cuidados primários de saúde, principalmente nas comunidades sem acesso fácil a medicamentos (AMERI et al, 2015). Em 2006, o governo brasileiro lançou a Política de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS) e a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) objetivando a ampliação das opções terapêuticas, melhoria da atenção à saúde aos usuários do SUS e para reforçar o uso racional e seguro da fitoterapia. Em consequência, em 2009 houve o lançamento em 2009 do Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (BRASIL, 2012).

Estima-se que cerca de 80% da população mundial utilize produtos à base de plantas medicinais nos seus cuidados com a saúde, por estarem muito distantes dos centros de saúde, por não possuírem recursos para adquirir os medicamentos prescritos ou na busca pelo consumo de produtos naturais (VEIGA JÚNIOR, 2008).

Apesar da rica biodiversidade, o Brasil possui apenas um fitoterápico produzido a partir de uma espécie da flora brasileira e onde todas as fases de desenvolvimento ocorreram em território nacional. O anti-inflamatório tópico Acheflan® (Laboratório Aché), produzido a partir da planta *Cordia verbenacea*, registrado na ANVISA em 2004 e lançado no mercado em 2005, representava 44% das prescrições médicas dentro dos anti-inflamatórios tópicos (CALIXTO; SIQUEIRA, 2008).

Além disso, espécies vegetais como *Harpagophytum procumbens* DC (garra do diabo) utilizado para dores articulares e lombares; *Salix alba* L. (salgueiro branco) utilizado como anti-térmico, anti-inflamatório e analgésico; *Matricaria recutita* L. (camomila) utilizado como anti-inflamatório tópico e *Uncaria tomentosa* (Willd. ex Roem. &Schult.) DC. (unha de gato) utilizado como anti-inflamatório foram

divulgadas na lista de medicamentos fitoterápicos e produtos tradicionais fitoterápicos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2014).

Contudo, enquanto há um amplo uso das plantas medicinais e da fitoterapia, deve-se considerar a necessidade de mais estudos para alicerçar o seu uso correto sendo necessário o desenvolvimento de estudos e protocolos para avaliar a eficácia e segurança das plantas medicinais e fitoterápicos (AMERI et al., 2015).

2.2 *Borreria verticillata* (L.) G. Mey.

A família Rubiaceae compreende uma das maiores famílias de angiospermas. No Brasil, esta família inclui cerca de 130 gêneros e 1500 espécies, sendo atualmente classificada em três subfamílias e mais de 43 tribos. O gênero *Borreria* compreende cerca de 250-300 espécies distribuídas nas regiões tropicais e subtropicais. Além disso, 36 espécies de *Borreria* foram registradas, dos quais 22 são endêmicas (CONSERVA; FERREIRA, 2012).

No Brasil a espécie vegetal *Borreria verticillata* (L.) G. Mey (Fig. 1) é conhecida como poaia, poaia preta, poaia miúda, cordão-de-frade e vassourinha (FERREIRA JÚNIOR, LEMOS, CONSERVA, 2012). Pertence a classe *Equisetopsida* C. Agardh, ordem *Gentianales* Juss. ex Bercht. & J. Presl e família *Rubiaceae* Juss. Seu uso tradicional é empregado na diabetes, emese, dermatoses, reumatismos, infecções e como antipirético e analgésico (VIEIRA et al., 1999; PEREIRA et al., 2005; FERREIRA; ROSA, 2009).

Estudos demonstram que *B. verticillata* apresentou atividade antibacteriana contra *Sarcina lutea*, *Vibrio cholerae* e *Staphylococcus aureus* (MAYNART et al., 1980); o extrato metanólico das raízes apresentou atividade contra 6 diferentes tipos de cepas de *Pseudomonas aeruginosas* (NETO et al., 2002) e apresentou atividade contra *Staphylococcus aureus*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Streptococcus pneumoniae* e *Gardnerella vaginalis* (BALDÉ et al., (2015).

Outros trabalhos demonstraram que *B. verticillata* apresentou atividade antimalárica frente *Plasmodium falciparum* (DETHER; ERANDE; RANJAN, 2013); atividade anti-inflamatória, analgésica periférica e central (ABUDULLAHI-GERO et al., 2014a); antioxidante (ABUDULLAHI-GERO et al., 2014b) e hepatoprotetora (MURTALA et al., 2015). Esses efeitos foram atribuídos principalmente à presença de alcalóides, terpenos e flavonóides, entretanto, outros compostos como as

saponinas, esteróides, taninos, glicosídeos e iridóides (CONSERVA; FERREIRA, 2012; USHIE et al., 2013) também contribuem para os efeitos biológicos de *B. verticillata*.

Alcalóides (POUSSET et al., 1973; SAINTY et al., 1981; BALDÉ et al., 1991), iridóides (VIEIRA et al., 1999) e terpenos (DELAVEAU; JACCQUEMIN, 1976; BENJAMIN, 1979, 1980; BEVER et al., 1983; MOREIRA et al., 2010) são compostos presentes nessa espécie. Ogunwande et al. (2010) identificou no óleo essencial desta espécie o fitol (56,3%), 1,8-cineol (20,4%), α -pineno (7,1%) e p-cimeno (4,0%).

Compostos como o iridóide esperulosídeo possui efeitos anti-inflamatórios, atua via fator nuclear kappa β (NF- κ B) e proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPK) inibindo significativamente os níveis de TNF- α , IL-1 β e IL-6 *in vitro* e *in vivo*, o edema pulmonar e atividade da mieloperoxidase (MPO) (QIU et al., 2016). Além disso, terpenos como o cariofileno apresentam atividade anti-inflamatória por interferir na migração de neutrófilos, reduzir a produção de TNF- α , a expressão de COX-2, iNOS e IL-1 β e atividade analgésica por ser agonista dos receptores canabinóides (CB₂) (FERNANDES et al., 2007; PAULA-FREIRE et al., 2014).

Diante das atividades biológicas apresentadas por esta espécie e do seu potencial na redução da dor, o detalhamento a cerca da atividade antinociceptiva de *B. verticillata* merece mais estudos.



Figura 1. Espécie vegetal *Borreria verticillata* (L.) G. Mey.

2.3 Métodos experimentais para estudo da atividade analgésica e anti-inflamatória

Vários modelos *in vivo* são utilizados na pesquisa de compostos com atividade analgésica e anti-inflamatória. Em geral, avaliam-se parâmetros como edema, migração leucocitária, permeabilidade vascular e dor como ponto de partida para caracterização farmacológica de novos compostos (LAPA et al., 2002).

O edema de pata induzido em ratos ou camundongos, descrito por Winter et al. (1962) é desenvolvido a partir da administração subplantar de carragenina na pata posterior é um modelo simples e amplamente utilizado para determinar a atividade anti-inflamatória de compostos (PRAJAPATI et al., 2014). É um modelo que produz edema, migração de neutrófilos e liberação de citocinas (BONET et al, 2013). O modelo é caracterizado por duas fases: a fase inicial que é observada até 2 hora após a indução e está relacionada com a liberação de histamina, serotonina e bradicinina e a fase tardia após 2 hora, sendo caracterizada pelo aumento da produção de prostaglandinas (PGs) a partir da indução da COX-2 (SADEGHI et al., 2011; PRAJAPATI et al., 2014). Citocinas pró-inflamatórias como a IL-1 e IL-6, TNF- α , ativação de neutrófilos com produção de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico, também contribuem para manutenção do processo inflamatório (PRAJAPATI et al., 2014). Além disso, o método induz hiperalgesia por ativação direta dos receptores TRPV1 (BONET et al., 2013) e alodinia térmica e mecânica (TAMADDONFARD et al., 2013).

O modelo de contorções abdominais induzidas por ácido acético (KOSTER et al., 1959) é um método de dor visceral e têm sido utilizado para avaliar fármacos que possuem efeito analgésico periférico, a partir da estimulação de receptores peritoneais locais, mastócitos e liberação de prostaglandinas, leucotrienos, serotonina, histamina, cininas e íons H^+ e K^+ (OLONODEN; ADERIBIGBE; BAKRE, 2015).

A dor induzida pela formalina evidência duas fases da sensibilidade dolorosa (HUNSKAAR; HOLE, 1987). A primeira fase, dor neurogênica, é iniciada aos primeiros 5 minutos devido a um efeito direto sobre os nociceptores e consequente ativação das fibras C, sendo suprimida por analgésicos de ação central. A segunda fase, dor inflamatória é iniciada aos 15-30 minutos é dependente da combinação de alterações inflamatórias no tecido periférico e de alterações

funcionais no corno dorsal da medula espinal, iniciada pelas fibras C durante a primeira fase (KHOSHDEL; TAKHSHID; OWJI, 2016).

O *tail-flick* teste desenvolvido por D'Amour e Smith (1941) é utilizado para avaliar a atividade antinociceptiva central e refere-se predominantemente aos reflexos medulares e supra-espinhais (MANSOURI et al., 2013). O teste é baseado em um estímulo térmico aplicado na cauda do animal. O movimento da cauda é controlado pelo arco reflexo da medula espinal e, fármacos como os opióides, conseguem inibir o reflexo caudal dos animais (TINGSUSAEM et al., 2015).

2.4 Ciclooxygenase-2 (COX-2) e receptor N-metil-D-aspartato (NMDA) na dor

A enzima ciclooxygenase (COX) participa dos processos inflamatórios e dolorosos. A COX, isoforma 1 (COX-1) e isoforma 2 (COX-2), são responsáveis pela metabolização do ácido araquidônico (AA), resultante da ação da fosfolipase A₂ (PLA₂) nos lipídeos de membrana produzindo os intermediários, prostaglandina G₂ (PGG₂) e prostaglandina H₂ (PGH₂), que serão isomerados a prostanóides como as prostaglandinas, prostaciclina e os tromboxanos (HOHJOH et al., 2014).

A isoforma COX-1 é constitutivamente expressa em vários tecidos e induz a produção de prostaglandinas envolvidas na regulação de funções fisiológicas como a citoproteção da mucosa gástrica, homeostasia renal e função plaquetária. A COX-2 é frequentemente referida como a isoforma induzível responsável pela produção de prostaglandinas durante a inflamação (CEBOLA; PEINADO, 2015).

A COX-2 é constitutivamente expressa em baixos níveis em neurônios da medula espinal e células da glia, sendo supra regulada no sistema nervoso central (SNC) em resposta a fatores inflamatórios, hormonais e fatores de crescimento. Considera-se que prostaglandina E₂ (PGE₂) é o principal prostanóide pró-inflamatório envolvido na hipersensibilidade dolorosa modulando as vias nociceptivas periférica e central. A PGE₂ ativa na periferia os canais de sódio e cálcio, reduz o fluxo de potássio, ativam receptores purinérgicos, sensibiliza e potencializa os receptores de potenciais transitórios do tipo vanilóide 1 (TRPV1) aumenta a sensibilidade de receptores a bradicinina via proteína quinase A (PKA) e proteína quinase C (PKC) produzindo assim, hiperalgesia e alodinia. A sensibilização central da PGE₂ pré-sináptica ocorre pela liberação de cálcio, glutamato, substância P e do peptídeo relacionado ao gene de calcitonina (CGRP).

Em nível pós-sináptico a PGE_2 potencializa a ativação dos receptores NMDA, AMPA e bloqueia a liberação de neurotransmissores inibitórios como a glicina (CHEN; YANG; GROSSER, 2013)

Estruturalmente a COX-2 é considerada um dímero formado por 581 aminoácidos, homólogo e com 60% de identidade de sequência com a COX-1. Seus monômeros são formados três domínios: o N-terminal que forma o domínio de ligação do fator de crescimento epidérmico; um domínio de ligação à membrana e um sítio catalítico que contém os sítios ativos da ciclooxigenase e uma peroxidase. O sítio ativo é formado por um canal hidrofóbico que se estende a partir do domínio de ligação da membrana até o domínio catalítico (KURUMBAIL et al., 1996; ROUZER; MARNETT; 2009; ZARGHI; ARFAEI, 2011).

A terapia com os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) é utilizada por inibir a ação da COX- 1 e COX-2, fator de necrose tumoral ($\text{TNF-}\alpha$) e óxido nítrico sintase induzível (iNOS), reduzindo com isso, a vasodilatação e a dor gerados pelas prostaglandinas (PGE_2) e prostaciclina (PGI_2). Portanto, os AINEs são clinicamente utilizados para o tratamento da dor, contudo causam efeitos adversos gastrointestinais, renais e cardiovasculares entre outros (DWIVEDI et al., 2015). A indometacina é um dos AINEs derivados do ácido acético que inibe a COX de forma competitiva, reversível e não seletiva, reduzindo com isso a síntese de prostaglandinas (PGE_2) (JOHNSTON et al., 2012)

A transmissão de sinais neuronais como a dor, acontece pela liberação de neurotransmissores a partir da propagação dos potenciais de ação gerada por íons como cálcio (Ca^{2+}) e sódio (Na^+) (WANG; GROFFER, 2010). Em resposta aos potenciais de ação, neurotransmissores excitatórios como o ácido L-glutamato e aspartato são liberados no corno dorsal da medula espinal. O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório, agindo na transmissão rápida entre os neurônios sensoriais primários e secundários, através dos receptores metabotrópicos (mGluR) e ionotrópicos (iGluR). Os iGluR são representados pelos receptores N-metil-D-aspartato (NMDA), α -amino-3-hidroxi-5-metilsoxazol-4-propiónico (AMPA) e ácido cainato (KA) (ROCHA et al., 2007).

O receptor NMDA é um heterotetrâmero composto cada um por duas subunidades GluN1 e GluN2. A subunidade GluN1 é ativada pela glicina e a subunidade GluN2 é ativada pelo L-glutamato. O íon magnésio (Mg^{2+}) bloqueia o canal do receptor e sua remoção proporciona o influxo de cálcio, sódio e propagação

da excitabilidade neuronal. As subunidades do receptor são moduladas por 4 domínios: domínio amino-terminal (ATD) que contribui para o controle da velocidade de abertura, fechamento e contém sítios para compostos alostéricos; um domínio carboxi-terminal (CTD) que facilita a sinalização intracelular para neuroplasticidade; domínio de ligação extracelular (LBD) onde ocorre ligação de agonistas e antagonistas que controlam a abertura do canal iônico e um domínio transmembrana (TMD) que dá forma heterotetrâmero do canal iônico (MUIR, 2010; KARAKAS; FURUKAWA, 2014; BOUVIER et al., 2015).

Além disso, o receptor NMDA é distribuído no sistema nervoso central e expressos em aferentes primários na pele, nos sistemas urogenitais e gastrointestinais, modulando a liberação de neurotransmissores nas terminações nervosas periféricas (BOUVIER et al., 2015). Também contribuem para atividade elétrica e de marcapasso no sistema cardiovascular, remodelação óssea pelos osteoblastos e osteoclastos, equilíbrio eletrolítico e regulação da pressão arterial pelos rins (HOGAN-CANN; ANDERSON, 2016).

O receptor NMDA é um componente chave na evolução e manutenção dos estados dolorosos. Com isso, bloqueadores destes receptores como a memantina são utilizados para o alívio da dor. A memantina exerce seu efeito antagonista, principalmente em nível pré-sináptico, reduz os potenciais de longo prazo, inibe receptores de acetilcolina e de serotonina 5-HT₃ e exerce efeitos anti-inflamatórios por reduzir a liberação de citocinas no sistema nervoso central e com isso, a sensibilização central (JOHSON, GLASGOW, POVYSHEVA, 2015). Outros antagonistas como a cetamina e dextrometorfano têm sido pesquisados por atenuarem a dor (MUIR, 2010).

2.5 Estudo *in silico*

O estudo de moléculas com propriedades terapêuticas capazes de representarem novos protótipos de fármacos é uma tarefa complexa pela multiplicidade de fatores que influenciam a resposta terapêutica de uma substância exógena. Estima-se que o custo para o desenvolvimento de uma única molécula bioativa é de 1,8 bilhões de dólares, sendo aprovados apenas 5-6 medicamentos por ano nos Estados Unidos. A razão mais comum para esse fracasso é a falta de eficácia e segurança dos medicamentos, os quais não foram aparentes nos ensaios pré-clínicos (CLEGGA; GABHANN, 2015).

Diante disso, as ferramentas biotecnológicas assumiram grande importância no desenvolvimento de novas moléculas bioativas. Em geral, o processo de descoberta de moléculas bioativas envolve a identificação, otimização das propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas e a seleção dos compostos líderes para o desenvolvimento posterior dos fármacos (GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010).

Considerando-se o expressivo número de alvos biológicos (proteínas alvo) promissores para o planejamento de fármacos, as técnicas de triagem biológica automatizada em alta escala (HTS - *High Through Put Screening*) e de triagem virtual (VS-*Virtual Screening*) aliada aos notáveis avanços da biologia estrutural e a disponibilidade de recursos computacionais de alto desempenho, os modelos computacionais ganharam grande importância dentre as ferramentas biotecnológicas, pois permitem incorporar variações no sistema ligante-receptor, permitindo com isso, o planejamento de novas abordagens experimentais (ZHENG et al., 2013; CLEGG; GABHANN, 2015; KASERER et al., 2015).

A modelagem molecular pode ser empregada no planejamento racional de fármacos seguindo duas abordagens: indireta e direta. A primeira é utilizada quando a estrutura do receptor é desconhecida; no entanto, os ligantes conhecidos são empregados para prever o local farmacofórico necessário para interagir com o receptor. Na segunda abordagem a estrutura do receptor é conhecida, mas a conformação do ligante dentro do receptor é desconhecida (GUIDO; ANDRICOPULO; OLIVA, 2010). A determinação estrutural em três dimensões (3D) de macromoléculas biológicas (em geral proteínas) por técnicas como a cristalografia de raios-X e ressonância magnética nuclear (RMN). Apesar de avanços nessas técnicas, limitações ainda persistem e a modelagem por homologia ou modelagem comparativa é uma das alternativas na predição de estruturas em três dimensões (FILHO; ALENCASTRO, 2003).

Assim a modelagem é baseada no fato de que proteínas homólogas – proteínas derivadas de um mesmo ancestral - apresentam similaridade estrutural. Com isso, é possível a determinação estrutural em 3D de uma “proteína de interesse” a partir de proteínas homólogas (FILHO; ALENCASTRO, 2003; CAVASOTTO; PHATAK, 2009). O processo de modelagem por homologia consiste na: identificação e seleção da proteína molde presente nos bancos de dados;

alinhamento das sequências de resíduos de aminoácidos; construção da proteína modelo; otimização do modelo e validação (VYAS et al., 2012).

A primeira etapa da modelagem é a identificação de proteínas com estruturas 3D conhecidas que possuam similaridade com a proteína de interesse. Essa identificação poderá ser baseada na família protéica ao qual pertence à proteína de interesse ou a partir de ferramentas de buscas que identificam proteínas moldes através do grau de identidade com a proteína de interesse. Posteriormente, é realizado o alinhamento das sequências de aminoácidos do molde com a proteína de interesse, permitindo prever estruturalmente as regiões conservadas e variáveis. A partir do alinhamento entre a proteína de interesse e o molde, é realizada a construção do modelo a partir da determinação em 3D dos átomos pertencentes às regiões conservadas, alças e cadeias laterais. A otimização e a validação permitem melhorar as interações desfavoráveis entre átomos e avaliar a qualidade da estrutura 3D final respectivamente (FILHO; ALENCASTRO, 2003; PITMAN; MENZ, 2006; VYAS et al., 2012).

Segundo Cavasatto e Phatak (2009), os moldes construídos com 50% de similaridade, apresentam precisão suficiente para aplicação na descoberta de novas drogas. Com isso, a modelagem por homologia é utilizada para prever interações do ligante-receptor, auxiliar em experiências de mutagênese, racionalizar dados entre estrutura e atividade, e orientar na otimização de moléculas líderes.

A técnica de modelagem comparativa possui limitações como: estrutura molde indisponível; sequências moldes com qualidade insuficiente para construção do modelo e baixo grau de similaridade entre o molde e a proteína de interesse (< 30%) (PITMAN; MENZ, 2006; VERLI, 2014).

A docagem molecular ou docking ou atracamento molecular consiste na predição da conformação e a orientação de moléculas a partir das interações entre ligante-receptor, por meio das menores energias de ligações (LÓPEZ-CAMACHO et al., 2015). Segundo Quevedo et al (2014), a docagem molecular é utilizada para: determinar o receptor alvo e analisar os prováveis locais de ligações; selecionar os ligantes e propor as melhores conformações e orientações (acoplamento) do complexo ligante-receptor, através das constantes de ionização inibição e dissociação; e sintetizar e/ou testar os ligantes com melhores interações.

O processo de docagem molecular possui como objetivo a formação de um complexo ligante-receptor estável, definido pela interação entre o ligante e os

aminoácidos do receptor. Isto equivale a prever a energia de ligação livre do complexo ligante-receptor, gerando com isso, conjuntos de ligantes ordenados pelas energias de ligação, sendo as moléculas líderes escolhidas para estudos posteriores (KHAMISA; GOMAA; AHMED, 2015).

No meio biológico, tanto o ligante quanto o receptor se adaptam um ao outro durante o processo de reconhecimento molecular, processo denominado de encaixe induzido. Durante a docagem molecular, diferentes orientações e conformações do ligante no sítio de ligação do receptor são realizadas (VERLI, 2014). Entretanto, o processo de docagem molecular assume receptores rígidos, sendo assim, um dos fatores limitantes da técnica (ZHENG et al., 2013).

Visando ultrapassar a rigidez protéica, a dinâmica molecular (DM) fundamentada nos princípios da mecânica clássica, permite acrescentar flexibilidade no complexo ligante-receptor, ao contrário do que acontece na docagem molecular, favorecendo com isso, interações e complementaridade (NAMBA; SILVA; SILVA, 2008).

As simulações de DM permitem avaliar as preferências conformacionais das proteínas nos quais átomos e moléculas interagem por meio de suas propriedades por um determinado período de tempo, o que resulta em simulações de movimento do ligante e do receptor. Assim, é possível prever propriedades como a estabilidade térmica e atividade ótima diante de mudanças no pH (KHAN et al., 2016).

As ferramentas computacionais também estão sendo utilizadas de forma promissora na predição das atividades biológicas de compostos isolados e elucidados a partir dos produtos naturais. Estudos como Guimarães et al (2014) demonstram por docagem molecular interações favoráveis entre o carvacrol presente no óleo de *Origanum* (Lamiaceae) com o receptor do ácido gama amino-butírico (GABA_A) e interleucina 10 (IL-10). Loza-Mejía et al (2015) a partir da docagem molecular demonstrou interações dos colestano, estigmastano, lanostano e quassina, com a ciclooxigenase-1 (COX-1), ciclooxigenase-2 (COX-2), óxido nítrico sintase induzível (i-NOS), lipoxigenase 5 (LOX-5) respectivamente. Ortiz et al (2016) também utilizou a docagem molecular para demonstrar interações favoráveis entre o α -bisabolol presente *Matricaria chamomilla* L., e a COX-2. Calado et al (2015) demonstrou por docagem molecular que o ascaridol presente nas folhas de *Chenopodium ambrosioides* parece ser antagonista dos receptores NMDA.

3. OBJETIVOS

3.1 Geral

Avaliar atividade antinociceptiva do extrato hidroalcoólico e da fração acetato de etila de *Borreria verticillata* (L.) G. Mey, e a predição de compostos identificados através da docagem molecular e dinâmica molecular em relação à ciclooxygenase-2 (COX-2) e ao receptor N-metil-D-aspartato (NMDA).

3.2 Específicos

- Avaliar o efeito do extrato hidroalcoólico e fração acetato de etila de *B. verticillata* em modelo experimental de inflamação (edema de pata induzido por carragenina);
- Avaliar o efeito do extrato hidroalcoólico e fração acetato de etila de *B. verticillata* nos modelos experimentais de dor (teste de formalina, tail-flick e contorções abdominais induzidas por ácido acético);
- Determinar os constituintes do extrato hidroalcoólico e fração acetato de etila de *B. verticillata*;
- Realizar cálculos de docagem molecular dos compostos presentes na fração acetato de etila;
- Realizar simulações de dinâmica molecular do complexo composto líder/receptor, obtido no cálculo de docagem molecular;
- Avaliar a atividade *in vivo* do composto selecionada na docagem e dinâmica molecular;

REFERÊNCIAS

AMERI, A.Z. et al. Toxicity study about a medicinal plant *Casearia sylvestris*: a contribution to the Brazilian Unified Health System (SUS). **Journal of Ethnopharmacol.** v.175, n.4, p.9-13, 2015.

ABDULLAHI-GERO, H.S.; AHMAD, A.; HUSSAINI, I.M. Preliminary evaluation of ethanol leaf extract of *Borreria verticillata* Linn (Rubiaceae) for analgesic and anti-inflammatory effects. **Journal of Medicinal Plant research**, v.8, n.20, p. 736-747, 2014a.

ABDULLAHI-GERO, H.S.; AHMAD, A.; HUSSAINI, I.M. Evaluation of Antioxidant Activity of Leave Extract of *Borreria verticillata* Linn (Rubiaceae). **Journal of Natural Sciences Research.**, v. 9, p. 25-30, 2014b.

ARONOFF G.M. What Do We Know About the Pathophysiology of Chronic Pain? Implications for Treatment Considerations. **Medical Clinics of North America**, v.100, n.1, p.31-42, 2016.

BALDÉ, A. M. et al. Spermacoceine, Bis-indole alkaloids from *Borreria verticillata*. **Phytochemistry**, v. 30, n. 3, p. 997-1000, 1991.

BALDÉ, A.M. et al. Chemotherapeutical Evaluation of *Borreria verticillata* Extracts. **Journal of Plant Sciences**. Special Issue: Ethnopharmacological Investigation of Medicinal Plants, v. 3, n.1-2, 2015, pp. 28-31.

BASHIR, U.; COLVIN, A.L. The place of pharmacological treatment in chronic pain. **Anaesthesia & Intensive Care Medicine**, v. 14, n. 12, p. 528-532, 2013.

BENJAMIN, T.V. Investigation of *Borreria verticillata*, an antieczematous plant of Nigeria. **Quarterly Journal Of Crude Drug Research**, v. 17, p. 135-6, 1979.

BENJAMIN TV. Analysis of the volatile constituents of local plants used for skin disease. **J Afr Med Pl.**, v. 3, p. 135-9, 1980.

BEVER, B. O. Medicinal Plants in Tropical West Africa II. Plants acting on the nervous system. **Journal of Ethnopharmacology**. v.7, n. 1, p. 1-93, 1983.

BONET, I.J. et al. The role of transient receptor potential A 1 (TRPA1) in the development and maintenance of carrageenan-induced hyperalgesia. **Neuropharmacology**.v.65, p. 206-212, 2013.

BOUVIER G. et al. Presynaptic nmda receptors: roles and rules. **Neuroscience**, v. 311, p. 322-340, 2015.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção a Saúde. Portaria nº 1083, de 02. de outubro de 2012. Aprova o Protocolo Clínico e Diretrizes Terapêuticas da Dor

Crônica. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 02 outubro 2012.

BRASIL, Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 02 DE 13 DE MAIO DE 2014. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, 02 de maio de 2014.

Calado, G.P et al. *Chenopodium ambrosioides* L. Reduces Synovial Inflammation and Pain in Experimental Osteoarthritis. **PLoS One**, v. 11, n.10, 2015.

CALIXTO, J.B., SIQUEIRA, J.M.J. Desenvolvimento de Medicamentos no Brasil: Desafios Desenvolvimento de Medicamentos no Brasil: Desafios. **Gazeta Médica da Bahia.**, v.1, n.78 p. 98-106, 2008.

CAVASOTTO, C.N.; PHATAK, S.S. Homology modeling in drug discovery: current trends and applications. **Drug Discovery Today**. v.14, n. 13, p. 676-83, 2009.

CEBOLA, I.; PEINADO, M.A. Epigenetic deregulation of the cox pathway in cancer. **Progress in Lipid Research**, v. 51, n. 4, p. 301-3, 2012.

CHEN Y. C. Beware of docking! **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 36, n. 2, p. 78-95, 2014.

CHEN, L.; YANG, G.; GROSSER, U.T. Prostanoids and inflammatory pain. **Prostaglandins & other lipid mediators**, v. 104–105, p.58-66, 2013.

CLEGG L.E.; GABHANN, M.F. Molecular mechanism matters: Benefits of mechanistic computational models for drug development. **Pharmacological Research**, v.99, p. 149-54, 2015.

COLOVOS, C.; YEATES, T. O. Verification of protein structures: patterns of non-bonded atomic interactions, **Protein Science**, v.2, p. 1511-1519, 1993.

CONSERVA, L.M.; FERREIRA, J.J.C. Borreria and Spermacoce species (Rubiaceae): A review of their ethnomedicinal properties, chemical constituents, and biological activities. **Pharmacognosy Reviews**, v.6, n. 11, p. 46-55, 2012.

DELAVEREAU, A. R.; JACQUEMIN, H. Phytochemical Research On Several Madagascan Rubiaceae plant. **Phytochemistry**, v.31, n. 1, p. 163-166, 1976.

DETHER, D.H.; ERANDE, R.D.; RANJAN, A. Biomimetic total syntheses of borreverine and flinderole alkaloids. . **The Journal of Organic Chemistry**, v.78, n. 20, p. 10106-20, out. 2013.

DUTRA R.C. et al. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v.23, 2016.

DWIVEDI A.K. et al. Molecular basis for nonspecificity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs). **Drug Discovery Today**, v. 20, n.7, p. 863-879, 2015.

D'AMOUR, F.; SMITH, D. L. A Method for determining loss of pain sensation. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**., v. 27, p. 74-9, 1941.

FERNANDES, E.S. et al.. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. **Eur Journal of Pharmacology**, v.569, n. 3, p. 228-36, 2007.

FERREIRA, A. G; ROSA, S. G. T. Germinação de sementes de sete espécies medicinais nativas do sul do Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.11, n.3, p. 230-235, 2009.

FERREIRA JÚNIOR, J.C.; P, R. P. L.; CONSERVA, L. M. Chemical constituents from *Spermacoce verticillata* (rubiacaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 44, p. 208-11, 2012.

FILHO, S.O.A.; ALENCASTRO, R. B. Modelagem de proteínas por homologia. **Química Nova**, v. 26, n. 2, p. 253-259, 2003.

GILRON I.; JENSEN T.S.; Dickenson A.H. Combination pharmacotherapy for management of chronic pain: from bench to bedside. **Lancet Neurol**, v. 12, n. 11, 2013.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A. D. Modelagem molecular de fármacos. **Rev. Proc. Quim.**, v.2, n. 4, p.24-26, 2008.

GUIDO, R. V. C.; ANDRICOPULO, A.D.; OLIVA, G. Planejamento de fármacos, biotecnologia e química medicinal: aplicações em doenças infecciosas. **Estudos Avançados**, v. 24, n.70, pp.81-98, 2010.

GUIMARÃES A.G. et al. Evidence for the involvement of descending pain-inhibitory mechanisms in the attenuation of cancer pain by carvacrol aided through a docking study. **Life Science**., v.22, n. 1, p. 8-15, 2014.

HOHJOH, H. et al. Prostanoid receptors and acute inflammation in skin. **Biochimie**, v. 107, p. 78-81, 2014.

HOGAN-CANN A.D, ANDERSON C.M. Physiological Roles of Non-Neuronal NMDA Receptors. **Trends Pharmacological Science**., p.1-18, 2016.

HUSKAAR, S.; HOLE, K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. **Pain**., v.30, n. 1, p.103-14, 1987.

JOHNSON, J.W.; GLASGOW, N.G.; POVYSHEVA, N.V. Recent insights into the mode of action of memantine and ketamine. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 20, p. 54-63, 2015.

JOHNSTON, P.G. et al. Evidence-based use of indomethacin and ibuprofen in the neonatal intensive care unit. **Clinics in Perinatology**, v. 39, n. 1, p. 111-36, 2012.

KALYAANAMOORTHY S.; CHEN, Y.P. Modelling and enhanced molecular dynamics to steer structure-based drug discovery. **Progress in Biophysics and Molecular Biology**, v. 114, n. 3, pg 123-136, 2014.

KHAMIS, M.A.; GOMAA, W., AHMED, W. F. Machine learning in computational docking. **Artificial Intelligence in Medicine**, v.63, n. 3, p. 135-152, 2015.

KHAN F. ET al. Current updates on computer aided protein modeling and designing. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.85, p.48-62, 2016.

Khoshdel Z, Takhshid MA, Owji AA. Effects of intrathecal amylin on formalin-induced nociception and on cAMP accumulation in the rat embryonic spinal cells. **Neuropeptides**, v.57, p. 95-100, 2016.

KARAKAS E.; FURUKAWA, H. Crystal structure of a heterotetrameric NMDA receptor ion channel. **Science**, v. 344, n. 6187, p.992-997, 2014.

KASERER T. et al. Prospective performance evaluation of selected common virtual screening tools. Case study: Cyclooxygenase (COX) 1 and 2. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.96, n.6, p. 445-57, 2015.

KOSTER, R. et al. Acetic acid analgesic screening. **Federation Proceedings**, n. 18, p. 418–420, 1959.

KURUMBAIL, R.G. et al. Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. **Nature**, v. 384, n.6, p. 644-8, 1996.

LAPA, A. J. **Métodos de Avaliação da Atividade Farmacológica de Plantas Medicinais**. Cyted, 2002.

LASKOWSKI, R.A. et al. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **J. Appl. Crystallogr.**, v.26, p. 283-291, 1993.

LÓPEZ-CAMACHO, E. et al. Solving molecular flexible docking problems with metaheuristics: A comparative study. **Applied Soft Computing**, v. 28, p.379-393, 2015.

LOZA-MEJÍA M.; SALAZAR, J.R. Sterols and triterpenoids as potential anti-inflammatories: Molecular docking studies for binding to some enzymes involved in inflammatory pathways. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**, v.62, p. 18-25, 2015.

MANSOURI, T.M.; NAGHIZADEH, B.; GHORBANZADEH, B. F. Y. Central and peripheral antinociceptive effects of ellagic acid in different animal models of pain. **European Journal of Pharmacology**, v.707, n. 1-3, p.46-53, 2013.

MAYNART, G. et al. Antibacterial effect of borreverine, an alkaloid isolated from *Borreria verticillata* (Rubiaceae). **Soc. Biol. Fil.**, v.174, n.5, p. 925-8, 1980.

MOREIRA, V. F. et al New Chemical Constituents from *Borreria verticillata* (Rubiaceae). **Helvetica Chimica Acta**, n. 93, n.9, p. 1751–1757, 2010.

MUIR, W.W. NMDA receptor antagonists and pain: ketamine. **Veterinary Clinics of North America: Equine Practice**, v. 26, n. 3, p.565-78, 2010.

MURTALA, Y. et al. Effect of Aqueous Leaf Extract of *Borreria verticillata* of Sudano-Sehelian Savanna on CCl₄ induced hepatotoxicity. **Journal of Natural Sciences Research**, v.24, p.67-72, 2015.

NAMBA, A. M.; SILVA, V. B. DA; SILVA, C. H. T. P. Dinâmica molecular: teoria e aplicações em planejamento de fármacos. **Eclética Química**, v. 33, n. 4, p. 13-24, 2008.

Neto, P. A. P. S et al. Antibacterial activity of *Borreria verticillata* roots. **Fitoterapia.**, n. 73, v. 6, p. 529-531, 2002.

NICKEL, F.T. et al. Mechanisms of neuropathic pain. **European Neuropsychopharmacology.**, v. 22, n.2, p. 81-91, 2012.

OGUNWANDE, I. A. et al. Essential oil constituents and biological activities of *Peristrophe bicalyculata* and *Borreria verticillata*. **Natural product communications**, v. 5, n. 11, p. 1815-8, 2010.

OLONODE, E.T.; ADERIBIGBE, A.O.; BAKRE, A.G. Anti-nociceptive activity of the crude extract of *Myrianthus arboreus* P. Beauv (Cecropiaceae) in mice. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 171, n. 2, p. 94-98, 2015.

ORTIZ, M.I. et al. Isolation, identification and molecular docking as cyclooxygenase (COX) inhibitors of the main constituents of *Matricaria chamomilla* L. extract and its synergistic interaction with diclofenac on nociception and gastric damage in rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v.78, p.248-56, 2016.

PAULA-FREIRE, L. et al. The oral administration of trans-caryophyllene attenuates acute and chronic pain in mice. **Phytomedicine.**, v.. 21, n 3, p. 356-62, 2014.

PEREIRA, C. O. et al. Abordagem etnobotânica de plantas medicinais utilizadas em dermatologia na cidade de João Pessoa- Paraíba, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais.**, v. 7, n. 3, p. 9-71, 2005.

PHANG.L.K.D; TANG, K.H. Current pharmacological modalities for control of chronic non-cancer pain. **Trends in Anaesthesia and Critical Care**, v.3, p. 283-288, 2013.

PINGSUSAEN, P. et al. Investigation of anti-inflammatory, antinociceptive and antipyretic activities of *Stahlianthus involu cratus* rhizome ethanol extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 162, n.13, p. 199-206, 2015.

PRAJAPATI, V.D. et al. Carrageenan: a natural seaweed polysaccharide and its applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 105, n.25, p. 97-112, 2014.

POUSSET, J.L. et al. La borrerine: nouvel alcaloïde isolé du *Borreria verticillata* **Phytochemistry**, v. 12, n. 9, p. 2308-2310, 1973.

PITMAN, M.R.; MENZ, R.M. Methods for Protein Homology. **Modelling Applied Mycology and Biotechnology**, v.6, p. 37-59, 2006.

QIU, J. et al. Pretreatment with the compound asperuloside decreases acute lung injury via inhibiting MAPK and NF- κ B signaling in a murine model. **International Immunopharmacology**, v. 31, p. 109-15, 2016.

QUEVEDO, C.V. et al. A strategic solution to optimize molecular docking simulations using Fully-Flexible Receptor models. **Original Research Article Expert Systems with Applications**, v.41, n.16, p.7608-7620, 2014.

RICCIOTTI E.; FITZ, G.G. A. Prostaglandins and inflammation. **Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology**, v. 31, n.5, p.986-1000, 2011.

ROCHA, A.P.C. et al. Dor: aspectos atuais da sensibilização periférica e central. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, Campinas, v. 57, n. 1, p. 94-105, 2007.

ROUZER, C.A.; MARNETT, L.J. Cyclooxygenases: structural and functional insights. **Journal Lipid Research**, v. 50, p. 29-34, 2009.

SÁ, K.N. et al. Chronic pain and gender in Salvador population, Brazil. **Pain**, v. 139, n.3 p. 498-506, 2008.

SADEGHI, H. et al. A study on the mechanisms involving the anti-inflammatory effect of amitriptyline in carrageenan-induced paw edema in rats. **European Journal of Pharmacology**, v.30, n. 667, p.396-401, 2011.

Sainty, D. et al. Iridoids of *Borreria verticillata*. **Planta Medica**, v. 42, p. 260-4, 1981.

SNEHA P.; DOSS, G.P.C. Molecular Dynamics: New Frontier in Personalized Medicine. **Advances in Protein Chemistry and Structural Biology**, v.102, p. 181-224, 2016.

TAMADDONFARD, E. et al. Comparison of the effects of crocin, safranal and diclofenac on local inflammation and inflammatory pain responses induced by carrageenan in rats. **Pharmacological Reports**, v.65, n.5, p.1272-1280, 2013.

VEIGA JUNIOR, V.F. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 308-313, Jun. 2008.

USHIE, O. A.; ADAMU, H. M.; OGAR, D. A.; GUNDA H. J. Phytochemistry of *Borreria verticillata* Stem Bark. **International Journal of Traditional and Natural Medicines**, v. 2, n.2, p. 97-103, 2013.

VERLI, H. **Bioinformática da biologia á Flexibilidade Molecular**. São Paulo: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, 2014.

VIEIRA, I. J. C. et al. Iridoids from *Borreria verticillata*. **Organic Letter**, v.1 n. 8, p.1169-1171, 1999.

VIEIRA, M. E. B et al. Prevalence, characteristics, and factors associated with chronic pain with and without neuropathic characteristics in São Luís, Brazil. **Journal of Pain and Symptom Management**, v. 44, n. 2, p. 239-241, 2012.

VYAS V.K. et al. Homology modeling a fast tool for drug discovery: current perspectives. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.74, n. 1, p. 1-17, 2012.

Zarghi, A.; Arfaei S. Selective COX-2 Inhibitors: A Review of Their Structure-Activity Relationships. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v.10, n. 4, p. 655-83, 2011.

ZHENG M. et al. Computational methods for drug design and discovery: focus on China. **Trends in Pharmacological Sciences**, v.34, n.10, p. 549-59, 2013.

WANG, J.; GOFFER. Y. AMPA receptors and pain—A future therapeutic intervention? **Original Research Article Techniques in Regional Anesthesia and Pain Management**, v.14, n.2, p. 59-64, 2010.

WINTER, C. A. et al. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. **"Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, n. 111, p. 544-7, 1962.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Regional office for the Western Pacific. Research guidelines for evaluating the safety and efficacy of herbal medicines.** p. 86, 1993.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (Who). **The world medicines situation 2011: traditional medicines: global situation, issues and challenges.** p. 12, 2011.

Atividade antinociceptiva de *Borreria verticillata*: estudos *in vivo* e *in silico*

Rosa Helena M. Silva¹, Nathália de Fátima M. Lima¹, Alberto Jorge O. Lopes^{1,3}, Cleydlenne Costa Vasconcelos¹, José Wilson C. de Mesquita², Ludmila Santos S. de Mesquita², Maria Nilce de S. Ribeiro², Ricardo Martins Ramos³, Maria do Socorro de S. Cartágenes^{*1}, João Batista S. Garcia^{#1}.

¹Laboratório de Estudo Experimental da Dor, Departamento de Ciências Fisiológicas.

²Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Farmácia ^{1,2}Universidade Federal do Maranhão, Av. dos Portugueses, 1966, CEP 65080-805, São Luís, MA, Brasil.

³Laboratório de Pesquisa em Sistemas de Informação, Departamento de Informação, Ambiente, Saúde e Produção Alimentícia, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí. Praça da Liberdade, 1597, Centro, CEP 64000-040, Teresina, Piauí, Brasil.

Revista: [Proceedings of the National Academy of Sciences](#)

Atividade antinociceptiva de *Borreria verticillata*: estudos *in vivo* e *in silico*

Rosa Helena M. Silva¹, Nathália de Fátima M. Lima¹, Alberto Jorge O. Lopes^{1,3}, Cleydlenne Costa Vasconcelos¹, José Wilson C. de Mesquita², Ludmila Santos S. de Mesquita², Fernando César V. M. Lima¹, Maria Nilce de S. Ribeiro², Ricardo Martins Ramos³, Maria do Socorro de S. Cartágenes^{*1}, João Batista S. Garcia^{#1}.

¹Laboratório de Estudo Experimental da Dor, Departamento de Ciências Fisiológicas.

²Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Farmácia ^{1,2}Universidade Federal do Maranhão, Av. dos Portugueses, 1966, CEP 65080-805, São Luís, MA, Brasil.

³Laboratório de Pesquisa em Sistemas de Informação, Departamento de Informação, Ambiente, Saúde e Produção Alimentícia, Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Piauí. Praça da Liberdade, 1597, Centro, CEP 64000-040, Teresina, Piauí, Brasil.

Resumo

Borreria verticillata (L.) G. Mey espécie conhecida como vassourinha apresenta atividade antibacteriana, antimalárica, hepatoprotetora, antioxidante, analgésica e anti-inflamatória, entretanto sua atividade antinociceptiva é pouco estudada. O objetivo deste trabalho foi avaliar atividade antinociceptiva do extrato hidroalcoólico bruto (EHBv) e fração acetato de etila (FAC) de *B. verticillata* realizando estudos *in vivo* e *in silico*. Para avaliação *in vivo*, foram utilizados os testes do edema de pata, contorções abdominais, formalina e tail flick. Ratos Wistar e camundongos Swiss foram tratados via oral e divididos em 6 grupos: controle-NaCl 0.9%(CTL), memantina 10 mg/Kg (MEM), indometacina 10 mg/Kg (INDO), EHBv 500 mg/kg (EHBv 500), FAC 25 mg/Kg (FAC 25), FAC 50 mg/Kg (FAC 50). O tratamento com EHBv 500, FAC 25 e 50 apresentou efeito antiedematogênico e antinociceptivo periférico. Para avaliação *in silico* os compostos identificados na FAC foram submetidos a docagem molecular, o melhor composto foi selecionado para simulações de dinâmica e testado *in vivo* molecular. O ácido ursólico apresentou melhores parâmetros de afinidade com COX-2, GluN1a e GluN2B durante a docagem molecular. Nas simulações por dinâmica molecular, o ácido ursólico apresentou alta frequência de contatos com Arg120 e Glu524 do local ativo da COX-2 e com o domínio LBD da Glun1a e GluN2B podendo com isso, impedir a ativação da COX-2 e do receptor NMDA. O tratamento com ácido ursólico 10mg/Kg (AU)

apresentou efeito antinociceptivo periférico e central. Sugere-se que o efeito antinociceptivo periférico de *B. verticillata* pode ser atribuído predominantemente à ação de compostos com ação anti-inflamatória. O ácido ursólico é o principal composto ativo, sendo um composto promissor para o desenvolvimento de fármacos inibidores da COX-2 e antagonistas dos receptores NMDA.

Palavras-chaves: *Borreria verticillata*, COX-2, receptor NMDA, docagem molecular, simulações por dinâmica molecular.

Significância

A dor representa uma experiência emocional, sensorial e sua crescente ocorrência constitui um dos fatores para o aumento da utilização de analgésicos. Contudo, o efeito antinociceptivo periférico de *Borreria verticillata* representa uma alternativa para o tratamento da dor. Além disso, o ácido ursólico principal ativo com atividade biológica desta espécie, representa uma molécula promissora para o desenvolvimento de inibidores da enzima COX-2 e antagonistas dos receptores NMDA.

Introdução

A dor representa um sistema de alerta para o organismo sobre um dano tecidual (1). Seu mecanismo fisiopatológico envolve diversas áreas biológicas dentre os quais, estão a ativação da enzima ciclooxigenase-2 (COX-2) e do receptor N-metil-D-aspartato (NMDA).

A enzima ciclooxigenase (COX) participa dos processos inflamatórios e dolorosos pela síntese de prostaglandina E₂ (PGE₂) que é o principal prostanóide pró-inflamatório envolvido na hipersensibilidade dolorosa modulando as vias nociceptivas periférica e central (2). A COX-2 é constitutivamente expressa em baixos níveis em neurônios da medula espinal e células da glia, sendo supra regulada no sistema nervoso central (SNC) em resposta a fatores inflamatórios. Estruturalmente é formada por um longo canal lipofílico cuja entrada é uma constricção feita por Arg120, Tyr355 e Glu524 na superfície da enzima (3).

O receptor NMDA é um heterotetrâmero composto cada um por duas subunidades GluN1 e GluN2. A ativação do receptor requer a ligação da glicina na subunidade GluN1 e do glutamato a subunidade GluN2 (4). As subunidades do

receptor são moduladas por 4 domínios: domínio amino-terminal (ATD); um domínio carboxi-terminal (CTD); domínio de ligação extracelular (LBD) e domínio transmembrana (TMD) (5). Desempenha papel importante na sensibilização central através da amplificação nociceptiva na medula, aumento da condutância iônica e despolarização da membrana (6,7).

Diante disso, a terapia com os anti-inflamatórios não-esteroidais (AINES) e antagonistas dos receptores NMDA são utilizados para o alívio da dor. Entretanto, efeitos adversos como tontura, vômito e constipação limitam a utilização dessas classes de fármacos. O uso de plantas medicinais tem sido uma prática comum utilizada como alternativa para o tratamento de doenças. No Brasil a espécie vegetal *Borreria verticillata* (L.) G. Mey é conhecida como poaia, poaia preta, poaia miúda, cordão-de-frade e vassourinha (8), vem apresentando atividades antibacteriana (9,10), antimalárica (11), hepatoprotetora (12) e antioxidante (13).

Novas abordagens tecnológicas têm sido utilizadas para avaliar as propriedades farmacológicas de extratos e princípios ativos derivados de plantas medicinais (14). A docagem molecular é uma técnica computacional utilizada para prever a orientação favorável de um ligante flexível ligado ao receptor rígido (15). Entretanto, os receptores são biologicamente flexíveis, sendo capazes de alterar sua conformação em resposta a mudanças no pH, concentração de íons e quando ligados a agonistas e antagonistas (16). Para suprir a necessidade da mobilidade nativa dos receptores, utiliza-se a dinâmica molecular para atribuir flexibilidade ao receptor e ligante, a partir da conformação de interações mais favoráveis, obtida na docagem molecular (17).

Considerando e levando-se em consideração os fatores que colaboram para os mecanismos da dor, além do uso de plantas medicinais como alternativa terapêutica, este trabalho objetivou avaliar a atividade antinociceptiva do extrato hidroalcoólico bruto e fração acetato de etila de *B. verticillata* e interações moleculares de compostos presentes na FAc com a enzima COX-2 e o receptor NMDA.

Resultados

Avaliação do teor de flavonoides e fenóis

O EHBv apresentou teor de flavonoides e fenóis de 9.61 mg/ml e 7.67 mg/ml.

Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV-Vis)

No EHBv foram identificados ácido gálico, β -sitosterol, ácido glicirritínico, β -amirina, ácido caféico, ácido cumarínico e quercetina (Tabela S1). Na fração acetato de etila, foram identificados ácidos gálico, ursólico, caféico e elágico.

Cromatografia gasosa acoplado ao espectro de massas (CG-MS)

Na FAc foram identificados 13 constituintes pertencentes às classes dos álcoois, açúcares, ácidos graxos e flavonoides. Os principais compostos encontrados foram os açúcares D-psicofuranose (10,72%), glicopiranose (33,47%) e o ácido graxo ácido 10-undecenóico (15,70%) (Tabela S2).

Estudos bilógicos *in vivo*

Teste do edema de pata induzido por carragenina

A administração subplantar de carragenina causou edema na pata nos animais durante as 5 horas analisadas. O pico do efeito edematogênico foi observado a partir da 4h de indução.

Os tratamentos com EHBv 500, FAc 25 e FAc 50 também foram capazes de reduzir significativamente o efeito edematogêncio induzido pela carragenina na 3, 4 e 5 horas, quando comparados ao grupo controle. O EHBv 500 mg/Kg reduziu o edema em 41%, 42% e 43%, a FAc 25 mg/kg em 48%, 61% e 67% e a FAc 50 mg/kg reduziu o edema em 41%, 53% e 61% (Fig 1). Comparando-se os efeitos do extrato, frações e fármacos padrões (indometacina e memantina), foi possível observar que a indometacina, FAc 25 e 50 foram mais eficazes na redução do edema. As frações nas doses de 25 e 50mg/Kg apresentaram efeitos equivalentes, não havendo diferença estatisticamente significativa inter grupos.

O tratamento com indometacina 10 mg/Kg reduziu de forma significativa o edema em 72%, 74% e 77% após 3, 4 e 5 horas, respectivamente quando comparado ao grupo controle (CTL). As reduções do efeito edematogênico causados pela administração da memantina 10 mg/kg foram de 20%, 18% e 14% após 3, 4 e 5 horas, respectivamente em comparação ao grupo controle (CTL).

Teste de contorções abdominais

A administração intraperitoneal de ácido acético induziu dor nos animais durante os 20 minutos analisados. O tratamento com EHBv 500, FAc 25, FAc 50 reduziu de forma significativa o número de contorções em 71%; 72% e 42%

respectivamente em relação ao grupo controle (Fig 2). Comparando-se os efeitos do extrato, frações e fármacos padrões (indometacina e memantina), foi possível observar que a indometacina, EHBv 500, FAc 25 reduziram de forma equivalente o número de contorções dos animais. As reduções da FAc 50 foram equivalentes a memantina.

Os tratamentos com indometacina e memantina reduziram significativamente o número de contorções abdominais em 72,5% e 33%, respectivamente em comparação ao grupo controle.

Teste da formalina

O teste de formalina avalia a dor em duas fases, na primeira fase o tratamento com MEM, FAc 25 e 50 reduziu de forma significativa a dor neurogênica em 54%; 45% e 57% respectivamente em relação ao grupo controle. O tratamento com indometacina não reduziu de forma significativa a dor neurogênica. Comparando-se os efeitos das frações e memantina, FAc 50 apresentou reduções equivalentes a memantina. Na segunda fase, os tratamentos com INDO, MEM, EHBv 500, FAc 25 e 50 reduziram de forma significativa a dor inflamatória em 82%; 63%; 57%; 57% e 59%, respectivamente quando comparados ao grupo controle (Fig 3). Comparando-se os efeitos do extrato, frações e fármacos padrões (indometacina e memantina), o EHBv 500, FAc 25 e 50 apresentaram reduções equivalentes memantina e indometacina, não havendo diferença estatisticamente significativa inter grupos.

Tail-flick teste

O tratamento com memantina 10 mg/Kg reduziu significativamente a dor dos animais, através do aumentou em 15%, 40% e 40% no tempo de latência aos 60, 120 e 180 minutos respectivamente em comparação ao grupo controle. A indometacina, o EHBv 500, FAc 25 e 50, não foram capazes de aumentar de forma significativa o tempo de latência dos animais durante os 180 minutos analisados (Fig 4).

Estudos *in silico*

Docagem molecular

Para a docagem molecular foram selecionados todos os compostos identificados por CLAE-UV-Vis na fração acetato de etila de *B. verticillata*.

Dentre os compostos identificados na fração acetato de etila do extrato de *B. verticillata*, o ácido ursólico foi o composto que apresentou melhores parâmetros de afinidade nos cálculos de docagem molecular com a enzima COX-2 (Fig. 5) e com as subunidades GluN1a (Fig. 6A) e GluN2B (Fig. 6B) do receptor NMDA. Os resultados dos valores de energia de ligação de todos os ligantes estão dispostos na Tabela 1.

Para a enzima COX-2, o ácido ursólico apresentou valores de energia de ligação e constante de inibição superiores aos do fármaco indometacina, -9.86 kcal/mol e 0.05 μ M e -8.30 kcal/mol e 0.82 μ M, respectivamente. Os ácidos elágico, caféico e gálico apresentaram energia de ligação de -7.54, -6.68 e -5.88 kcal/mol, respectivamente. Em relação ao receptor NMDA, observou-se que o ácido ursólico apresentou melhores parâmetros de afinidade com a cadeia GluN1a, cujos valores encontrados de -7.02 kcal/mol e 7.13 μ M se mostraram próximos ao do fármaco memantina, sendo que este obteve valores de -7.82 kcal/mol e 1.86 μ M. Quanto a cadeia GluN2B, o ácido ursólico apresentou valores de afinidade ligeiramente superiores aos da memantina sendo -5.69 kcal/mol e 67.35 μ M para o ácido ursólico e de -5.66 kcal/mol e 71.18 μ M, para memantina. Os ácidos elágico, caféico e gálico apresentaram energia de ligação de -5.67, -4,57 e -4,47 kcal/mol respectivamente para GluN1a e -5.34, -5.16 e -5.04 kcal/mol respectivamente para a GluN2B.

As interações com os aminoácidos realizadas pelo ácido ursólico, memantina e indometacina, identificadas nas conformações selecionadas nos cálculos de docagem molecular estão dispostas na Tabela 2.

Dinâmica molecular

De acordo com o resultado da docagem molecular, o ácido ursólico foi selecionado como melhor composto para formação do complexo com o receptor NMDA e COX-2. Foram consideradas relevantes as interações $\geq 50\%$.

Em relação a COX-2, o ácido ursólico apresentou altas frequências de interações com Lys79, Leu80, Lys83, Pro84, Arg120, Leu123, Try155, Ser199, Phe470, Leu472, Ser481 e Glu524 (Figura 7A). As maiores frequências de

interações foram encontradas para o Glu524 com 97% de ligações de hidrogênio e Arg120 com 96% de interações hidrofóbicas. A indometacina apresentou alta frequência de interações com Asn43, Arg44, Thr62, Phe64, Leu80, Try122, Leu123, Ile124, Asp125, Phe470 e Arg469. As mais relevantes foram com Try122 e Leu123 ambas com 88% de interações hidrofóbicas (Figura 7B).

Em relação ao GluN1a (Fig. 8A), o ácido ursólico apresentou alta frequência de interação com Ile497, Pro510, Ala502, Phe507 e Glu506, sendo as maiores frequências de interações com 82% Ile497 (67% de interações hidrofóbicas e 15% de ligações de hidrogênio) e 81% Phe507 (24% ligações hidrofóbicas e 57% ligações de hidrogênio). Para o GluN2B (Fig. 8B), o ácido ursólico apresentou alta frequência de interação com Ile483, Ser488, Phe493 e Asp492 Pro496. O Asp492 e Phe493 apresentaram 66% de frequência de interação, sendo 2% e 25% de ligações hidrofóbicas e 64% e 41% de ligações de hidrogênio, respectivamente. A memantina apresentou maior número de contato com o GluN1a (Fig. 8C) e alta frequência de interação com Phe436, Phe511, Lys512, Ala712, Phe736, Glu764, Met763, Leu766, sendo 100% de interações de hidrogênio com Lys512 e 84% com Glu764 (61% de interações hidrofóbicas e 23% ligações de hidrogênio). Com o GluN2B (Fig. 8D) a memantina apresentou 50% de interação com Glu489 (30% de interações hidrofóbicas e 20% de ligações de hidrogênio).

As frequências de interações do ácido ursólico e memantina com GluN1a e GluN2B estão descritas nas figura 8.

Testes in vivo do composto selecionado in silico

A partir dos resultados obtidos pelos testes *in silico*, animais foram tratados com ácido ursólico (Sigma-Aldrich) e submetidos ao teste do edema de pata induzido por carragenina e tail flick teste.

O tratamento com ácido ursólico 10 mg/Kg reduziu significativamente o edema induzido pela carragenina durante as 5 horas analisadas. Essas reduções foram de 57-84% quando comparadas ao grupo controle. Comparando-se o efeito do ácido ursólico com indometacina e memantina, observou-se que o ácido ursólico foi mais eficaz na redução do edema. Os tratamentos com indometacina e memantina apresentaram reduções semelhantes a citadas anteriormente (Fig. 9).

O tratamento com ácido ursólico 10 mg/Kg aumentou significativamente o tempo de latência dos animais do 30-120 minutos em 28-42% quando comparado

ao grupo controle. Esse efeito não foi observado aos 180 minutos. O tratamento com memantina aumentou significativamente o tempo de latência quando comparado ao grupo controle. Este resultado foi semelhante ao citado anteriormente (Fig. 10).

Discussão

Com base nos resultados obtidos dos testes biológicos do presente estudo, observou-se que o extrato hidroalcoólico bruto e fração acetato de etila possuem efeito antinociceptivo periférico com participação anti-inflamatória. Os testes *in silico* demonstraram que dos compostos identificados na fração acetato de etila, o ácido ursólico é o principal componente ativo, apresentando interações relevantes com aminoácidos do local ativo da COX-2 e do receptor NMDA.

O EHB, FAc 25 e 50 apresentaram efeito antiedematogênico equivalente ao indometacina a partir da 3h. O edema de pata se caracteriza por apresentar duas fases: a primeira é iniciada a partir da administração da carragenina e dura até 2 horas, sendo este período de tempo correlacionado a fase exsudativa da inflamação a partir da liberação de mediadores inflamatórios como a histamina, serotonina e bradicinina; a segunda fase ocorre a partir da 3 horas de administração, sendo regulada pela infiltração de neutrófilos e mantida pela produção de prostaglandinas (19,20). Durante o processo inflamatório ou dano tecidual há liberação de substâncias que promovem vasodilatação, extravasamento de plasma e recrutamento celular. Adicionalmente, há aumento da liberação de glutamato pelos aferentes primários (fibras A δ e C) e aumento da ativação de receptores glutamatérgicos como o NMDA, que promovem a propagação dos potenciais de ação e liberação de neurotransmissores excitatórios no corno dorsal da medula espinal (21). Com isso, sugere-se que o efeito antiedematogênico das FAc's podem ser atribuídos à inibição da enzima COX-2 e consequente redução da síntese de PGE₂, assim como ocorrido no tratamento oral com o indometacina. Além disso, estudos demonstram que o bloqueio dos receptores NMDA também influencia no processo inflamatório, pois reduzem a migração leucocitária (22), citocinas pró-inflamatórias (23) e inibem parcialmente a fosfolipase A₂ (24) justificando-se com isso o efeito antiedematogênico causado pelos tratamentos.

O tratamento oral com EHBv 500, FAc 25 e 50 reduziram o número de contorções abdominais em 71%, 72% e 42% respectivamente. As reduções

causadas pelo tratamento com EHBv 500 e FAc 25 foram equivalentes ao tratamento com indometacina e a FAc 50 equivalente a memantina.

O teste de contorções abdominais é um modelo de dor inflamatória visceral utilizada na triagem de compostos com atividade analgésica periférica que envolve a ativação de receptores somáticos e viscerais, além de induzir inflamação local mediada pela prostaglandina, bradicinina, TNF- α , IL-1 β e IL-8 (25,26). Estudos demonstraram que em modelos de dor inflamatória, há aumento da ativação de receptores periféricos e aumento na concentração de glutamato na medula espinal (27,28). Os resultados encontrados neste trabalho podem ser atribuídos principalmente à inibição da enzima COX-2 e consequente redução da síntese de PGE₂, uma vez que houve equivalência dos tratamentos (EHBv 500 e FAc 50) com a indometacina. Além disso, também devemos levar em consideração a inibição periférica da ação do glutamato nos nociceptores pela memantina, pois houve equivalência entre este fármaco e FAc 50.

Os resultados do presente estudo demonstraram que o tratamento oral com MEM, FAc 25 e 50 reduziram o *licking time* em ambas as fases do teste da formalina. O tratamento com EHBv 500 e INDO reduziram o tempo da resposta nociceptiva (*licking time*) apenas na fase inflamatória. As reduções do *licking time* causadas pelo extrato e frações, são semelhantes às reduções causadas pela memantina e indometacina na primeira e segunda fase respectivamente.

O modelo de nocicepção induzido por formalina desencadeia uma resposta nociceptiva bifásica (29). A primeira fase (0-5 minutos) corresponde à fase neurogênica onde ocorre predominantemente a ativação de fibras C, enquanto a segunda fase (15-30 minutos) corresponde à fase inflamatória, sendo desenvolvida por uma combinação de mediadores inflamatórios, sensibilização periférica e central (29,30,31).

Os receptores NMDA periféricos contribuem para o desencadeamento e manutenção da sensibilização periférica sob condições de lesão celular e inflamação (32). Estudos demonstraram que fármacos antagonistas dos receptores NMDA como a memantina são capazes de reduzir a resposta nociceptiva na primeira e segunda fase (31,33). Segundo Roberts et al (34) descreveram redução em 50% da fase inflamatória de ratos *knockout* ao receptor NMDA subunidade GluN1, sugerindo que a redução na expressão desses receptores diminui a sinalização sináptica mediada pelo glutamato e substância P na medula espinal.

Os anti-inflamatórios não esteroidais (AINES) como a indometacina reduzem a resposta nociceptiva apenas na segunda fase (30). Diante disso, sugere-se que a redução nociceptiva na primeira fase pode ser atribuída a inibição da ação periférica do glutamato nos nociceptores e inibição na segunda fase da COX-2 e PGE₂.

Buscando investigar o potencial analgésico central do EHBv e FAc foi utilizado o teste *tail flick* (35). O tratamento com EHBv 500, FAc 25 e 50 e indometacina, não foram capazes de promover analgesia central. Entretanto, os animais tratados com memantina 10mg/Kg, apresentaram maior tempo de latência após 60, 120 e 180 minutos de tratamento. De acordo com Danneman et al (36) a resposta comportamental caudal a estímulos nocivos são regulados predominantemente por estruturas espinais e supra-espinais. Com isso, a analgesia produzida pelo tratamento com a memantina deve-se ao bloqueio do receptor NMDA, reduzindo a sensibilização central mediada por neurotransmissores excitatórios como o glutamato (23,37).

A atividade antinociceptiva periférica de *B. verticillata* encontrada neste trabalho, está de acordo com os descrito por Abdullahi-Gero et al (38), que demonstrou que o tratamento oral e intraperitoneal nas doses de 200-1000mg/Kg com extrato etanólico das folhas desta espécie apresentou efeito anti-inflamatório, analgésico periférico e central, além de sugerir que a dose letal (DL₅₀) oral é ≥ 5000 mg/Kg para camundongos e ratos.

De acordo com os resultados da análise química, as atividades biológicas apresentadas pelo EHBv podem ser atribuídas principalmente a presença de compostos fenólicos e triterpenos. Na FAc foram identificados os compostos fenólicos, ácidos gálicos, caféico, elágico e o triterpeno ácido ursólico. Estudos têm mostrado que esses compostos apresentam efeitos anti-inflamatórios e analgésicos como: redução da alodinia e efeito anti-inflamatório do ácido gálico (39), redução da migração leucocitária, radicais livres e óxido nítrico pelo ácido caféico (40), interação do ácido elágico com receptores opióides (41) e inibição da atividade do fator nuclear kappa beta (NF- κ B) pelo ácido ursólico (42). Portanto, a atividade antinociceptiva periférica com ação anti-inflamatória de *B. verticillata* relatadas neste trabalho, também podem ser atribuídas à presença desses compostos.

Diante desses resultados, os ácidos gálico, caféico, elágico e ursólico identificados na FAc foram submetidos inicialmente a docagem molecular para COX-2 e receptor NMDA. Segundo Guimarães et al (43), energias de ligação

negativas representam interações favoráveis do complexo ligante-receptor. De acordo com os resultados, o ácido ursólico foi o ligante que apresentou menor energia de ligação sendo assim, o ligante mais favorável para a formação de complexo com a enzima COX-2, receptor NMDA e consequentemente foi selecionado para as simulações de dinâmica molecular.

Durante a dinâmica molecular o ácido ursólico permaneceu interagindo com a COX-2 e com ambas as subunidades do receptor NMDA, assim como os fármacos padrões indometacina e memantina. Estruturalmente, o local ativo da COX-2 consiste em um canal lipofílico cuja entrada é formada pela Arg120, Tyr355 e Glu524 (44) e sua ativação causa a metabolização do ácido araquidônico (AA) a partir da interação com Arg120, Tyr355, Tyr385 e Ser530 da COX, levando a produção de prostaglandinas (45).

Estudos confirmam a importância da interação com estes aminoácidos, indicando que eles são potenciais alvos de pesquisa de novos inibidores dessa enzima. Derivados do ácido fenâmico foram avaliados acerca de sua atividade inibitória da COX-2 *in vitro* e após verificar-se a eficácia desses compostos, foi realizada a cristalografia de raios-x dos complexos. Observou-se que os derivados do ácido fenâmico mantiveram interações com Arg120, Tyr355, Tyr385, Trp387, Glu524, Leu531 (46). Avaliações do potencial inibidor da COX-2, por Meloxicam e Isoxicam, também realizadas *in vitro* e posterior cristalografia de raios-x, identificou interações de ambos os compostos com Met113, Leu117, Arg120, Ile345, Val349, Leu352, Leu359, Phe518, Ala527, Ser530 e Leu531 (45). A interação da COX-2 com o ibuprofeno, outro AINE com atividade anti-inflamatória e analgésica, também evidenciou a participação dos aminoácidos Arg120, Val349, Tyr355, Trp387, Met522, Val523, Gly526, Ala527 e Ser530 da COX-2 (47). Os resultados desse estudo destacam ainda que os aminoácidos Arg120 e Tyr355 localizados na entrada do canal da ciclooxygenase são fundamentais para interação entre COX-2 e o ibuprofeno.

O presente estudo demonstrou que o ácido ursólico manteve constantes interações com aminoácidos importantes como Arg120, Glu524 e com outros aminoácidos próximos aos que foram descritos nos trabalhos anteriores, como exemplo Try115 (próximo a Met113 e Leu117, observados nas interações do Isoxicam e Meloxicam), Leu123 (próximo a Arg120 nas interações do Meloxicam,

Isoxicam e Ibuprofeno), Glu524 (próximo a Val523 para interação do Ibuprofeno e Meloxicam e Gly526 na interação com Ibuprofeno).

Esta pesquisa também demonstrou que o perfil de interação entre o ácido ursólico e a COX-2 encontrado na docagem molecular foi mantido durante a dinâmica molecular, mesmo diante de variações de temperatura, pressão, água e flexibilidade proteica. As interações do ácido ursólico com aminoácidos adjacentes ao local ativo e ao local de metabolização do AA como Try115, Ser119, Tyr122, Leu123, Asp125, Pro528 podem ainda, intensificar o potencial de inibição da COX-2 pelo ácido ursólico. Com isso, pode-se sugerir que o ácido ursólico: (1) pode bloquear o acesso de ligantes ao local ativo da COX-2; (2) interações com Arg120 e aminoácidos adjacentes ao local ativo podem reduzir a metabolização do ácido araquidônico; (3) interações entre inibidores do local ativo da COX-2, Arg120 e Glu524 já foram descritas, demonstrando a importância desses aminoácidos no possível bloqueio do local ativo da COX-2 pelo ácido ursólico (Fig. S1).

O receptor NMDA é estruturalmente um heterotetrâmero formado por duas subunidades GluN1 e GluN2. Essas subunidades são moduladas pelos domínios amino-terminal (ATD), domínio de ligação (LBD), transmembrana (TMD) e carboxi-terminal (CTD) (5). Para ativação do receptor NMDA é necessário à ligação simultânea do glutamato ao GluN2 e glicina ou d-serina ao GluN1 por meio de interações dos seus grupos α -amino e α -carboxil com regiões do domínio de ligação extracelular (LBD). O domínio LBD é formado por três regiões transmembranas (M1, M2, M3), dois segmentos (S1, S2) que caracterizam o local ativo e que estão contidos nos subdomínios D1 e D2 respectivamente (48).

De acordo com Kaye et al (49) o local ativo do subdomínio D1 é formado pelos aminoácidos Gln405, Phe484, Thr486, Pro516, Thr518, Arg523 e o local ativo subdomínio D2 é formado por Ser688, Ser687, Val6869, Trp731, Asp732, Ser756. Diferentes estudos com antagonistas do GluN1 como DCKA, TK40 e apresentaram interações com Phe484, Thr518, Pro516, Arg523 (50); GluN405, Phe484, Pro516, Leu517, Thr518, Arg523, Ser687, Ser688, Val689 (51) respectivamente. Essas interações correspondem aos Gln383, Phe462, Pro494, Leu495, Thr496, Arg501, Ser665, Ser666, Val667 na nossa estrutura. Após 10 ns de simulações de dinâmica molecular obtivemos alta frequência de interação do ácido ursólico com Ile497, Ala502, Phe507, Ser508, Lys509 e Pro510 localizados próximos aos locais descritos

pelos trabalhos anteriores sugerindo com isso, o potencial do ácido ursólico em inibir a ligação da glicina ao GluN1.

Lee et al (52) desenvolveram após testes de inibição *in vitro* a estrutura cristalográfica da cadeia GluN2B complexada com o agonista parcial ácido trans-1-aminociclobutano-1,3-dicarboxílico (t-ACB) e detectaram que o t-ACBD fez interações com os aminoácidos His479 e Thr507. Esses aminoácidos equivalem aos His454 e Thr482 no presente estudo e observou-se que o ácido ursólico realizou interações com o Ile483 e Ser488 e demais aminoácidos da vizinhança, evidenciando assim que o ácido ursólico pode impedir a ligação de agonistas a subunidade GluN2 do receptor NMDA.

Outros estudos têm demonstrado o efeito antinociceptivo e anti-inflamatório do ácido ursólico pela inibição dos receptores TRPV1 e sinergismo serotoninérgico (5-HT) (53), redução da liberação IL-2, IL-6, IFN- γ , TNF- α , ROS, fosfolipase A2, NF- κ B, redução da expressão de COX-2, iNOS (54) e interação favoráveis para formação do complexo com COX-1 e COX-2 (3). Os resultados apresentados neste trabalho demonstraram que o ácido ursólico apresentou efeito antinociceptivo periférico pela inibição da COX-2 no teste do edema de pata induzido por carragenina e analgesia central no tail flick teste. Esses resultados permitem sugerir que o AU é o principal composto responsável pelas atividades encontradas neste trabalho.

Não há estudos na literatura que descrevam *in vivo* e *in silico* a relação do potencial antinociceptivo de compostos presentes nas partes áreas de *B. verticillata*. Diante dos resultados apresentados, sugerimos que o efeito antinociceptivo periférico encontrado neste trabalho, podem ser atribuído a compostos com ação anti-inflamatória. Essa atividade pode estar ligada à presença de flavonóides, fenóis e terpenos que podem contribuir redução das atividades da enzima COX-2, receptor NMDA periférico e consequentemente para redução da dor. Além disso, os resultados *in silico* e *in vivo* permitiram selecionar e sugerir que o ácido ursólico é o principal composto ativo presente em *B. verticillata*, pois apresentou melhores parâmetros de afinidade, realizou interações estáveis com a enzima COX-2 e com subunidades GluN1a e GluN2B do receptor NMDA e apresentou efeito antinociceptivo periférico e central. Com isso, o ácido ursólico configura-se como uma molécula promissora para o desenvolvimento de inibidores da enzima COX-2 e antagonistas dos receptores NMDA.

Materiais e Métodos

Material Botânico

Foram utilizadas partes aéreas de *B. verticillata*, coletadas na cidade de São José de Ribamar, Maranhão (2°33'13.3"S 44°11'22.8" W), em julho de 2014 e catalogadas no Herbário do Maranhão (MAR) da Universidade Federal do Maranhão sob o número 5151.

Obtenção do extrato hidroalcoólico e fração acetato de etila

As partes aéreas de *B. verticillata* foram secas em estufa com circulação de ar a 38°C, seguida de trituração em moinho de facas, obtendo-se o pó moderadamente grosso (tamanho inferior a 710 µm e superior a 250 µm) (55).

O pó obtido foi dividido em duas partes. A primeira parte foi macerada e remacerado com álcool etílico 70% durante cinco dias sob agitação ocasional, sendo este processo repetido três vezes, filtrado, particionado com diclorometano (1:1, v/v) e concentrado em evaporador rotativo sob pressão reduzida a 40°C, obtendo-se o extrato hidroalcoólico de *B. verticillata* (56). A segunda parte foi macerada com etanol 95% por 72 horas, sendo este processo repetido quatro vezes. A solução extrativa resultante foi concentrada em evaporador rotativo sob pressão reduzida a 40°C. Posteriormente, foi dissolvido metanol:água (7:3 v/v) durante 60 minutos sob agitação mecânica, particionada com hexano, clorofórmio e acetato de etila (q.s.p) em ampola de separação, filtrada sob pressão reduzida com sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄) e concentrada em evaporador rotativo para obtenção da fração acetato de etila (FAc) (57). A FAc foi utilizada nos testes *in vivo* pela maior obtenção de compostos fenólicos e flavonóides.

Avaliação do teor de fenóis e flavonóides

O teor de compostos fenólico (TCF) do EHBv foi determinado com o reagente Folin-Ciocalteu e carbonato de sódio 20 %. A reação foi mantida no escuro por 2 h a temperatura ambiente e a absorbância foi medida em espectrofotômetro a 760 nm (58). O TCF foi calculado a partir da curva de calibração construída com soluções padrão de ácido gálico (1,0-30,0 µg mL⁻¹) e expresso como equivalente de ácido gálico (%).

O teor de flavonóides totais (TFT) do EHBv foi determinado com solução metanólica de cloreto de alumínio (AlCl_3) 5%. A reação foi mantida no escuro por 30 min a temperatura ambiente e a absorbância foi medida em espectrofotômetro a 425 nm (59). O teor de flavonóides totais (TFT) foi calculado a partir da curva de calibração construída com soluções padrão de quercetina ($1,0\text{-}30,0\text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$) e expresso como equivalente de quercetina (mg/ml).

Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de ultravioleta-visível (CLAE-UV-Vis)

A fração acetato de etila (FAC) e o extrato hidroalcoólico bruto (EHBv) foram analisados em um cromatógrafo líquido de alta eficiência (Thermo Finnigan Surveyor) acoplado a detector de ultravioleta-visível (CLAE-UV-Vis). Foi utilizada uma coluna analítica ACE 5 C18 de fase reversa ($250 \times 4,6\text{ mm}$, $5\text{ }\mu\text{m}$). Os compostos da FAC e EHBv foram separados em temperatura ambiente usando gradiente de eluição com um fluxo de 1 mL/min . As fases móveis consistiram de água purificada contendo 0,1% de ácido acético (A) e acetonitrila (B). O gradiente usado foi: 0-5 min, 20% de B; 5-10 min, 25% de B; 10-15 min, 25-23% de B, 15-20 min, 23-21% de B; 20-25 min, 21-18% de B; 25-30 min, 18-15% de B, 30-35 min, 15-0% de B. O volume de injeção no sistema de CLAE foi de $5\text{ }\mu\text{L}$ e a detecção no UV-Vis foi realizada em 254 nm.

Cromatografia gasosa acoplado ao espectro de massas (CG-MS)

A FAC (10 mg) foi derivatizada em piridina ($300\text{ }\mu\text{L}$) e bis-(trimetilsilil) trifluoroacetamida com trimetilclorossilano (BSTFA / TMCS, $100\text{ }\mu\text{L}$) e aquecida a 80°C durante 1 h, como descrito por Campos et al., (2014), com modificações. O produto derivatizado foi analisado em um cromatógrafo gasoso (GC-2010, Shimadzu, Japão), acoplado a espectrômetro de massas (GCMS-QP2010 SE, Shimadzu, Japão), empregando-se uma coluna Rtx-5MS ($30\text{ m} \times 0,25\text{ mm i.d.}$, $0,25\text{ }\mu\text{m}$, Restek, EUA), hélio como gás de arraste, a um fluxo de $1,0\text{ mL/min}$. A temperatura do forno foi inicialmente mantida a 70°C e programado para aumentar a uma taxa de 4°C/min até 310°C e mantida a 310°C durante 4 min. A temperatura do injetor foi de 250°C e o volume de injeção foi de $1,0\text{ mL}$ na razão de divisão de 1:30. Os espectros de massas foram obtidos com ionização por impacto de elétrons (70 eV) no modo de varredura total (40 a 1000 m/z), utilizando fonte de íons a 200°C .

C. Os compostos foram identificados por comparação dos espectros de massas obtidos com a biblioteca NIST 11.

Estudos biológicos *in vivo*

Animais

Foram utilizados ratos da linhagem Wistar, espécie *Rattus norvegicus*, adultos, machos e fêmeas com peso 200-300g e camundongos *Mus musculus* adultos, machos e fêmeas com peso entre 25-35g obtidos do Biotério Central da Universidade Federal do Maranhão (UFMA). Os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) parecer nº17, sob o protocolo nº 23115.013545/2015-89.

Grupos experimentais

Foram utilizados seis grupos experimentais, sendo todos compostos por 6 animais. O grupo controle (CTL) foi tratado com NaCl 0.9% (0,1ml/Kg) via oral (v.o), o grupo (INDO) foi tratado com indometacina (10 mg/Kg v.o), o grupo (MEM) foi tratado com memantina (10 mg/Kg v.o), o grupo FAc foi tratado com a fração acetado de etila de *B. verticillata* nas doses de 25 mg/kg (FAc 25 v.o) e 50 mg/Kg (FAc 50 v.o) e o grupo EHBv foi tratado com extrato hidroalcoólico de *B. verticillata* (500 mg/Kg v.o). Após os testes *in silico* os animais foram tratados com ácido ursoólico 10 mg/Kg (AU) v.o.

Teste do edema de pata induzido por carragenina

O teste foi utilizado para avaliação da atividade farmacológica a partir da administração subplantar de carragenina. Camundongos foram distribuídos e tratados conforme descrito no item “grupos experimentais” e após 60 minutos de tratamento, o edema de pata foi induzido pela administração de 50 µL de carragenina 1% subplantar na pata direita do animal, sendo o mesmo volume de NaCl 0,9% administrado na pata esquerda. O volume da pata do animal foi mensurado pelo pletismômetro digital (Modelo Ugo Basile, Verese-Itália) com 1, 2, 3, 4 e 5 horas após a indução. O valor do edema foi obtido pela diferença entre o volume da pata direita e esquerda, sendo expressos como a variação do volume da pata (mL) ao decorrer do tempo (60,61).

Teste de contorções abdominais

O teste de contorções abdominais induzidos por ácido acético é descrito como um modelo inflamatório víscero-somático utilizado para triagem farmacológica da atividade antinociceptiva periférica e central. Camundongos foram distribuídos e tratados conforme descrito no item “grupos experimentais”. Após 60 minutos de tratamento, as contorções abdominais foram induzidas pela administração intraperitoneal de ácido acético 0.8% (10 mL/Kg). As contorções foram contadas cumulativamente durante os 20 minutos subsequentes após a indução (62). Os resultados foram expressos como média do número acumulado de contorções (27,41).

Teste da formalina

O modelo de nocicepção induzido pela formalina permite avaliar os mecanismos nociceptivos neurogênicos decorrentes da ativação de fibras nociceptivas e inflamatórios decorrentes da liberação de mediadores inflamatórios. Os camundongos foram tratados conforme já descrito e depois de decorridos 60 minutos, foi administrado via subplantar 20 µL de formalina 2,5% na pata direita dos animais. A resposta nociceptiva caracterizada por lambe ou morder a pata, foi avaliada nos primeiros 5 minutos para avaliação de mecanismos neurogênicos e do 15º ao 30º minuto para avaliação dos mecanismos inflamatórios (*lincking time*) (29,63).

Tail-flick teste

Este teste foi utilizado para avaliar a atividade antinociceptiva central através da estimulação dos reflexos medulares. Ratos foram tratados conforme descrito anteriormente e depois de 60 minutos, foi aplicado no último terço da cauda dos animais um estímulo térmico (Modelo Ugo Basile, Varese-Itália) e registrado o tempo de latência de retirada da cauda (*flinch*) basal, 30, 60, 120 e 180 minutos. A intensidade do estímulo foi ajustada a fim de obter uma latência de retirada entre 3-6 segundos e considerado como *cut-off* o tempo de 10 segundos para evitar lesões na cauda dos animais (35,41).

Estudos *in silico*

Estruturas dos compostos e receptores

Os compostos identificados nas frações foram obtidos no banco de dados do Projeto PubChem, estruturalmente esquematizados em três dimensões (3D) com o GaussView 5.0.8 (64). As propriedades geométricas e vibracionais foram calculadas (otimizadas) no vácuo em nível do método da Teoria do Funcional da Densidade (TFD) utilizando-se o funcional híbrido B3LYP combinado com a base 6-31 ++ G (d, p) com o programa Gaussian 09 (65).

A estrutura 3D da COX-2 (cadeia A) de camundongos *Swiss* foi obtida do *Protein Data Bank* (PDB) código 1DDX. Os fármacos memantina e indometacina tiveram as suas estruturas 3D obtidos do projeto PubChem códigos 4054 e 3715, respectivamente. Os modelos estruturais das subunidades GluN1a e GluN2B do receptor NMDA de *Rattus norvegicus* foram obtidas por modelagem por homologia.

Modelagem por homologia

Foi utilizado modelagem por homologia das subunidades GluN1a e GluN2B do receptor NMDA, pois as estruturas 3D disponíveis no PDB não são completas. Foi realizada conforme Ramos et al (66) com o MODELLER 9v14 (67), utilizando as sequências de aminoácidos das subunidades GluN1 e GluN2B (NCBI códigos GI:645985944 e GI:645985945, respectivamente). O controle da qualidade dos modelos escolhidos foi realizada utilizando os programas PROCHECK (68) e Errat (69) implementados no servidor SAVES e com o Z-Score (ProSA-web Protein Structure Analysis). Logo após análise da qualidade dos modelos, um estágio adicional de refinamento dos modelos foi realizado através de Simulações por Dinâmica Molecular (DM) durante 8ns com o pacote GROMACS 4.6.7. (70).

Docagem molecular

Utilizando-se o pacote AutoDock 4.2 (71) proteínas (modelos refinados) e ligantes foram preparados para os cálculos de docagem com o módulo AutoDock Tools (ADT), versão 1.5.6 conforme Ramos et al (66). Os centros das malhas de afinidade foram definidos nos resíduos: Arg120 para COX-2; Tyr513 para NMDA GluN1a; Arg487 para NMDA GluN2B. As coordenadas iniciais dos complexos para as simulações por DM foram escolhidas utilizando o critério da conformação de menor energia do cluster combinada com inspeção visual.

Dinâmica molecular dos complexos

As simulações por dinâmica molecular dos complexos selecionados na docagem molecular foram realizadas com o software GROMACS 4.6.7 (70) conforme Ramos et al (66). A topologia dos ligantes foi gerada pelo *Automated Topology Builder* (ATB) and *Repository* versão 2.1 (72). Os estados de protonação das histidinas das proteínas foram determinados utilizando o servidor online H++ - <http://biophysics.cs.vt.edu/hppdetails.php>. Para aumentar a amostragem, foram realizadas três simulações por DM de 10ns para cada complexo usando diferentes velocidades atômicas assinaladas de acordo com a distribuição de Maxwell. Os dados gerados para os últimos 4 ns de cada sistema simulado foram utilizados. Durante o estágio de produção foram obtidos 123 quadros realizados a cada 100ps. Detalhes das interações foram calculadas usando o programa *LigPlot+* (68). Um mínimo de 50% de contato (soma de interações hidrofóbicas e pontes de hidrogênio) dos quadros analisados foi estabelecido como critério de eficiência de ligação.

Análise estatística

A comparação das médias dos diferentes grupos experimentais foi realizada pela análise de variância univariada (One-way ANOVA), seguida pelo teste de Newman-Keuls com $p < 0,05$. Os dados foram analisados por meio do programa Graph PadPrism 5, utilizando-se a média $\pm$ erro padrão.

Notas de rodapé

Contribuição dos autores: Conceituação: RHMS, MSSC, JBSG. Metodologia: RHMS, NFML, AJOL, CCV, JWCM, LSSM, RMR. Análise dos dados: RHMS, AJOL, CCV, JWCM, LSSM, RMR, MSSC, JBSG. Reagentes/materiais/ferramentas de análise: RMR, MNSR. Escrita do artigo: RHMS, AJOL, CCV, MSSC, JBSG.

*Endereço de e-mail: scartagenes@gmail.com

#Endereço de e-mail: jbgarcia@uol.com.br

Agradecimentos

Nós gostaríamos de agradecer ao Centro Nacional de Processamento de Alto Desempenho (CENAPAD-UFC) da Universidade Federal do Ceará pela disponibilidade para os ensaios *in silico* e ao Prof. Dr. Eduardo B. de Almeida Jr.

botânico responsável pelo Herbário do Maranhão (MAR) pela identificação botânica da espécie vegetal citada neste trabalho. Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo a Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA) e pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento em Pesquisa (CNPq).

Referências

1. Nickel FT, Seifert F, Lanz S, Maihöfner C. Mechanisms of neuropathic pain. *Eur Neuropsychopharmacol*. 2012 Feb;22(2):81-91.
2. Chen L, Yang G, Grosser T. Prostanoids and inflammatory pain, Prostaglandins & Other Lipid Mediators. 2013;104–105:58-66.
3. Magalhães WS, Corrêa CM, Alencastro RB, Nagem TJ. Bases moleculares da ação anti-inflamatória dos ácidos oleanólico e ursólico sobre as isoformas da ciclo-oxigenase por docking e dinâmica molecular. *Química Nova*. 2012 35(2):241-248.
4. Tajima N, Karakas E, Grant T, Simorowski N, Diaz-Avalos R, et al. Activation of NMDA receptors and the mechanism of inhibition by ifenprodil. *Nature*. 2016 May 2;534(7605):63-8.
5. Karakas E, Furukawa H. Crystal structure of a heterotetrameric NMDA receptor ion channel. *Science*. 2014 May 30;344(6187):992-7.
6. Aronoff GM. What Do We Know About the Pathophysiology of Chronic Pain? Implications for Treatment Considerations. *Med Clin North Am*. 2016. Jan;100(1):31-42. Review.
7. Phang LKD, Tan KH. Current pharmacological modalities for control of chronic non-cancer pain. *Trends in Anaesthesia and Critical Care*. 2013;3:283-8.
8. Júnior JCF, Lemos RPL, Conserva LM. Chemical constituents from *Spermacoce verticillata* (Rubiaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*. 2012;44:208-11.
9. Balde AM, Pieters LA, Traore MS, Camara A, et al. Chemotherapeutical Evaluation of *Borreria verticillata* Extracts. *Journal of Plant Sciences. Special Issue: Ethnopharmacological Investigation of Medicinal Plants*. Vol. 3, No. 1-2, 2015, pp. 28-31.
10. De Sá Peixoto Neto PA, Vladimilisa SM, Corrente CNV, Porfírio Z, Caetano LC. Antibacterial activity of *Borreria verticillata* roots. *Fitoterapia*. 2002 Oct;73(6):529-31.
11. Dethe DH, Erande RD, Ranjan A. Biomimetic total syntheses of borreverine and flinderole alkaloids. *J Org Chem*. 2013 Oct 18;78(20):10106-20.
12. Murtala Y, Babandi, A, Sunusi MM, Shehu D, Babagana K, et al. Effect of Aqueous Leaf Extract of *Borreria verticillata* of Sudano-Sehelian Savanna on CCl₄ induced hepatotoxicity. *Journal of Natural Sciences Research* 2015; 24:67-72.
13. Abdullahi-Gero HS, Ahmad AZAU, Hussaini IM. Evaluation of Antioxidant Activity of Leave Extract of *Borreria verticillata* Linn (Rubiaceae). *Journal of Natural Sciences Research*. 2014;9:25-30.
14. Dutra RC, Campos MM, Santos AR, Calixto JB. Medicinal plants in Brazil: Pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. *Pharmacol Res*. 2016 Jan 23.
15. Chen YC. Beware of docking! *Trends Pharmacol Sci*. 2015 Feb;36(2):78-95. Review. Erratum in: *Trends Pharmacol Sci*. 2015 Sep;36(9):617.
16. Sneha P, Doss CG. Molecular Dynamics: New Frontier in Personalized Medicine. *Adv Protein Chem Struct Biol*. 2016;102:181-224.

17. Verli H. Bioinformática da biologia á Flexibilidade Molecular. 1th ed. São Paulo: Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular; 2014.
18. Ogunwande IA, Walker TM, Bansal A, Setzer WN, Essien EE. Essential oil constituents and biological activities of *Peristrophe bicalyculata* and *Borreria verticillata*. *Nat Prod Commun*. 2010 Nov;5(11):1815-8.
19. Honmore VS, Kandhare AD, Kadam PP, Khedkar VM, Sarkar D, et al. Isolates of *Alpinia officinarum* Hance as COX-2 inhibitors: Evidence from anti-inflammatory, antioxidant and molecular docking studies. *Int Immunopharmacol*. 2016 Apr;33:8-17.
20. Wilches I, Tobar V, Peñaherrera E, Cuzco N, Jerves L, et al. Evaluation of anti-inflammatory activity of the methanolic extract from *Jungia rugosa* leaves in rodents. *J Ethnopharmacol*. 2015 Sep 15;173:166-71.
21. Miller KE, Hoffman EM, Sutharshan M, Schechter R. Glutamate pharmacology and metabolism in peripheral primary afferents: physiological and pathophysiological mechanisms. *Pharmacol Ther*. 2011 Jun;130(3):283-309.
22. Bong GW, Rosengren S, Firestein GS. Spinal cord adenosine receptor stimulation in rats inhibits peripheral neutrophil accumulation. The role of N-methyl-D-aspartate receptors. *J Clin Invest*. 1996 Dec 15;98(12):2779-85.
23. Morel V, Etienne M, Wattiez AS, Dupuis A, Privat AM, et al. Memantine, a promising drug for the prevention of neuropathic pain in rat. *Eur J Pharmacol*. 2013 Dec 5;721(1-3):382-90.
24. Buritova J, Chapman V, Honoré P, Besson JM. Interactions between NMDA- and prostaglandin receptor-mediated events in a model of inflammatory nociception. *Eur J Pharmacol*. 1996 May 6;303(1-2):91-100.
25. Olonode ET, Aderibigbe AO, Bakre AG. Anti-nociceptive activity of the crude extract of *Myrianthus arboreus* P. Beauv (Cecropiaceae) in mice. *J Ethnopharmacol*. 2015 Aug 2;171:94-8.
26. Rodrigues MR, Kanazawa LK, das Neves TL, da Silva CF, Horst H, et al. Antinociceptive and anti-inflammatory potential of extract and isolated compounds from the leaves of *Salvia officinalis* in mice. *J Ethnopharmacol*. 2012 Jan 31;139(2):519-26.
27. Shamsi MM, Keyhanfar F. Assessment of the antinociceptive effects of pregabalin alone or in combination with morphine during acetic acid-induced writhing in mice. *Pharmacol Biochem Behav*. 2013 Sep;110:249-54.
28. Santos AR, Gadotti VM, Oliveira GL, Tibola D, Paszcuk AF, et al. Mechanisms involved in the antinociception caused by agmatine in mice. *Neuropharmacology*. 2005 Jun;48(7):1021-34.
29. Hunskaar S, Hole K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain*. 1987 Jul;30(1):103-14.
30. Tjølsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH, Hole K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain*. 1992 Oct;51(1):5-17. Review.
31. Berrino L, Oliva P, Massimo F, Aurilio C, Maione S, Grella A, et al. Antinociceptive effect in mice of intraperitoneal N-methyl-D-aspartate receptor antagonists in the formalin test. *Eur J Pain*. 2003;7(2):131-7.
32. Christoph T, Reissmüller E, Schiene K, Englberger W, Chizh BA. Antiallodynic effects of NMDA glycine(B) antagonists in neuropathic pain: possible peripheral mechanisms. *Brain Res*. 2005 Jun 28;1048(1-2):218-27.
33. Davidson EM, Carlton SM. Intraplantar injection of dextrorphan, ketamine or memantine attenuates formalin-induced behaviors. *Brain Res*. 1998 Feb 23;785(1):136-42.

34. McRoberts JA, Ennes HS, Marvizón JC, Fanselow MS, Mayer EA, et al. Selective knockdown of NMDA receptors in primary afferent neurons decreases pain during phase 2 of the formalin test. *Neuroscience*. 2011 Jan 13;172:474-82.
35. D'Amour FE, Smith DL. (1941) A method for determining loss of pain sensation. *J Pharmacol Exp Ther* 72:74–79.
36. Danneman PJ, Kiritsy-Roy JA, Morrow TJ, Casey KL. Central delay of the laser-activated rat tail-flick reflex. *Pain*. 1994 Jul;58(1):39-44.
37. Parsons CG, Danysz W, Quack G. Memantine is a clinically well tolerated N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist a review of preclinical data. *Neuropharmacology*. 1999 Jun;38(6):735-67.
38. Abdullahi-Gero HS, Ahmed A, Zezi AU, Hussaini IM. Preliminary evaluation of ethanol leaf extract of *Borreria verticillata* Linn (Rubiaceae) for analgesic and anti-inflammatory effects. *Journal of Medicinal Plant research*. 2014 May 8(20): 736-747.
39. Couto AG, Kassuya CAL, Calixto JB, Petrovick PR. Anti-inflammatory, antiallodynic effects and quantitative analysis of gallic acid in spray dried powders from *Phyllanthus niruri* leaves, stems, roots and whole plant. *Rev. bras. farmacogn*. 2013 Feb 23(1):124-131.
40. Mehrotra A, Shanbhag R, Chamallamudi MR, Singh VP, Mudgal J. Ameliorative effect of caffeic acid against inflammatory pain in rodents. *Eur J Pharmacol*. 2011 Sep;666(1-3):80-6.
41. Mansouri MT, Naghizadeh B, Ghorbanzadeh B. Involvement of opioid receptors in the systemic and peripheral antinociceptive actions of ellagic acid in the rat formalin test. *Pharmacol Biochem Behav*. 2014 May;120:43-9.
42. Takada K, Nakane T, Masuda K, Ishii H. Ursolic acid and oleanolic acid, members of pentacyclic triterpenoid acids, suppress TNF- α -induced E-selectin expression by cultured umbilical vein endothelial cells. *Phytomedicine*. 2010 Dec 1;17(14):1114-9.
43. Guimarães AG, Scotti L, Scotti MT, Mendonça Júnior FJ, et al. Evidence for the involvement of descending pain-inhibitory mechanisms in the attenuation of cancer pain by carvacrol aided through a docking study. *Life Sci*. 2014 Oct 22;116(1):8-15.
44. Rowlinson SW, Kiefer JR, Prusakiewicz JJ, Pawlitz JL, Kozak KR, et al. A novel mechanism of cyclooxygenase-2 inhibition involving interactions with Ser-530 and Tyr-385. *J Biol Chem*. 2003 Nov 14;278(46):45763-9.
45. Xu S, Hermanson DJ, Banerjee S, Ghebreselasie K, Clayton GM, et al. Oxicams bind in a novel mode to the cyclooxygenase active site via a two-water-mediated H-bonding Network. *J Biol Chem*. 2014 Mar 7;289(10):6799-808.
46. Orlando BJ, Malkowski MG. Substrate-selective Inhibition of Cyclooxygenase-2 by Fenamic Acid Derivatives Is Dependent on Peroxide Tone. *J Biol Chem*. 2016 Jul 15;291(29):15069-81.
47. Orlando BJ, Lucido MJ, Malkowski MG. The structure of ibuprofen bound to cyclooxygenase-2. *J Struct Biol*. 2015 Jan;189(1):62-6.
48. Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, Menniti FS, Vance KM, et al. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol Rev*. 2010 Sep;62(3):405-96. doi: 10.1124/pr.109.002451. Review. Erratum in: *Pharmacol Rev*. 2014 Oct;66(4):1141.
49. Kaye SL, Sansom MS, Biggin PC. Molecular dynamics simulations of the ligand-binding domain of an N-methyl-D-aspartate receptor. *J Biol Chem*. 2006 May 5;281(18):12736-42.

50. Furukawa H, Gouaux E. Mechanisms of activation, inhibition and specificity: crystal structures of the NMDA receptor NR1 ligand-binding core. *EMBO J*. 2003 Jun 16;22(12):2873-85.
51. Kvist T, Steffensen TB, Greenwood JR, Mehrzad Tabrizi F, Hansen KB, et al. Crystal structure and pharmacological characterization of a novel N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonist at the GluN1 glycine binding site. *J Biol Chem*. 2013 Nov 15;288(46):33124-35.
52. Lee CH, Lü W, Michel JC, Goehring A, Du J, et al. NMDA receptor structures reveal subunit arrangement and pore architecture. *Nature*. 2014 Jul 10;511(7508):191-7.
53. Verano J, González-Trujano ME, Déciga-Campos M, Ventura-Martínez R, Pellicer F. Ursolic acid from *Agastache mexicana* aerial parts produces antinociceptive activity involving TRPV1 receptors, cGMP and a serotonergic synergism. *Pharmacol Biochem Behav*. 2013 Sep;110:255-64.
54. Kashyap D, Tuli HS, Sharma AK. Ursolic acid (UA): A metabolite with promising therapeutic potential. *Life Sci*. 2016 Feb 1;146:201-13.
55. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Farmacopéia Brasileira*. 2010;1: 81-62.
56. Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LAT, et al. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 3th ed. Porto Alegre: Editora da Universidade UFRGS;2010.
57. Souza FHT. *FITOQUÍMICA DE BORRERIA VERTICILLATA (L.) G. MEY., BORRERIA OCYMOIDES (BURM. F.) DC. E RICHARDIA BRASILIENSIS GOMES (RUBIACEAE)* [dissertation]. João Pessoa (PB): Universidade Federal da Paraíba; 2013.
58. Dutra RP, Abreu BV, Cunha MS, Batista MC, Torres LM, et al. Phenolic acids, hydrolyzable tannins, and antioxidant activity of geopropolis from the stingless bee *Melipona fasciculata* Smith. *J Agric Food Chem*. 2014 Mar 26;62(12):2549-57.
59. Dutra RP, Nogueira AMC, Marques RRO, Costa MCP, Ribeiro MNS. Avaliação farmacognóstica de geoprópolis de *Melipona fasciculata* Smith da Baixada maranhense, Brasil. *Rev. bras. farmacogn*. 2008; 18: 557-562.
60. Winter CA, Risley EA, Nuss GW. Carrageenin-induced edema in hind paw of the rat as an assay for antiinflammatory drugs. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1962 Dec;111:544-7.
61. Sadeghi H, Hajhashemi V, Minaiyan M, Movahedian A, Talebi A. A study on the mechanisms involving the anti-inflammatory effect of amitriptyline in carrageenan-induced paw edema in rats. *Eur J Pharmacol*. 2011 Sep 30;667(1-3):396-401.
62. Koster R, Anderson M, Debeer EJ. 1959. Acetic acid analgesic screening. *Fed. Proc*. 18, 418–420.
63. Nemoto W, Ogata Y, Nakagawasai O, Yaoita F, Tanado T, et al. The intrathecal administration of losartan, an AT1 receptor antagonist, produces an antinociceptive effect through the inhibition of p38 MAPK phosphorylation in the mouse formalin test. *Neurosci Lett*. 2015 Jan 12;585:17-22.
64. GaussView, Version 5, Dennington R, Keith T. Millam J. Semichem Inc., Shawnee Mission, KS, 2009.
65. Gaussian 09, Revision D.01, Frisch MJ, Trucks GW, Schlegel HB, Scuseria GE, Robb MA, Cheeseman JR, et al., Gaussian, Inc., Wallingford CT, 2009.
66. Ramos RM, Perez JM, Baptista LA, de Amorim HL. Interaction of wild type, G68R and L125M isoforms of the arylamine-N-acetyltransferase from *Mycobacterium*

tuberculosis with isoniazid: a computational study on a new possible mechanism of resistance. *J Mol Model*. 2012 Sep;18(9):4013-24.

67. Webb B, Sali A. Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER. *Curr Protoc Bioinformatics*. 2014 Sep 8;47:561-32.

68. Laskowski RA, MacArthur MW, Moss DS, Thornton JM. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. *J. Appl. Crystallogr*. 1993;26:283–291.

69. Colovos C, Yeates TO. Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions. *Protein Sci*. 1993 Sep;2(9):1511-9.

70. Berk Hess, David van der Spoel, and Erik Lindahl. Gromacs User Manual version 4.6.7. Disponível em <<http://www.gromacs.org>> Acesso em 10 de abril de 2016.

71. Morris GM, Huey R, Olson AJ. Using AutoDock for ligand-receptor docking. *Curr Protoc Bioinformatics*. 2008 Dec;Chapter 8:Unit 8.14.

72. Malde AK, Zuo L, Breeze M, Stroet M, Poger D, Nair PC, et al. An Automated Force Field Topology Builder (ATB) and Repository: Version 1.0. *J Chem Theory Comput*. 2011 Dec 13;7(12):4026-37.

Legenda das figuras

Fig 1. Edema de pata induzido pela administração subplantar de carragenina 1% em camundongos tratados via oral com NaCl 0.9%, indometacina 10 mg/kg, memmanatina 10 mg/Kg, EHBv 500 mg/Kg e FAc (25mg/kg e 50 mg/Kg). a: INDO vs CTL; b: MEM vs CTL; c: EHBv 500 vs CTL; d: FAc 25 vs CTL; e: FAc 50 vs CTL. n =6, $p < 0,05$ (ANOVA; Newman Keuls).

Fig 2. Contorções abdominais induzidas pela administração intraperitoneal de ácido acético 0.8% (10 ml/Kg) em camundongos tratados via oral com NaCl 0.9%, indometacina 10 mg/kg, memantina 10 mg/Kg, EHBv 500 mg/Kg e FAc (25mg/kg e 50 mg/Kg). a: INDO vs CTL; b: MEM vs CTL; c: EHBv 500 vs CTL; d: FAc 25 vs CTL; e: FAc 50 vs CTL, n= 6, $p < 0,05$ (ANOVA; Newman Keuls).

Fig 3. Teste da formalina induzido pela administração de formalina subplantar em camundongos tratados via oral com NaCl 0.9%, indometacina 10 mg/kg, memantina 10 mg/Kg, EHBv 500 mg/Kg e FAc (25mg/kg e 50 mg/Kg). a: INDO vs CTL; b: MEM vs CTL; c: EHBv 500 vs CTL; d: FAc 25 vs CTL; e: FAc 50 vs CTL; n= 6, $p < 0,05$ (ANOVA; Newman Keuls).

Fig 4. Tail flick teste em ratos tratados via oral com NaCl 0.9%, indometacina 10 mg/kg, memantina 10 mg/Kg, EHBv 500 mg/Kg e FAc (25mg/kg e 50 mg/Kg). b: MEM vs CTL, n= 6, $p < 0,05$ (ANOVA; Newman Keuls).

Fig 5. Conformação espacial obtida por docagem molecular do ácido ursólico (amarelo) e indometacina (azul) com a enzima COX-2 (PDB: 1DDX). Imagem gerada pelo VMD.

Fig 6. Conformação espacial obtida por docagem molecular dos ligantes ácido ursólico (amarelo) e memantina (verde) com o receptor N-metil-D-aspartato (NMDA). (A): GluN1a, (B): GluN2B. Imagem gerada pelo VMD

Fig 7. Frequência de contatos hidrofóbicos (verde) e pontes de hidrogênio (laranja) entre ácido ursólico + COX-2 (A) e indometacina + COX-2 (B). As frequências correspondem aos 4 ns finais de simulações de dinâmica molecular.

Fig 8. Frequência de contatos hidrofóbicos (verde) e pontes de hidrogênio (laranja) entre ursólico + GluN1a (A), ácido ursólico + GluN2B (B), memantina + GluN1a (C) memantina + GluN2B (D). As frequências correspondem aos 4 ns finais de simulações de dinâmica molecular.

Fig 9. Edema de pata induzido pela administração subplantar de carragenina 1% em camundongos tratados via oral com NaCl 0.9%, indometacina 10 mg/kg, memmanatina 10 mg/Kg e ácido ursólico 10 mg/Kg. a: INDO vs CTL; b: MEM vs CTL; f: AU vs CTL. n =6, $p < 0,05$ (ANOVA; Newman Keuls).

Fig 10. Tail flick teste em ratos tratados via oral com NaCl 0.9%, indometacina 10 mg/kg, memantina 10 mg/Kg, EHBv 500 mg/Kg e e ácido ursólico 10 mg/Kg. b: MEM vs CTL; f: AU vs CTL. n= 6, $p < 0,05$ (ANOVA; Newman Keuls).

Tabela 1. Interações por docagem molecular da indometacina, memantina e compostos identificados na FAc com COX-2, GluN1a e GluN2B.

GluN1a			GluN2B			COX-2		
Ligante	EL* (kcal/mol)	Ki** (uM)	Ligante	EL* (kcal/mol)	Ki** (uM)	Ligante	EL* (kcal/mol)	Ki** (uM)
Memantina	-7.82	1.86	Memantina	-5.66	71.18	Indometacina	-8.30	0.82
Ac. Ursólico	-7.02	7.13	Ac. Ursólico	-5.69	67.35	Ac. Ursólico	-9.86	0.05
Ac. Elágico	-5.67	70.17	Ac. Gálico	-5.34	122.58	Ac. Elágico	-7.54	2.99
Ac. Gálico	-4.57	448.26	Ac. Caféico	-5.16	164.28	Ac. Caféico	-6.68	12.69
Ac. Caféico	-4.47	531.44	Ac. Elágico	-5.04	201.80	Ac. Gálico	-5.88	49.19

*EL - Energia de Ligação

** Ki - Constante de Inibição

Tabela 2. Interações do ácido ursólico, memantina e indometacina para as conformações escolhidas por docagem molecular.

GluN1a			GluN2B		COX-2	
Ligante	Ligações de Hidrogênio	Interações Hidrofóbicas	Ligações de Hidrogênio	Interações Hidrofóbicas	Ligações de Hidrogênio	Interações Hidrofóbicas
Ac. Ursólico	Tyr535, Arg733	Ile497, Phe507, Ser508, Lys509, Pro510, Ser734, Gly735	Phe493, Lys736	Ile483, Ser420, Glu489, Val491, Asp492	Lys83, Tyr122, Ser471	Pro84, Tyr115, Ser119, Arg120, Leu123, Phe470, Glu524, Pro528
Memantina	Asp765, Asp767	Lys512, Ala712, Glu715, Phe716, Glu764	Val490	Val169, Trp171, Glu489, Lys736, Asp737	NA	NA
Indometacina	NA	NA	NA	NA	Lys83, Tyr122	Asn43, Arg44, Thr62, Leu80, Lys468, Arg469, Ser471.

NA - Não Avaliado

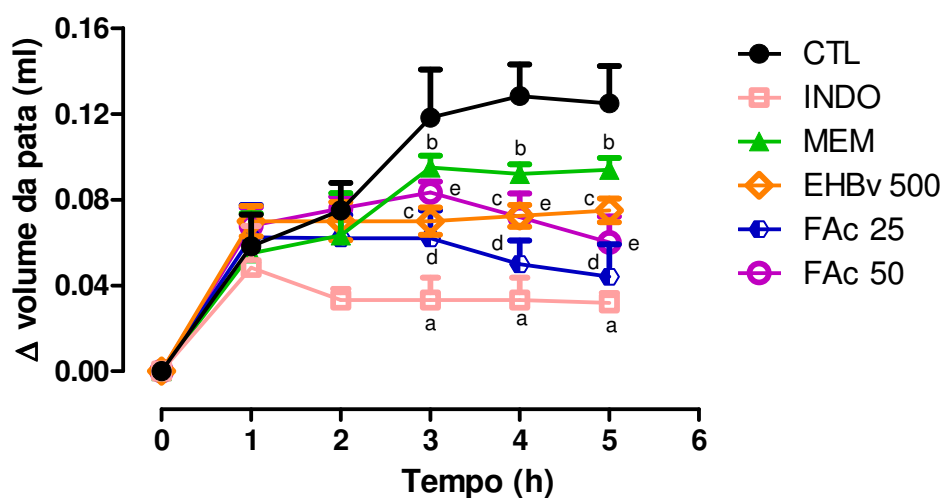


Fig 1. Edema de pata induzido pela administração subplantar de carragenina 1% em camundongos tratados via oral com NaCl 0.9%, indometacina 10 mg/kg, memmanatina 10 mg/Kg, EHBv 500 mg/Kg e FAc (25mg/kg e 50 mg/Kg). a: INDO vs CTL; b: MEM vs CTL; c: EHBv 500 vs CTL; d: FAc 25 vs CTL; e: FAc 50 vs CTL. n=6, $p < 0,05$ (ANOVA; Newman Keuls).

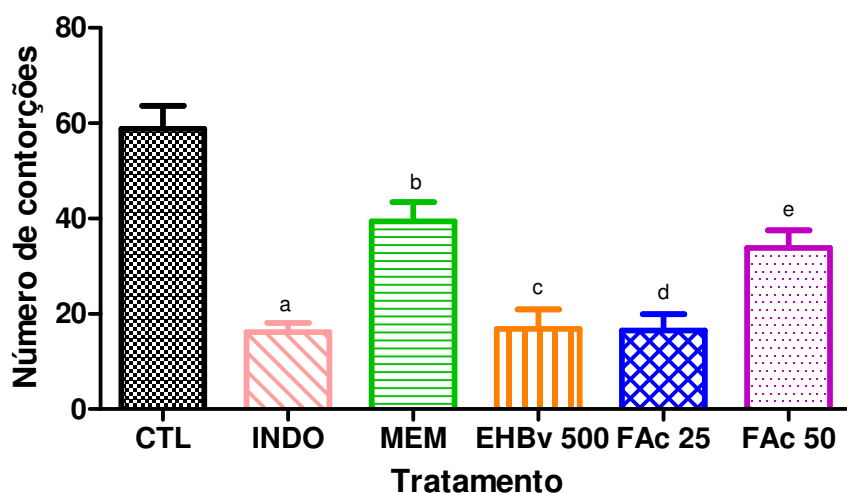


Fig 2. Contorções abdominais induzidas pela administração intraperitoneal de ácido acético 0.8% (10 ml/Kg) em camundongos tratados via oral com NaCl 0.9%, indometacina 10 mg/kg, memantina 10 mg/Kg, EHBv 500 mg/Kg e FAc (25mg/kg e 50 mg/Kg). a: INDO vs CTL; b: MEM vs CTL; c: EHBv 500 vs CTL; d: FAc 25 vs CTL; e: FAc 50 vs CTL, n= 6, $p < 0,05$ (ANOVA; Newman Keuls).

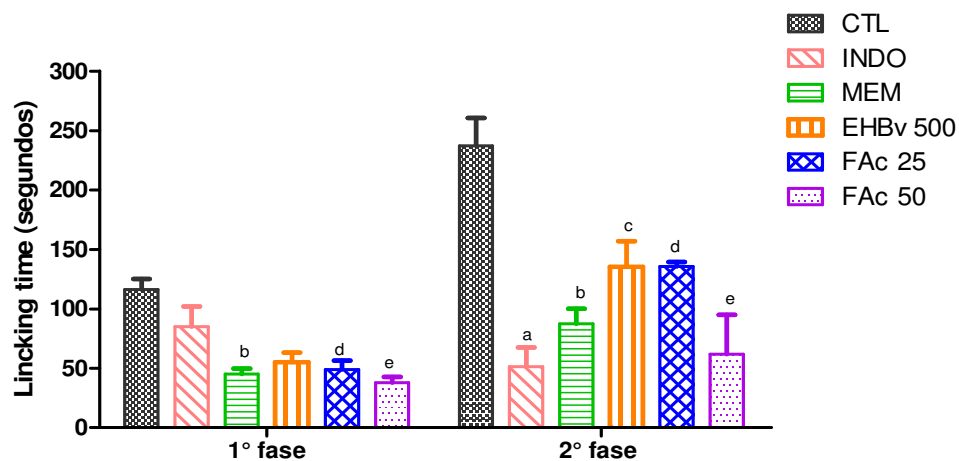


Fig 3. Teste da formalina induzido pela administração de formalina subplantar em camundongos tratados via oral com NaCl 0.9%, indometacina 10 mg/kg, memantina 10 mg/Kg, EHBv 500 mg/Kg e FAc (25mg/kg e 50 mg/Kg). a: INDO vs CTL; b: MEM vs CTL; c: EHBv 500 vs CTL; d: FAc 25 vs CTL; e: FAc 50 vs CTL; n= 6, $p < 0,05$ (ANOVA; Newman Keuls).

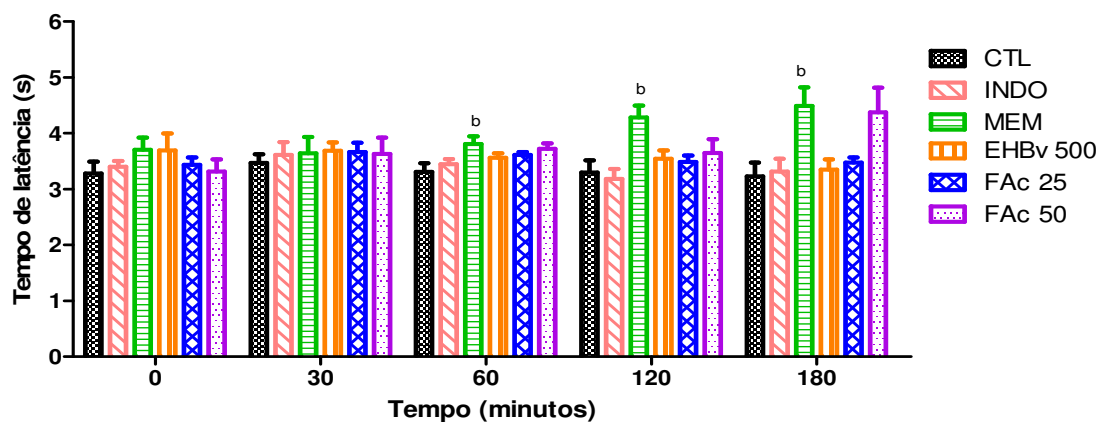


Fig 4. Tail flick teste em ratos tratados via oral com NaCl 0.9%, indometacina 10 mg/kg, memantina 10 mg/Kg, EHBv 500 mg/Kg e FAc (25mg/kg e 50 mg/Kg). b: MEM vs CTL, n= 6, $p < 0,05$ (ANOVA; Newman Keuls).

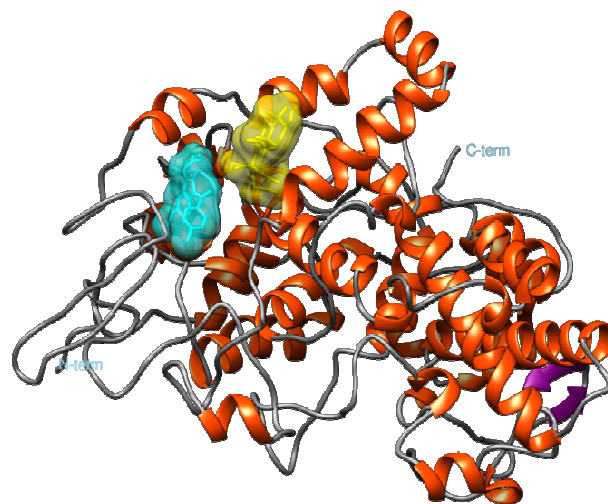


Fig 5. Conformação espacial obtida por docagem molecular do ácido ursólico (amarelo) e indometacina (azul) com a enzima COX-2 (PDB: 1DDX). Imagem gerada pelo VMD.

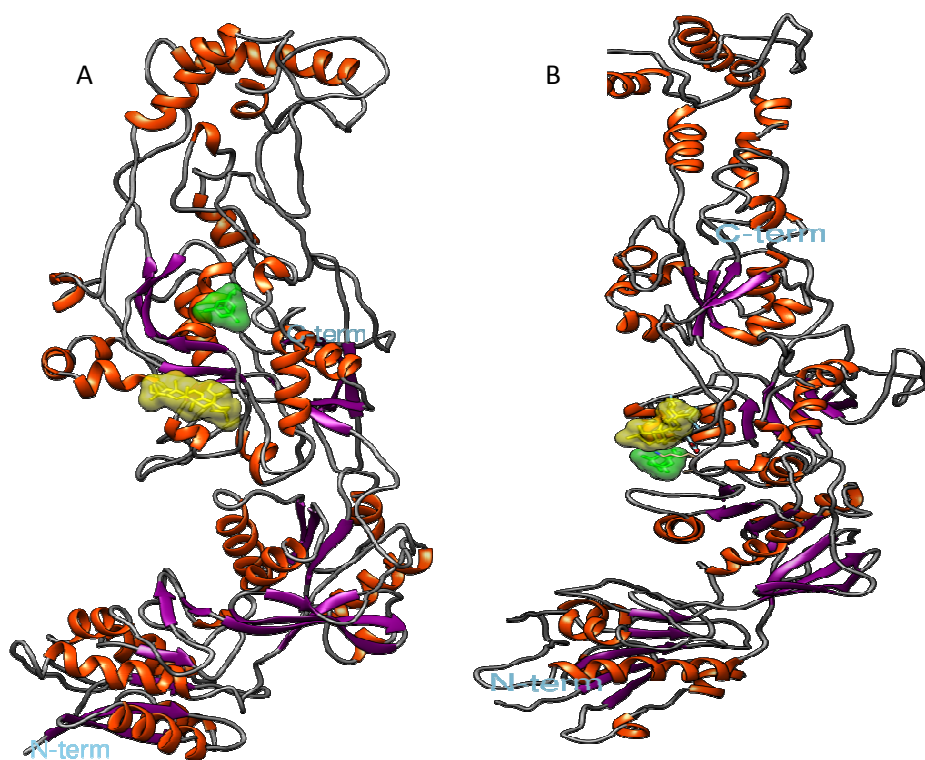


Fig 6. Conformação espacial obtida por docagem molecular dos ligantes ácido ursólico (amarelo) e memantina (verde) com o receptor N-metil-D-aspartato (NMDA). (A): GluN1a, (B): GluN2B. Imagem gerada pelo VMD.

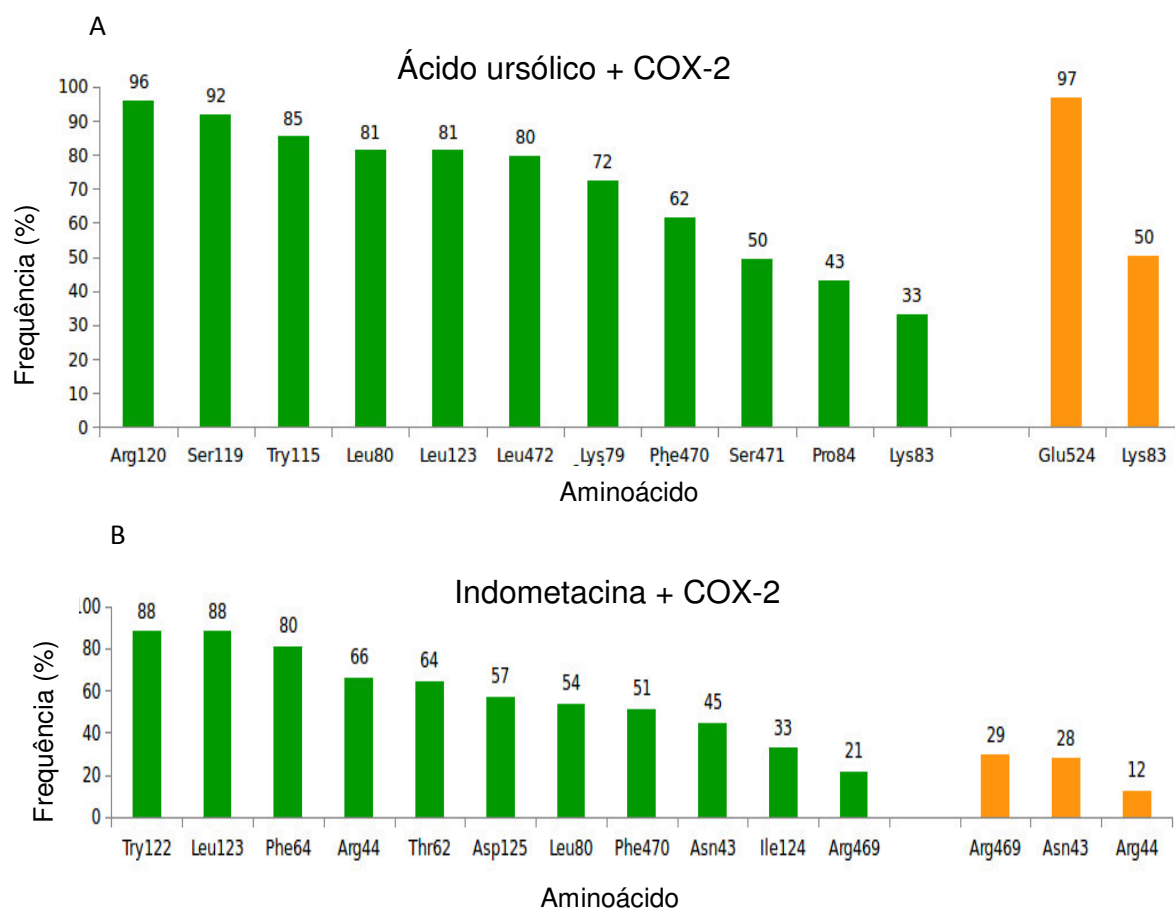


Fig 7. Frequência de contatos hidrofóbicos (verde) e pontes de hidrogênio (laranja) entre ácido ursólico + COX-2 (A) e indometacina + COX-2 (B). As frequências correspondem aos 4 ns finais de simulações de dinâmica molecular.

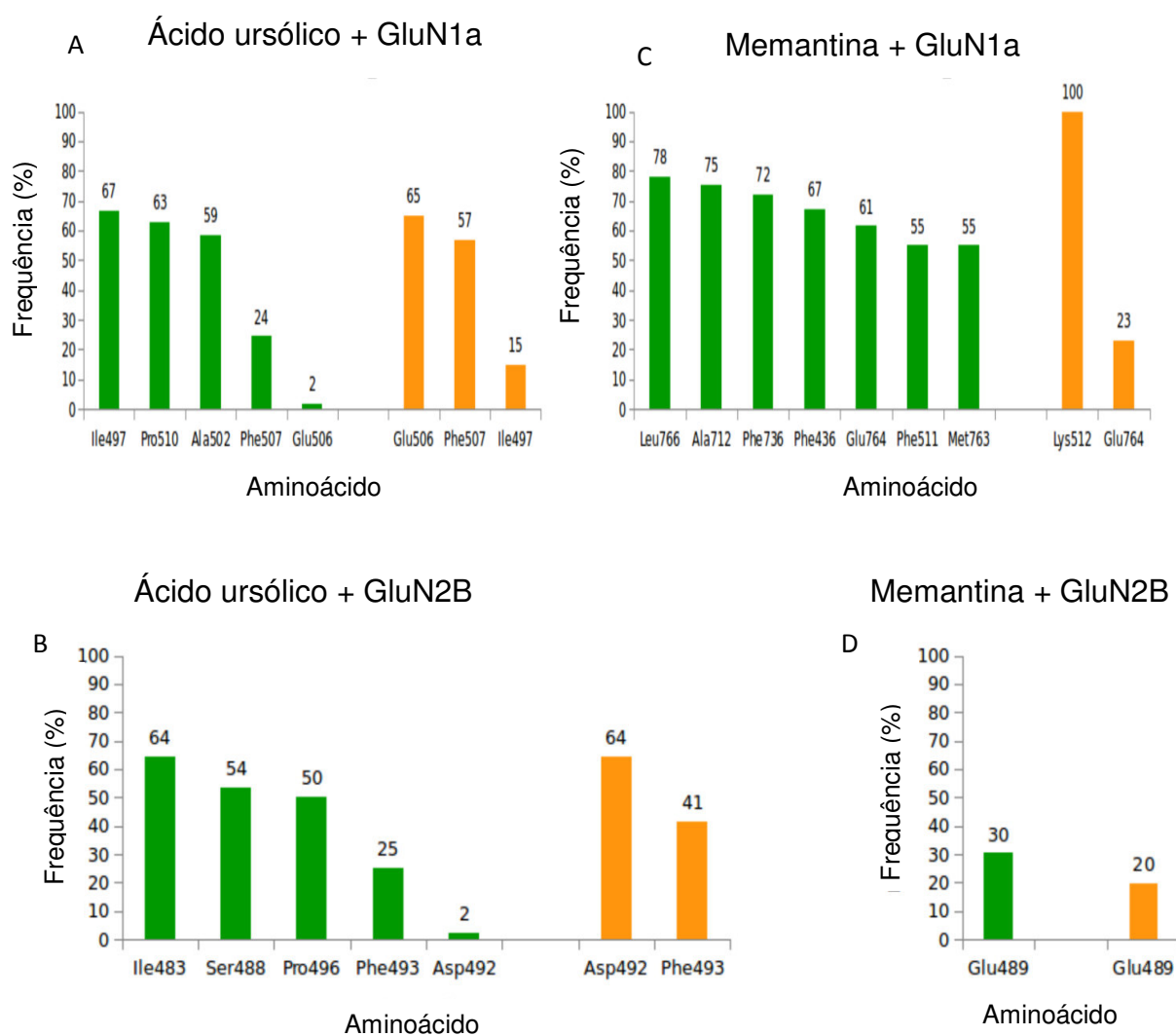


Fig 8. Frequência de contatos hidrofóbicos (verde) e pontes de hidrogênio (laranja) entre ursólico + GluN1a (A), ácido ursólico + GluN2B (B), memantina + GluN1a (C) memantina + GluN2B (D). As frequências correspondem aos 4 ns finais de simulações de dinâmica molecular.

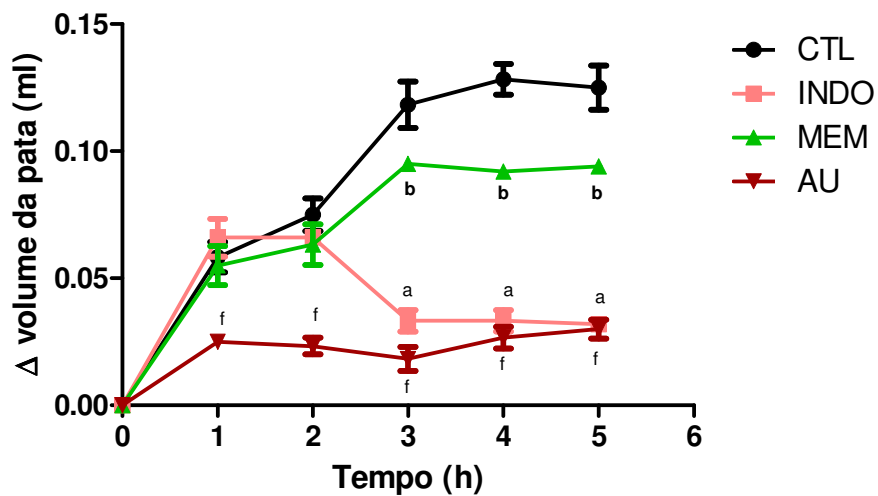


Fig 9. Edema de pata induzido pela administração subplantar de carragenina 1% em camundongos tratados via oral com NaCl 0.9%, indometacina 10 mg/kg, memmanatina 10 mg/Kg e ácido ursólico 10 mg/Kg. a: INDO vs CTL; b: MEM vs CTL; f: AU vs CTL. n =6, $p < 0,05$ (ANOVA; Newman Keuls).

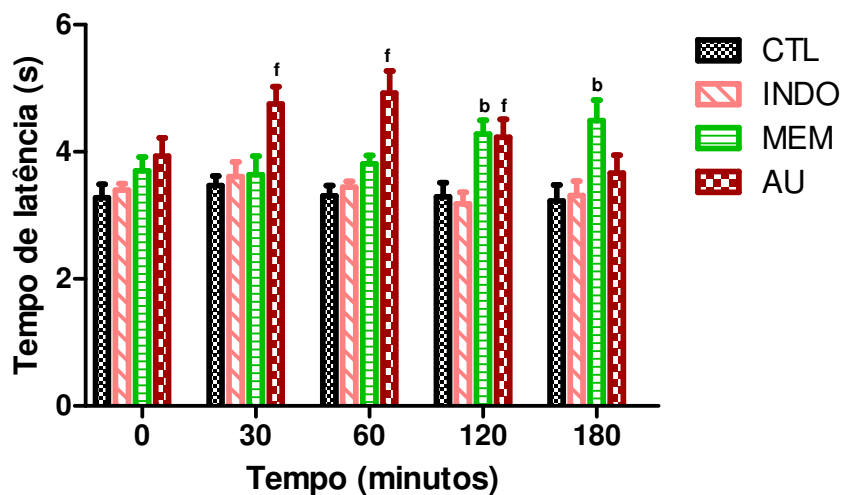


Fig 10. Tail flick teste em ratos tratados via oral com NaCl 0.9%, indometacina 10 mg/kg, memantina 10 mg/Kg, EHBv 500 mg/Kg e e ácido ursólico 10 mg/Kg. b: MEM vs CTL; f: AU vs CTL. n= 6, $p < 0,05$ (ANOVA; Newman Keuls).

APÊNDICE A

Tabela S1. Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-UV-Vis) dos constituintes identificados no extrato hidrolacoólico (EHBv) e fração acetato de etila (FAC) de *B. verticillata*

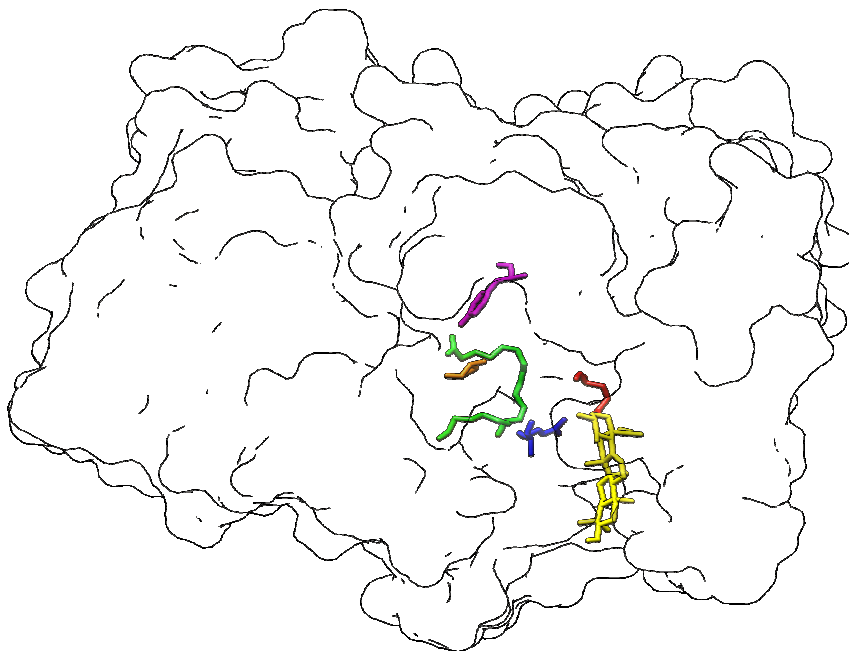
	Composto	Tempo de retenção (tR) min.	Área (%)
EHBv	Ácido gálico	9,650	1,13
	β-sitosterol	12,973	0,14
	Ácido Glicirritínico	13,908	1,97
	β-Amirina	14,238	26,67
	Ácido caféico	16,440	0,13
	Ácido cumarínico	20,033	1,20
	Quercetina	31,732	14,40
FAC	Ácido gálico	4,793	7,364
	Ácido ursólico	6,323	2,366
	Ácido caféico	6,717	2,366
	Ácido elágico	8,202	6,176

Tabela S2. Identificação dos constituintes presentes a fração acetato de etila (FAC) de *B. verticillata*

Classe dos componentes	Compostos identificados	(%) Área
Álcool	Glicerol	9,7
	Butanetriol	3,06
Açúcares	D-psicofuranose	10,72
	Fructopiranose	2,41
	Glicopiranose	33,47
	D-galactose	1,55
Ácidos graxos	Trealose	1,81
	Ácido palmítico	2,04
	Ácido esteárico	2,71
	Ácido 10-undecenóico	15,70
	1-monopalmitina	2,21
Flavonóides	Quercetina	1,99
	Miricetina	2,16

APÊNDICE B

A



B

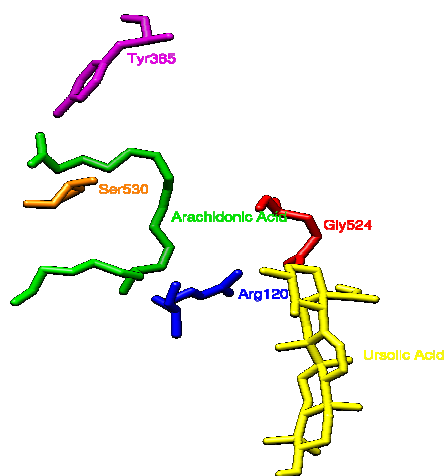


Fig. S1. Sobreposição da estrutura cristalográfica código PDB 4RUT (COX-2 complexada com o ácido araquidônico) com o último frame da simulação por DM do ácido ursólico com a COX-2. (A) Modo de ligação do ácido ursólico (amarelo) e ácido araquidônico (verde) na COX-2. COX-2 representada por superfície molecular transparente. (B) Expansão do modo de ligação dos ácidos ursólico e araquidônico com resíduos do local ativo Arg120 (azul), Gly524 (vermelho), Ser530 (laranja) e Tyr385 (roxo) representados em varetas.

4. CONCLUSÃO

O extrato hidroalcólico e fração acetato de etila de *B. verticillata* apresentaram atividade predominantemente antinociceptiva periférica. Esta foi demonstrada pela redução do número de contorções abdominais e redução do tempo de resposta no teste da formalina. Pode-se ainda sugerir a participação de componentes anti-inflamatórios demonstrado pelo efeito antiedematogênico no teste do edema de pata. A atividade antinociceptiva periférica pode estar ligada à presença de compostos fenólicos e terpenos que podem contribuir redução da atividade da enzima COX-2, do receptor NMDA periférico e consequentemente para redução da dor.

Dos compostos identificados, o ácido ursólico foi o composto que apresentou melhores parâmetros de afinidade durante os cálculos de docagem molecular e manteve interações com aminoácidos pertencentes ao local ativo da enzima COX-2 e receptor NMDA durante as simulações de dinâmica molecular. Além disso, os teste *in vivo* demonstraram que o ácido ursólico apresentou efeito anti-inflamatório e analgésico central. Então, sugere-se que o ácido ursólico é o principal composto ativo presente nas partes áreas de *B. verticillata*, sendo um composto promissor para o desenvolvimento de fármacos utilizados para analgesia.

ANEXO A- INSTRUÇÕES PARA SUBMISSÃO “[PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF THE UNITED STATES OF AMERICA](#)”

Initial Submission.

All authors must submit their articles at www.PNAScentral.org. Only a single PDF file containing all text, figures, tables, and SI is required for initial Direct Submission. High-resolution files are not required for initial submission. The corresponding author must include the following information for each coauthor: author order, first name, last Name, email address, and institution. Authors may upload a cover letter (optional), video files, and datasets separately. A length estimate is not required for initial submissions, but 6-page articles should be under 49,000 characters (including spaces, figures, and tables) and 10-page articles under 82,000. PNAS Plus submissions undergo the same review process as Direct Submissions. Authors writing their papers in LaTeX should use our [LaTeX template](#). Authors will need to complete the [License to Publish](#) form and provide permissions for any [previously published material](#).

Revised and Contributed Submission.

Authors of Contributed papers and authors of revisions or resubmissions must provide publication-ready source files; guidelines for submitting source files appear below. Publication-ready file formats include Word and LaTeX. Only one article text file should be submitted. SI text files should be uploaded separately. Figures and tables should not be included in main or SI text files. Corresponding authors of Contributed papers will be provided a URL for file submission after the member has initiated the process by providing his or her endorsement and copies of the reviews received.

Manuscript Length.

PNAS generally uses a two-column format averaging 67 characters, including spaces, per line. The maximum length of a regular research article is 6 pages (or 10 pages for PNAS Plus articles), including all text, spaces, and the number of characters displaced by figures, tables, and equations.

An [online submission tool](#) provides authors with an estimation of whether their manuscript fits within the PNAS length requirements (see [Length Estimate Guidelines and FAQ](#)). When submitting tables, figures, and/or equations in addition to text, keep the text for your manuscript under 39,000 characters (including spaces) for 6-page articles and 65,000 for 10-page articles.

Digital Figures.

High-resolution figure files are not required for initial submissions. Resolution of at least 300 dpi for all figures is required. Only TIFF, EPS, PowerPoint, and high-resolution PDF for Mac or PC are allowed for figures that will appear in the main text. Authors may submit PRC or U3D files for 3D images; these must be accompanied by 2D representations in TIFF, EPS, or high-resolution PDF format. (See [SI](#) below for supplementary material.) Color images must be in RGB (red, green, blue) mode. Include the font files for any text. Images must be final size, preferably one column width (8.7 cm). Figures wider than one column should be sized to 11.4 cm or 17.8 cm wide. Numbers, letters, and symbols should be no smaller than 6 points (2 mm) and no larger than 12 points (6 mm) after reduction and must be consistent. Composite figures must be preassembled. Figures must be submitted as separate files, not embedded in manuscript text. See the [Digital Art Guidelines](#). Figures and tables may be enlarged to improve legibility of text.

Tables.

Each table should have a brief title above the table. Table footnotes should be below the table. Tables must be submitted as separate files, not embedded in the manuscript text. Publication-ready formats include Word and LaTeX.

SI.

The main text of the paper must stand on its own without the [SI](#). Refer to SI in the manuscript at an appropriate point in the text. Number supporting figures and tables starting with S1, S2, etc. Authors are limited to no more than 10 SI files, not including movie files.

Authors who place detailed materials and methods in SI must provide sufficient detail in the main text methods to enable a reader to follow the logic of the procedures and results and also must reference the online methods. If a paper is fundamentally a study of a new method or technique, then the methods must be described completely in the main text.

Because PNAS edits SI and composes it into a single PDF, authors must provide the following file formats only:

- *Text*: Supply Word, RTF, or LaTeX files (LaTeX files must be accompanied by a PDF with the same file name for visual reference).
- *Figures*: Provide a brief legend for each supporting figure after the supporting text. Provide figure images in TIFF, EPS, PowerPoint, high-resolution PDF, JPEG, or GIF format; figures may not be embedded in manuscript text. When saving TIFF files, use only LZW compression; do not use JPEG compression. Do not save figure numbers, legends, or author names as part of the image. Composite figures must be preassembled.
- *3D figures*: Supply a composable U3D or PRC file so that it may be edited and composed. Authors may submit a PDF file but please note it will be published in raw format and will not be edited or composed.
- *Tables*: Supply Word, RTF, or LaTeX files (LaTeX files must be accompanied by a PDF with the same file name for visual reference); include only one table per file. Do not use tabs or spaces to separate columns in Word tables.
- *Datasets*: Supply Excel (.xls), RTF, PDF, CSV, or TXT files. This file type will be published in raw format and will not be edited or composed.
- *Movies*: Supply Audio Video Interleave (avi), Quicktime (mov), Windows Media (wmv), animated GIF (gif), or MPEG files and submit a brief legend for each movie in a Word or RTF file. All movies should be submitted at the desired reproduction size and length. Movies should be no more than 10 MB in size.
- *Still images*: Authors must provide a still image from each video file. Supply TIFF, EPS, high-resolution PDF, JPEG, or GIF files.
- *Appendices*: PNAS prefers that authors submit individual source files to ensure readability. If this is not possible, supply a single PDF file that contains all of the SI associated with the paper. This file type will be published in raw format and will not be edited or composed.

Journal Cover Figures.

Authors are invited to submit scientifically interesting and visually arresting cover images. For examples, see www.pnas.org/coverarchive. Illustrations need not be reprinted in the article but should be representative of the work. Images should be original, and authors grant PNAS the exclusive license to publish. Include a brief lay-language caption (50–60 words) and credit information (e.g., Image courtesy of...). Images should be 21 cm wide by 22.5 cm high. Files should be EPS or TIFF and should be in RGB (red, green, blue) color mode. Cover figure files may be submitted

online when the paper is submitted or may be sent to PNASCovers@nas.edu; contact PNAS for instructions on submitting large files. Submissions provided outside the online submission system should include manuscript number, author name, phone, and email.

Manuscript Format

Manuscript Order.

Many authors find it useful to organize their manuscripts with the following order of sections; title page, abstract, significance statement, introduction, results, discussion, materials and methods, acknowledgments, references, and figure legends. Provided that authors present information clearly and concisely, other variations to this format are allowed. Number all manuscript pages starting with the title page as page 1.

Title Page. Please note that information entered in the submission form will be used for publication purposes (e.g., author contact information and affiliations). Please also include the following information on the title page:

- *Classification:* Select a major (Physical, Social, or Biological Sciences) and a minor category from the following. Dual classifications are permitted between major categories and in exceptional cases, subject to Editorial Board approval, within a major category.
- **PHYSICAL SCIENCES:** Applied Mathematics; Applied Physical Sciences; Astronomy; Chemistry; Computer Sciences; Earth, Atmospheric, and Planetary Sciences; Engineering; Environmental Sciences; Mathematics; Physics; Statistics; and Sustainability Science.
- **SOCIAL SCIENCES:** Anthropology; Economic Sciences; Environmental Sciences; Political Sciences; Psychological and Cognitive Sciences; Social Sciences; and Sustainability Science.
- **BIOLOGICAL SCIENCES:** Agricultural Sciences; Anthropology; Applied Biological Sciences; Biochemistry; Biophysics and Computational Biology; Cell Biology; Developmental Biology; Ecology; Environmental Sciences; Evolution; Genetics; Immunology and Inflammation; Medical Sciences; Microbiology; Neuroscience; Pharmacology; Physiology; Plant Biology; Population Biology; Psychological and Cognitive Sciences; Sustainability Science; and Systems Biology.
- *Title:* Titles should be no more than three typeset lines (generally 135 characters including spaces) and should be comprehensible to a broad scientific audience. The specific organism studied should be included. Please provide a short title of fewer than 50 characters including spaces for mobile devices and RSS feeds.
- *Author affiliation:* Include department, institution, and complete address, with the ZIP/postal code, for each author. Use superscripts to match authors with institutions. Authors are encouraged to supply their ORCID iD at submission.
- *Corresponding author:* The name, complete address, telephone number, and email address of the author to whom correspondence and proofs should be sent. Email addresses will appear in the article footnotes.
- *Keywords:* Keywords are listed below the abstract of the published article. At least three keywords are required at submission.

Abstract. Provide an abstract of no more than 250 words on page 2 of the manuscript. Abstracts should explain to the general reader the major contributions of the article. References in the abstract must be cited in full within the abstract itself and cited in the text.

Significance Statement. Authors must submit a 120-word-maximum statement about the significance of their research paper written at a level understandable to an undergraduate-educated scientist outside their field of specialty. The primary goal of

the Significance Statement is to explain the relevance of the work in broad context to a broad readership. The Significance Statement appears in the paper itself and is required for all research papers.

Text. Describe procedures in sufficient detail so that the work can be repeated. Methods must be presented after results and discussion. Follow the spelling and usage given in *Webster's Third New International Dictionary* or the *Random House Dictionary of the English Language*. Avoid laboratory jargon. Correct chemical names should be given, and strains of organisms should be specified. Trade names should be identified by an initial capital letter with the remainder of the name lowercase. Names of suppliers of uncommon reagents or instruments should be provided. Use Système International units and symbols whenever possible. Statements of novelty and priority are not permitted in the text.

- **Language-editing services:** Prior to submission, authors who believe their manuscripts would benefit from professional editing are encouraged to use a language-editing service (see list at www.pnas.org/site/authors/language-editing.xhtml). PNAS does not take responsibility for or endorse these services, and their use has no bearing on acceptance of a manuscript for publication.

- **Use of URLs in text:** As a publisher, PNAS must be able to archive the data essential to a published article. Where such archiving is not possible, deposition of data in public databases, such as GenBank, ArrayExpress, Protein Data Bank, Unidata, and others outlined in the Information for Authors, is acceptable. Only links to websites that are permanent public repositories, such as self-perpetuating online resources funded by government, academia, and industry, are permitted. Links to an author's personal web page are not acceptable. PNAS allows authors to post their PNAS paper on their home page after the paper is published in PNAS.

- **Gene nomenclature:** Prior to submission, authors should consult [Genecards](#), or [MGI Nomenclature page](#), or [HUGO Gene Nomenclature Committee](#), or equivalent resources, to ensure standardized nomenclature is used for species-specific gene and protein names. For proposed gene names that are not already approved, please submit the gene symbols to the appropriate nomenclature committee as these must be deposited and approved before publication of the article.

- **Abbreviations:** Abbreviations should be accessible to a broad scientific audience; abbreviations that are specific to a particular field should be defined at first mention in the text.

- **Nomenclature and style:** Use international standards on nomenclature. PNAS uses *Scientific Style and Format: The CSE Manual for Authors, Editors, and Publishers* (8th edition, 2014) as the primary style guide.

Footnotes. PNAS distinguishes author affiliations and footnotes from in-text footnotes by assigning a different set of footnote symbols to each type. Superscript lowercase letters separated by commas (no spaces) are used for author affiliations. Superscript numerals separated by commas (no spaces) are used for author footnotes. In-text footnotes should be preceded by a footnote symbol, used in the order *, †, ‡, §, ¶, #, ||, **, ††, ‡‡, §§, ¶¶, ##.

Acknowledgments. List acknowledgments and funding sources. PNAS collaborates with [FundRef](#) to use a standard taxonomy of funder names. Dedications are rarely allowed.

References. References must be in PNAS style. Only published or in-press papers and books may be cited in the reference list. For references to in-press articles, please confirm with the cited journal that the article is in press and include a DOI number and online publication date. Unpublished abstracts of papers presented at

meetings or references to "data not shown" are not permitted. References should be cited in numerical order as they appear in text, and all references, including for the SI, should be included in the main manuscript file. Because tables and figures will be inserted in the text where first cited, references in these sections should be numbered accordingly. **Include the full title for each cited article.** All authors may be named in the citation for initial submissions. For revisions or final submissions, if there are more than five authors, list the first author's name followed by et al. Provide inclusive page ranges for journal articles and book chapters. Provide date of access for online sources

Journal articles are cited as follows:

10. Neuhaus J-M, Sitcher L, Meins F, Jr, Boller T (1991) A short C-terminal sequence is necessary and sufficient for the targeting of chitinases to the plant vacuole. *Proc Natl Acad Sci USA* 88(22):10362-10366.

Cite research datasets in the references if they have a DOI, and list the authors, title, publisher (repository name), and identifier (DOI in URL format) as follows:

12. van Sebillie E, Doblin M (2016) Data from "Drift in ocean currents impacts intergenerational microbial exposure to temperature." Figshare. <https://dx.doi.org/10.6084/m9.figshare.3178534.v2>.

Use MEDLINE/PubMed abbreviations of journal titles or use the full journal title for any journals not indexed in MEDLINE.

Articles or chapters in books are cited as follows:

14. Hill AVS (1991) HLA associations with malaria in Africa: some implications for MHC evolution. *Molecular Evolution of the Major Histocompatibility Complex*, eds Klein J, Klein D (Springer, Heidelberg), pp 403-420.

Figure Legends. Provide these separately from figures, after the references in the manuscript. For figures with multiple panels, the first sentence of the legend should be a brief overview of the entire figure; each panel must be explicitly referenced and described at least once in the figure legend. Graphs should include clearly labeled error bars described in the figure legend. Authors must state whether a number that follows the $\pm$ sign is a standard error (SEM) or a standard deviation (SD). The number of independent data points (N) represented in a graph must be indicated in the legend. Numerical axes on graphs should go to 0, except for log axes. Statistical analyses should be done on all available data and not just on data from a "representative experiment." Statistics and error bars should only be shown for independent experiments and not for replicates within a single experiment.

ANEXO B- SUBMISSÃO DO ARTIGO

Manuscript #	2016-15948
Current Revision #	0
Submission Date	2016-09-24
Manuscript Title	Antinociceptive activity of <i>Borreria verticillata</i> : <i>in vivo</i> and <i>in silico</i> studies
Manuscript Type	PNAS Plus
Special Features and Colloquia	N/A
Classification	Biological Sciences/Pharmacology
Database deposition	
Corresponding Author	Maria do Socorro Sousa Cartagenes (Federal University of Maranhão)
Co-Authors	Rosa Helena Moraes Silva , Nathália de Fátima Melo Lima , Alberto Jorge Oliveira Lopes , Cleydlenne Costa Vasconcelos , José Wilson C Mesquita , Ludmilla Santos Mesquita , Fernando César Vilhena Moreira Lima , Maria Nilce Sousa Ribeiro , Ricardo Martins Ramos , Maria do Socorro Sousa Cartagenes (corr-auth) , João Batista Santos Garcia
Abstract	<i>Borreria verticillata</i> has diverser biological activities, however, its antinociceptive action still demands more thorough investigation. The present study was to assess the antinociceptive activity of ... View full abstract
Significance Statement	Pain is an emotional and sensory experience; the increasing occurrence of pain is one of the factors accounting for the increased use of analgesics. The ... View full alternate abstract
Suggested Editorial Board Member	Susan Amara (National Institutes of Health), Richard Aldrich (The University of Texas at Austin), Ramon Latorre (1Centro Interdisciplinario de Neurociencias de Valparaíso, Facultad de Ciencias, Universidad de Valparaíso.)
Suggested Editor	Kurt Beam (U. of Colorado Denver, Anschutz Medical Campus), Nancy Carrasco (Yale School of Medicine), David Clapham (Howard Hughes Medical Institute, Boston Children's Hospital) -BOARD
Author Conflict of Interest	
Funding Body Archiving Mandates	No Funders