



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CAMPUS DE SOBRAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ALAIN OLIVEIRA DOS SANTOS

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E DOS EFEITOS ANTINOCICEPTIVO E ANTI-INFLAMATÓRIO NA ATM DE RATOS DE DERIVADOS SEMISSINTÉTICOS DE UM BENZILISOTIOCIANATO ISOLADO DE *Moringa oliefera* Lam.

SOBRAL – CE

2016

ALAIN OLIVEIRA DOS SANTOS

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E DOS EFEITOS ANTINOCICEPTIVO E ANTI-INFLAMATÓRIO NA ATM DE RATOS DE DERIVADOS SEMISSINTÉTICOS DE UM BENZILISOTIOCIANATO ISOLADO DE *Moringa oliefera* Lam.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Curso de Medicina, da Universidade Federal do Ceará – *Campus* Sobral, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde. Área de concentração: Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dra. Hellíada Vasconcelos Chaves

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Mirna MarquesBezerra

SOBRAL – CE

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca Universitária

Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

- S233a Santos, Alain Oliveira dos.
Avaliação da toxicidade e dos efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório an ATM de ratos de derivados semissintéticos de um benzilisotiocianato isolado de Moringa oleifera Lam. / Alain Oliveira dos Santos. – 2016.
128 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Campus de Sobral, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Sobral, 2016.
Orientação: Profa. Dra. Heliáda Vasconcelos Chaves.
Coorientação: Profa. Dra. Mirna Marques Bezerra.
1. Articulação Temporomandibular. 2. Hipernocicepção articular. 3. Isotiocianatos. 4. Toxicidade. 5. Moringa oleifera. I. Título.

CDD 610

ALAIN OLIVEIRA DOS SANTOS

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E DOS EFEITOS ANTINOCICEPTIVO E ANTI-INFLAMATÓRIO NA ATM DE RATOS DE DERIVADOS SEMISSINTÉTICOS DE UM BENZILISOTIOCIANATO ISOLADO DE *Moringa oliefera* Lam.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – Curso de Medicina, da Universidade Federal do Ceará – *Campus* Sobral, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde. Área de concentração: Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof^a. Dra. Hellíada Vasconcelos Chaves
Co-orientadora: Prof^a. Dra. Mirna Marques Bezerra Brayner

Aprovado em ___/___/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Hellíada Vasconcelos Chaves (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará (UFC) – *Campus* Sobral

Prof. Dr. Vicente de Paulo Teixeira Pinto
Universidade Federal do Ceará (UFC) – *Campus* Sobral

Prof. Dr. Francisco Geraldo Barbosa
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Às mulheres de minha vida: Maria Iraní Oliveira dos Santos, Nicole Oliveira dos Santos e Isabella Suanne Pereira da Silva, pela paciência, carinho, força, apoio em todos os aspectos de minha vida e pelo amor que tem por mim.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente à minha mãe, Maria Iraní Oliveira dos Santos, por toda a força, amor e apoio que sempre me deu. Só ela sabe as dificuldades enfrentadas até que eu chegasse aqui. Esse trabalho é para ela.

À minha irmã Nicole Oliveira dos Santos que confia sempre em mim, acima de tudo. Ela tem certeza do meu potencial (coisa que nem eu tenho).

Ao amor da minha vida, Isabella Suanne Pereira da Silva, que sempre esteve ao meu lado, me acalmando, me dando forças nas horas difíceis, orando. Por nunca desistir de mim.

Ao meu irmão Plínio Oliveira dos Santos, a quem eu já servi de exemplo e de quem hoje falo com orgulho, pelo grande homem que se tornou em todos os aspectos da vida.

A minha tia Maria do Socorro Gomes Fernandes, que sempre acreditou, torceu e ajudou nos momentos mais difíceis.

Aos meus amigos Francisco Nonato Fraga Júnior e Anderson de Sousa Oliveira, que sempre torceram e torcem por mim, se entristecem comigo, vibram com cada vitória minha como se fosse sua. Espécimes raros.

A Ellen Lima de Assis, por toda a paciência que teve para ajudar a este trabalho fluir e por me aguentar com minhas “piadas bestas”. Por deixar suas horas de lazer e atividades acadêmicas de lado para que este trabalho se concretizasse.

A Hermany Capistrano de Freitas, que com seu jeito polido, metucioso, detalhista, deu importantes ajustes a esse trabalho, primando sempre pela excelência. Também por seu suor e dedicação, abnegando as vezes de seus afazeres acadêmicos em nome de triunfos nos experimentos.

A Francisco Isaac Fernandes Gomes, por abraçar esta causa, mesmo não sendo sua, com todo esforço, abnegação e, por fim, companheirismo. És um amigo para mim. Perdoe o inglês: You are a cool guy.

A Felipe Dantas da Silveira, por me assessorar nas mais inusitadas horas, pelo seu esforço e primazia pela correta execução deste trabalho, por ser meus braços direito e esquerdo.

A Antônio Mateus e Thomas Dominik, pela solicitude prestada, pelos nãoos que nunca me foram dados, por todo o tempo e esforço dedicados da maneira mais altruísta possível.

Ao professor Dr. Marcos Reinaldo da Silva e sua parceria frutífera. Por toda sua solicitude, paciência, ajuda e torcida para que tudo desse certo.

Aos componentes do Departamento de Química Orgânica: Dr. Jair Mafezoli, Diana Kelly de Castro Almeida, Dr. Francisco Geraldo Barbosa, por todas as contribuições dadas, sem as quais este trabalho não seria possível.

Aos professores: Dr. Vicente de Paulo Teixeira Pinto, Dra. Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar, Dr. José Ronaldo Vasconcelos da Graça, Dra. Camila Gomes Virgínio Coelho, Dr. Francisco Plácido Nogueira Arcanjo, Dra. Paula Góes Pinheiro Dutra, Dr. Igor Iuço Castro da Silva pelo riquíssimo conhecimento repassado, que encontra-se agora aplicado neste trabalho.

Ao professor Paulo Roberto Santos, pelas extremas paciência e solicitude em todos os processos burocráticos, assim como pela imensa quantidade de conhecimento repassada.

A Danielle Rocha do Val, por tudo, todo o suor, sangue, sorrisos e lágrimas. Sem você este trabalho não teria sido realizado. Não tenho palavras para descrever a gratidão que sinto por sua ajuda.

Ao anjo na Terra chamado Dra. Mirna Marques Bezerra, que também faz vezes de co-orientadora, a mãe do LAFS, poço de bondade, paciência, solicitude, que deu o direcionamento correto a este trabalho. Inspiração para todos.

A minha orientadora, Dra Hellíada Vasconcelos Chaves, que me guiou, direcionou, incentivou e em conduziu por esta jornada, cheia de intempéries, percalços. Como uma mãe guia um filho, pegou-me pela mão e colocou-me no caminho certo. Eternamente grato.

E por fim a Deus, que me protege, me guia, faz pequenos milagres diariamente para que tudo dê certo no fim e me coloca ao lado de pessoas, como as supracitadas. Que este trabalho possa ser parte de sua obra na busca de melhorar a vida dos que sofrem.

“Esvazie sua mente, seja amorfo, disforme como a água. Você coloca a água em um copo, ela se torna o copo. Você coloca a água em uma garrafa, ela se torna a garrafa. Você coloca a água em uma chaleira, ela se torna a chaleira. A água pode fluir ou ela pode destruir. Seja a água, meu amigo”. (Bruce Lee)

RESUMO

Introdução: A inflamação é uma importante condição clínica que acomete a articulação temporomandibular (ATM), porém seus mecanismos ainda não são completamente compreendidos e não há terapêutica efetiva para este quadro clínico. A espécie *Moringa oleífera* Lam. possui atividades analgésicas e anti-inflamatórias que podem ser atribuídas aos seus isotiocianatos. **Objetivos:** Verificar toxicidade (em camundongos) e efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório na inflamação ATM (em ratos) de um isotiocianato de *Moringa oleífera* Lam. e de seus 7 derivados semissintéticos. **Materiais e métodos:** Foi verificada a toxicidade sistêmica das substâncias em camundongos machos e fêmeas durante 14 dias com as doses: MC-1 1µg/kg; MC-D1 1µg/kg, MC-D3 100µg/kg, MC-D6 1µg/kg, MC-D7 1µg/kg, MC-D8 1µg/kg, MC-D9 10µg/kg e MC-H 1µg/kg. Nas substâncias consideradas seguras (MC-D7, MC-D9 e MC-H), foi averiguada a eficácia antinociceptiva pelos testes da formalina (1.5%, 50µL) e da serotonina (255mg), por via intra-articular (i.a.) na ATM esquerda de ratos. O efeito anti-inflamatório foi avaliado através da permeabilidade vascular com corante azul de Evans. Ainda foi realizado o teste Rotarod para avaliar efeitos na motricidade. **Resultados e Discussão:** Dentre os derivados testados MC-D7, MC-D9 e MC-H não apresentaram toxicidade, comprovado através de taxa de sobrevivência, análises bioquímicas e histológicas. Estes derivados reduziram a hipernocicepção inflamatória induzida por formalina, mas apenas MC-H reduziu a hipernocicepção induzida por Serotonina, sugerindo ação sobre receptores adrenérgicos. Estes 3 derivados também reduziram de maneira significativa o extravasamento plasmático no teste do Azul de Evans, sugerindo também atividade anti-inflamatória. No teste Rotarod não houve diferenças entre os grupos testados e o controle, reforçando a hipótese de efeito antinociceptivo, mas não sobre a motricidade dos animais. **Conclusão:** Os derivados MC-D7, MC-D9 e MC-H se mostraram eficazes em reduzir a hipernocicepção induzida por formalina na ATM de ratos. São necessárias novas pesquisas para investigar os mecanismos de ação destas drogas.

Palavras-chave: articulação temporomandibular, hipernocicepção articular, Isotiocianatos, toxicidade, *Moringa oleífera*

ABSTRACT

Introduction: Inflammation is an important clinical condition that affects the temporomandibular joint (TMJ), but the mechanisms are not fully understood and there is no effective therapy for this clinical condition. *Moringa oleifera* Lam has analgesic and anti-inflammatory activities that can be attributed to their isothiocyanates.

Objectives: The objectives of this study are verify therapeutic application (toxicity, antinociceptive and antiinflammatory effectiveness) in rats TMJ of a isothiocyanate from *Moringa oleifera* Lam and their 7 derived semi-synthetic.

Materials and methods: The toxicity of substances in mice (male and female) was evaluated for 14 days with the doses MC-1 1µg/kg; MC-D1 1µg/kg; MC-D3 100µg/kg; MC-D6 1µg/kg; MC-D7 1µg/kg; MC-D8 1µg/kg; MC-D9 10mg/kg; MC-H 1µg/kg. In substances considered safe (MC-D7, MC-D9 and MC-H) was determined to antinociceptive efficacy by Formalin test (1.5%, 50 µL) and Serotonin test (255mg), by intra-articular injection (i.a.) in the left TMJ of rats. The anti-inflammatory effect was assessed by vascular permeability with Blue Evans dye. Also it was performed the Rotarod test to assess effects on motor function.

Results and Discussion: Among the derivatives only tested MC-D7, MC-D9 and MC-H showed no toxicity, evidenced by survival rate, biochemical and histological analysis. These derivatives have reduced the formalin-induced inflammatory hyperalgesia but only MC-H reduced the hyperalgesia induced by serotonin, suggesting action on adrenergic receptors. These 3 derived also reduced significantly the plasma extravasation in Blue Evans dye test, suggesting anti-inflammatory activity. In the Rotarod test there were no differences between the tested groups and control, reinforcing the hypothesis of analgesic effect, but not on the motor skills.

Conclusion: Derivatives MC-D7, D9-MC and MC-H were effective in reducing the hyperalgesia induced by formalin in the TMJ of rats. New research is necessary to investigate the mechanisms of action of these drugs.

Keywords: temporomandibular joint, hypernociception articulate, Isothiocyanates, toxicity, *Moringa oleifera*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Estruturas químicas dos derivados semissintéticos obtidos a partir de 4-(4'-O-acetil- α -L-ramnolisolxi)benzilisotiocianato.....	38
Figura 2 -	Taxa de sobrevivência dos animais machos no ensaio de segurança de MC1 e seus 7 derivados.....	39
Figura 3 -	Taxa de sobrevivência dos animais fêmeas no ensaio de segurança de MC1 e seus 7 derivados.....	39
Figura 4 -	Análise histopatológica dos órgãos fígado, coração, baço e rim (magnificação: 400x, coloração: HE) no ensaio de segurança de MC-1 e seus 7 derivados.....	46
Figura 5 -	Modificações estruturais nas moléculas de MC-D7, MC-D8 e MC-H em comparação com o isotiocianato de <i>Moringa oleifera</i> (MC-1).....	47
Figura 6 -	Eficácia antinociceptiva de MC-D7 na hipernocicepção inflamatória induzida por formalina.....	49
Figura 7 -	Eficácia antinociceptiva de MC-D9 na hipernocicepção inflamatória induzida por formalina.....	50
Figura 8 -	Eficácia antinociceptiva de MC-H na hipernocicepção inflamatória induzida por formalina.....	50
Figura 9 -	Eficácia antinociceptiva de MC-D7, MC-D9 e MC-H na hipernocicepção inflamatória induzida por serotonina.....	51
Figura 10 -	Extravasamento plasmático de corante azul de Evans de MC-D7, MC-D9 e MC-H na hipernocicepção inflamatória induzida por formalina.....	51

Figura 11 - Efeito de MC-D7 (1µg/kg), MC-D9 (10µg/kg) e MC-H (1µg/kg) no teste Rotarod (tempo de latência).....	52
Figura 12 - Efeito de MC-D7 (1µg/kg), MC-D9 (10µg/kg) e MC-H (1µg/kg) no teste Rotarod (número de quedas).....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Número total de mortes (machos e fêmeas) no ensaio de segurança de MC-1 e seus derivados semissintéticos.....	40
Tabela 2 -	Alterações comportamentais dos animais machos no ensaio de segurança de MC-1 e seus derivados semissintéticos.....	41
Tabela 3 -	Alterações comportamentais dos animais fêmeas no ensaio de segurança de MC-1 e seus derivados semissintéticos.....	41
Tabela 4 -	Níveis séricos de AST e ALT dos grupos MC-1, MC-D1, MC-D3, MC-D6, MC-D7, MC-D8 e MC-D9 no ensaio de segurança de MC-1 e seus derivados semissintéticos.....	42
Tabela 5 -	Níveis séricos de AST e ALT do grupo MC-H no ensaio de segurança de MC-1 e seus derivados semissintéticos.....	42
Tabela 6 -	Níveis séricos de creatinina de MC-D7, MC-D8 e MC-D9 no ensaio de segurança de MC-1 e seus derivados semissintéticos.....	43
Tabela 7 -	Níveis séricos de creatinina de MC-H no ensaio de segurança de MC-1 e seus derivados semissintéticos.....	43
Tabela 8 -	Peso não drenado dos órgãos dos grupos MC-1, MC-D1, MC-D3, MC-D6, MC-D7, MC-D8 e MCD9 no ensaio de segurança de MC-1 e seus derivados semissintéticos.....	44
Tabela 9 -	Peso não drenado dos órgãos do grupo MC-H no ensaio de segurança de MC-1 e seus derivados semissintéticos.....	44

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ALT	alanina aminotransferase
AST	aspartato aminotransferase
ATM	Articulação temporomandibular
Ca ²⁺	Cálcio
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CH ₂ Cl ₂	Diclorometano
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
DAINES	Drogas anti-Inflamatórias não esteroidais
DL50	Dose Letal em 50% dos animais
DMAP	4dimetilaminopiridina
DTM	Disfunção temporomandibular
Et ₃ N	Trietilamina
g	Gramas
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
i.a.	Intra articular
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-6	Interleucina 6
IL-8	Interleucina 8
ikb α	Inibidor alfa do fator nuclear kappa beta
iNOS	Óxido Nítrico Sintase induzível
Litro	Litro
Lam	Lamarck
LPS	Lipopolissacarídeo
K ⁺	Potássio
MAPKs	proteínocinasas ativadas por mitógeno
MEC	Matriz extracelular
mg	Miligramas
mg/kg	Miligramas por quilo
mL	Mililitro
mmol	Milimol
MMP-2	Matriz Metaloproteinase-2

MsCl	Metassulfonila
NF- κ β	Fator nuclear κ β
NO	Óxido Nítrico
OCDE	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
OH	Hidroxila
P<0,05	Probabilidade de erro menor que 5%
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
s	segundos
SNC	Sistema Nervoso Central
TNF α	fator de necrose tumoral alfa
THF	Tetraidrofurano
μ L	Microlitro
μ g	Micrograma
μ g/kg	Micrograma por quilo
\pm EPM	Mais ou menos o erro padrão da média

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. JUSTIFICATIVA	19
3. HIPÓTESE	20
4 OBJETIVOS	21
4.1 Objetivo Geral	21
4.2 Objetivos Específicos	21
5. REFERENCIAL TEÓRICO	22
5.1 Disfunção Temporomandibular	22
5.2 Moringa Oleifera Lamark	24
5.3 Utilização de produtos naturais para desenvolvimento de novos fármacos	25
6 MATERIAIS E MÉTODOS	27
6.1 Animais	27
6.2 Material Vegetal	27
6.3 Síntese do derivado MC-D1 [4-(2',3',4'-O-triacetil-α-L-raminosiloxi)benzil isotiocianato] a partir de MC-1 [4-(4'-O-acetil-α-L-raminosilóxi)-benzilisotiocianato]	29
6.4 Síntese do derivado MC-D3 [4-(4'-O-acetil-2',3'-dimetóxi-α-Lraminosiloxi) benzil isotiocianato] a partir de MC-1 [4-(4'-O-acetil-α-L-raminosilóxi)benzilisotiocianato]	29
6.5 Síntese do derivado MC-D6 [N-[(4'-O-acetil-α-L-raminosiloxi)benzil]-hidrazina carbotioamida] a partir de MC-1 [4-(4'-O-acetil-α-L-raminosilóxi)benzilisotiocianato]	29
6.6 Síntese do derivado MC-D7 (N-[4-(4'-O-acetil-α-L-raminosiloxi)benzil]-2-(piridinil-4-carbonil)hidrazina-1-carbotioamida) a partir de MC-1 [4-(4'-O-acetil-α-L-raminosilóxi)benzilisotiocianato]	30
6.7 Síntese do derivado MC-D8 [4-(4'-O-acetil-2',3'-dimesiloxi-α-L-raminosiloxi) benzilisotiocianato] a partir de MC-1 [4-(4'-O-acetil-α-L-raminosilóxi)benzilisotiocianato]	30

6.8 Síntese do derivado MC-D9 {4-[4'-O-acetil-2',3'-O-bis(decanoiloxi)- α -L-raminosiloxi]benzilisotiocianato} a partir de MC-1 [4-(4'-O-acetil- α -L-raminosilóxi)benzilisotiocianato]	31
6.9 Síntese do derivado MC-H {4-[(2',3',4'-O-triacetil- α -L-raminosiloxi) <i>N</i> -benzil]hidrazinacarbotioamida} a partir de MC-1 [4-(4'-O-acetil- α -L-raminosilóxi)benzilisotiocianato]	31
6.10 Estudo da toxicidade de MC-1 e dos 7 derivados semissintéticos extraídos das flores de <i>Moringa oleífera</i>	32
6.11 Eficácia antinociceptiva e anti-inflamatória de MC-D7, MC-D9 e MC-H (derivados semissintéticos obtidos das flores de <i>Moringa oleífera</i>) no modelo de hiperalgesia inflamatória induzida na articulação temporomandibular (ATM) de ratos.	33
6.11.1 <i>Delineamento Experimental</i>	33
6.11.2 <i>Injeções intra-articulares</i>	34
6.11.3 <i>Testes comportamentais para a avaliação da resposta nociceptiva induzida pela Formalina e pela Serotonina</i>	34
6.12 Análise da permeabilidade vascular por extravasamento de azul de Evans	35
6.13 Teste Rota Rod para analisar atividade ansiolítica dos derivados MC-D7, MC-D9 e MC-H	36
6.14 Análise Estatística	36
7 RESULTADOS	37
7.1 Estruturas químicas dos derivados	37
7.2 Ensaio de toxicidade aguda e subcrônica.....	37
7.2.1 <i>Taxa de sobrevivência dos animais submetidos ao uso dos derivados</i> ...37	
7.2.2 <i>Alterações comportamentais</i>	40
7.2.3 <i>Níveis séricos de enzimas hepáticas (AST e ALT)</i>	41
7.2.4 <i>Níveis séricos de creatinina</i>	42
7.2.5 <i>Peso dos órgãos dos animais</i>	43

7.3 Análise histopatológica.....	44
7.4 Mudanças estruturais e redução da toxicidade	45
7.5 Eficácia antinociceptiva dos derivados semissintéticos MC-D7, MC-D9 e MC-H na hipernocicepção inflamatória induzida pela Formalina	47
7.6 Eficácia antinociceptiva dos derivados semissintéticos MC-D7, MC-D9 e MC-H na hipernocicepção inflamatória induzida pela Serotonina	48
7.7 Eficácia anti-inflamatória dos derivados semissintéticos MC-D7, MC-D9 e MC-H verificada através do extravasamento plasmático com azul de Evans (Inflamação induzida por Formalina)	48
7.8 Análise da motricidade e coordenação motora através do Teste Rotarod	49
8 DISCUSSÃO	53
9 CONCLUSÃO	58
10 REFERÊNCIAS.....	59
APÊNDICE A: Documentos enviados ao INPI solicitando depósito de patente dos derivados MC-D7, MC-D9 e MC-H, reivindicando seu efeito analgésico.....	64
APÊNDICE B: Artigo a ser submetido ao periódico <i>Journal of Ethnopharmacology</i>	92

1. INTRODUÇÃO

O termo Disfunção Temporomandibular (DTM) se refere a um grupo de condições que acometem as articulações temporomandibulares (ATM), musculatura mastigatória e todos os tecidos associados a estas estruturas. Estas condições geralmente estão associadas a dor aguda ou persistente e podem apresentar como sinais e sintomas a dificuldade de mastigar, falar e prejuízo de outras funções orofaciais. O agravamento e cronificação do quadro clínico pode causar afastamentos no trabalho e diminuição das interações sociais, com consequente diminuição da qualidade de vida. A artrite na ATM é um tipo de DTM que pode ser gerada por fatores hormonais, traumatismos, sobrecarga da musculatura e que, se sustentada por algum tempo pode levar a degeneração articular (GREENE, 2010; WADHWA; KAPILA, 2008)

Mecanismos complexos envolvem as vias nociceptivas da região orofacial, que compreende a ATM. Após o estímulo nociceptivo inicia-se a liberação local de mediadores que irão permitir a comunicação e sensibilização neuronal (periférica e central), assim como perpetuação da condição algica: citocinas, óxido nítrico (NO), bradicinina, substância p, Serotonina e eicosanoides (CHAVES et al., 2011; FUSARO et al., 2012; OKUSE, 2007; SESSLE, 2005). Neurônios sensitivos locais do 5º par craniano (nervo trigeminal) levam a o estímulo nociceptivo para o tronco encefálico, precisamente no subnúcleo caudal, que possui projeções de outros núcleos e regiões cerebrais superiores (tálamo, córtex, substância cinzenta periaquedutal) o que permite a modulação dos nociceptivos, assim como a sensibilização central, está ultima causando a hiperalgesia e alodinia da região orofacial (SESSLE, 2005; 1999)

Além de procedimentos cirúrgicos, fisioterapia, placas oclusais, a farmacoterapia é uma abordagem largamente utilizada na prática clínica como terapêutica principal ou coadjuvante na DTM (OKESON, 2008; BARBOSA; BARBOSA, 2009. Porém, muitas drogas têm se mostrado pouco eficientes no tratamento prolongado das DTMs, como por exemplo as drogas anti-inflamatórias não esteroides (DAINES), que, embora funcionem de maneira eficaz em alguns pacientes, demoram meses a mostrar benefícios analgésicos plenos e possuem efeitos colaterais renais e gástricos com o uso prolongado. Corticosteroides possuem efeitos na analgesia, mas, não atenuam nem diminuem a progressão da artrose da ATM e os relaxantes musculares mostram efetividade duvidosa. Devido a esta baixa efetividade

no tratamento farmacológico da DTM se faz oportuno e necessário a busca por novos fármacos que possam ser mais efetivos (CAIRNS, 2010).

Moringa oleifera Lamarck é uma planta tropical da família Moringaceae, É encontrada em áreas tropicais, no sul da Ásia e possui largo emprego de seus componentes na medicina tradicional e alimentação da África e Ásia por apresentar diversas atividades biológicas, dentre elas a anti-inflamatória. Em suas folhas, sementes, flores e frutos são encontrados 4 isotiocinatos (CHEENPRACHA *et al.*, 2010; WATERMAN *et al.*, 2014). Estas substâncias são capazes de reduzir a inflamação na encefalomielite, perda mielínica e dano axonal, reduzir a atividade do óxido nítrico (NO), e citocinas *in vitro* (WATERMAN, *et al.* 2014; GALUPPO, *et al.* 2014; MISHRA *et al.*, 2011; CHEENPRACHA *et al.*, 2010). Porém, o seu papel na dor e na inflamação, assim como suas propriedades toxicológicas não estão bem esclarecidas Embora alguns estudos não tenham encontrado toxicidade (Adedapo, Falayi e Oyagbeme (2015) há relatos de propriedades larvicidas, surgimento de discrasias sanguíneas, morte aborto em roedores (ADEDAPPO; MOGBOJURI; EMIKPE, 2009; FERREIRA *et al.*, 2009; MARACAJÁ *et al.*, 2010).

O conhecimento sobre produtos naturais é, muitas vezes, o único recurso terapêutico de variadas comunidades e grupos étnicos em todo o mundo. Essa prática vem despertando nas últimas décadas a atenção da comunidade científica na perspectiva de avaliar a eficácia e segurança desses recursos naturais. Compreender as atividades farmacológicas dos compostos presentes na *Moringa oleifera* se faz necessário, visando encontrar componentes tanto eficazes no combate a inflamação quanto seguros para o uso, podendo assim contribuir para a introdução de uma nova abordagem terapêutica no tratamento e manejo da condição algica e inflamatória da ATM. (MISHRA *et al.*, 2011; CAIRNS, 2010).

2. JUSTIFICATIVA

Devido à dificuldade no manejo da DTM, a descoberta de novos fármacos que se mostrem eficientes nesse manejo se apresenta como alternativa de grande valia. Pesquisas com este objetivo têm sido realizadas por nosso grupo e têm apresentado a eficácia na redução da hipernocicepção na artrite em modelos animais (ratos) utilizando produtos naturais extraídos de plantas, tendo encontrado resultados semelhantes ao de drogas já conhecidas (indometacina) (FREITAS et al., 2016; RIVANOR et al., 2014; VAL et al., 2014). Estas pesquisas mostram que os produtos naturais e derivados semissintéticos destes melhoram inúmeros parâmetros da artrite induzida por Zymosan na ATM de ratos: redução da nocicepção, redução da inflamação, diminuição do infiltrado leucocitário (principalmente neutrófilos) e de sua degranulação.

Já existem evidências na literatura que apontam para um potencial anti-inflamatório da espécie *Moringa oleifera* Lam. Muitas pesquisas têm sido desenvolvidas com o extrato aquoso e extrato metanoico de folhas e sementes, com resultados satisfatórios na redução da inflamação. Porém, esses estudos não dão a certeza de qual substância é a mediadora deste efeito, além da contrapartida destes extratos possuírem efeitos tóxicos. Outros estudos que utilizam apenas os isotiocianatos da *Moringa oleifera* Lam., mostraram que estas substâncias são capazes de reduzir a inflamação, tendo sido este efeito evidenciado principalmente em culturas de células. *In vivo*, apenas em modelos animais de lesões de SNC que possam estar associadas a inflamação. Não existem ainda estudos que mostrem a eficácia dos isotiocianatos da *Moringa oleifera* Lam. em outros tipos de inflamação, tampouco de algum derivado semissintético destes.

Portanto, compreender o papel dos isotiocianatos da espécie *Moringa oleifera* Lam. na artrite na ATM nos parece uma alternativa viável e oportuna, que pode vir a contribuir no manejo e tratamento da DTM. Porém, devido a controvérsia que existe a respeito da toxicidade da planta (não se sabendo quais substância são responsáveis) se faz necessário também estudar a toxicidade do isotiocianato e seus derivados antes de submetê-los a testes de hipernocicepção, visando assim encontrar substâncias eficazes e não tóxicas para o tratamento das DTMs.

3. HIPÓTESE

O isotiocianato isolado de *Moringa oleifera* Lam., assim como seus 7 derivados semissintéticos podem ser eficazes em reduzir de maneira estatisticamente significativa a hipernocicepção e inflamação induzida por formalina e serotonina na ATM de ratos, reduzindo inclusive a permeabilidade vascular. O isotiocianato isolado de *Moringa oleifera* Lam., assim como seus 7 derivados podem não afetar a motricidade de coordenação motora dos animais, sendo que a redução no comportamento nociceptivo se deve ao seu efeito apenas analgésico e anti-inflamatório. Eles também podem não apresentar toxicidade sistêmica verificável por meio de observações comportamentais, dosagens de enzimas hepáticas e renais, sendo assim considerados seguros para o uso.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

- Avaliar a toxicidade e eficácia antinociceptiva e anti-inflamatória de um benzilisotiocianato isolado das flores de *Moringa oleifera* Lam. e de sete derivados semi-sintéticos em modelos de hipernocicepção inflamatória na ATM de ratos.

4.2 Objetivos Específicos

1. Descrever o processo de obtenção e caracterização química do isotiocianato isolado das flores de *Moringa oleifera* Lam. e seus derivados semissintéticos;
2. Verificar a existência de toxicidade oral aguda e subagudas do isotiocianato e seus derivados semissintéticos e classificá-los como tóxicos ou seguros para o uso;
3. Avaliar a eficácia antinociceptiva dos compostos não tóxicos, mediante o teste da formalina e da serotonina na ATM de ratos;
4. Análisar a permeabilidade vascular dos compostos não tóxicos por extravasamento de Azul de Evans do tecido periarticular da ATM de ratos;
5. Avaliar a influência dos compostos não tóxicos na motricidade e coordenação motora dos animais através do teste Rotarod;

5. REFERENCIAL TEÓRICO

5.1 Disfunção Temporomandibular

O termo Disfunção Temporomandibular (DTM) refere-se a um conjunto de condições musculoesqueléticas e neuromusculares envolvendo a articulação temporomandibular (ATM), músculos mastigatórios e todos os tecidos associados (o disco interarticular, ligamentos). Seus sintomas estão frequentemente associados à dor aguda ou persistente e podem se manifestar como: limitação de movimentos mandibulares, dificuldade de falar e/ou mastigar e realizar outras funções orofaciais, zumbido e vertigem (DE ROSSI *et al.*, 2014, GREENE, 2010; BARBOSA; BARBOSA, 2009; WADHWA; KAPILA, 2008).

De Rossi *et al.* (2014) encontraram divergências na literatura sobre prevalência de DTM na população, esta variando de 5%~6% até 12%. Steven e Kraus (2014) traçaram o perfil de 511 pacientes com DTM: 401 brancos, 63 afro-americanos, 8 hispânicos e 39 de outras etnias, média de idade foi 43,9 (44,9 nas mulheres e 43,7 nos homens) e relação mulher/homem de 5:1. A maioria dos pacientes possuía ensino superior. Bagis *et al.* (2012), em um estudo com 243 pacientes, sendo 171 mulheres e 72 homens com médias de 35 e 41 anos, respectivamente, encontraram que o gênero pode determinar o surgimento da disfunção (dor em repouso, dor no masseter e ruídos articulares foram significativamente maiores nas mulheres). A idade e a perda dental também foram importantes fatores de risco.

A etiologia mais aceita é a multifatorial, com aspectos psicológicos, anatômicos, neuromusculares e parafuncionais (BARBOSA; BARBOSA, 2009). Sharma *et al.* (2011) classificam os fatores etiológicos como: predisponentes (elevam o risco), iniciadores e perpetuadores (dificultam o tratamento ou aumentam a progressão), podendo o mesmo fator fazer parte das 3 classificações. As principais causas apontadas são: bruxismo, frouxidão ligamentar, fatores hormonais, predisposição genética (associada a hormônios), causas iatrogênicas (intubações), parafunções, traumatismos (micro e macro) e desordens musculoesqueléticas sistêmicas (WADHWA; KAPILA, 2008; SHARMA *et al.*, 2011; DE ROSSI *et al.*, 2014).

Dentre os vários possíveis diagnósticos clínicos e estruturas acometidas, a artrite na ATM é uma das condições preocupantes e de difícil manejo clínico e pode

ser caracterizada como inflamação (edema, eritema, aumento da temperatura) associada com a dor articular (LEEW;KLASSER, 2013; WADHWA; KAPILA, 2008).

Existem evidências clínicas e laboratoriais de que, na artrite da ATM citocinas, óxido nítrico (NO), bradicinina, substância p, trifosfato de adenosina (ATP), aminas vasoativas como serotonina (5-hidroxitriptamina) e histamina, complemento e eicosanoides são liberados pelos tecidos e exercem um papel na comunicação neuronal, e posteriormente viabilizam a sensibilização neuronal (primária e secundária) e possível perpetuação da condição álgica (CHAVES *et al.*, 2011; FUSARO *et al.*, 2010; SESSLE, 2005).

O trajeto da nocicepção na ATM possui algumas particularidades e vias de transmissão específicas para aquela região, com respostas também específicas. Após algum estímulo nociceptivo na ATM, os mediadores químicos supracitados excitam inicialmente neurônios sensitivos locais (terminações nervosas livres A-beta ou C) que fazem parte do 5º par craniano (nervo Trigeminal) e tem fibras aferentes para o sistema nervoso central (SNC), que terminam em neurônios de segunda ordem dentro do tronco encefálico, em uma região chamada subnúcleo caudal. O subnúcleo caudal é considerado o local que recebe as informações nociceptivas da região orofacial e possui projeções de outros núcleos e regiões cerebrais superiores, o que permite a modulação dos estímulos nociceptivos direcionados a ele (SESSLE, 1999)

Estímulos continuados na região orofacial, como a artrite na ATM podem ocasionar mudanças no funcionamento dos neurônios do subnúcleo caudal. Estas mudanças incluem: aumentos do campo receptor cutâneo, diminuição do limiar de excitação e sensibilização central. Esta última causa manutenção do quadro álgico, alodinia e pode até diminuir a modulação inibitória do SNC no subnúcleo caudal. Este quadro pode tornar difícil o manejo da dor orofacial causada pela artrite da ATM. (SESSLE, 2005)

O tratamento das DTMs deve ser, preferencialmente, conservador, quando esta disfunção não apresenta necessidade cirúrgica, ou quando ainda não há degeneração discal com contato entre as superfícies ósseas. Estes tratamentos se mostram muito efetivos na redução de dores, melhora da funcionalidade e, conseqüentemente, qualidade de vida. Dentre as modalidades terapêuticas é possível citar a terapia com placas oclusais, exercícios mandibulares, terapia cognitiva, fisioterapia (eletrotermofototerapia, fisioterapia manual) e terapia farmacológica

(OKESON, 2008; FERNANDES; MICHELOTTO; KIMURA, 2009; BARBOSA; BARBOSA, 2009).

Devido ao seu caráter multifatorial e por possuir mecanismos que visam a manutenção da dor, as DTMs tornam-se condições clínicas de difícil manejo para os diversos profissionais que nela atuam. Associada a estas dificuldades existe ainda, em muitos casos, uma procura tardia por tratamento, no momento em que a dor já tem se tornado insuportável. Neste sentido a abordagem farmacológica, que muitas vezes promove o alívio rápido dos sintomas, se torna crucial para a obtenção de qualidade de vida pelos pacientes, podendo esta abordagem atuar como adjuvante ou tratamento principal para a DTM (VAL et al., 2014; CAIRNS, 2010).

Porém, tanto as drogas de primeira escolha quanto drogas para casos mais específicos ou refratários tem se mostrado ineficientes no tratamento prolongado das DTMs. Não são todas as DAINES (drogas anti-inflamatórias não esteroidais), por exemplo, que funcionam de maneira eficaz, além de demorarem meses a mostrar benefícios analgésicos plenos e possuírem efeitos colaterais renais e gástricos com o uso prolongado. Corticosteroides funcionam bem na dor, porém não atenuam nem diminuem a progressão da artrose da ATM e estudos realizados com relaxantes musculares mostram efetividade duvidosa em relação ao placebo. Devido a esta baixa efetividade no tratamento farmacológico da DTM se faz oportuno e necessário a busca por novos fármacos que possam ser mais efetivos (CAIRNS, 2010).

5.2 Moringa Oleifera Lamark

A espécie *Moringa oleifera* Lamarck é uma planta tropical de crescimento rápido, conhecida como moringa. É uma das 13 espécies da família Moringaceae, dentro da ordem Brassicales, ao qual brócolis e outros vegetais crucíferos pertencem. É encontrada em áreas tropicais, no sul da Ásia, nas proximidades do Himalaia, do nordeste do Paquistão ao norte da Índia, e possui largo emprego de seus componentes (folhas, sementes, raiz, frutos, vagem) na medicina tradicional e alimentação da África e Ásia, por conter muitos nutrientes, dentre eles, proteínas e aminoácidos (GALUPPO et al., 2014; MISHRA et al. 2011, FERREIRA et al., 2008).

Dentre os constituintes químicos encontrados na *Moringa oleifera* Lam. destacam-se as vitaminas A, B, C, E, flavonoides, potássio (K⁺) e cálcio (Ca²⁺). Ademais, apresenta atividades biológicas como anti-ulcerativa, hipocolesterolêmica,

hipotensora vascular, bradicárdica, anti-fúngica, antitumoral, anti-bacteriana, anti-inflamatória, anti-espasmódica e diurética (FERREIRA *et al.*, 2009; CHEENPRACHA *et al.*, 2010).

As flores de *Moringa oleifera* Lam., especialmente, são uma fonte rica em β -caroteno, proteína, vitamina C, K^+ e Ca^{2+} e agem como antioxidantes, devido à presença de vários compostos antioxidantes, incluindo: ácido ascórbico, flavonoides, compostos fenólicos e carotenóides (SIDDHURAJU; BECKER, 2003; DILLARD; GERMAN, 2000).

Em suas folhas, sementes, flores e frutos são encontrados polissacarídeos fenólicos, os glucosinolatos, também chamados de glucomoringinas, que sofrem hidrólise através da enzima mirosinase para formar os isotiocinatos. Na *Moringa oleifera* Lamarck existem 4 glucosinolatos precursores de isotiocinatos, respectivamente (CHEENPRACHA *et al.*, 2010; WATERMAN *et al.*, 2014). Estas últimas substâncias se mostraram eficientes em reduzir a inflamação causada por apoptose, que acontece em doenças neurodegenerativas (encefalomielite), assim como diminuir a perda mielínica e o dano axonal (GALUPPO *et al.*, 2014), inibir/reduzir a atividade do óxido nítrico (NO), óxido nítrico sintase induzível (iNOS), fator de necrose tumoral α (TNF α) e interleucinas 1 β e 6 (IL1 β e IL6) em culturas de células, sendo o dano tissular induzido por lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos (CHEENPRACHA *et al.*, 2010; WATERMAN *et al.* 2014).

Porém, o seu papel na dor e na inflamação, assim como suas propriedades toxicológicas não estão bem esclarecidas. Analisando o extrato metanólico das folhas de *Moringa oleifera* Adedapo, Falayi e Oyagbeme (2015) observaram que este não foi tóxico em camundongos e teve efeito anti-inflamatório similar ao da indometacina. Outros autores porém relataram: propriedades larvicidas para o *Aedes aegypti*, discrasias sanguíneas e morte em roedores (doses acima de 1000mg/kg), altos índices de mortalidade em abelhas *Apis mellifera* africanizadas e propriedades abortíferas em roedores (ADEDAPPO; MOGBOJURI; EMIKPE, 2009; FERREIRA *et al.*, 2009; MARACAJÁ *et al.*, 2010). Portanto, compreender as atividades farmacológicas dos compostos presentes na *Moringa oleifera* faz-se necessário, visando encontrar componentes tanto eficazes no combate a inflamação quanto seguros para o uso em humanos.

5.3 Utilização de produtos naturais para desenvolvimento de novos fármacos

O conhecimento sobre produtos naturais é, muitas vezes, o único recurso terapêutico de variadas comunidades e grupos étnicos em todo o mundo. A pesquisa de recursos naturais tem-se revelado promissora na descoberta de ferramentas farmacológicas que podem ser utilizadas para testes de novas substâncias ou mesmo em testes diagnósticos. Essa prática vem despertando nas últimas décadas a atenção da comunidade científica na perspectiva de avaliar a eficácia e segurança desses recursos naturais (MISHRA et al., 2011).

Rivanor et al. (2014), utilizando uma lectina presente na alga *Caulerpa cupressoides*, reduziu a hipernocicepção provocada pela indução da artrite na ATM de ratos através do Zymosan. Foi observada redução na nocicepção, influxo leucocitário e expressão de citocinas com doses de 1, 0,1 e 0,01mg/kg. Freitas et al. (2016) observou redução na hipernocicepção inflamatória induzida por Zymosan na ATM de ratos utilizando uma lectina de *Abelmoscus esculentus*. Val et al. (2014), por sua vez, obtiveram resultado satisfatório na redução da hipernocicepção inflamatória induzida por Zymosan na ATM de ratos, através da modificação molecular de um flavonoide presente na *Tephrosia toxicaria* Pers. O derivado semissintético, além de mostrar eficácia antinociceptiva e anti-inflamatória, não apresentou toxicidade sistêmica por administração oral. Estes dados sugerem que a modificação química de metabólitos secundários existentes em plantas, pode ser, portanto, uma alternativa no tratamento e alívio sintomático da DTM.

Neste sentido, o esclarecimento da ação farmacológica de sete derivados semi-sintéticos obtidos a partir de um metabólito secundário da classe benzilisotiocianato, isolado das flores da *Moringa oleífera* Lamarck, observando sua segurança farmacológica e posteriormente seu papel na hipernocicepção inflamatória induzida por formalina na ATM de ratos, poderá contribuir para a introdução de uma nova abordagem terapêutica no tratamento e manejo da condição álgica e inflamatória da ATM.

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Animais

Foram usados camundongos machos e fêmeas (*Mus musculus*) albinos (25-30g) no ensaio de segurança do benzilisotiocianato e de seus 7 derivados e ratos machos (*Rattus norvegicus*) albinos (variação Wistar) (180-220g) na verificação da eficácia antinociceptiva, anti-inflamatória e ação na motricidade dos derivados MC-D7, MC-D9 e MC-H. Os animais foram provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do (UFC) e do biotério local da Faculdade de Medicina de Sobral, da Universidade Federal do Ceará-Campus Sobral. Os animais foram alojados em gaiolas plásticas, em sala com temperatura controlada ($23^{\circ}\text{C} \pm 2$) obedecendo os ciclos de claro e escuro (de 12 em 12 horas) no biotério local, com água e comida disponíveis *at libidum*.

Visando seguir os aspectos éticos o protocolo experimental foi preparado de acordo com o "Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais Para Fins Científicos e Didáticos - DBCA" do Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA) e submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa com Animais-CEPA, da UFC-Campus Fortaleza (CEPA Nº. 03/15). Todos os esforços foram realizados para minimizar o sofrimento animal.

6.2 Material Vegetal

Neste estudo foi realizada a obtenção do 4 - (4'-O-acetyl- α -L-ramnosiloxi) benzilisotiocianato (MC-1) a partir das flores de *Moringa oleífera* e posteriormente a hemi-síntese de seus derivados semissintéticos. O isolamento do 4 - [(4'-O-acetyl- α -L-ramnosiloxi) benzil] isotiocianato e a obtenção de seus derivados semissintéticos ocorreram no Laboratório de Biotecnologia e Síntese Orgânica em parceria com o Laboratório de Fitoquímica, do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da UFC, sob coordenação do professor Francisco Geraldo Barbosa.

O produto natural 4-(4'-O-acetil- α -L-raminosilóxi)benzilisotiocianato, estrutura mostrada na **Figura 4**, foi obtida a partir de flores de *Moringa oleifera* Lamarck (291g) oriundas do horto de plantas medicinais Prof. José de Abreu Matos da Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici, que, após coletadas, foram secas

em uma estufa a uma temperatura de 60 °C por 24 horas, para a total eliminação de água. Em seguida o material foi extraído com clorofórmio (1 L) durante 48h e o solvente foi removido sob pressão reduzida em um evaporador rotativo, para a obtenção do respectivo extrato.

O extrato clorofórmio (3,78 g) foi transferido para um gral de porcelana seguido da adição de sílica gel comum (6,59 g). Pequenas porções de solvente foram adicionadas à mistura para promover a total dissolução da amostra e aumentar a eficiência da adsorção. O material foi submetido à cromatografia filtrante, utilizando-se como eluentes 1,1L de hexano (para desengordurar e retirar impurezas) e em seguida 800 mL de acetato de etila, fração essa constituída principalmente por 4-[(2'-O-acetil- α -L-raminosilóxi)benzil]isotiocianato, e por fim 500 mL de metanol. Em seguida os eluentes foram destilados em evaporador rotatório sob pressão reduzida.

A fração acetato de etila (1972,6 mg), obtida da coluna filtrante do extrato clorofórmio, foi adsorvida em 2,0g de sílica gel e submetida à cromatografia de adsorção. A coluna foi eluída inicialmente com 100 mL de hexano, seguido por 200 mL de hexano:acetato de etila (7:3), 150 mL de hexano:acetato de etila (6:4), 200 mL de hexano:acetato de etila (1:1), 200 mL de acetato etila, 100 mL de metanol.

As frações foram coletadas em porções de 5 mL e analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD). As frações contendo 4-[(4'-O-acetil- α -L-raminosilóxi)benzil]isotiocianato, ainda impuro, foram reunidas, apresentando massa de 862 mg. Não sendo suficiente a coluna para isolar 4-[(4'-O-acetil- α -L-raminosilóxi)benzil]isotiocianato, realizou-se outra CCD com a intenção de purificar a substância. A CCD foi realizada em um gradiente de eluição usando a mistura diclorometano:acetato de etila (7:3), diclorometano:acetato de etila (1:1) e 100 mL de metanol. Obtendo assim, 599 mg de 4-[(4'-O-acetil- α -L-raminosilóxi)benzil]isotiocianato, produto natural que exhibe relevante atividade anti-inflamatória (CHEENPRACHA et al., 2010).

Com finalidade de se obter novas estruturas e verificar a relação entre toxicidade e estrutura, assim como atividade anti-inflamatória e estrutura, alterações foram feitas na estrutura do produto natural.

6.3 Síntese do derivado MC-D1 [4-(2',3',4'-O-triacetil- α -L-raminosilóxi)benzil isotiocianato] a partir de MC-1 [4-(4'-O-acetil- α -L-raminosilóxi)-benzilisotiocianato]

Para a obtenção de MC-D1 foi realizada uma reação de *O*-acetilação, que ocorreu em um frasco de vidro de 10 mL, contendo 0,085 mmol (30,0 mg) de benzilisotiocianato (MC-1) dissolvido em 1 mL de CH₂Cl₂. Em seguida adicionou-se 0,85 mmol (80 μ L) de anidrido acético, 0,85 mmol (118 μ L) de trietilamina e 0,085 mmol (10,4 mg) de 4dimetilaminopiridina (DMAP). A mistura foi mantida sob agitação magnética à temperatura ambiente e monitorada por CCD. O término da reação foi observado após 3 h, então se evaporou o solvente da mistura em evaporador rotativo e submeteu-se à cromatografia de adsorção sob 1,52 g de gel de sílica, usando 100 mL de hexano:acetato de etila (3:2), obtendo-se 35,6 mg do produto, na forma de óleo, com 96% de rendimento.

6.4 Síntese do derivado MC-D3 [4-(4'-O-acetil-2',3'-dimetóxi- α -Lraminosilóxi)benzil isotiocianato] a partir de MC-1 [4-(4'-O-acetil- α -L-raminosilóxi)benzilisotiocianato]

Para a obtenção de MC-D3 foi realizada a reação de metilação, que ocorreu em um frasco de vidro de 10 mL, contendo 0,085 mmol (30,0 mg) do benzilisotiocianato MC-1 dissolvido em 1 mL de MeCN, posteriormente foi adicionado 4,25 mmol (270 μ L) de iodeto de metila e 0,17 mmol (39,4mg) de óxido de prata. O progresso da reação foi monitorada por CCD. Depois de 24 horas, o meio reacional foi submetido a uma filtração. Posteriormente, a fase orgânica foi concentrada em um evaporador rotativo sob pressão reduzida com posterior purificação. O produto foi obtido com massa de 21 mg, correspondendo a 65% de rendimento.

6.5 Síntese do derivado MC-D6 [*N*-[(4'-O-acetil- α -L-raminosilóxi)benzil]-hidrazina carbotioamida] a partir de MC-1 [4-(4'-O-acetil- α -L-raminosilóxi)benzilisotiocianato]

Para a obtenção de MC-D6, em um balão de fundo redondo de 10mL adicionou-se MC-1 0,085 mmol (30,0mg) em 2 mL THF seco e 0,17 mmol (10 μ L) hidrazina. A mistura de reação foi mantida sob agitação a temperatura ambiente até a formação do produto da reação, analisado por CCD. Após o término da reação, adicionou-se 2 mL de água. A fase orgânica foi separada da fase aquosa por uma partição líquido-líquido com acetato de etila (3x5 mL). O solvente foi removido sob pressão reduzida e o produto foi purificado por cromatografia em coluna contendo 2,47 g de gel de sílica e usando 100 mL de acetato de etila (100%). O rendimento do produto purificado foi de 81% (26,5mg).

6.6 Síntese do derivado MC-D7 (*N*-[4-(4'-*O*-acetil- α -L-raminosiloxi)benzil]-2-(piridinil-4-carbonil)hidrazina-1-carbotioamida) a partir de MC-1 [4-(4'-*O*-acetil- α -L-raminosilóxi)benzilisotiocianato]

Para a obtenção de *N*-[4-(4'-*O*-acetil- α -L-raminosiloxi)benzil]-2-(piridinil-4-carbonil)hidrazina-1-carbotioamida (**Figura 1**), o produto natural 4-[(4'-*O*-acetil- α -L-raminosilóxi)benzil]isotiocianato foi colocado em um balão de fundo redondo 10mL e a ele foi adicionado 30,0mg em 2mL THF anidro e seguido da adição de 24 mg isoniazida. A mistura da reação foi mantida sob agitação à temperatura ambiente até a formação do produto da reação, analisado por CCD. O solvente foi removido sob pressão reduzida e o produto reacional foi purificado por cromatografia em coluna. O rendimento do produto purificado foi de 78%.

6.7 Síntese do derivado MC-D8 [4-(4'-*O*-acetil-2',3'-dimesiloxi- α -L-raminosiloxi) benzilisotiocianato] a partir de MC-1 [4-(4'-*O*-acetil- α -L-raminosilóxi)benzilisotiocianato]

Para a obtenção de MC-D8 foi realizada uma reação de mesilação, que ocorreu em um balão de fundo redondo de 50 mL, contendo 0,142mmol (50,0 mg) de MC-1 em 1mL de CH₂Cl₂. Em seguida, adicionou-se 0,425mmol (33 μ L) de cloreto de metanossulfonila (MsCl) e 0,425mmol (59 μ L) de trietilamina (Et₃N) (lentamente). O sistema reacional foi mantido sob agitação magnética e em banho de gelo (0 °C) por 5h. A formação do produto foi monitorada por CCD. O solvente foi removido sob

pressão reduzida e o produto purificado em cromatografia em coluna contendo 3,01 g de gel de sílica e usando 100 mL de hexano:acetato de etila (1:1). O produto foi obtido com 55% (39,5mg) de rendimento.

6.8 Síntese do derivado MC-D9 {4-[4'-O-acetil-2',3'-O-bis(decanoiloxi)- α -L-raminosiloxi]benzilisotiocianato} a partir de MC-1 [4-(4'-O-acetil- α -L-raminosilóxi)benzilisotiocianato]

Para a obtenção de 4-[[4'-O-acetil-2',3'-O-bis(decanoiloxi)- α -L-raminosiloxi]benzil]isotiocianato foi realizado o processo de O-acilação. Utilizou-se 5 equivalentes molar do cloreto de decanóila, e DMAP, em CH₂Cl₂ seco. A mistura foi mantida sob agitação magnética à temperatura ambiente e monitorada por CCD. O término da reação foi observado após 24h e em seguida evaporou-se o solvente da mistura sob pressão reduzida em evaporador rotativo e submeteu-se à cromatografia de adsorção eluída com uma mistura de hexano:acetato de etila (9.1). Obtendo-se o produto com 51 % de rendimento.

6.9 Síntese do derivado MC-H {4-[(2',3',4'-O-triacetil- α -L-raminosiloxi)*N*-benzil]hidrazinacarbotioamida} a partir de MC-1 [4-(4'-O-acetil- α -L-raminosilóxi)benzilisotiocianato]

Para a obtenção de 4-[(2',3',4'-O-triacetil- α -L-raminosiloxi)*N*-benzil]hidrazinacarbotioamida foi necessária a realização de dois processos químicos. Inicialmente, uma reação de O-acilação, seguida da reação de adição da hidrazina ao grupo isotiocianato. A primeira reação ocorreu em um frasco de vidro de 10mL, contendo 30,0mg do benzilisotiocianato dissolvido em CH₂Cl₂. Em seguida adicionou-se 80 μ L de anidrido acético, e um excesso de trietilamina e DMAP em quantidade catalítica. A mistura foi mantida sob agitação magnética à temperatura ambiente e monitorada por CCD (cromatografia em camada delgada). O término da reação foi observado após 3h, então evaporou-se o solvente da mistura em evaporador rotativo e submeteu-se à cromatografia de adsorção obtendo o produto como óleo, com 96% de rendimento. A segunda etapa reacional consistiu da adição do produto acetilado em 2mL THF e 10 μ L de uma solução de hidrazina 51%. A mistura de reação foi

mantida sob agitação a temperatura ambiente até a formação do produto da reação, analisado por CCD. Após o término da reação, adicionou-se 2mL de água. A fase orgânica foi separada da fase aquosa por uma partição líquido-líquido com acetato de etila (3x5mL). Após todas as etapas, o produto final foi obtido com 77% de rendimento.

6.10 Estudo da toxicidade de MC-1 e dos 7 derivados semissintéticos extraídos das flores de *Moringa oleifera*

Para avaliar e mensurar se os compostos apresentam alguma toxicidade, local ou sistêmica, assim como morbimortalidade, antes que fosse avaliado se os derivados têm efeito anti-inflamatório ou antinociceptivo foi realizado inicialmente um ensaio de segurança baseado no protocolo 420 (2001) da OCDE (*Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico*). Neste mesmo estudo foram feitos ensaios com doses únicas e repetidas.

Foram usados 110 camundongos albinos *Mus musculus*, 55 machos e 55 fêmeas. Para cada derivado existiu um grupo de machos (n=5) e um grupo de fêmeas (n=5), assim como o grupo controle. A substância controle utilizada foi solução salina 0,9%. O composto MC-H foi testado em um momento posterior aos outros, utilizando um grupo controle diferente devido a essa substância ter sido a última a ser elaborada e enviada ao laboratório. As doses testadas foram as seguintes: MC-1 1µg/kg; MC-D1 1µg/kg; MC-D3 100µg/kg; MC-D6 1µg/kg; MC-D7 1µg/kg; MC-D8 1µg/kg; MC-D9 10mg/kg e MC-H 1µg/kg, devido à baixa disponibilidade dos compostos.

O estudo de dose única consistiu na administração da substância testada via oral (gavagem, *per os*) em uma única dose por um período que não superior a 24 horas. Após 24 horas o estudo de dose única foi finalizado e os animais passaram a fazer parte do estudo de doses repetidas (os estudos são contínuos), onde diariamente os animais receberam a mesma dose do composto, baseando-se no peso do animal, durante 14 dias.

No estudo de toxicidade aguda (dose única, 24 horas), após a administração da dose do composto os animais foram observados por examinadores calibrados nos intervalos de 15 minutos, 30 minutos, uma hora, duas horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas e 24 horas, visando observar se houveram alterações de comportamento que pudessem indicar morbidade e também mortalidade, a saber:

piloereção, agressividade, sonolência, contorção abdominal, lambidas, cambalhotas, agitação, pulsão sexual, perda de peso e morte (VAL, *et al.* 2014).

Após as 24 horas iniciais (fim do experimento de toxicidade aguda, com dose única), iniciou-se o experimento de toxicidade subcrônica (doses repetidas), que consistiu na administração da dose do derivado de acordo com o peso do animal, durante 14 dias consecutivos, no mesmo horário e a observação dos mesmos parâmetros comportamentais de morbimortalidade utilizados no estudo de toxicidade aguda, porém durante apenas 15 minutos seguidos, subsequentemente à administração do derivado ou substância controle. No 15º dia os animais foram anestesiados com quetamina+xilasina e tiveram sangue coletado pelo plexo oftálmico para se realizarem dosagens bioquímicas das enzimas hepáticas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) e metabólitos renais (creatinina), para confirmar se houveram ou não alterações no funcionamento destes 2 órgãos. Em seguida os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical. A fim de avaliar alterações não detectáveis a olho nu ou por meios laboratoriais naqueles animais que não apresentaram alterações comportamentais foi realizada, após a eutanásia, a remoção do coração, fígado, baço e rim para a realização da análise microscópica por patologista, realizadas em microscópio óptico acoplado a sistema de captura de imagens digitais. Os aumentos utilizados foram: 100x, para aspectos morfológicos gerais e 400x, para análise detalhada dos eventos histológicos, tanto celulares quanto na matriz extra celular (MEC), com análise cega de grupos experimentais (fármacos-teste), seguindo a norma ISO 10993-11.

6.11 Eficácia antinociceptiva e anti-inflamatória de MC-D7, MC-D9 e MC-H (derivados semissintéticos obtidos das flores de *Moringa oleífera*) no modelo de hiperalgia inflamatória induzida na articulação temporomandibular (ATM) de ratos.

6.11.1 Delineamento Experimental

Os animais foram pré-tratados via oral com os derivados MC-D7 (0,01µg/kg; 0,1µg/kg ou 1µg/kg), MC-D9 (0,1µg/kg; 1µg/kg ou 10µg/kg) e MC-H (0,01µg/kg; 0,1µg/kg ou 1µg/kg). Uma hora após o pré-tratamento com as substâncias supracitadas, os animais receberam uma injeção intra-articular (formalina a 1.5%) e

tiveram o comportamento nociceptivo quantificado. Imediatamente após os testes comportamentais os animais foram anestesiados e eutanasiados por decapitação. Cada grupo possuiu n=5 animais (ratos machos, *Rattus norvegicus* albinos Wistar entre 180 a 220g). As melhores doses obtidas no teste da formalina foram utilizadas no teste da serotonina (injeção de Serotonina 225mg i.a. na ATM), visando minimizar o número de animais utilizados.

6.11.2 Injeções intra-articulares

Os animais foram anestesiados com isoflurano e receberam uma injeção do agente inflamatório (Formalina a 1,5% ou Serotonina 225mg) (ROVERONI *et al.*, 2001; OLIVEIRA-FUSARO *et al.*, 2012). Para a administração do agente inflamatório na ATM, uma agulha 30G conectada a uma seringa 50µl (705 N 50µl, Hamilton) por um tubo de polietileno P50 foi inserida na porção inferior da borda do arco zigomático da ATM esquerda do animal, sendo avançada na direção ventral até contactar a região dorsolateral do côndilo.

6.11.3 Testes comportamentais para a avaliação da resposta nociceptiva induzida pela Formalina e pela Serotonina

Os testes comportamentais foram realizados durante a fase clara, entre 9h e 17h em uma sala silenciosa, com temperatura controlada entre $23^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ} \text{C}$ (ROSLAND, 1991). No momento do teste os animais não tiveram acesso à água e comida. Para minimizar o estresse durante o experimento os pesquisadores manipularam os animais previamente por um período de 7 dias. A realização da análise comportamental para ambos os testes se deu em caixas de observação medindo 30x30x30cm com sua base e 3 lados espelhados e um vidro transparente na frente. A região superior não possui proteção. Cada animal foi previamente colocado na caixa por 10 minutos (imediatamente antes da injeção de formalina) para sua adaptação ao local do experimento, visando também minimizar o estresse (ABBOTT *et al.*, 1986). Imediatamente após a injeção intra-articular, o animal já acordado foi colocado na caixa espelhada e suas respostas comportamentais de coçar a área com as patas dianteiras ou traseiras e levantar reflexamente a cabeça foram quantificadas durante 45 minutos no teste da Formalina, divididos em 15 blocos de 3 minutos. O tempo em segundos que o animal permaneceu coçando a região orofacial foi quantificada

através de cronometro digital e o número de vezes que o animal levantou reflexamente a cabeça foi quantificada através de um contador manual de células (ROVERONI et al., 2001; FUSARO *et al.*, 2012). Devido ao ato de levantar a cabeça reflexamente possuir um padrão de duração de 1s a intensidade da resposta nociceptiva foi medida adicionando-se esse comportamento ao tempo total de coçar a região orofacial, como foi previamente padronizado (ROVERONI et al., 2001; FUSARO et al., 2012). Imediatamente após o teste comportamental os animais foram anestesiados e eutanasiados por decapitação.

6.12 Análise da permeabilidade vascular por extravasamento de azul de Evans

Os animais receberam tribromo (1%, i.p., 0,1mL/100g), e em seguida injeção intrarticular de formalina (1,5%, 50 μ L) na ATM. Para averiguação da inflamação todos os animais receberam uma dose de 50mg/kg do corante Azul de Evans (TORRES-CHÁVEZ et al., 2011) e.v. (veia peniana) imediatamente após a aplicação de formalina (1,5%, 50 μ L) na ATM e, após 45 minutos, os animais foram eutanasiados por decapitação. Baseando-se na propriedade do corante Azul de Evans de ligar-se às proteínas plasmáticas, o local da injeção de formalina foi identificado visualmente, devido à maior concentração de corante no referido tecido (HAAS et al., 1992), permitindo assim a remoção adequada dos tecidos para posterior análise do extravasamento através de técnicas espectrofotométricas.

Para a extração do corante, o tecido periarticular de cada animal foi pesado e colocado em microtubos tipo eppendorf contendo 1mL de formamida e mantido por 24 horas a 60°C (FIORENTINO *et al.*, 1999). Após a extração, a quantidade de corante extravasada no tecido foi determinada em um leitor de microplacas, afim de medir as absorbâncias (em 620nm) das diferentes soluções de formamida. Os resultados dessas leituras foram posteriormente comparados com os resultados de leituras de soluções com concentrações conhecidas (curva de calibração com 4 μ g, 2 μ g, 1 μ g e 0,5 μ g de corante por mL de formamida). A quantidade de corante extravasada (μ g) em cada solução foi dividida pelo peso (g) do respectivo tecido incubado. O extravasamento de foi calculado em microgramas de corante por grama de tecido dissecado. Foram realizados 5 grupos com n=5: Salina, Formalina, MC-D7 maior dose

no teste da formalina, MC-D9 maior dose no teste da Formalina e MC-H maior dose no teste da formalina.

6.13 Teste Rota Rod para analisar atividade ansiolítica dos derivados MC-D7, MC-D9 e MC-H

O teste do *Rota Rod* mensura o efeito do relaxamento muscular ou desordem da coordenação motora ocasionada pela ação de drogas em animais (CARLINI; BURGOS, 1979). Os animais foram colocados com as quatro patas sobre uma barra giratória separada por amplas abas que possibilitam a análise comportamental de cada animal. No modelo para ratos, são quatro divisões, cujo rotor apresenta diâmetro de 7 cm, possibilitando o estudo simultâneo de 4 animais, com uma rotação de 4 a 40 rpm, por um período de 5 minutos, após 1 hora a administração de MC-D7 MC-D9 e MC-H (maiores doses respectivas no teste da formalina) ou veículo (salina 0,9% *per os*). Foram registrados: tempo de latência (segundos), tempo de permanência na barra giratória (segundos), e o número de quedas (PIEL, 2014; DUNHAM; MIYA, 1957).

6.14 Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Para comparação múltipla dos dados paramétricos dos testes comportamentais e farmacológicos foi utilizada a análise de variância (ANOVA) e o nível de significância entre os grupos foi determinado pelos testes Bonferroni para detectar as diferenças entre o grupo controle e os grupos em tratamento. Em todas as análises estatísticas foi considerado o nível crítico para rejeição da hipótese de nulidade menos que 5% ($p < 0,05$).

7 RESULTADOS

7.1 Estruturas químicas dos derivados

A **Figura 1** mostra a estrutura final dos compostos obtidas pelas reações químicas descritas na metodologia. As modificações estruturais no produto natural podem ter sido responsáveis tanto pelas alterações comportamentais, presença ou ausência de toxicidade, bem como efeito antinociceptivo observado nos compostos, como pode ser visto à frente.

7.2 Ensaio de toxicidade aguda e subcrônica

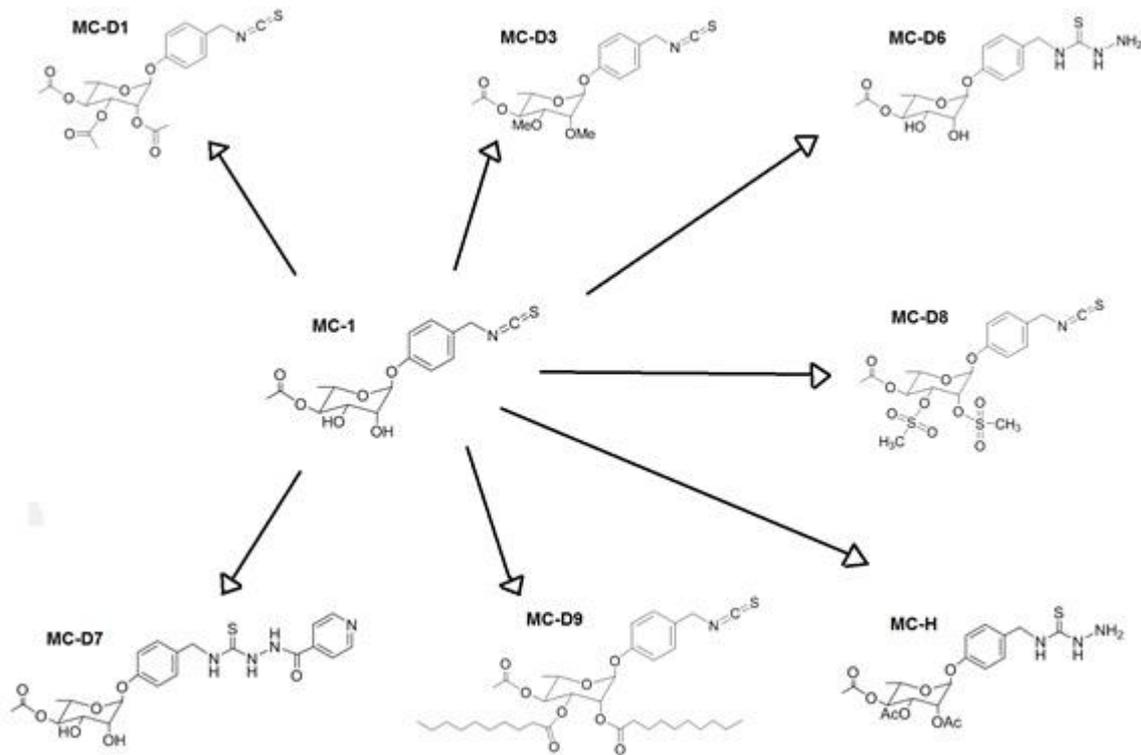
7.2.1 Taxa de sobrevivência dos animais submetidos ao uso dos derivados

Antes de avaliar a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória dos derivados, foi realizado um ensaio de segurança para avaliar a toxicidade do bezilisotiocianato e de seus 7 derivados, baseando-se no protocolo 420 da OCDE (OCDE, 2001), com algumas adaptações. A avaliação da toxicidade de MC-H foi realizada em momento posterior aos demais derivados, devido a ele ter sido o último derivado a ser sintetizado, utilizando um processo híbrido de obtenção com os reagentes e processos utilizados para as obtenções de MC-D1 e MC-D6. As doses usadas para teste foram MC-1: 1µg/kg, MC-D1: 1µg/kg, MC-D3: 100µg/kg, MC-D6: 1µg/kg, MC-D7: 1µg/kg, MC-D8: 1µg/kg, MC-D9: 10µg/kg e MC-H: 1µg/kg. A **Figura 2** mostra a taxa de sobrevivência dos animais machos. O grupo MC-1 apresentou menor taxa de sobrevivência dentre todos os grupos (20%), com 4 mortes (dias 3, 5, 9 e 13). O grupo MC-D1 apresentou a segunda menor taxa de sobrevivência (60%), com 2 mortes (dias 3 e 8). O grupo MC-D3 apresentou taxa de sobrevivência de 80%, com apenas uma morte (dia 10). Os grupos MC-D6, MC-D7, MC-D8, MC-D9, MC-H e Salina (ambos) não apresentaram mortalidade nos animais machos.

A **Figura 3** mostra a taxa de sobrevivência dos animais fêmeas. A taxa de sobrevivência do grupo MC-1 foi 0%, com a última morte acontecendo no 11º dia (dias 5, 7, 8, 9 e 11). Os grupos MC-D1, MC-D3, MC-D6 e MC-D8 apresentaram taxa de sobrevivência de 60%, MC-D9, por sua vez, apresentou taxa de sobrevivência de 80%. Os

grupos Salina (ambos), MC-D7 e MC-H não apresentaram mortalidade para as fêmeas.

Figura 1: Estruturas químicas dos derivados semissintéticos obtidos a partir de 4-[(4'-O-acetil- α -L-ramnolisolxi)benzil]isotiocianato.



Fonte: Elaborada pelos autores

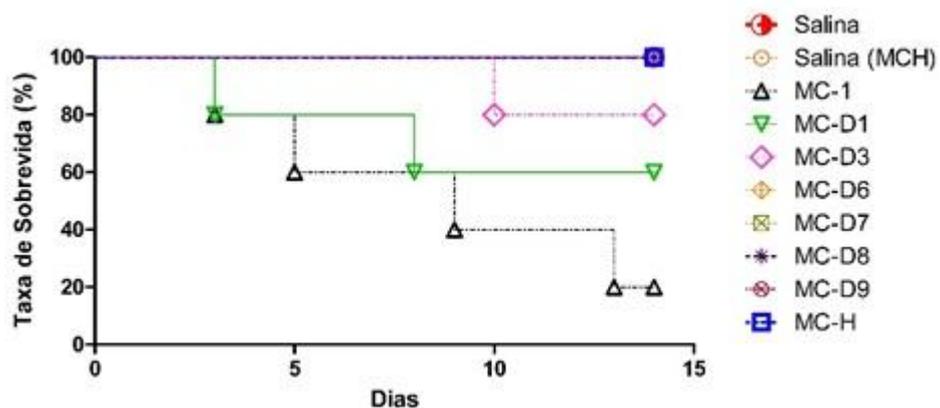
Ao realizar a soma dos grupos de machos e fêmeas dos respectivos derivados semissintéticos é possível observar o número total de mortes e o percentual de sobrevivência de cada derivado (**Tabela 1**).

A maioria dos grupos tratados apresentou mortalidade dos animais, excetuando-se MC-D7 (nenhuma morte), o que significa este derivado pode ser considerado seguro para o uso em experimentos e possivelmente em humanos, enquanto que as drogas que causaram mais de uma morte por grupo não são seguras para o uso (MC-1, MC-D1, MC-D3, MC-D6, MC-D8).

Os grupos tratados com MC-D9, por sua vez, apresentaram baixa mortalidade (uma morte, animal fêmea), o que é aceitável segundo o protocolo seguido (OCDE, 2001). Nos grupos de animais tratados com MC-H não houve mortes, o que significa que este derivado também é seguro para o uso em laboratório e possivelmente em humanos. Embora estes resultados mostrem que MC-D7, MC-D9

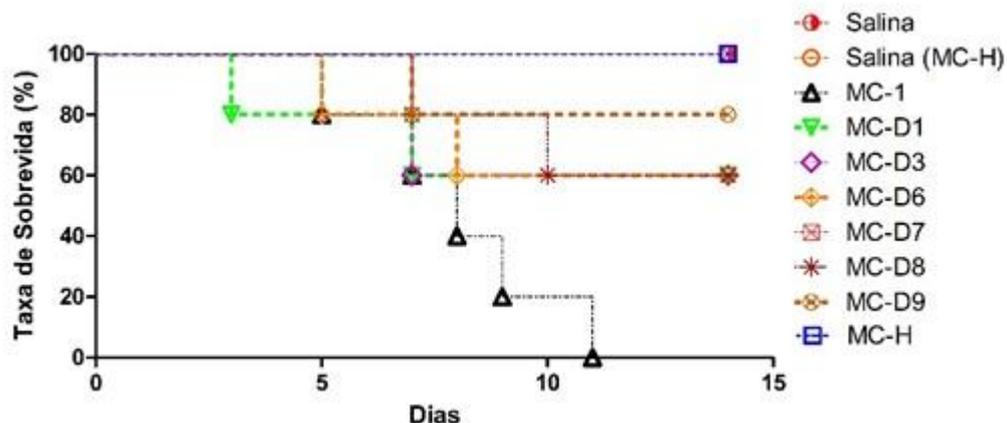
e MC-H podem ser considerados seguros para o uso, estes resultados ainda devem ser confrontados com as análises bioquímicas, análises comportamentais e posteriormente análises histológicas para se obter a confirmação de sua segurança para os usos mencionados acima.

Figura 2: Taxa de sobrevivência dos animais machos no ensaio de segurança de MC1 e seus 7 derivados. Cada grupo é representado por um símbolo colorido com uma linha pontilhada. Cada decréscimo na curva representa e sua aproximação do percentual 0 (eixo y) representa a morte de um animal naquele grupo no dia em questão (eixo x). Esta queda na curva representa portanto decréscimo de percentual de sobrevivência.



Fonte: Elaborada pelos autores

Figura 3: Taxa de sobrevivência dos animais fêmeas no ensaio de segurança de MC1 e seus 7 derivados. Cada grupo é representado por um símbolo colorido com uma linha pontilhada. Cada decréscimo na curva representa e sua aproximação do percentual 0 (eixo y) representa a morte de um animal naquele grupo no dia em questão (eixo x). Esta queda na curva representa portanto decréscimo de percentual de sobrevivência.



Fonte: Elaborada pelos autores

Tabela 1: Número total de mortes (machos e fêmeas) no ensaio de segurança de MC-1 e seus derivados semissintéticos. A maior taxa de mortalidade ocorreu no grupo MC-1. As maiores taxas de sobrevivência foram encontradas nos grupos MC-D7, MC-D9 e MC-H.

Grupos	Fêmeas (n° de mortes)	Machos (n° de mortes)	Total	Sobrevivência (%)
Salina	-	-	0	100%
Salina (controle de MC-H)	-	-	0	100%
MC-1	5	4	9	10%
MC-D1	2	2	4	60%
MC-D3	2	1	3	70%
MC-D6	2	-	2	80%
MC-D7	-	-	0	100%
MC-D8	2	-	2	80%
MC-D9	1	-	1	90%
MC-H	-	-	0	100%

Fonte: Elaborada pelos autores

7.2.2 Alterações comportamentais

Para saber se o uso dos derivados em dose única ou repetidas poderia causar alterações no comportamento que possam estar relacionadas à taxa de mortalidade, as alterações comportamentais durante os 14 dias foram avaliadas. A **Tabela 2** mostra as alterações comportamentais dos machos e a **Tabela 3** a das fêmeas.

Nos machos, os grupos MC-D7 e MC-H não apresentaram alterações comportamentais, de maneira semelhante aos grupos controles (Salina e Salina controle de MC-H). Apenas um animal do grupo MC-D9 apresentou agressividade e pulsão sexual. Nos demais grupos os comportamentos de piloereção (MC-1, MC-D1, MC-D3 e MC-D6) e sonolência (MC-1, MC-D1, MC-D3 e MC-D8) foram as alterações de comportamento mais presentes. Agressividade foi observada também no grupo MC-D1, assim como agitação. Nas fêmeas, os grupos MC-D7, MC-D9 e MC-H não apresentaram alterações comportamentais, semelhantemente aos seus controles (Salina e Salina controle de MC-H). Os comportamentos observados nos demais grupos foram piloereção (MC-1, MC-D1, MC-D3, MC-D6 e MC-D8), sonolência (MC-1, MC-D3, MC-D6 e MC-D8) e contorção abdominal (MC-D3 e MC-D6). Estas alterações comportamentais foram prioritariamente observadas nos grupos com taxas de sobrevivência não aceitáveis (MC-1, MC-D1, MC-D3, MC-D6 e MC-D8), o que corrobora com a hipótese de que os derivados supracitados podem ser tóxicos.

7.2.3 Níveis séricos de enzimas hepáticas (AST e ALT)

A **Tabela 4** mostra os níveis séricos de AST e ALT correspondentes aos grupos dos derivados MC-1, MC-D1, MC-D3, MC-D6, MC-D7, MC-D8 e MC-D9 machos e fêmeas juntos. Nos grupos MC-1 ($120,5 \pm 0,0$, de apenas um animal), MC-D1 ($90,3 \pm 17,4$), MC-D3 ($104,0 \pm 19,0$), MC-D6 ($125,5 \pm 9,4$), MC-D8 ($94,98 \pm 16,0$) e MC-D9 ($83,26 \pm 11,1$) os níveis de AST foram maiores do que o grupo salina, porém sem significância estatística. Os níveis de ALT de apenas 2 derivados, MC-1 ($36,6 \pm 0,0$, de apenas um animal) e MC-D3 ($33,7 \pm 7,3$) foram maiores do que os níveis encontrados no grupo Salina ($32,5 \pm 5,6$), porém, sem significância estatística.

Tabela 2: Alterações comportamentais dos animais machos no ensaio de segurança. Os comportamentos mais comuns apresentados foram piloereção e sonolência. As alterações comportamentais foram observadas imediatamente a administração do derivado e durante os 10 minutos seguintes.

Grupos	Alterações comportamentais	Nº de animais
Saline	-	-
Saline (MC-H control)	-	-
MC-1	Piloereção, Sonolência.	5
MC-D1	Piloereção, Sonolência, Agressividade, Agitação	5
MC-D3	Piloereção, Sonolência	3
MC-D6	Sonolência.	3
MC-D7	-	-
MC-D8	Sonolência	5
MC-D9	Agressividade, Pulsão sexual.	-
MC-H	-	-

Fonte: Elaborada pelos autores

Tabela 3: Alterações comportamentais dos animais fêmeas no ensaio de segurança. Os comportamentos mais comuns apresentados foram piloereção e sonolência. As alterações comportamentais foram observadas imediatamente a administração do derivado e durante os 10 minutos seguintes.

Grupos	Alterações comportamentais	Nº de animais
Saline	-	-
Saline (MC-H control)	-	-
MC-1	Piloereção, Sonolência.	5
MC-D1	Piloereção	5
MC-D3	Piloereção, Sonolência, Contorção.	3
MC-D6	Piloereção, Sonolência, Contorção.	3
MC-D7	-	-
MC-D8	Piloereção, Sonolência.	5
MC-D9	-	-
MC-H	-	-

Fonte: Elaborada pelos autores

Tabela 4: Níveis séricos de AST e ALT dos grupos MC-1, MC-D1, MC-D3, MC-D6, MC-D7, MC-D8 e MC-D9. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Salina. Os dados são representados como média \pm E.P. M. (n=5). (ANOVA, Bonferroni).

Grupos	AST	ALT
Salina	81,7 \pm 15,87	32,5 \pm 5,6
MC-1	120,5 \pm 0,0	36,6 \pm 0,0
MC-D1	90,3 \pm 17,4	27,6 \pm 5,8
MC-D3	104,0 \pm 19,0	33,7 \pm 7,3
MC-D6	125,5 \pm 9,4	32,5 \pm 7,7
MC-D7	79,89 \pm 13,1	30,0 \pm 3,3
MC-D8	94,98 \pm 16,0	31,3 \pm 2,2
MC-D9	83,26 \pm 11,1	23,1 \pm 3,6

Fonte: Elaborada pelos autores

A **Tabela 5** mostra os níveis de AST e ALT do grupo MC-H em relação ao seu controle (Salina controle MC-H). Embora os níveis de AST tenham sido maiores em MC-H (256,8 \pm 44,2) do que no grupo Salina controle de MC-H (192,3 \pm 33,16) não houve diferença estatisticamente significativa. Os níveis de ATL também foram maiores no grupo MC-H (63,9 \pm 7,3), em relação ao grupo Salina controle de MC-H (52,1 \pm 4,9), mas novamente não houve diferença estatisticamente significativa.

7.2.4 Níveis séricos de creatinina

Não foi possível dosar os níveis séricos de creatinina dos animais de todos os grupos devido a quantidade coletada de sangue não ter sido suficiente (principalmente naqueles grupos em onde houve maior mortalidade ou onde os animais se encontravam em morte eminente). Os níveis séricos de creatinina dos grupos que receberam os derivados estão representados nas **Tabelas 6 e 7**.

Tabela 5: Níveis séricos de AST e ALT do grupos MC-H. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Salina. Os dados são representados como média \pm E.P. M. (n=5). (ANOVA, Bonferroni).

Grupos	AST	ALT
Salina	192,3 \pm 33,16	52,1 \pm 4,9
MC-H	256,8 \pm 44,2	63,9 \pm 7,3

Fonte: Elaborada pelos autores

Na **Tabela 6** os grupos MC-D7 (0,37 \pm 0,02) e MC-D9 (0,43 \pm 0,03) apresentaram níveis séricos de creatinina maiores do que o grupo Salina (), porém

não houveram diferenças estatisticamente significativas, diferentemente do grupo MC-D8 ($0,33 \pm 0,04$), que apresentou valores mais altos e diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). O derivado MC-H apresentou, por sua vez (**Tabela 7**) nível sérico menor do que o seu controle ($0,37 \pm 0,02$), o grupo salina ($0,50 \pm 0,14$) e não houve diferença estatisticamente significativa.

7.2.5 Peso dos órgãos dos animais

Foram observadas as variações no peso dos órgãos (coração, baço, fígado e rim dos animais), com a finalidade de detectar alguma visceromegalia. O peso dos órgãos é mostrado nas **Tabelas 8 e 9**.

Tabela 6: Níveis séricos de creatinina de MC-D7, MC-D8 e MC-D9. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Salina. Os dados são apresentados como média \pm E.P.M. ($n=5$). (ANOVA, Bonferroni).

Grupos	Creatinina
Salina	$0,33 \pm 0,04$
MC-D7	$0,37 \pm 0,02$
MC-D8	$0,50 \pm 0,02^*$
MC-D9	$0,43 \pm 0,03$

Fonte: Elaborada pelos autores

Tabela 7: Níveis séricos de creatinina de MC-H. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Salina. Os dados são apresentados como média \pm E.P.M. ($n=5$). (ANOVA, Bonferroni).

Grupos	Creatinina
Salina	$0,50 \pm 0,14$
MC-H	$0,37 \pm 0,02$

Fonte: Elaborada pelos autores

A **Tabela 8** mostra que o peso do coração de todos os grupos foi menor do que o grupo Salina. O peso do fígado de MC-1 ($1,540 \pm 0$), MC-D3 ($1,621 \pm 0,184$) e MC-D6 ($1,641 \pm 0,095$) foi maior que o peso de Salina ($1,514 \pm 0,070$), porém não

houve diferença significativa estatisticamente. Os pesos dos rins dos grupos MC-1 ($0,299 \pm 0$) e MC-D3 ($0,271 \pm 0,024$) foram maiores do que o grupo Salina ($0,265 \pm 0,025$), mas novamente não houve diferença estatisticamente significativa. Os pesos dos baços dos grupos MC-D3 ($0,106 \pm 0,008$), MC-D6 ($0,184 \pm 0,047$) e MC-D9 ($0,103 \pm 0,010$) foram maiores do que o de Salina ($0,095 \pm 0,006$), porém, apenas a diferença entre o peso de MC-D6 e o de Salina foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Na **Tabela 9** é possível observar que os pesos dos órgãos de MC-H (coração: $164 \pm 0,006$; fígado: $1,518 \pm 0,076$; rim: $0,241 \pm 0,016$) foram menores do que os do grupo Salina (coração: $0,187 \pm 0,012$; fígado: $1,559 \pm 0,070$; rim: $0,268 \pm 0,021$;). Embora o peso médio do baço de MC-H ($0,104 \pm 0,010$) tenha sido superior ao de Salina ($0,096 \pm 0,005$), não houve diferença estatisticamente significativa.

Tabela 8: Peso dos órgãos dos grupos MC-1, MC-D1, MC-D3, MC-D6, MC-D7, MC-D8 e MC-D9. Foram removidos o coração, fígado, baço e rim. Dados são mostrados como média \pm E.P.M. . * $p < 0,05$ em relação ao grupo Salina. (ANOVA, Bonferroni)

Grupo	Coração (g)	Fígado (g)	Rim (g)	Baço (g)
Salina	$0,234 \pm 0,017$	$1,514 \pm 0,070$	$0,265 \pm 0,025$	$0,095 \pm 0,006$
MC-1	$0,175 \pm 0$	$1,540 \pm 0$	$0,299 \pm 0$	$0,072 \pm 0$
MC-D1	$0,206 \pm 0,017$	$1,511 \pm 0,120$	$0,250 \pm 0,022$	$0,095 \pm 0,005$
MC-D3	$0,203 \pm 0,010$	$1,621 \pm 0,184$	$0,271 \pm 0,024$	$0,106 \pm 0,008$
MC-D6	$0,180 \pm 0,011$	$1,641 \pm 0,095$	$0,265 \pm 0,025$	$0,184 \pm 0,047^*$
MC-D7	$0,222 \pm 0,015$	$1,480 \pm 0,058$	$0,264 \pm 0,013$	$0,090 \pm 0,007$
MC-D8	$0,205 \pm 0,010$	$1,460 \pm 0,091$	$0,253 \pm 0,018$	$0,085 \pm 0,002$
MC-D9	$0,192 \pm 0,009$	$1,463 \pm 0,059$	$0,248 \pm 0,014$	$0,103 \pm 0,010$

Fonte: Elaborada pelos autores

Tabela 9: Peso dos órgãos do grupo MC-H. Foram removidos o coração, fígado, baço e rim. Dados são mostrados como média \pm E.P.M. Não houve diferenças significativas em relação ao grupo Salina. (ANOVA, Bonferroni)

Grupo	Coração (g)	Fígado (g)	Rim (g)	Baço (g)
Salina	$0,187 \pm 0,012$	$1,559 \pm 0,070$	$0,268 \pm 0,021$	$0,096 \pm 0,005$
MC-H	$0,164 \pm 0,006$	$1,518 \pm 0,076$	$0,241 \pm 0,016$	$0,104 \pm 0,010$

Fonte: Elaborada pelos autores

7.3 Análise histopatológica

Os derivados MC-D7, MC-D9 e MC-H além de estarem relacionados a taxas de sobrevivência mais altas dentre as substâncias testadas, também apresentaram alterações comportamentais e bioquímicas mínimas, sendo que nenhuma alteração nestes grupos foi estatisticamente significativa. Para corroborar com estes dados foi

realizada a análise histopatológica de quatro órgãos, a saber: coração, baço, fígado e rim.

A **Figura 4** mostra que nos órgãos animais dos grupos tratados com Salina, MC-D7, MC-D9 e MC-H (em análise histopatológica cega dos 3 grupos testados em modelo murinho), não foi observada toxicidade. Os órgãos tiveram sua morfologia geral preservada, bem como a integridade de suas células parenquimatosas (típicas da constituição de cada tecido) e estromais (tecido conjuntivo de permeio e endotelial/vasos sanguíneos). Os grupos tratados com MC-D7 e MC-H exibiram no baço nódulos linfáticos de maior dimensão frente aos demais grupos, sugerindo maior reatividade na produção linfocitária na polpa branca. Nos rins dos animais tratados com MC-H houve aumento progressivo de eosinofilia (característica de rica presença de aminoácidos) nos túbulos proximais e distais, indicando maior filtração, reabsorção e excreção renal, porém mantendo íntegra a morfologia néfrica cortico-medular. Esses resultados podem indicar que os produtos testados não geram toxicidade sistêmica de acordo com o ensaio de toxicidade aguda e subaguda e apresenta biocompatibilidade *in vivo*, segundo os critérios da norma ISO 10993-11.

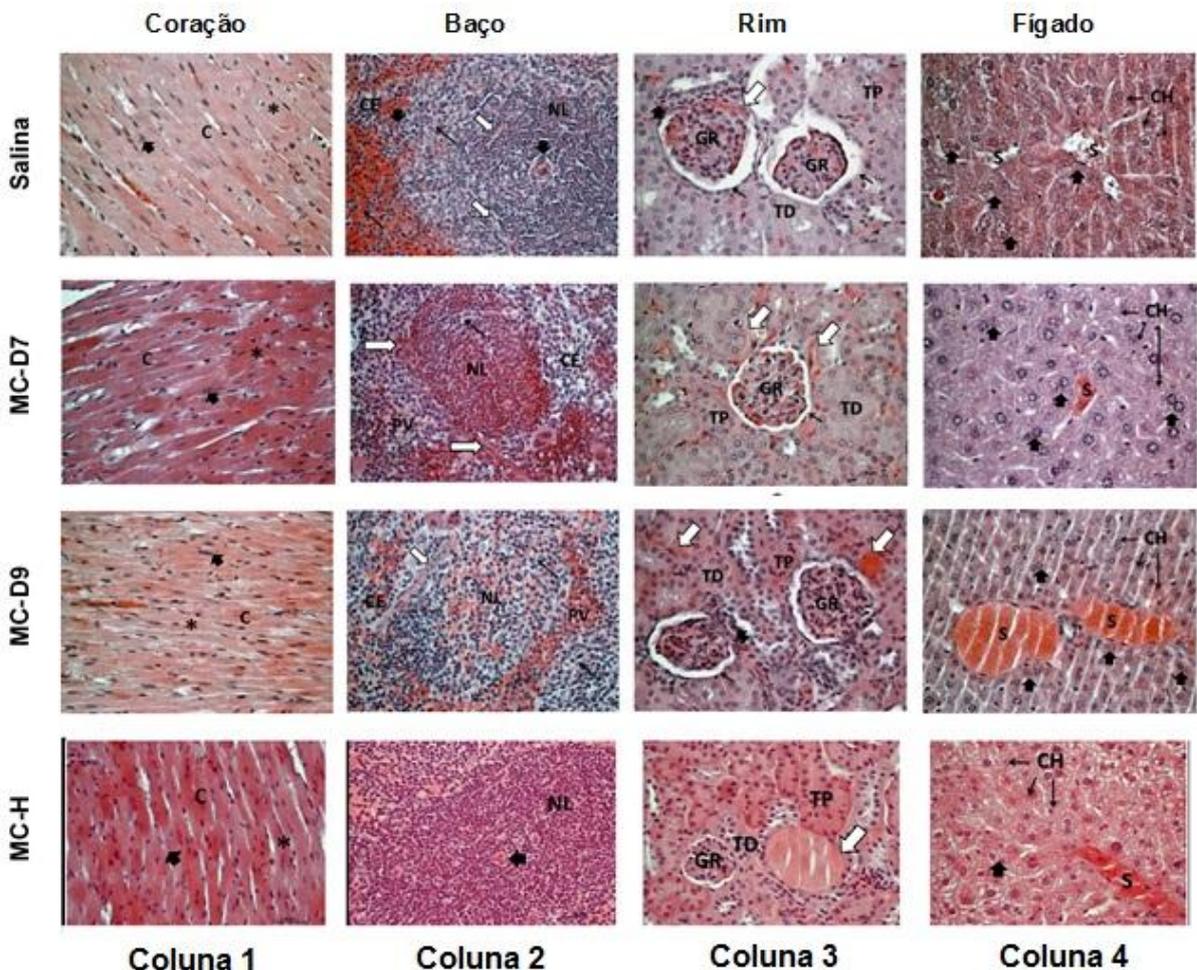
7.4 Mudanças estruturais e redução da toxicidade

Neste ensaio de segurança foi possível observar que os derivados semissintéticos MC-D7, MC-D9 e MC-H estiveram relacionados a maiores taxas de sobrevivência, ausência de alterações comportamentais e níveis séricos de enzimas hepáticas e creatinina dentro dos valores normais. Estes valores indicam menor toxicidade destes derivados em comparação a MC-1 e aos demais derivados, podendo assim serem considerados seguros para o uso. Estas modificações podem ser visualizadas na **Figura 5**.

As modificações estruturais promovidas nas moléculas dos derivados semissintéticos estão destacadas por elipses em vermelho. Na molécula de MC-D7 (*N*-[4-(4'-*O*-acetil- α -L-raminosiloxi)benzil]-2-(piridinil-4-carbonil)hidrazina-1-carbotioamida) é possível observar a remoção do grupo isotiocianato (N=C=S) e adição do grupo (piridinil-4-carbonil)hidrazina-1-carbotioamida. Na molécula de MC-D9 (4-[[4'-*O*-acetil-2',3'-*O*-bis(decanoiloxi)- α -L-raminosiloxi]benzil]isotiocianato) a mudança foi a acilação de duas hidroxilas osídicas, com a inserção de dois grupos de cadeia alifática extensa (10 C). As mudanças estruturais em MC-H (4-[(2',3',4'-*O*-

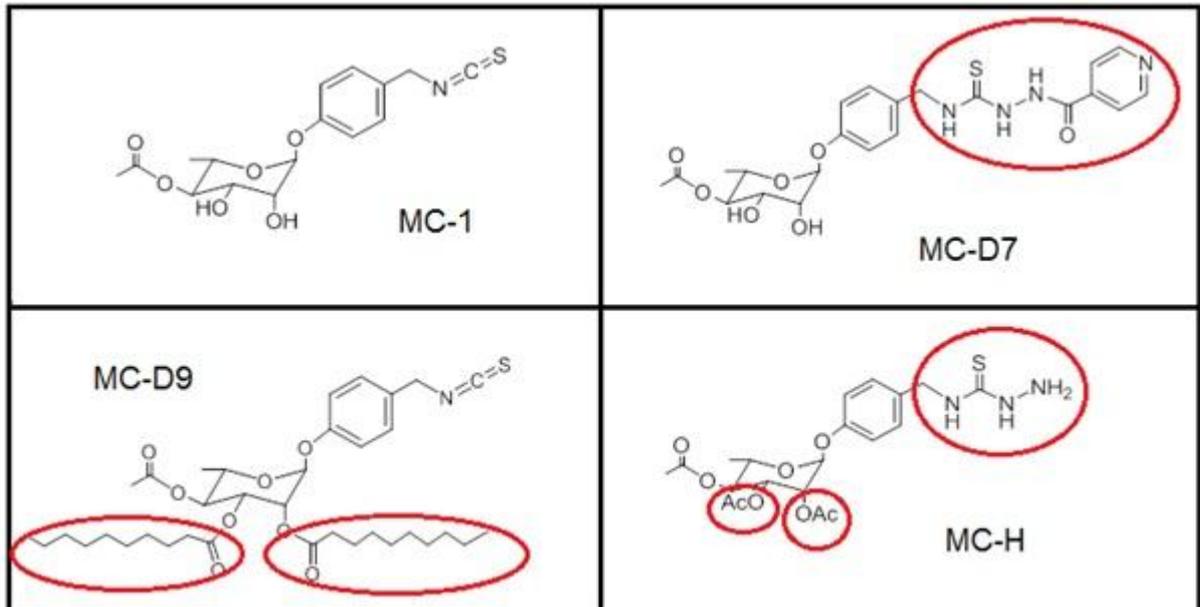
triacetil- α -L-raminosiloxi)*N*-benzil]hidrazinacarbotioamida) foram a substituição do grupo isotiocianato por um grupo hidrazinacarbotioamida e também a acilação de duas hidroxilas osídicas, com a inserção de mais dois grupos acetilas na molécula. Estas mudanças estruturais, portanto, podem ter sido determinantes na redução da toxicidade destas drogas.

Figura 4: Análise Histopatológica dos órgãos (magnificação: 400x, coloração: HE). Coluna 1: coração de Salina, MC-D7, MC-D9 e MC-H respectivamente. Cardiomiócitos (C) com aspectos morfológicos dentro do padrão de normalidade. Células com eosinofilia citoplasmática característica (*) e núcleos basofílicos múltiplos e preservados (seta preta). Coluna 2: baço de Salina, MC-D7, MC-D9 e MC-H respectivamente. Presença de nódulos linfáticos (NL), envoltos por polpa vermelha (PV), capilares sinusóides (seta branca) e cordões esplênicos (CE) com predomínio de linfócitos. Dentro do nódulo linfático, pequena presença de áreas mais claras correspondentes ao centro germinativo (seta fina) sugerindo uma linfocitose intensa (MC-D7 e MC-H) e moderada (Salina, MC-D9). Coluna 3: rim de Salina, MC-D7, MC-D9 e MC-H respectivamente. Salina, MC-D7 e MC-D9: Região cortical do rim, com corpúsculos renais formados por glomérulos renais (GR) e cápsula renal (setas finas), capilares sanguíneos hiperêmicos (setas brancas), mácula densa (seta preta, se houver) e túbulos contorcidos proximais (TP, mais eosinofílicos) e distais (TD, citoplasma mais pálido), dentro do padrão morfológico de normalidade. MC-H: TP e TD encontram-se com maior eosinofilia citoplasmática frente aos demais grupos experimentais. Coluna 4: fígado Salina, MC-D7, MC-D9 e MC-H respectivamente. Cordões de hepatócitos (CH), que podem apresentar binucleação típica (setas pretas), entremeados por capilares sinusóides (S). Salina, MC-D7 e MC-D9: todos os órgãos dentro dos padrões de normalidade. MC-H: hepatócitos apresentam moderado depósito de glicogênio.



Fonte: Elaborada pelos autores

Figura 5: Alterações estruturais nas moléculas de MC-D7, MC-D8 e MC-H em comparação com o isotiocianato constituinte da *Moringa oleifera* (MC-1). As alterações estão destacadas por elipses em vermelho.



Fonte: Elaborada pelos autores

7.5 Eficácia antinociceptiva dos derivados semissintéticos MC-D7, MC-D9 e MC-H na hipernocicepção inflamatória induzida pela Formalina

Devido à toxicidade dos derivados semissintéticos MC-1, MC-D1, MC-D3, MC-D6 e MC-D8, comprovada no ensaio de segurança resolveu-se verificar se havia efeito antinociceptivo na hipernocicepção inflamatória induzida pela Formalina apenas dos compostos MC-D7, MC-D9 e MC-H. Nestes experimentos houve um grupo controle positivo (indometacina 5mg/kg *per os*, grupo Indo).

A **Figura 6** mostra o comportamento nociceptivo dos animais submetidos ao pré-tratamento com MC-D7 no teste da Formalina. Nos animais submetidos apenas a aplicação de Formalina (grupo Formalina) i.a. na ATM (1,5%), o comportamento nociceptivo foi significativamente maior ($p < 0.05$) ($233 \pm 7,77$) do que o grupo Sham (grupo Salina) ($48 \pm 2,24$). Os animais pré-tratados com MC-D7 mostraram redução estatisticamente significativa ($p < 0.05$) do comportamento nociceptivo em relação ao grupo Formalina nas três doses testadas, $0,01 \mu\text{g}/\text{kg}$ ($94,8 \pm 4,87$), $0,1 \mu\text{g}/\text{kg}$ ($86,8 \pm 21,7$) e $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ ($72,4 \pm 26$), respectivamente. A dose que apresentou maior redução foi escolhida para os experimentos posteriores, neste caso $1 \mu\text{g}/\text{kg}$. Os animais pré-tratados com o composto MC-D9 (**Figura 7**) mostraram redução do comportamento

nociceptivo de maneira estatisticamente significativa ($p < 0.05$) nas doses de $0,1 \mu\text{g}/\text{kg}$ ($87,2 \pm 10,4$), $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ ($128,4 \pm 13,7$) e $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ ($78,8 \pm 11$) em relação ao grupo Salina ($233 \pm 7,77$). A dose que apresentou maior redução foi escolhida para os experimentos posteriores, neste caso $1 \mu\text{g}/\text{kg}$.

Os animais pré-tatados com o composto MC-H também mostraram redução do comportamento nociceptivo de maneira estatisticamente significativa ($p < 0.05$) nas 3 doses testadas, $0,01 \mu\text{g}/\text{kg}$ ($108,8 \pm 17,25$), $0,1 \mu\text{g}/\text{kg}$ ($63,40 \pm 8,95$) and $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ ($56,1 \pm 7,46$) em relação ao grupo Formalina ($233 \pm 7,77$), como mostra a **Figura 8**.

7.6 Eficácia antinociceptiva dos derivados semissintéticos MC-D7, MC-D9 e MC-H na hipernocicepção inflamatória induzida pela Serotonina

Também foi mensurada a eficácia antinociceptiva dos derivados semi-sintéticos em animais sujeitos a hipernocicepção inflamatória induzida pela Serotonina i.a (ATM). As respectivas doses de cada derivado foram: MC-D7 $1 \mu\text{g}/\text{kg}$, MC-D9 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ e MC-H $1 \mu\text{g}/\text{kg}$. Neste experimento houve um grupo controle positivo pré-tratado com indometacina $5 \text{mg}/\text{kg}$ *per os* (grupo Indo).

O comportamento nociceptivo foi significativamente maior ($p < 0,05$) no grupo que recebeu apenas a Serotonina i.a na ATM (grupo Serotonina) ($105,6 \pm 3$) ao ser comparado com o grupo que recebeu Salina i.a na ATM (grupo Salina) ($27,8 \pm 4,7$), como mostra a **Figura 9**. O efeito nociceptivo induzido pela Serotonina foi reduzido de maneira estatisticamente significante ($p < 0,05$) no grupo Indo ($29,33 \pm 2,4$), porém, este efeito não foi reduzido pelo derivado MC-D7 ($117,6 \pm 25$) nem por MC-D9 ($143,3 \pm 12,7$), que, por sua vez, apresentaram valores significativamente mais altos do que o grupo Salina. Dos três derivados testados apenas MC-H reduziu ($74 \pm 8,2$) o comportamento hipernociceptivo induzido pela serotonina de maneira estatisticamente significante ($p < 0,05$).

7.7 Eficácia anti-inflamatória dos derivados semissintéticos MC-D7, MC-D9 e MC-H verificada através do extravasamento plasmático com azul de Evans (Inflamação induzida por Formalina)

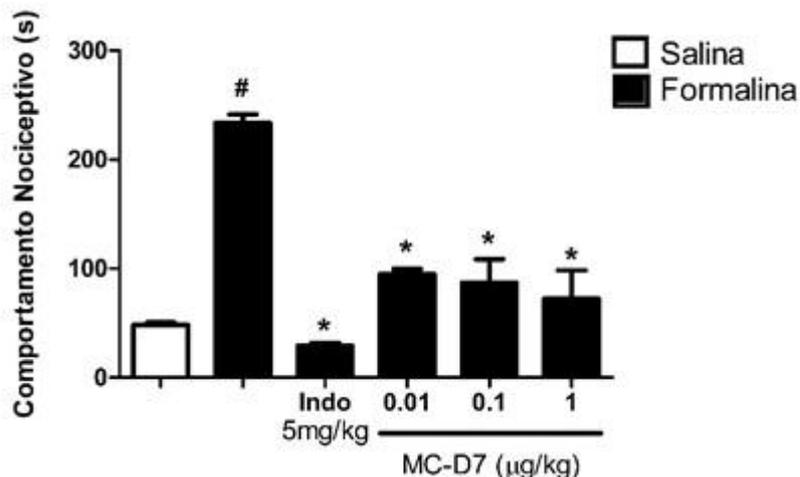
A fim de verificar se os derivados MC-D7 ($1 \mu\text{g}/\text{kg}$), MC-D9 ($10 \mu\text{g}/\text{kg}$) e MC-H ($1 \mu\text{g}/\text{kg}$) possuem também efeito anti-inflamatório na ATM de ratos foi realizado o

teste de extravasamento plasmático com Azul de Evans. Na **Figura 10** é possível observar que houve diferença significativa entre o grupo Salina ($15,4 \pm 1,9$) e o grupo Formalina ($64,3 \pm 8,7$). Os derivados MC-D7 ($13,9 \pm 1,1$), MC-D9 ($17,9 \pm 2,2$) e MC-H ($9,6 \pm 1,3$) reduziram o extravasamento plasmático de maneira estatisticamente significativa em relação ao grupo Formalina, sugerindo possível atividade anti-inflamatória destes compostos.

7.8 Análise da motricidade e coordenação motora através do Teste Rotarod

Para avaliar se os derivados semi-sintéticos MC-D7, MC-D9 e MC-H podem causar letargia, sonolência relaxamento muscular ou desordem na coordenação motora que impliquem nos testes comportamentais (Formalina e Serotonina), gerando assim um viés, foi realizado o Teste Rotarod. As doses usadas foram: MC-D7 $1\mu\text{g}/\text{kg}$, MC-D9 $10\mu\text{g}/\text{kg}$ e MC-H $1\mu\text{g}/\text{kg}$.

Figura 6: Eficácia antinociceptiva de MC-D7 na hipernocicepção inflamatória induzida por Formalina. # $p < 0,05$ em relação ao grupo Salina. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Formalina. Dados são apresentados como média \pm E.P.M. ($n=5$). (ANOVA, Bonferroni).



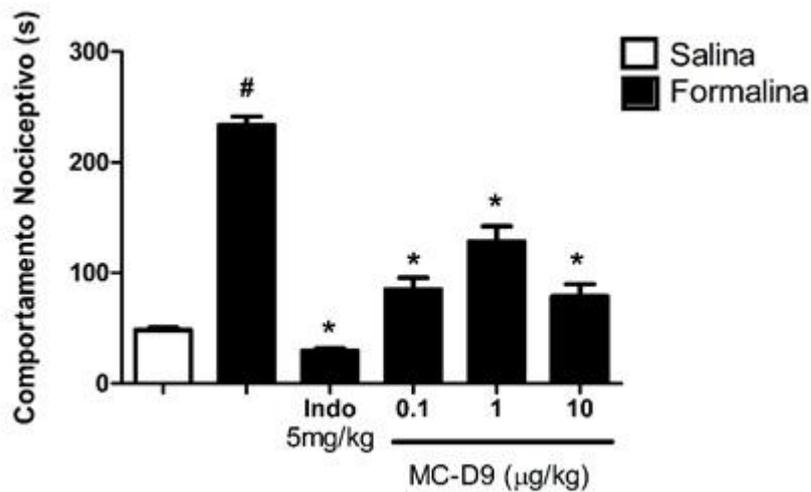
Fonte: Elaborada pelos autores

A **Figura 11** mostra os resultados para o tempo de latência (s) e a **Figura 12** mostra o número de quedas dos animais. Os grupos MC-D7 ($133,2\text{s} \pm 11,1$), MC-D9 ($128,3\text{s} \pm 16,2$) e MCH ($120,2\text{s} \pm 13,6$) tiveram maiores tempos de latência do que

o grupo Salina ($93.5s \pm 5.6$), o que significa que os derivados não apresentaram efeito ansiolítico.

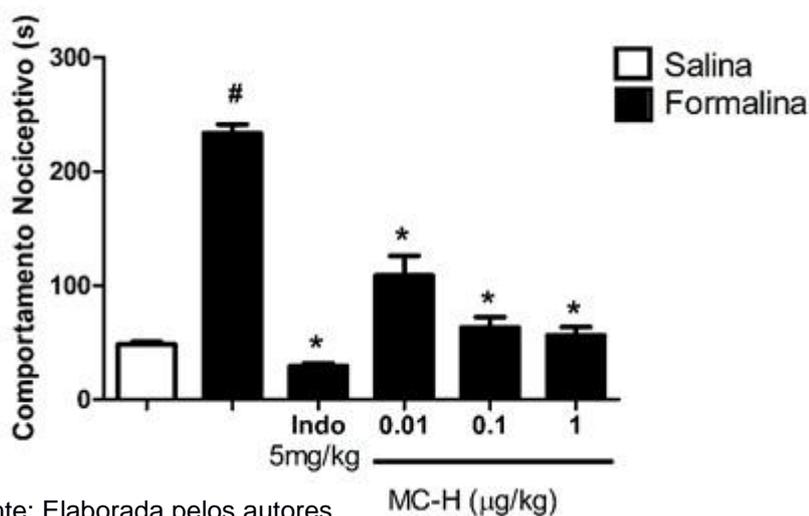
Em relação ao número de quedas os animais tratados com os derivados MC-D9 (2.6 ± 0.2) e MC-H (3 ± 0.3) apresentaram maior número de quedas do que o grupo Salina (2.2 ± 0.2), porém não houve diferença estatisticamente significativa. MC-D7 possuiu um menor número de quedas do que o grupo Salina ($1,75 \pm 0.4$), mas também não houve diferença estatisticamente significativa.

Figura 7: Eficácia antinociceptiva de MC-D9 na hipernocicepção inflamatória induzida por Formalina. # $p < 0,05$ em relação ao grupo Salina. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Formalina. Dados são apresentados como média \pm E.P.M. (n=5). (ANOVA, Bonferroni).



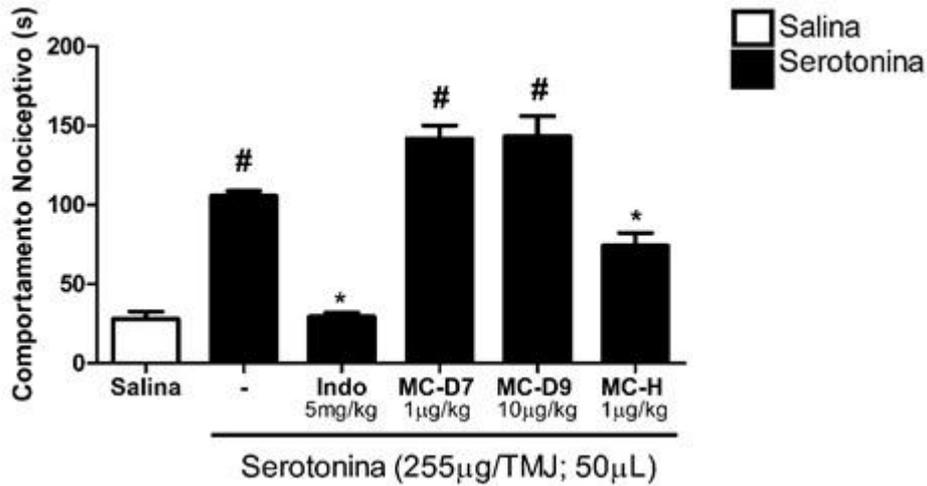
Fonte: Elaborada pelos autores

Figura 8: Eficácia antinociceptiva de MC-H na hipernocicepção inflamatória induzida por Formalina. # $p < 0,05$ em relação ao grupo Salina. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Formalina. Dados são apresentados como média \pm E.P.M. (n=5). (ANOVA, Bonferroni).



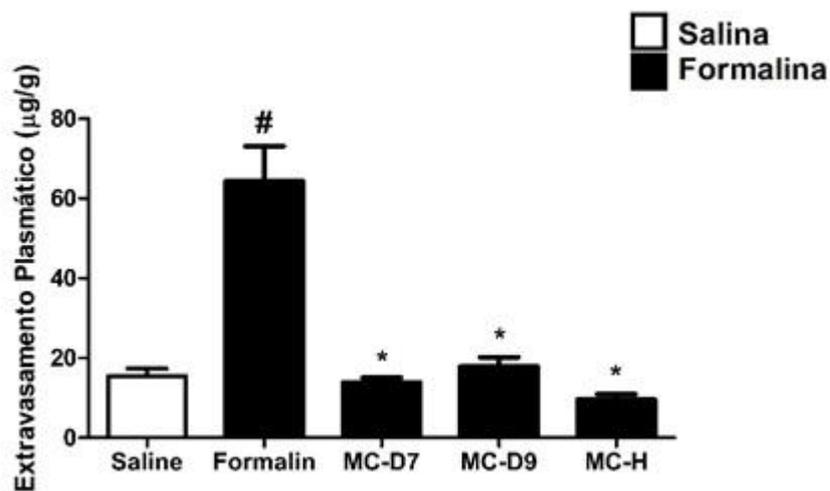
Fonte: Elaborada pelos autores

Figura 9: Eficácia antinociceptiva de MC-D7, MC-D9 e MC-H na hipernocicepção inflamatória induzida por Serotonina. # $p < 0,05$ em relação ao grupo Salina. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Serotonina. Dados são apresentados como média \pm E.P.M. (n=5). (ANOVA, Bonferroni).



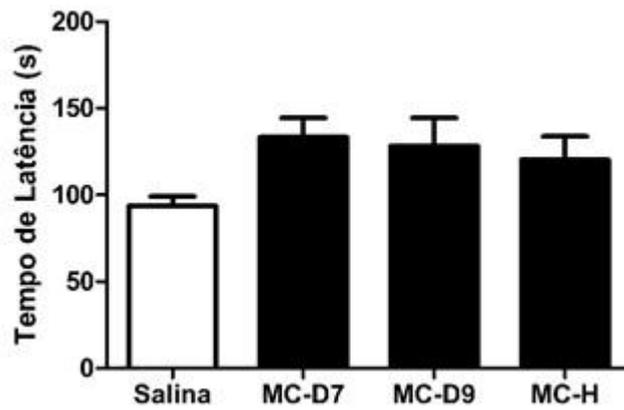
Fonte: Elaborada pelos autores

Figura 10: Extravasamento plasmático de corante Azul de Evans de MC-D7, MC-D9 e MC-H na hipernocicepção inflamatória induzida por Formalina. # $p < 0,05$ em relação ao grupo Salina. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Formalina. Dados são apresentados como média \pm E.P.M. (n=5). (ANOVA, Bonferroni).



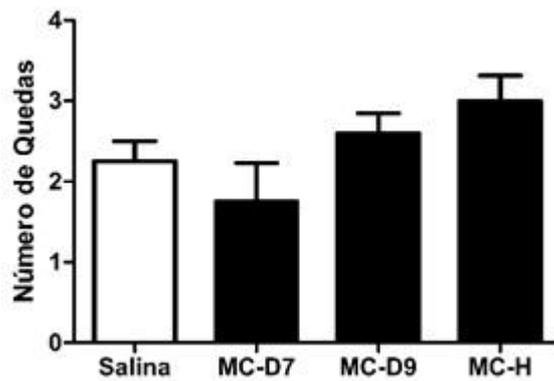
Fonte: Elaborada pelos autores

Figura 11. Efeito de MC-D7 (1µg/kg), MC-D9 (10µg/kg) e MC-H (1µg/kg) no teste Rotarod (tempo de latência). Os derivados semissintéticos MC-D7, MC-D9 e MC-H não reduziram o tempo de latência dos animais em comparação ao grupo Salina. Não houve diferenças significativas entre os grupos (ANOVA, Bonferroni).



Fonte: Elaborada pelos autores

Figura 12. Efeito de MC-D7 (1µg/kg), MC-D9 (10µg/kg) e MC-H (1µg/kg) no teste Rotarod (número de quedas). Os derivados semissintéticos MC-D7, MC-D9 e MC-H tiveram maior número de quedas, porém não houveram diferenças estatisticamente significativas em comparação ao grupo Salina. (ANOVA, Bonferroni).



Fonte: Elaborada pelos autores

8 DISCUSSÃO

Neste estudo é descrita a hemi-síntese de 7 derivados do 4-(4'-O-acetil- α -L-raminosilóxi)benzilisotiocianato (MC-1) isotiocianato isolado das flores de *Moringa oleifera* Lam. (MC-D1, MC-D3, MC-D6, MC-D7, MC-D8, MC-D9 e MC-H). Também foram verificadas as toxicidades aguda e subaguda do isotiocianato puro e dos 7 derivados semissintéticos, a fim de classificá-los como tóxicos ou seguros para o uso em animais de laboratório e, posteriormente, após outros estudos, em humanos, com finalidade terapêutica e de modo comercial.

Existe atualmente uma grande busca pelo desenvolvimento de fármacos e descoberta de drogas que possam ser mais eficazes e ao mesmo tempo menos tóxicas do que as existentes no mercado para o tratamento de DTM (CAIRNS, 2010). A procura por drogas anti-inflamatórias e analgésicas tanto pode envolver novos usos para produtos naturais já conhecidos como a síntese de novas substâncias a partir destes fitoterápicos objetivando aumentar sua eficiência. Nosso grupo recentemente patenteou produtos semissintéticos extraídos a partir de flavonoides presentes na *Tephrosia toxicaria* Pers., que exibiram atividade anti-inflamatória e antinociceptiva na ATM de ratos, comprovados através de testes comportamentais, dosagens de citocinas e extravasamento plasmático e também foram considerados seguros em ensaio de segurança semelhante ao realizado neste estudo (VAL et al. 2014).

As propriedades farmacológicas da *Moringa oleifera* Lam já são bem conhecidas. Dentre estas propriedades estão: antiespasmódica, antifúngica, antibacteriana, diurética, antiepiléptica, anti-inflamatória, analgésica, anti-helmíntica, usada para distúrbios do sistema nervoso, espleno e hepatomegalias.(MISHRA et al. 2011).

Porém, nosso trabalho mostrou que o isotiocianato isolado (MC-1) e seus derivados MC-D1, MC-D3, MC-D6 e MC-D8 apresentaram toxicidade e altos índices de mortalidade em camundongos. Na literatura, já existem relatos de toxicidade de componentes da *Moringa oleifera* Lam., principalmente no extrato aquoso de folhas, flores e sementes. Ferreira *et al.* (2009) observaram até 100% (5200 μ L) de mortalidade em larvas de *Aedes aegypti*. Também observaram mortalidade em camundongos nas doses de 550 e 700 mg/kg em ensaio de toxicidade aguda e apenas aumento do timo em ensaio de segurança subaguda em ratos. Kavitha *et al.* (2012), investigando efeitos agudos e subagudos de extrato aquoso de sementes de *Moringa*

oleifera Lam. em peixes encontraram alterações hematológicas como: diminuição de glicose, proteínas, hemoglobina (29%), hematócrito (35%), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) (3%), hemácias (28%) e aumento de volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média (HCM), número de leucócitos, AST, ALT, (em mais de 50%). Nath *et al.* (1992) em estudo de propriedades das plantas indianas evidenciaram que o extrato aquoso de folhas de *Moringa oleifera* Lam. (175 mg/kg) foi 100% abortífero em ratas. Adedapo, Mogbojuri e Emikpe (2009), utilizando extrato aquoso das folhas de *Moringa oleifera* observaram que doses de 2000 mg/kg não causaram mortalidade em camundongos, porém essa e doses menores (1600, 800 e 400 mg/kg) causaram letargia, alterações no número de plaquetas e discreta anemia.

Araújo *et al.* (2013), em ensaio de segurança com extrato aquoso (2000mg/kg), também encontrou apenas redução na contagem de células sanguíneas de camundongos, mas não houve mortalidade. Awodele *et al.* (2012) avaliando a toxicidade aguda do extrato aquoso das folhas de *Moringa oleifera* Lam. não verificaram toxicidade *per os* em camundongos (doses de 400, 800, 1600, 3200 e 6400 mg/kg), apenas letargia, diferentemente da administração intraperitoneal (i.p.), onde verificaram mortalidade nas doses de 1000 mg/kg (20%) e 2000 mg/kg (80%), encontrando como dose letal 50% (DL50) 1585 mg/kg, além de observarem alterações significativas no sangue e órgãos (microscopicamente) e no ganho de peso. Dose de 1500 mg/kg elevou a ureia e creatinina. Não houveram alterações em AST e ALT e nem na motilidade do espermatozoide, apenas oligospermia. Embora presentes nas folhas, sementes e flores, toda a toxicidade observada não deve ser atribuída apenas aos isotiocianatos, devido à grande quantidade de outras substâncias presentes na *Moringa oleifera* Lam. Em nenhum estudo com animais porém foram usadas doses tão baixas e mesmo doses altas obtiveram índices de mortalidade menores ou semelhantes aos nossos (MC-1).

Baseando-se na toxicidade (e citotoxicidade) explanada acima, principalmente referindo-se a mortalidade, aumento na ureia e creatinina (FERREIRA *et al.*, 2009; AWODELE *et al.*, 2012) e a alterações hematológicas (KAVITHA *et al.*, 2012; MOGBOJURI; EMIKPE, 2009), é possível relacionar doses altas de extrato aquoso de *Moringa oleifera* com lesões renais, principalmente. A eritropoietina, produzida nos rins, é fator de crescimento importante para diferenciação das hemácias. Nas análises histológicas dos rins de MC-D7 e MC-H foi possível observar

maior eosinofilia em túbulos contorcidos distais, o que indica discreto aumento da filtração, aumento da quantidade de aminoácidos e menor reabsorção, alterações estas, que, em maiores proporções levam a lesão renal. As doses pequenas destes derivados semissintéticos podem ter sido o fator protetor de lesões renais, enquanto que doses maiores (em alguns casos 10^7 vezes maiores que as utilizadas neste estudo) podem ter causado lesões renais, com conseqüente prejuízo da produção de eritropoietina, evidenciadas pela grande incidência de discrasias sanguíneas. Estudos mais aprofundados se fazem necessários para confirmar esta hipótese.

Dufour, Stahl e Baysse (2015) mencionam a possibilidade dos isotiocianatos exercerem papel de proteção nas plantas contra agressões externas, servindo como bactericida e fungicida, exercendo essa função por meio de inibição de transcrição gênica e respiração celular e formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), assim preservando a vida da planta.

Este é o primeiro estudo que testa a eficiência destes isotiocianatos semissintéticos (MC-D7, MC-D9 e MC-H) na redução da hipernocicepção inflamatória na ATM induzida por formalina e serotonina em ratos. O teste da formalina na ATM, padronizado por Roveroni et al. (2001), é usado como indutor de inflamação aguda e hipernocicepção na ATM, alterando o comportamento dos animais em poucos minutos. O comportamento dos grupos Sham fica em torno do escore de 40 ± 10 (soma de levantamentos de cabeça com tempo de coçar, em segundos), enquanto que os grupos que recebem formalina 1,5% na ATM apresentam escore de 190 ± 10 . Pesquisas recentes vêm utilizando-o com sucesso na investigação de novas substâncias analgésicas inibidoras de PPAR γ (15-deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J2) (CLEMENTE-NAPIMOGA *et al.*, 2012). Ele também tem a vantagem de ser bem mais específico para simular distúrbios na ATM do que a indução por injeção subcutânea na face do animal (CLAVELOU *et al.*, 1989).

Nosso estudo revela a redução do escore do teste da formalina de maneira estatisticamente significativa ($p < 0,05$) nos 3 compostos testados, especialmente MC-H (média= escore 56) na dose de $1 \mu\text{g}/\text{kg}$, seguido por MC-D7 (média= escore 76) na dose de $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ e MC-D9 (média= escore 78) na dose de $10 \mu\text{g}/\text{kg}$.

Park *et al.* (2011), através da utilização do 4-(2'-O-acetil- α -L-raminosilóxi)benzilisotiocianato nas doses de $1,25 \mu\text{M}$ e $2,5 \mu\text{M}$ em culturas de células (macrófagos de camundongos RAW 264.7) obtiveram redução de parâmetros cruciais existentes na hipernocicepção inflamatória. Eles observaram que houve redução da

expressão de NF- κ B e relacionaram esta redução a uma maior presença do I κ B α (inibidor alfa do fator nuclear kappa beta) não fosforilado, mensurado através de western blot. Como o I κ B α é o inibidor de NF- κ B, sua presença seria, nesse caso, um marcador que indica indiretamente a ativação ou inibição de NF- κ B. Também visualizaram a redução na expressão de iNOS. O NO, embora possa exercer ambos papéis de pró-inflamatório e anti-inflamatório, a depender da quantidade, se mostra na maioria das vezes como crucial na manutenção do processo inflamatório (CHAVES et al., 2011). Outro parâmetro foi a diminuição da expressão de MAPKs (proteínocinas ativadas por mitógeno) (p-ERK1/2, p-SAPK/JNK, mas não p-p38 MAPK), que pode sugerir diminuição de NF- κ B, já que o primeiro exerce papel regulatório no segundo. Porém foi observado que p-ERK1/2 não participa da regulação de NF- κ B, o que sugere a participação de outras MAPKs envolvidas (PARK et al., 2011; KAMINSHKA, 2005),.

O segundo teste utilizado para mensurar redução da hipernocicepção inflamatória foi o teste da serotonina, cuja execução é semelhante ao teste da formalina, porém, realizado em apenas 30 minutos. A ação da serotonina é mais rápida do que a formalina devido a sua direta ativação de vias noradrenalina-dependentes por ligação a receptores β 1 e β 2, sem a utilização de cascatas de citocinas para tal (OLIVEIRA-FUSARO et al., 2012). No teste da serotonina foi possível observar que houve redução do comportamento hipernociceptivo de forma significativa apenas no grupo tratado com o derivado MC-H.

Além de atuar nos receptores neuronais 5HT₃ (que nesse caso, funcionam como canais iônicos) a Serotonina também atua em receptores β 1 e β 2 adrenérgicos, localmente. A dor inflamatória depende de vias de sinalização comuns, que culminam em sensibilização neuronal primária. Basicamente parte da cascata de citocinas envolvidas na dor iniciadas pela liberação de TNF α culmina na liberação de prostaglandinas e, atuando por outra via, a de IL-8, ocorre a liberação tissular de aminas simpatomiméticas, entre elas a Serotonina, que nesse caso, não depende da liberação de TNF α , o que faz com que essa via seja mais direta (menor quantidade de mediadores) (CUNHA et al., 2005). O derivado MC-H portanto pode, devido ao seu efeito antinociceptivo em relação a serotonina, atuar de forma a inibir a ação desta, antagonizando os receptores β 1 e β 2, por exemplo, ao passo que MC-D7 e MC-D9 podem atuar apenas em fases da cascata iniciada por TNF α , não tendo assim efeito

na hiperalgesia provocada pela Serotonina (DINIZ *et al.*, 2015; FUSARO *et al.*, 2012; CUNHA *et al.*, 2005).

Os derivados MC-D7, MC-D9 e MC-H também reduziram significativamente o extravasamento plasmático (teste Azul de Evans), na ATM de ratos, em relação ao grupo não tratado (grupo Formalina), sugerindo assim uma redução considerável na inflamação. Esta redução pode explicar em partes o efeito dos 3 derivados no comportamento nociceptivo induzido por formalina, em que a diminuição aconteceria não só pelo efeito antinociceptivo, mas também anti-inflamatório dos 3 derivados (CAIRNS, 2010; BOLETA-CERANTO; VEIGA; ARSATI, 2005).

O teste Rotarod é utilizado para avaliar a motricidade de pequenos animais, sendo um bom modelo coadjuvante em experimentos de osteoartrite. Quando a quantidade de rotações por minuto (rpm) torna-se alta, ela exige adequada performance do animal, em que, com a presença de alguma alteração na motricidade, o mesmo não consegue se manter sobre o cilindro. Os animais tratados com os derivados MC-D7, MC-D9 e MC-H tiveram tempos de latência maiores (embora de maneira não significativa) o que sugere que os derivados não interferiram na motricidade e coordenação motora dos animais (PIEL *et al.*, 2014).

9 CONCLUSÃO

Neste estudo descrevemos a toxicidade de 7 derivados semissintéticos obtidos a partir de um benzilisotiocianato (MC-1) isolado das flores de *Moringa oleifera* Lam. Também relatamos que três derivados semissintéticos (MC-D7, MC-D9 e MC-H), além de atóxicos, foram capazes de reduzir a inflamação e a nocicepção mediada por formalina na ATM de ratos e que apenas MC-H reduziu a inflamação e a nocicepção induzida pela serotonina sugerindo que as diferenças estruturais conferem ações distintas nestas vias. Nossos estudos apontam para o potencial uso de MC-D7, MC-D9 e MC-H nas DTMs. Para tanto se faz necessário investigar as vias metabólicas, alvos celulares e moleculares, para assim compreender os mecanismos de ação, possibilitando assim a otimização de seu uso.

10 REFERÊNCIAS

ABBOTT, F. V., FRANKLIN, K. B. J., CONNELL, B. The stress of a novel environment reduces formalin pain: possible role of serotonin. **Eur. J. Pharmacol.**, Amsterdam, v.126, n.1-2, p.141-144, 1986.

ADEDAPO, A. A.; FALAYI, O. O; OYAGBEMI, A. A. Evaluation of the analgesic, anti-inflammatory, anti-oxidant, phytochemical and toxicological properties of the methanolic leaf extract of commercially processed *Moringa oleifera* in some laboratory animals. **J Basic Clin Physiol Pharmacol**; v.26, n.5, p. 491–499, set. 2015

ADEDAPO, A. A.; MOGBOJURI, O. M.; EMIKPE, B. O. Safety evaluations of the aqueous extract of the leaves of *Moringa oleifera* in rats. **Journal of Medicinal Plants Research** v. 3, n.8, p. 586-591, ago, 2009.

ARAÚJO, L. C. C. et al. Evaluation of Cytotoxic and Anti-Inflammatory Activities of Extracts and Lectins from *Moringa oleifera* Seeds. **Plos One**. v.8, n.12, p. 1-15, dez., 2013.

BAGIS, B. et al. Gender Difference in Prevalence of Signs and Symptoms of Temporomandibular Joint Disorders: A Retrospective Study on 243 Consecutive Patients. **International Journal of Medical Science**. v.9, n.7, p. 539-544, ago. 2012.

BARBOSA, V. C. S.; BARBOSA, F. S. **Fisioterapia nas disfunções temporomandibulares**. São Paulo: Phorte, 2009.

BOLETA-CERANTO, D. C. F.; VEIGA, M. C. F. A.; ARSATI, F. Efeito da dexametasona e do meloxicam sobre o extravasamento plasmático induzido por carragenina na ATM de ratos. **Revista Odonto Ciência**, v. 20, n. 50, p. 354-360, out./dez. 2005.

CAIRNS, B.E. Pathophysiology of TMD pain – basic mechanisms and their implications for pharmacotherapy. **J. Oral Rehabil**. v.37, p. 391–410, 2010.

CHAVES, H. V. et al. Experimental model of zymosan-induced arthritis in the rat temporomandibular joint: role of nitric oxide and neutrophils. **Journal of Biomedicine & Biotechnology**. v. 2011, p. 1-11, jan. 2011.

CARLINI E.A.; BURGOS, V. Screening farmacológico de ansiolíticos: Metodologia laboratorial e comparação entre diazepam e clorobenzepam. **Rev. Ass. Bras. Psiquiatria**, v.1, p.25-31, 1979.

CHEENPRACHA, S. et al. Potential anti-inflammatory phenolic glycosides from the medicinal plant *Moringa oleifera* fruits. **Bioorganic & medicinal chemistry**. v.18, n.17, p. 6598-6602, set. 2010.

CLAVELOU, P. et al. Application of the formalin test to the study of orofacial pain in the rat. **Neuroscience Letters**. v. 103, n.3, p. 349-353, set. 1989.

CLAVELOU, P. et al. The orofacial formalin test in rats: effects of different formalin concentrations. **Pain**. v. 62, n.3, p. 295-301, set. 1995.

CLEMENTE-NAPIMOGA, J. T. et al. 15d-PGJ2-loaded in nanocapsules enhance the antinociceptive properties into rat temporomandibular hypernociception. **Life Sciences**. v.90, n. 23-24, p. 944-949, jun., 2012.

CUNHA, T. M. et al. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **Proceedings of National Academy of Science of the United States of America**. v. 102, n. 5, p. 1755-1760, fev. 2005.

DE ROSSI, S. S. et al. Temporomandibular Disorders: Evaluation and Management. **The Medical Clinics of North America**. v. 98, n. 6, p. 1353-1384, nov. 2014.

DILLARD, C. J.; GERMAN, J. B. Phytochemicals: nutraceutical and human health. **Journal of the Science of food and agriculture**. v. 80, n. 12, p. 1744-1756, set. 2000.

DINIZ, D. A. et al. Serotonin induces peripheral mechanical antihyperalgesic effects in mice. **European Journal of Pharmacology**. v.767, p. 94-97, nov. 2015.

DUFOUR, V.; STAHL, M.; BAYSSE, C. The antibacterial properties of isothiocyanates. **Microbiology**. v. 161, n.2, p. 229-243, fev. 2015.

DUNHAM, N. W.; MIYA, T. S. A Note on a Simple Apparatus for Detecting Neurological Deficit in Rats & Mice. **J. Am. Pharmaceut. Assoc.**, v.46, n.3, 1957

FERNADES, W. V. B; MICHELOTTO, A. B.; KIMURA, S. Comparação entre Técnicas Osteopáticas e Fisioterapia Convencional para o Tratamento das Desordens Temporomandibulares. **Revista Inspirar**. Curitiba. v.1, n.1, p. 29-33, jun./jul. 2009.

FERREIRA, P. M. P. et al. Larvicidal activity of the water extract of *Moringa oleifera* seeds against *Aedes aegypti* and its toxicity upon laboratory animals. **An Acad Bras Cienc**. v.81, n. 2, p. 207-217, 2009.

FERREIRA, P. M. P. et al. **Moringa oleifera**: bioactive compounds and nutritional potential. **Revista Nutrição**. Campinas. v. 21, n.4, p. 431-437, jul./ago., 2009.

FIORENTINO, P. M.; CAIRNS, B. E.; HU, J. W. Development of inflammation after application of mustard oil or glutamate to the rat temporomandibular joint. **Archs Oral Biol**. v.44, n.1, p.27-32, 1999.

FREITAS, R. S. et al. Lectin from *Abelmoschus esculentus* reduces zymosaninduced temporomandibular joint inflammatory hypernociception in rats via heme oxygenase-1 pathway integrity and tnf- α and il-1 β suppression. **International Immunopharmacology**. v.38, p. 313-323, 2016.

FUSARO, M. C. G. O. et al. 2010. P2X3 and P2X2/3 receptors mediate mechanical hyperalgesia induced by bradykinin, but not by pro-inflammatory cytokines, PGE₂ or dopamine. **European Journal of Pharmacology**. v. 649, p. 177-182, 2010.

GALUPPO, M. et al. Antiinflammatory activity of glucomoringin isothiocyanate in a mouse model of experimental autoimmune encephalomyelitis. **Fitoterapia**. v. 95, p. 160-174, jun. 2014.

GREENE, C. S. Managing patients with temporomandibular disorders: A new "standard of care". **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics** v. 138, n.1, p.3-4, jul. 2010.

HAAS, D. A. et al. Development of an orofacial model of acute inflammation in the rat. **Archives of Oral Biology**. v. 35, n. 5, p. 417-422, mai. 1992.

ISO 10993-11. Biological Evaluation of Medical Devices – Parts 11: tests for systemic toxicity. 1. ed. 1992.

KAMINSHKA, B. MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy--from molecular mechanisms to therapeutic benefits. **Biochem. Bioph. Acta**. v.1754, n.1-2, p. 253-262, dez. 2005.

KAVITHA, C. et al. Toxicity of *Moringa oleifera* seed extract on some hematological and biochemical profiles in a freshwater fish, *Cyprinus carpio*. **Experimental and Toxicology Pathology**. v.64, n. 7-8, p. 681-687, nov. 2012.

LEEuw, R., KLASSER,G.D. **Orofacial Pain-Guidelines for assesement, diagnosis, and management**. 5. ed.: Quintessence, 2013.

MARACAJÁ, P. B. et al. Efeito tóxico do extrato de flores de *Moringa oleifera* L. para abelhas *Apis mellifera* africanizadas. **Agropecuária Científica no Semi-árido**. v.6, n. 3, p. 33 – 37, jul./set., 2010

MISHRA, G. et al. Traditional uses, phitochemistry and pharmacology properties of *Moringa oleifera* plants: an overview. **Der Pharmacia Lettre**. v.3, n.2, p. 141-164, 2011.

NATH, D. et al. Commonly used Indian abortifacient plants with special reference to their teratologic effects in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 36, n.2, p. 147-154, abr., 1992.

OKESON, J. P. **Tratamento das desordens temporomandibulares e oclusão**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

OKUSE, K. Pain signalling pathways: from cytokines to ions channels. **The international Journal of Biochemistry & Cell Biology**. v.39, n.3, p. 490-496, 2007.

ORGANIZATION FOR ECONOMICS CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. 420 OECD Guidelines for Teste of Chemical: Acute Toxicity – fixed dose procedure. dez. 2001.

PARK, E. J. et al. Inhibition of lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression and inducible nitric oxide synthase by 4-[(2'-Oacetyl- α -L-

rhamnosyloxy)benzyl]isothiocyanate from *Moringa oleífera*. **Nutr. Cancer**. v.63, n.6, p. 971-982, 2011.

PIEL, M. J. et al. Pain assessment in animal models of osteoarthritis. **Gene**. v. 537, n.2, p. 184-188, mar., 2014.

RAGASA, C. Y. et al. Cytotoxic Isothiocyanates from *Moringa oleifera* Lam Seeds. **Philippine Science Letters**, v.5, n.1, p. 46-52, 2012.

RIVANOR, R. L. C. et al. A lectin from the green seaweed *Caulerpa cupressoides* reduces mechanical hyper-nociception and inflammation in the rat temporomandibular joint during zymosan-induced arthritis. **International Immunopharmacology**. v.21, p. 34-43, 2014

ROSLAND, J. H. The formalin test in mice: the influence of ambient temperature. **Pain**. v.45, n.2, p. 211-216, mai. 1991.

ROVERONI, R. C. et al. Development of a behavioral model of TMJ pain in rats: The TMJ formalin test. **Pain**. v. 94, n.2, p. 185-191, nov. 2001.

SESSLE, B. J. The Neural Basis of Temporomandibular Joint and Masticatory Muscle Pain. **Journal of Orofacial Pain**. v. 13, n.4, p. 238-245, 1999.

SESSLE, B. J. Peripheral and central mechanisms of orofacial pain and their clinical correlates. **Minerva Anesthesiology**. v. 71, n. 4, p. 117-136, 2005.

STEVEN, L.; KRAUS, P. T. Characteristics of 511 patients with temporomandibular disorders referred for physical therapy. **Oral Medicine**. v. 118, n. 4, p. 432-439, out. 2014.

SHARMA, S. et al. Etiological factors of temporomandibular joint disorders. **Nat. J. Maxillofac. Surg**. v.2, n.2, p. 116-119, jul./dez. 2011.

SIDDHURAJU, P.; BECKER, K. Antioxidant properties of various solvent extracts of total phenolic constituents from three different agroclimatic origins of drumstick tree (*Moringa oleifera* Lam.) leaves. **Journal of agricultural food and chemistry**. v. 51, n.8, p. 2144-2155, abr. 2003.

TORRES-CHAVEZ, K. E. et al. Effect of gonadal steroid hormones on formalin-induced temporomandibular joint inflammation. **Eur. J. Pain**. v.16, n.2, p. 204-216, 2011

VAL, D. R. et al. *Tephrosia toxicaria* Pers. reduces temporomandibular joint inflammatory hypernociception: the involvement of the HO-1 pathway. **European Journal of Pain**. Londres. v. 18, n. 9, p. 1280-1289, out. 2014.

WADHWA, S.; KAPILA, S. TMJ Disorders: Future Innovations in Diagnostics and Therapeutics. **Journal of Dental Education**. v. 72, n. 8, p. 930-947, ago. 2008.

WATERMANN, C. et al. Stable, water extractables isothiocyanates from *Moringa oleifera* leaves attenuates inflammation in vitro. **Phytochemistry**. v. 103, p. 114-122, jul. 2014.

WU, X. et al. Isorthiocyanates induce oxidative stress and suppress the metastasis potential of human non-small cell lung cancer cells. **BMC Cancer**. v.269, n.10, 2010

APÊNDICE A: Documentos enviados ao INPI solicitando depósito de patente dos derivados MC-D7, MC-D9 e MC-H, reivindicando seu efeito analgésico

FORMULÁRIO INICIAL

◆ Título da invenção:

Efeito analgésico de *N*-[4-(4'-*O*-acetil- α -L-raminosiloxi)benzil]-2-(piridinil-4-carbonil)hidrazina-1-carbotioamida, 4-[4'-*O*-acetil-2',3'-*O*-bis(decanoiloxi)- α -L-raminosiloxi]benzilisotiocianato e 4-[(2',3',4'-*O*-triacetil- α -L-raminosiloxi)*N*-benzil]hidrazinacarbotioamida

Descrição da invenção (máximo de cinco linhas):

N-[4-(4'-*O*-acetil- α -L-raminosiloxi)benzil]-2-(piridinil-4-carbonil)hidrazina-1-carbotioamida, 4-[4'-*O*-acetil-2',3'-*O*-bis(decanoiloxi)- α -L-raminosiloxi]benzilisotiocianato e 4-[(2',3',4'-*O*-triacetil- α -L-raminosiloxi)*N*-benzil]hidrazinacarbotioamida, reduziram a hipernocicepção inflamatória induzida por formalina (1,5%) na articulação temporomandibular de ratos, apresentando, portanto, atividade analgésica.

◆ Inventor responsável (deve ser, necessariamente, um servidor da ICT/UFC).

Especificar Departamento/Unidade/Grupo de Pesquisa:

1. Prof^a. Dr^a Hellíada Vasconcelos Chaves – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Ceará, *Campus* de Sobral; Inflamação e dor;

◆ Nome completo dos demais inventores e instituições a que estão vinculados;

1. Prof^a Dr^a Mirna Marques Bezerra – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde e Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Ceará, *Campus* de Sobral;
2. Prof. Dr. Francisco Geraldo Barbosa - Programa de Pós-Graduação em Química, Departamento de Química Orgânica, Universidade Federal do Ceará, *Campus* do Pici;

3. Msc. Diana Kelly Castro de Almeida - Estudante de Pós-Graduação, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, *Campus do Pici*;
4. Prof. Dr. Jair Mafezoli - Programa de Pós-Graduação em Química, Departamento de Química Orgânica, Universidade Federal do Ceará, *Campus do Pici*;
5. Prof. Dr. Marcos Reinaldo da Silva - Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, *Campus do Pici*;
6. Prof. Dr. Gerardo Cristino Filho – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde e Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Ceará, *Campus de Sobral*;
7. Prof. Dr. Vicente de Paulo Teixeira Pinto – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde e Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Ceará, *Campus de Sobral*;
8. Prof^a Dr^a Gerly Anne de Castro Brito – Programa de Pós-Graduação em Ciências Morfofuncionais, Departamento de Morfologia, Universidade Federal do Ceará, *Campus do Porangabussu*;
9. Prof^a Dr^a Juliana Trindade Clemente-Napimoga – Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP) - UNICAMP;
10. Prof^a Dr^a Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar – Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde e Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Ceará, *Campus de Sobral*;
11. Alain Oliveira dos Santos – Mestrando pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Ceará, *Campus de Sobral*;
12. Msc. Danielle Rocha do Val – Doutoranda da Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO;
13. Ellen Lima de Assis- Bolsista do Programa de Iniciação Científica (PIBIC), Curso de Odontologia, Universidade Federal do Ceará, *Campus de Sobral*;
14. Felipe Dantas Silveira – Mestrando pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Ceará, *Campus de Sobral*;
15. Francisco Isaac Fernandes Gomes - Bolsista do Programa de Iniciação Científica (PIBIC), Curso de Odontologia, Universidade Federal do Ceará, *Campus de Sobral*;

16. Hermany Capistrano Freitas - Bolsista do Programa de Iniciação Científica (PIBIC), Curso de Medicina, Universidade Federal do Ceará, *Campus* de Sobral;
17. Thomas Dominik de Souza dos Reis - Bolsista do Programa de Iniciação Científica (PIBIC), Curso de Medicina, Universidade Federal do Ceará, *Campus* de Sobral;
18. Antônio Mateus Gomes Pereira - Biólogo, Universidade Estadual Vale do Acaraú;
19. Prof. Dr. Igor Iuço Castro da Silva - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal do Ceará, *Campus* de Sobral.

◆ A invenção foi desenvolvida com o apoio de algum órgão de fomento? Qual (Quais)?

1. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq;
2. Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico – FUNCAP;
3. Instituto de Biomedicina do Semi-Árido Brasileiro (INCT-IBISAB);
4. Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

◆ Principais linhas de pesquisa em que o grupo atua e respectivos setores de aplicação;

1. Bioprospecção em plantas do nordeste brasileiro - Setores Industriais, Médicos e Veterinários;
2. Macromoléculas na Inflamação e Dor – Setores Industriais, Médicos e Veterinários.

◆ Houve algum tipo de divulgação pública, parcial ou total, da referida invenção?

Não se aplica

◆ Em caso afirmativo, assinale uma das opções abaixo: Não se aplica.

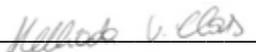
Qualquer outra forma de divulgação:

Não se aplica.

Declaro que todas as informações contidas neste documento são verdadeiras.

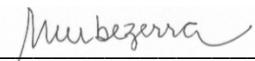
Fortaleza, 27 de abril de 2016.

Inventor responsável:



Profª Drª Hellíada Vasconcelos Chaves - CPF: 841.849.303-87

Demais inventores:



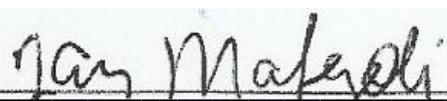
1. Profa. Dra. Mirna Marques Bezerra – CPF: 877.081.244-68



2. Prof. Dr. Francisco Geraldo Barbosa - CPF: 561.682.503-44



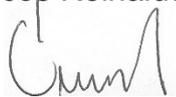
3. MSc. Diana Kelly Castro de Almeida – CPF: 048202813-05



4. Prof. Dr. Jair Mafezoli - CPF: 549843869-91



5. Prof. Dr. Marcos Reinaldo da Silva - CPF: 010.631.263-47



6. Prof. Dr. Gerardo Cristino Filho - CPF: 164.166.783-49



7. Prof. Dr. Vicente de Paulo Teixeira Pinto - CPF: 359.927.003-15

Gerly Anne de Castro Brito

8. Profª Drª Gerly Anne de Castro Brito - CPF: 241.988.463-91

9. Profª Drª Juliana Trindade Clemente-Napimoga - CPF: 031.739.696-00

Juliana

10. Profª Drª Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar - CPF: 463.554.643-87

Alain Oliveira dos Santos

11. Alain Oliveira dos Santos - CPF: 021.935.183-00

Danielle Rocha do Val

12. MSc. Danielle Rocha do Val - CPF: 904.232.833-91

Ellen Lima

13. Ellen Lima de Assis - CPF: 022.509.843-10

Felipe Dantas Silveira

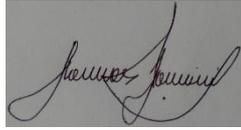
14. Felipe Dantas Silveira - CPF: 021.450.503-02

Francisco Isaac Fernandes Gomes

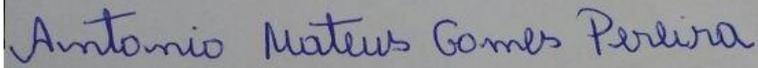
15. Francisco Isaac Fernandes Gomes - CPF: 040.570.063-62

Hermany Capistrano Freitas

16. Hermany Capistrano Freitas - CPF: 024.289.603-00



17. Thomas Dominik de Souza dos Reis- CPF: 033.541.033-29



18. Antônio Mateus Gomes Pereira- CPF: 052.927.413-29



19. Prof Dr Igor Iuço Castro da Silva - CPF: 093.941.517-88

RELATÓRIO DESCRITIVO

EFEITO ANALGÉSICO DE *N*-[4-(4'-*O*-ACETIL- α -L-RAMINOSILOXI)BENZIL]-2-(PIRIDINIL-4-CARBONIL)HIDRAZINA-1-CARBOTIOAMIDA, 4-[4'-*O*-ACETIL-2',3'-*O*-BIS(DECANOILOXI)- α -L-RAMINOSILOXI]BENZILISOTIOCIANATO E 4-[(2',3',4'-*O*-TRiacetil- α -L-RAMINOSILOXI)*N*-BENZIL]HIDRAZINACARBOTIOAMIDA

[001]A presente invenção se refere ao uso de ***N*-[4-(4'-*O*-acetil- α -L-raminosiloxi)benzil]-2-(piridinil-4-carbonil)hidrazina-1-carbotioamida (MC-D7), 4-[(4'-*O*-acetil-2',3'-*O*-bis(decanoiloxi)- α -L-raminosiloxi]benzil}isotiocianato (MC-D9) e 4-[(2',3',4'-*O*-triacetil- α -L-raminosiloxi)*N*-benzil]hidrazinacarbotioamida (MC-H), Figuras 1, 2 e 3, respectivamente, como agentes analgésicos. Os compostos *N*-[4-(4'-*O*-acetil- α -L-raminosiloxi)benzil]-2-(piridinil-4-carbonil)hidrazina-1-carbotioamida, 4-[4'-*O*-acetil-2',3'-*O*-bis(decanoiloxi)- α -L-raminosiloxi]benzilisotiocianato e 4-[(2',3',4'-*O*-triacetil- α -L-raminosiloxi)*N*-benzil]hidrazinacarbotioamida são derivados de isotiocianatos, e nesta invenção foram sintetizados a partir de 4-[(4'-*O*-acetil- α -L-raminosilóxi)benzil]isotiocianato (Figura 4).**

[002]Os isotiocianatos são hidrolisados pela enzima mirosinase a partir de glucosinolatos (também chamados de glucomoringinas, ou glicosídeos de óleo de mostarda), que são polissacarídeos fenólicos presentes em plantas, alguns deles, particularmente na família Moringaceae, da ordem Brassicales, liberados durante lesões teciduais nessas plantas durante o processo de digestão. Os isotiocianatos desta invenção foram obtidos a partir das flores de *Moringa oleifera* Lamarck. O isotiocianatos da *Moringa oleifera* Lamarck, diferentemente dos presentes em crucíferas, são compostos sólidos em temperatura ambiente e mais estáveis quimicamente.

[003]Há relatos de uso de substâncias derivadas da *Moringa oleifera* Lamarck na alimentação humana e de animais, assim como comprovações de atividades biológicas como anti-ulcerativa, hipocolesterolêmica, hipotensora vascular, bradicárdica, antifúngica, antitumoral, antibacteriana, anti-inflamatória, antiespasmódica e diurética. As flores apresentam propriedades estimulantes, tônicas, diuréticas, ajudam na secreção da bile, são fonte de β -caroteno, proteínas,

vitamina C, cálcio e potássio e agem como antioxidantes, devido à presença de vários compostos antioxidantes, incluindo: ácido ascórbico, flavonoides, compostos fenólicos e carotenoides.

[004]Estudos demonstraram que os isotiocianatos de *Moringa oleifera* Lamarck, incluindo o 4-(4'-O-acetil- α -L-raminosilóxi)benzilisotiocianato, se mostraram eficientes em reduzir a inflamação causada por apoptose, que acontece em doenças neurodegenerativas (encefalomielite), assim como diminuir a perda mielínica e o dano axonal, inibir/reduzir a atividade do óxido nítrico (NO), óxido nítrico sintase induzível (iNOS), fator de necrose tumoral α (TNF α) e interleucinas 1 β e 6 (IL1 β e IL6) em culturas de células, sendo o dano tissular induzido por lipopolissacarídeos (LPS) bacterianos, reduzindo, conseqüentemente, a inflamação.

[005]Nesta aplicação, o 4-(4'-O-acetil- α -L-raminosilóxi)benzilisotiocianato, estrutura mostrada na **Figura 4**, foi obtida a partir de flores de *Moringa oleifera* Lamarck (291g) oriundas do horto de plantas medicinais Prof. José de Abreu Matos da Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici, que, após coletadas, foram secas em uma estufa a uma temperatura de 60 °C por 24 horas, para a total eliminação de água. A extração dos constituintes foi realizada com clorofórmio. O solvente foi removido sob pressão reduzida após 48 horas, em um evaporador rotativo, para a obtenção do respectivo extrato.

[006]O extrato clorofórmio (3,78 g) foi transferido para um gral de porcelana, seguido da adição de sílica gel comum (6,59 g). Pequenas porções de solvente foram adicionadas à mistura para promover a total dissolução da amostra e aumentar a eficiência da adsorção. O material foi submetido à cromatografia filtrante, utilizando-se como eluentes 1,1 L de hexano (para desengordurar e retirar impurezas) e em seguida 800 mL de acetato de etila, fração essa constituída principalmente por 4-[(4'-O-acetil- α -L-raminosilóxi)benzil]isotiocianato, e por fim 500 mL de metanol. Em seguida os eluentes foram destilados em evaporador rotativo, sob pressão reduzida.

[007]A fração acetato de etila (1972,6 mg), obtida da coluna filtrante do extrato clorofórmio, foi adsorvida em 2,0 g de sílica gel e submetida à cromatografia de adsorção. A coluna foi eluída inicialmente com 100 mL de hexano, seguido por 200 mL de hexano:acetato de etila (7:3), 150 mL de hexano:acetato de etila (6:4), 200 mL de hexano:acetato de etila (1:1), 200 mL de acetato etila, 100 mL de metanol.

[008]As frações foram coletadas em porções de 5 mL e analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD). As frações contendo 4-(4'-O-acetil- α -L-

raminosilóxi)benzilisotiocianato, ainda impuro, foram reunidas, apresentando massa de 862 mg. Não sendo suficiente a coluna para isolar 4-(4'-O-acetil- α -L-raminosilóxi)benzilisotiocianato, realizou-se outra coluna com a intenção de purificar a substância. A coluna foi realizada em um gradiente de eluição usando a mistura diclorometano/acetato de etila (7:3), diclorometano/acetato de etila (1:1) e 100 mL de metanol. Obtendo assim, 599 mg de 4-(4'-O-acetil- α -L-raminosilóxi)benzilisotiocianato, produto natural que exhibe relevante atividade anti-inflamatória. Um diagrama esquemático da obtenção de 4-(4'-O-acetil- α -L-raminosilóxi)benzilisotiocianato pode ser visto na **Figura 5**.

[009]Para a obtenção de **N-[4-(4'-O-acetil- α -L-raminosilóxi)benzil]-2-(piridinil-4-carbonil)hidrazina-1-carbotioamida (Figura 1)**, 0,085 mmol do produto natural 4-(4'-O-acetil- α -L-raminosilóxi)benzilisotiocianato foram adicionados em um balão de fundo redondo, 10 mL, juntamente com 2 mL THF (tetraidrofurano) anidro e 0,17 mmol (24 mg) de isoniazida. A mistura reacional foi mantida sob agitação à temperatura ambiente até a formação do produto da reação, analisado por CCD. O solvente foi removido sob pressão reduzida e o produto reacional foi purificado por cromatografia em coluna. O rendimento do produto purificado foi de 78%.

[010]Para a obtenção de **4-[4'-O-acetil-2',3'-O-bis(decanoilóxi)- α -L-raminosilóxi]benzilisotiocianato** foi realizada a uma reação de O-acilação. Utilizou-se 5 equivalentes molar do cloreto de decanoíla, e DMAP, em CH₂Cl₂ seco. A mistura foi mantida sob agitação magnética à temperatura ambiente e monitorada por CCD. O término da reação foi observado após 24 h e em seguida evaporou-se o solvente da mistura reacional sob pressão reduzida em evaporador rotativo e submeteu-se à cromatografia de adsorção eluída com uma mistura de hexano/acetato de etila (9:1). Obtendo-se o produto com 51% de rendimento.

[011]Para a obtenção de O **4-[(2',3',4'-O-triacetil- α -L-raminosilóxi)N-benzil]hidrazinacarbotoamida** foi necessária a realização de dois processos químicos inicialmente, uma reação de O-acilação e outra reação de adição da hidrazina ao grupo isotiocianato. A primeira reação ocorreu em um frasco de vidro de 10 mL, contendo 0,085 mmol (30,0 mg) do benzilisotiocianato dissolvido em CH₂Cl₂. Em seguida adicionou-se 80 μ L de anidrido acético, e um excesso de trietilamina e DMAP em quantidade catalítica. A mistura foi mantida sob agitação magnética à temperatura ambiente e monitorada por CCD (cromatografia em camada delgada). O término da reação foi observado após 3h, então evaporou-se o solvente da mistura

em evaporador rotativo e submeteu-se à cromatografia de adsorção obtendo o produto como óleo, com 96% de rendimento. A segunda etapa reacional consistiu da adição do produto acetilado em 2 mL THF e 10 µL de uma solução de hidrazina 51%. A mistura reacional foi mantida sob agitação a temperatura ambiente até a formação do produto, analisado por CCD. Após o término da reação, adicionou-se 2 mL de água. A fase orgânica foi separada da fase aquosa por uma partição líquido-líquido com acetato de etila (3x5 mL). Após todas as etapas, o produto final foi obtido com 77% de rendimento.

[012]A presente invenção trata da atividade analgésica de ***N*-[4-(4'-*O*-acetil- α -L-raminosiloxi)benzil]-2-(piridinil-4-carbonil)hidrazina-1-carbotioamida, 4-[4'-*O*-acetil-2',3'-*O*-bis(decanoiloxi)- α -L-raminosiloxi]benzilisotiocianato e 4-[(2',3',4'-*O*-triacetil- α -L-raminosiloxi)*N*-benzil]hidrazinacarbotioamida** em modelo de hipernocicepção inflamatória induzida por formalina na articulação temporomandibular de ratos. Foram utilizados ratos *Wistar* machos com massa corpórea entre 170 a 220 g provenientes do Biotério Central do *Campus* do Pici e do Biotério Setorial do Curso de Medicina – UFC – *Campus* de Sobral. Os animais foram mantidos em caixas de plástico com livre acesso à água e comida a uma temperatura média de 22 ± 2 °C obedecendo a ciclos de claro-escuro de 12h. O estudo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da Universidade Federal de Ceará (Protocolo número 03/15). Todos os esforços foram feitos para minimizar o sofrimento dos animais assim como o número de animais utilizados em acordo com as diretrizes da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL/COBEA) e normas internacionais (Guide for care and use of laboratory animals - NIH publication 85-23, revised 1985).

[013]O protocolo experimental para a indução da hipernocicepção inflamatória por formalina na articulação temporomandibular (ATM) de ratos foi realizado como descrito por Roveroni e colaboradores, *Pain*, v. 94, n.2, p. 185-191, nov. 2001, com a seguinte metodologia: os animais foram anestesiados com isoflurano por via inalatória para que, posteriormente, se procedesse a injeção intra-articular (i.art.) na articulação temporomandibular (ATM) através de uma agulha calibre 30G, conectada a uma seringa de microlitro Hamilton (50 µL) por um tubo de polietileno P50, que foi inserida na porção inferior da borda póstero-inferior do arco zigomático da ATM esquerda, sendo avançada em direção anterior até contactar a região póstero-lateral do côndilo, onde foram injetados 50µl de Formalina (1,5%), dissolvido em solução salina estéril.

Esse contato foi verificado mediante a uma resistência na progressão da agulha, correspondendo ao contato da agulha com a região pósterolateral do côndilo. Cada grupo de animal possuiu n=5 animais.

[014]Um primeiro grupo de animais passou pelo procedimento descrito acima e recebeu solução salina a 0,9% (1 ml / 300 g de peso) via oral previamente à injeção intra-articular de solução salina a 0,9% (50 µl / ATM), correspondendo ao grupo salina utilizado como controle, representado em branco nos gráficos das figuras 9, 10 e 11. Um segundo grupo de animais passou pelo procedimento descrito acima e recebeu solução salina a 0,9% (1 ml / 300 g de peso) via oral previamente à injeção intra-articular de formalina (50 µl / ATM), representado em preto nos gráficos das figuras 9, 10 e 11, em substituição aos compostos derivados 4-(4'-O-acetil- α -L-raminosilóxi)benzilisotiocianato, e foi nomeado como Grupo Formalina. Para cada composto derivado de 4-(4'-O-acetil- α -L-raminosilóxi)benzilisotiocianato, existiam 3 grupos de animais que recebiam as drogas em doses diferentes e recebiam a injeção i.art. de Formalina do modo descrito acima. Foi administrado, sessenta minutos antes da injeção i.art. de Formalina, **N-[4-(4'-O-acetil- α -L-raminosilóxi)benzil]-2-(piridinil-4-carbonil)hidrazina-1-carbotioamida** nas doses de 0,01, 0,1 ou 1 µg/kg por via oral, em três grupos de animais, respectivamente (**Figura 6**). Foi administrado, sessenta minutos antes da injeção i.a. de Formalina, **4-[[4'-O-acetil-2',3'-O-bis(decanoilóxi)- α -L-raminosilóxi]benzil]isotiocianato** nas doses de 0,1, 1 ou 10 µg/kg por via oral, em três grupos de animais, respectivamente (**Figura 7**). Foi administrado, sessenta minutos antes da injeção i.art. de Formalina, **4-[(2',3',4'-O-triacetil- α -L-raminosilóxi)N-benzil]hidrazinacarbotoamida** nas doses de 0,01, 0,1 ou 1 µg/kg por via oral, em três grupos de animais, respectivamente (**Figura 8**).

[015]Imediatamente após a injeção intra-articular, os animais, já conscientes, foram recolocados na câmara de observação, e as respostas comportamentais caracterizadas pelo ato de coçar a região injetada com a pata dianteira ou traseira e pelo ato de levantar reflexamente a cabeça foram quantificadas durante 45 min., divididos em 15 blocos de 3 min. O tempo em segundos que o animal permaneceu coçando a região orofacial foi quantificado através da utilização de um cronômetro, e o número de vezes que o animal levantou reflexamente a cabeça foi quantificado por um contador de células. Considerando que o ato de levantar reflexamente a cabeça segue um padrão uniforme de 1s de duração, a intensidade da resposta nociceptiva

foi quantificada somando-se esse comportamento ao ato de coçar a região injetada, como previamente padronizado.

[016]As **Figuras 6, 7 e 8** ilustram o efeito da administração de ***N*-[4-(4'-*O*-acetil- α -L-raminosiloxi)benzil]-2-(piridinil-4-carbonil)hidrazina-1-carbotioamida**, nas doses de 0,01, 0,1 ou 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, **4-[4'-*O*-acetil-2',3'-*O*-bis(decanoiloxi)- α -L-raminosiloxi]benzilisotiocianato** nas doses de 0,1, 1 ou 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$ e **4-[(2',3',4'-*O*-triacetil- α -L-raminosiloxi)*N*-benzil]hidrazinacarbotioamida** nas doses de 0,01, 0,1 ou 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$, respectivamente, sobre o comportamento hipernociceptivo em ratos com hipernocicepção inflamatória na articulação temporomandibular induzida por formalina. Nos gráficos, o eixo da ordenadas significa o número relativo à intensidade da resposta nociceptiva, e no eixo das abcissas as doses utilizadas em cada grupo experimental; os grupos com a coloração branca correspondem ao grupo salina, e os grupos com coloração preta correspondem aos grupos que receberam a injeção de formalina i;art. na ATM; o símbolo # representa diferença estatística do grupo formalina em relação ao grupo salina, e o símbolo * representa diferença estatística dos grupo tratados com ***N*-[4-(4'-*O*-acetil- α -L-raminosiloxi)benzil]-2-(piridinil-4-carbonil)hidrazina-1-carbotioamida**, **4-[4'-*O*-acetil-2',3'-*O*-bis(decanoiloxi)- α -L-raminosiloxi]benzilisotiocianato** e **4-[(2',3',4'-*O*-triacetil- α -L-raminosiloxi)*N*-benzil]hidrazinacarbotioamida** em relação ao grupo formalina.

[017]O pré-tratamento com ***N*-[4-(4'-*O*-acetil- α -L-raminosiloxi)benzil]-2-(piridinil-4-carbonil)hidrazina-1-carbotioamida**, (0,01, 0,1 e 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$), **4-[4'-*O*-acetil-2',3'-*O*-bis(decanoiloxi)- α -L-raminosiloxi]benzilisotiocianato** (0,1, 1 e 10 $\mu\text{g}/\text{kg}$) e **4-[(2',3',4'-*O*-triacetil- α -L-raminosiloxi)*N*-benzil]hidrazinacarbotioamida** (0,01, 0,1 e 1 $\mu\text{g}/\text{kg}$) reduziram de forma significativa a hipernocicepção inflamatória ao final dos 45 minutos após a injeção de formalina quando comparados ao grupo formalina, sendo semelhante ao grupo tratado apenas com solução salina, tendo sido demonstrado, portanto, efeito analgésico nas doses descritas dos compostos.

REIVINDICAÇÕES

1. USO DE *N*-[4-(4'-*O*-ACETIL- α -L-RAMINOSILOXI)BENZIL]-2-(PIRIDINIL-4-CARBONIL)HIDRAZINA-1-CARBOTIOAMIDA, 4-[4'-*O*-ACETIL-2',3'-*O*-BIS(DECANOILOXI)- α -L-RAMINOSILOXI]BENZILISOTIOCIANATO E 4-[(2',3',4'-*O*-TRiacetil- α -L-RAMINOSILOXI)*N*-BENZIL]HIDRAZINACARBOTIOAMIDA COMO AGENTES ANALGÉSICOS PARA APLICAÇÃO NA INDÚSTRIA FARMACÊUTICA". Caracterizado pela utilização de *N*-[4-(4'-*O*-acetil- α -L-raminosiloxi)benzil]-2-(piridinil-4-carbonil)hidrazina-1-carbotioamida, 4-[4'-*O*-acetil-2',3'-*O*-bis(decanoiloxi)- α -L-raminosiloxi]benzilisotiocianato e 4-[(2',3',4'-*O*-triacetil- α -L-raminosiloxi)*N*-benzil]hidrazinacarbotoamida, substâncias da classe dos isotiocianatos, em setores industriais farmacêuticos com vistas ao desenvolvimento de fármacos analgésicos sob a forma de emulsão, gel, sólido ou pó.

2. USO DE *N*-[4-(4'-*O*-ACETIL- α -L-RAMINOSILOXI)BENZIL]-2-(PIRIDINIL-4-CARBONIL)HIDRAZINA-1-CARBOTIOAMIDA, 4-[4'-*O*-ACETIL-2',3'-*O*-BIS(DECANOILOXI)- α -L-RAMINOSILOXI]BENZILISOTIOCIANATO E 4-[(2',3',4'-*O*-TRiacetil- α -L-RAMINOSILOXI)*N*-BENZIL]HIDRAZINACARBOTIOAMIDA COMO AGENTES ANALGÉSICOS PARA APLICAÇÃO NOS SETORES INDUSTRIAIS VETERINÁRIOS". Caracterizado pela utilização da *N*-[4-(4'-*O*-acetil- α -L-raminosiloxi)benzil]-2-(piridinil-4-carbonil)hidrazina-1-carbotioamida, 4-[4'-*O*-acetil-2',3'-*O*-bis(decanoiloxi)- α -L-raminosiloxi]benzilisotiocianato e 4-[(2',3',4'-*O*-triacetil- α -L-raminosiloxi)*N*-benzil]hidrazinacarbotoamida, substâncias da classe dos isotiocianatos, em setores industriais veterinários com vistas ao desenvolvimento de um fármacos analgésicos sob a forma de emulsão, gel, sólido ou pó.

FIGURAS

FIGURA 1

Figura 1: *N*-[4-(4'-*O*-acetil- α -L-raminosiloxi)benzil]-2-(piridinil-4-carbonil)hi-drazina-1-carbotioamida

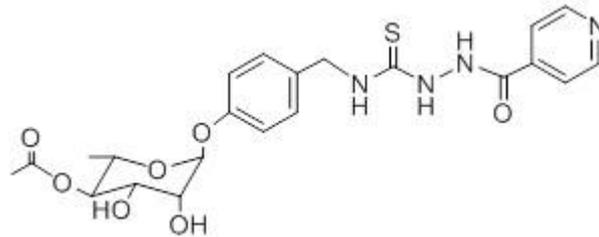


FIGURA 2

Figura 2: 4-[4'-*O*-acetil-2',3'-*O*-bis(decanoiloxi)- α -L-raminosiloxi]benzilisotio-cianato

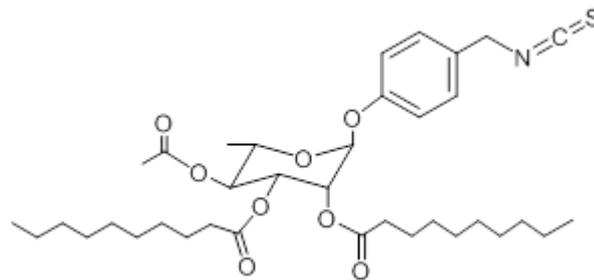


FIGURA 3

Figura 3: 4-[(2',3',4'-*O*-triacetil- α -L-raminosiloxi)*N*-benzil]hidrazinacarbotoamida

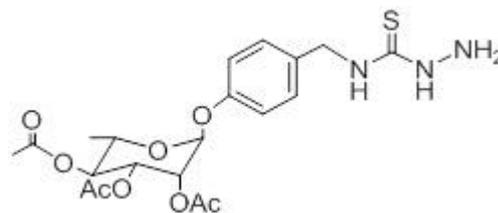


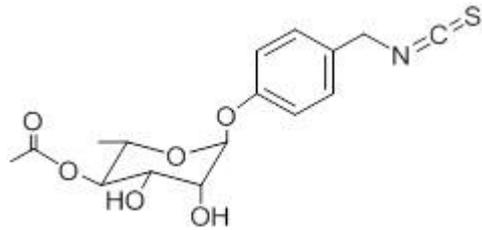
FIGURA 4Figura 4: 4-(4'-O-acetil- α -L-raminosilóxi)benzilisotiocianato

FIGURA 5

Figura 5: Diagrama esquemático do isolamento do 4-(4'-O-acetil- α -L-raminosilóxi)-benzilisotio-cianato presente na flores da *Moringa oleifera* Lam

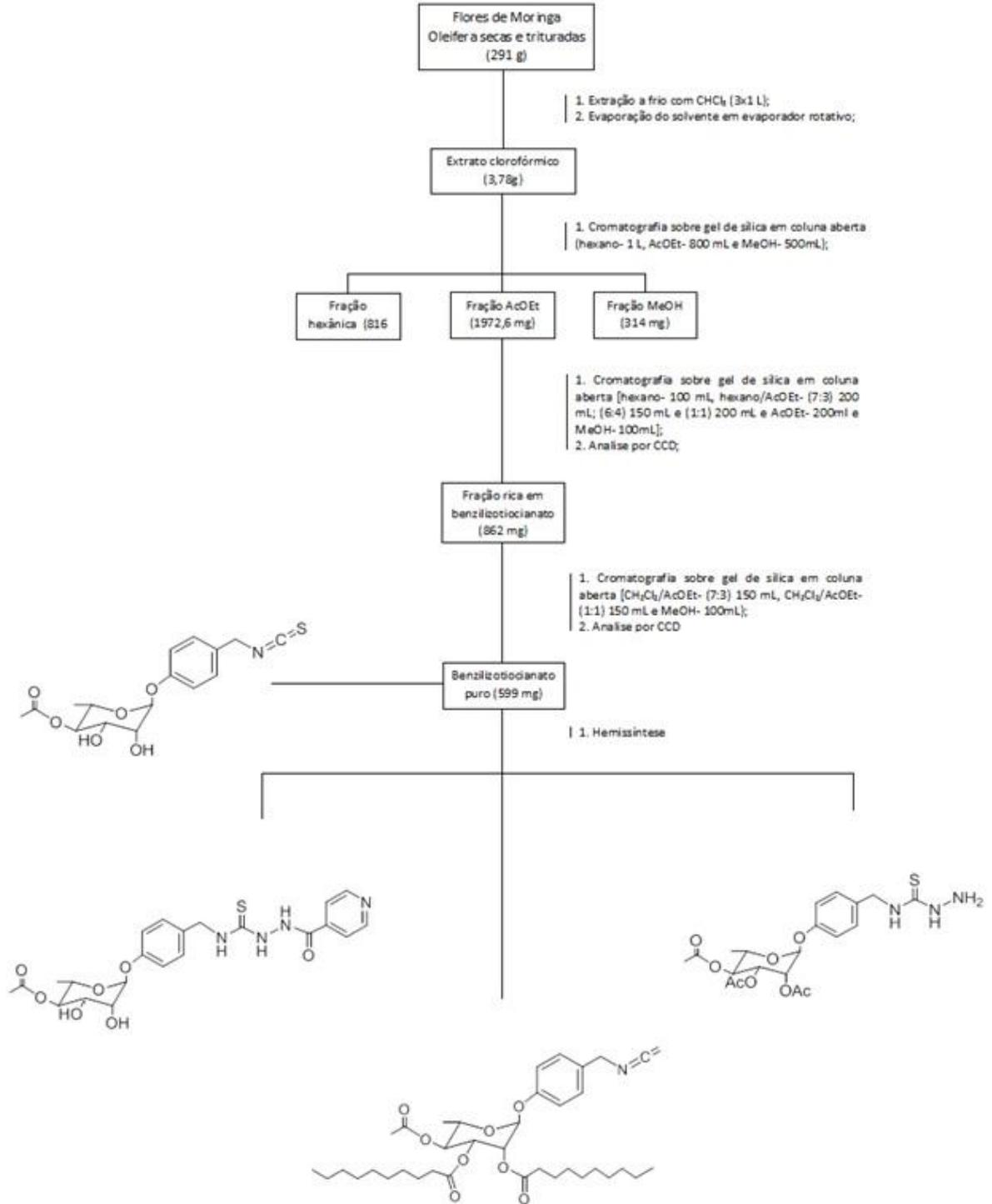


FIGURA 6

Figura 6: Efeito da administração de *N*-[4-(4'-*O*-acetil- α -L-raminosiloxi)benzil]-2-(piridinil-4-carbonil)hidrazina-1-carbotoioamida na ATM de ratos com hipernocicepção inflamatória induzida por formalina.

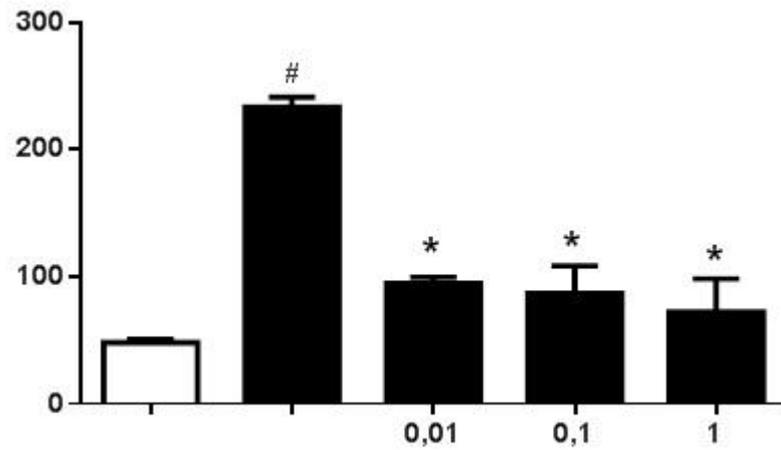
**FIGURA 7**

Figura 7: Efeito da administração de 4-[4'-*O*-acetil-2',3'-*O*-bis (decanoiloxi)- α -L-raminosiloxi]-benzilisotiocianato na ATM de ratos com hipernocicepção inflamatória induzida por formalina

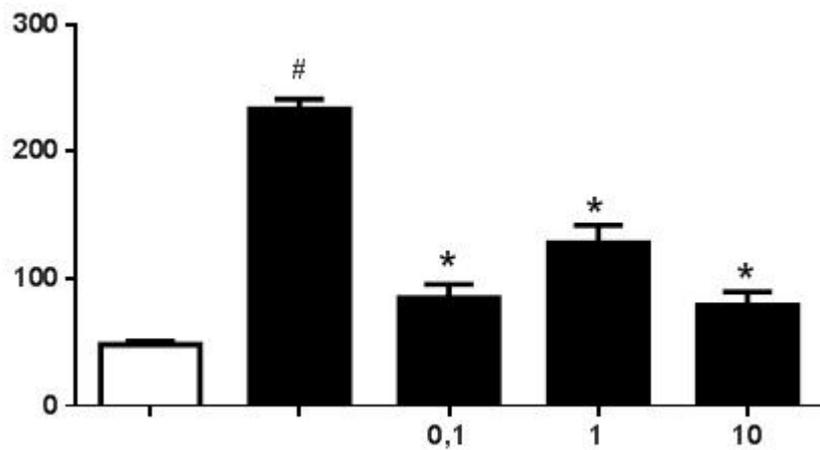
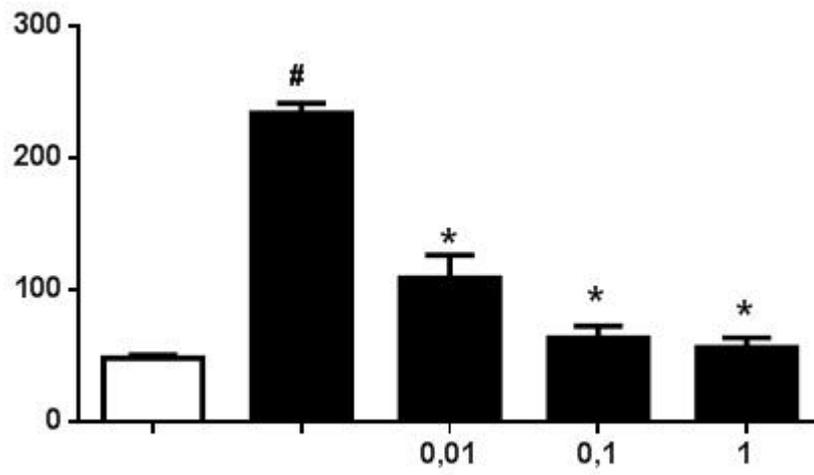


FIGURA 8

Figura 8: Efeito da administração de 4-[(2',3',4'-O-triacetil- α -L-raminosiloxi)*N*-benzil]hidrazina-carbotioamida na ATM de ratos com hipernocicepção inflamatória induzida por formalina.



RESUMO

EFEITO ANALGÉSICO DE *N*-[4-(4'-*O*-ACETIL- α -L-RAMINOSILOXI)BENZIL]-2-(PIRIDINIL-4-CARBONIL)HIDRAZINA-1-CARBOTIOAMIDA, 4-[4'-*O*-ACETIL-2',3'-*O*-BIS(DECANOILOXI)- α -L-RAMINOSILOXI]BENZILISOTIOCIANATO E 4-[(2',3',4'-*O*-TRIACETIL- α -L-RAMINOSILOXI)*N*-BENZIL]HIDRAZINACARBOTIOAMIDA

A presente invenção refere-se ao uso de *N*-[4-(4'-*O*-acetil- α -L-raminosiloxi)benzil]-2-(piridinil-4-carbonil)hidrazina-1-carbotioamida, 4-[4'-*O*-acetil-2',3'-*O*-bis(decanoiloxi)- α -L-raminosiloxi]benzilisotiocianato e 4-[(2',3',4'-*O*-triacetil- α -L-raminosiloxi)*N*-benzil]hidrazinacarbotioamida como agentes analgésicos no modelo de hipernocicepção inflamatória induzida por formalina na articulação temporomandibular (ATM) de ratos. São substâncias derivadas de um benzilisotiocianato [4-(4'-*O*-acetil- α -L-raminosilóxi)benzilisotiocianato], produto natural presente nas flores de *Moringa oleifera* Lamarck. Os isotiocianatos são eficientes em reduzir inflamação em modelos inflamatórios descritos na literatura.

Para a obtenção de *N*-[4-(4'-*O*-acetil- α -L-raminosiloxi)benzil]-2-(piridinil-4-carbonil)hidrazina-1-carbotioamida, 0,085 mmol do produto natural 4-(4'-*O*-acetil- α -L-raminosilóxi)benzilisotiocianato foram misturados com 2 mL de THF anidro e 24 mg de isoniazida. A mistura foi mantida sob agitação até a formação do produto da reação e analisado por CCD (cromatografia em camada delgada). O solvente foi removido e o produto reacional foi purificado por cromatografia em coluna.

Para a obtenção do 4-[(4'-*O*-acetil-2',3'-*O*-bis(decanoiloxi)- α -L-raminosiloxi]benzil)isotiocianato foi realizada uma reação de *O*-acilação. Utilizou-se 5 equivalentes molar do cloreto de decanóila, e DMAP, em CH₂Cl₂ seco. A mistura foi mantida sob agitação magnética e monitorada por CCD. O término da reação foi após 24 h. O solvente foi evaporado da mistura e em seguida o produto foi purificado em coluna cromatográfica.

Para a obtenção de O 4-[(2',3',4'-*O*-triacetil- α -L-raminosiloxi)*N*-benzil]hidrazinacarbotioamida foram realizados dois processos: reação de *O*-acilação e adição da hidrazina ao grupo isotiocianato. Adicionou-se 0,085 mmol (30,0 mg) do benzilisotiocianato em CH₂Cl₂, anidrido acético, trietilamina e DMAP, agitados por 3 horas. Evaporou-se o solvente da mistura e submeteu-a à cromatografia, obtendo o

produto acetilado (um óleo). Na segunda reação o produto acetilado foi adicionado em 2 mL THF e 10 µL de hidrazina 51%. A mistura passou novamente por agitação e após o término da reação monitorada por CCD, adicionou-se 2 mL de água.

O pré-tratamento (60 minutos antes da indução da hipernocicepção inflamatória através da formalina na ATM com *N*-[4-(4'-*O*-acetil- α -L-raminosiloxi)benzil]-2-(piridinil-4-carbonil)hidrazina-1-carbotioamida, 4-[4'-*O*-acetil-2',3'-*O*-bis(decanoiloxi)- α -L-raminosiloxi]benzilisotiocianato ou 4-[(2',3',4'-*O*-triacetil- α -L-raminosiloxi)*N*-benzil]hidrazinacarbotioamida reduziu de forma significativa a resposta nociceptiva induzida por formalina na ATM de ratos. Desta forma, estes compostos apresentaram atividade analgésica, não sendo diferente estatisticamente ($p < 0,05$) do grupo controle que recebeu apenas solução salina na ATM.

ANEXO INVENTOR

6. Nome

- 6.1 Nome: Hellíada Vasconcelos Chaves
6.2 Qualificação: Doutora
6.3 CPF: 841.849.303-87
6.4 Endereço completo: Avenida Comandante Maurocélío Rocha Pontes, 100
Bairro: Derby – Universidade Federal do Ceará – *Campus* de Sobral. Sobral,
Ceará.
6.5 CEP: 62.042-280
6.6 Telefone: 88-3611-2202
6.7 Fax: 88-3611-8000
6.8 E-mail: helliadachaves@yahoo.com.br

6. Nome

- 6.1 Nome: Mirna Marques Bezerra
6.2 Qualificação: Doutora
6.3 CPF: 87708124468
6.4 Endereço completo: Avenida Comandante Maurocélío Rocha Pontes, 100
Bairro: Derby – Universidade Federal do Ceará – *Campus* de Sobral. Sobral,
Ceará.
6.5 CEP: 62.042-280
6.6 Telefone: 88-3611-2202
6.7 Fax: 88-3611-8000
6.8 E-mail: mirnabrayner@gmail.com

6. Nome

- 6.1 Nome: Francisco Geraldo Barbosa
6.2 Qualificação: Doutor
6.3 CPF: 561682503-44
6.4 Endereço completo: Programa de Pós-Graduação em Química,
Departamento de Química Orgânica, Universidade Federal do Ceará, *Campus* do
Pici, Caixa Postal: 12200. Fortaleza, Ceará.
6.5 CEP: 60.440-970

- 6.6 Telefone: 85-3366-9364
- 6.7 Fax: 85-3366-9782
- 6.8 E-mail: fgerhar@gmail.com

6. Nome

- 6.1 Nome: Diana Kelly Castro de Almeida
- 6.2 Qualificação: Estudante de Pós-Graduação
- 6.3 CPF: 048202813-05
- 6.4 Endereço completo: Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, *Campus* do Pici. Fortaleza, Ceará.
- 6.5 CEP: 60.440-970
- 6.6 Telefone: 85-3366-9369
- 6.7 Fax: 85-3366-9782
- 6.8 E-mail: dianakelly25@hotmail.com

6. Nome

- 6.1 Nome: Jair Mafezoli
- 6.2 Qualificação: Doutor
- 6.3 CPF: 549843869-91
- 6.4 Endereço completo: Programa de Pós-Graduação em Química, Departamento de Química Orgânica, Universidade Federal do Ceará, *Campus* do Pici, Caixa Postal: 12200. Fortaleza, Ceará.
- 6.5 CEP: 60.440-970
- 6.6 Telefone: 85-3366-9364
- 6.7 Fax: 85-3366-9782
- 6.8 E-mail: jmafez@uol.com.br

6. Nome

- 6.1 Nome: Marcos Reinaldo da Silva
- 6.2 Qualificação: Doutor
- 6.3 CPF: 010631263-47
- 6.4 Endereço completo: Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, Universidade Federal do Ceará, *Campus* do Pici. Fortaleza, Ceará.
- 6.5 CEP: 60.440-970

- 6.6 Telefone: 85-3366-9369
- 6.7 Fax: 85-3366-9782
- 6.8 E-mail: reisolva_ce@yahoo.com.br

6. Nome

- 6.1 Nome: Gerardo Cristino Filho
- 6.2 Qualificação: Doutor
- 6.3 CPF: 16416678349
- 6.4 Endereço completo: Avenida Comandante Maurocélío Rocha Pontes, 100
Bairro: Derby – Universidade Federal do Ceará – *Campus* de Sobral. Sobral,
Ceará.
- 6.5 CEP: 62.042-280
- 6.6 Telefone: 88-3611-2202
- 6.7 Fax: 88-3611-8000
- 6.8 E-mail: gerardocristino@uol.com.br

6. Nome

- 6.1 Nome: Vicente de Paulo Teixeira Pinto
- 6.2 Qualificação: Doutor
- 6.3 CPF: 35992700315
- 6.4 Endereço completo: Avenida Comandante Maurocélío Rocha Pontes, 100
Bairro: Derby – Universidade Federal do Ceará – *Campus* de Sobral. Sobral,
Ceará.
- 6.5 CEP: 62.042-280
- 6.6 Telefone: 88-3611-2202
- 6.7 Fax: 88-3611-8000
- 6.8 E-mail: pintovicente@gmail.com

6. Nome

- 6.1 Nome: Gerly Anne de Castro Brito
- 6.2 Qualificação: Doutora
- 6.3 CPF: 24198846391

6.4 Endereço completo: Rua Delmiro de Farias, S/N. Bairro: Rodolfo Teófilo – Universidade Federal do Ceará – Faculdade de Medicina – Departamento de Morfologia – *Campus* do Porangabussu. Fortaleza, Ceará.

6.5 CEP: 60.416-030

6.6 Telefone: 85-3366-8471

6.7 Fax: 85-3366-6849

6.8 E-mai: gerlybrito@hotmail.com

6. Nome

6.1 Nome: Juliana Trindade Clemente Napimoga

6.2 Qualificação: Mestre e Doutora em Odontologia com área de concentração em Fisiologia Oral, Livre-Docente em Fisiologia e Biofísica pelo Departamento de Ciências Fisiológicas da FOP-UNICAMP.

6.3 CPF: 031.739.696/00

6.4 Endereço completo: Av. Pompeia, 1500 casa 100

6.5 CEP: 13.425.620

6.6 Telefone: (19)2106-5305

6.7 Fax: (19) 2106-5212

6.8 E-mail: juliana.napimoga@fop.unicamp.br

6. Nome

6.1 Nome: Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar

6.2 Qualificação: Doutora

6.3 CPF: 46355464387

6.4 Endereço completo: Avenida Comandante Maurocélvio Rocha Pontes, 100
Bairro: Derby – Universidade Federal do Ceará – *Campus* de Sobral. Sobral, Ceará.

6.5 CEP: 62.042-280

6.6 Telefone: 88-3611-2202

6.7 Fax: 88-3611-8000

6.8 E-mai: lissiana.aguiar@ufc.br

6. Nome

6.1 Nome: Alain Oliveira dos Santos

6.2 Qualificação: Mestrando

6.3 CPF: 02193518300

6.4 Endereço completo: Avenida Comandante Maurocélío Rocha Pontes, 100
Bairro: Derby – Universidade Federal do Ceará – *Campus* de Sobral. Sobral,
Ceará.

6.5 CEP: 62.042-280

6.6 Telefone: 88-3611-2202

6.7 Fax: 88-3611-8000

6.8 E-mail: alain3iverson@hotmail.com

6. Nome

6.1 Nome: Danielle Rocha do Val

6.2 Qualificação: Doutoranda

6.3 CPF: 90423283391

6.4 Endereço completo: Avenida Comandante Maurocélío Rocha Pontes, 100
Bairro: Derby – Universidade Federal do Ceará – *Campus* de Sobral. Sobral,
Ceará.

6.5 CEP: 62.042-280

6.6 Telefone: 88-3611-2202

6.7 Fax: 88-3611-8000

6.8 E-mail: danielleva@hotmail.com

6. Nome

6.1 Nome: Ellen Lima de Assis

6.2 Qualificação: Graduanda em Odontologia

6.3 CPF: 022.509.843-10

6.4 Endereço completo: Avenida Comandante Maurocélío Rocha Pontes, 100
Bairro: Derby – Universidade Federal do Ceará – *Campus* de Sobral. Sobral,
Ceará.

6.5 CEP:62042240

6.6 Telefone:(88)999030788

6.7 Fax:

6.8 E-mail: ellenjbe@hotmail.com

6. Nome

6.1 Nome: Felipe Dantas Silveira

6.2 Qualificação: Mestrando

6.3 CPF: 021.450.503-02

6.4 Endereço completo: Avenida Comandante Maurocélío Rocha Pontes, 100
Bairro: Derby – Universidade Federal do Ceará – Campus de Sobral. Sobral,
Ceará.

6.5 CEP: 62042-230

6.6 Telefone: (85) 996139219

6.7 Fax:

6.8 E-mail: felipedsilveira@gmail.com

6. Nome

6.1 Nome: Francisco Isaac Fernandes Gomes

6.2 Qualificação: Estudante de Graduação

6.3 CPF: 040.570.063-62

6.4 Endereço completo: Avenida Comandante Maurocélío Rocha Pontes, 100
Bairro: Derby – Universidade Federal do Ceará – *Campus* de Sobral. Sobral,
Ceará.

6.5 CEP: 62.042-280

6.6 Telefone: 88-3611-2202

6.7 Fax: 88-3611-8000

6.8 E-mail: isaac.odonto@hotmail.com

6. Nome

6.1 Nome: Hermany Capistrano Freitas

6.2 Qualificação: Estudante de Graduação

6.3 CPF: 024.289.603-00

6.4 Endereço completo: Avenida Comandante Maurocélío Rocha Pontes, 100
Bairro: Derby – Universidade Federal do Ceará – *Campus* de Sobral. Sobral,
Ceará.

6.5 CEP: 62.042-280

6.6 Telefone: (88) 88-3611-2202

6.7 Fax: 88-3611-8000

6.8 E-mail: hermanyf@hotmail.com

6. Nome

6.1 Nome: Thomas Dominik de Souza dos Reis

6.2 Qualificação: Estudante de Graduação

6.3 CPF: 033.541.033-29

6.4 Endereço completo: Avenida Comandante Maurocélío Rocha Pontes, 100
Bairro: Derby – Universidade Federal do Ceará – *Campus* de Sobral. Sobral,
Ceará.

6.5 CEP: 62.042-280

6.6 Telefone: (88) 88-3611-2202

6.7 Fax: 88-3611-8000

6.8 E-mail: thomasd.medicina@hotmail.com

6. Nome

6.1 Nome: Antônio Mateus Gomes Pereira

6.2 Qualificação: Biólogo

6.3 CPF: 052.927.413-29

6.4 Endereço completo: Avenida Comandante Maurocélío Rocha Pontes, 100
Bairro: Derby – Universidade Federal do Ceará – *Campus* de Sobral. Sobral,
Ceará.

6.5 CEP: 62.042-280

6.6 Telefone: (88) 88-3611-2202

6.7 Fax: 88-3611-8000

6.8 E-mail: mathewsgomes20@gmail.com

6. Nome

6.1 Nome: Igor Iuço Castro da Silva

6.2 Qualificação: Doutor

6.3 CPF: 093.941.517-88

6.4 Endereço completo: Avenida Comandante Maurocélío Rocha Pontes, 100
Bairro: Derby – Universidade Federal do Ceará – *Campus* de Sobral. Sobral,
Ceará.

6.5 CEP: 62.042-280

6.6 Telephone: (88) 88-3611-2202

6.7 Fax: 88-3611-8000

6.8 E-mail: igoriuco@gmail.com

APÊNDICE B: Artigo a ser submetido ao periódico *Journal of Ethnopharmacology*

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE E DOS EFEITOS ANTINOCICEPTIVO E ANTI-INFLAMATÓRIO NA ATM DE RATOS DE DERIVADOS SEMISSINTÉTICOS DE UM BENZILISOTIOCIANATO ISOLADO DE *Moringa oleifera* Lam.

Alain Oliveira dos Santos¹; Mirna Marques Bezerra Brayner¹; Vicente de Paulo Teixeira Pinto¹; Igor Iuço Castro da Silva¹; Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar¹; Danielle Rocha do Val²; Felipe Dantas da Silveira¹; Ellen Lima de Assis³; Francisco Isaac Fernandes Gomes³; Hermany Capistrano de Freitas⁴; Francisco Geraldo Barbosa⁵; Diana Kelly Castro de Almeida⁵; Jair Mafezoli⁵; Marcos Reinaldo da Silva⁵; Gerly Anne de Castro Brito⁶; Juliana Trindade Clemente-Napimoga⁷; Hellíada Vasconcelos Chaves¹

¹Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde – UFC Campus Sobral; ²Programa de Pós-graduação em Biotecnologia – Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) – UFPE; ³Faculdade de Odontologia – UFC – Campus Sobral; ⁴Faculdade de Medicina – UFC – Campus Sobral; ⁵Programa de Pós-Graduação em Química, Departamento de Química Orgânica, - UFC - Campus do Pici; ⁶Faculdade de Medicina – Departamento de Morfologia – UFC - Campus do Porangabussu; ⁷Departamento de Fisiologia, Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP

RESUMO

Introdução: A inflamação é uma importante condição clínica que acomete a articulação temporomandibular (ATM), porém seus mecanismos ainda não são completamente compreendidos e não há terapêutica efetiva para este quadro clínico. A espécie *Moringa oleifera* Lam. possui atividades analgésicas e anti-inflamatórias que podem ser atribuídas aos seus isotiocianatos. **Objetivos:** Verificar toxicidade (em camundongos) e efeitos antinociceptivo e anti-inflamatório na inflamação ATM (em ratos) de um isotiocianato de *Moringa oleifera* Lam. e de seus 7 derivados semissintéticos. **Materiais e métodos:** Foi verificada a toxicidade sistêmica das substâncias em camundongos machos e fêmeas durante 14 dias com as doses: MC-1 1µg/kg; MC-D1 1µg/kg, MC-D3 100µg/kg, MC-D6 1µg/kg, MC-D7 1µg/kg, MC-D8 1µg/kg, MC-D9 10µg/kg e MC-H 1µg/kg. Nas substâncias consideradas seguras (MC-D7, MC-D9 e MC-H), foi averiguada a eficácia antinociceptiva pelos testes da formalina (1.5%, 50µL) e da serotonina (255mg), por via intra-articular (i.a.) na ATM esquerda de ratos. O efeito anti-inflamatório foi avaliado através da permeabilidade

vascular com corante azul de Evans. Ainda foi realizado o teste Rotarod para avaliar efeitos na motricidade. **Resultados e Discussão:** Dentre os derivados testados MC-D7, MC-D9 e MC-H não apresentaram toxicidade, comprovado através de taxa de sobrevivência, análises bioquímicas e histológicas. Estes derivados reduziram a hipernocicepção inflamatória induzida por formalina, mas apenas MC-H reduziu a hipernocicepção induzida por Serotonina, sugerindo ação sobre receptores adrenérgicos. Estes 3 derivados também reduziram de maneira significativa o extravasamento plasmático no teste do Azul de Evans, sugerindo também atividade anti-inflamatória. No teste Rotarod não houve diferenças entre os grupos testados e o controle, reforçando a hipótese de efeito antinociceptivo, mas não sobre a motricidade dos animais. **Conclusão:** Os derivados MC-D7, MC-D9 e MC-H se mostraram eficazes em reduzir a hipernocicepção induzida por formalina na ATM de ratos. São necessárias novas pesquisas para investigar os mecanismos de ação destas drogas.

Palavras-chave: articulação temporomandibular, hipernocicepção articular, Isotiocianatos, toxicidade, *Moringa oleifera*

*Autor para correspondência

Endereço de e-mail: helliadachaves@yahoo.com.br

INTRODUÇÃO

O termo Disfunção Temporomandibular (DTM) se refere a um grupo de condições que acometem as articulações temporomandibulares (ATM), musculatura mastigatória e todos os tecidos associados a estas estruturas. Estas condições geralmente estão associadas a dor aguda ou persistente e podem apresentar como sinais e sintomas a dificuldade de mastigar, falar e prejuízo de outras funções orofaciais. O agravamento e cronificação do quadro clínico pode causar afastamentos no trabalho e diminuição das interações sociais, com conseqüente diminuição da qualidade de vida. A artrite na ATM é um tipo de DTM que pode ser gerada por fatores hormonais, traumatismos, sobrecarga da musculatura e que, se sustentada por algum tempo pode levar a degeneração articular (GREENE, 2010; WADHWA; KAPILA, 2008)

Mecanismos complexos envolvem as vias nociceptivas da região orofacial, que compreende a ATM. Após o estímulo nociceptivo inicia-se a liberação local de

mediadores que irão permitir a comunicação e sensibilização neuronal (periférica e central), assim como perpetuação da condição algica: citocinas, óxido nítrico (NO), bradicinina, substância p, Serotonina e eicosanoides (CHAVES et al., 2011; FUSARO et al., 2012; OKUSE, 2007; SESSLE, 2005). Neurônios sensitivos locais do 5º par craniano (nervo trigeminal) levam a o estímulo nociceptivo para o tronco encefálico, precisamente no subnúcleo caudal, que possui projeções de outros núcleos e regiões cerebrais superiores (tálamo, córtex, substância cinzenta periaquedutal) o que permite a modulação dos nociceptivos, assim como a sensibilização central, está ultima causando a hiperalgesia e alodinia da região orofacial (SESSLE, 2005; 1999)

Além de procedimentos cirúrgicos, fisioterapia, placas oclusais, a farmacoterapia é uma abordagem largamente utilizada na prática clínica como terapêutica principal ou coadjuvante na DTM (OKESON, 2008; BARBOSA; BARBOSA, 2009. Porém, muitas drogas têm se mostrado pouco eficientes no tratamento prolongado das DTMs, como por exemplo as drogas anti-inflamatórias não esteroides (DAINES), que, embora funcionem de maneira eficaz em alguns pacientes, demoram meses a mostrar benefícios analgésicos plenos e possuem efeitos colaterais renais e gástricos com o uso prolongado. Corticosteroides possuem efeitos na analgesia, mas, não atenuam nem diminuem a progressão da artrose da ATM e os relaxantes musculares mostram efetividade duvidosa. Devido a esta baixa efetividade no tratamento farmacológico da DTM se faz oportuno e necessário a busca por novos fármacos que possam ser mais efetivos (CAIRNS, 2010).

Moringa oleifera Lamarck é uma planta tropical da família Moringaceae, É encontrada em áreas tropicais, no sul da Ásia e possui largo emprego de seus componentes na medicina tradicional e alimentação da África e Ásia por apresentar diversas atividades biológicas, dentre elas a anti-inflamatória. Em suas folhas, sementes, flores e frutos são encontrados 4 isotiocinatos (CHEENPRACHA *et al.*, 2010; WATERMAN *et al.*, 2014). Estas substâncias são capazes de reduzir a inflamação na encefalomielite, perda mielínica e dano axonal, reduzir a atividade do óxido nítrico (NO), e citocinas *in vitro* (WATERMAN, *et al.* 2014; GALUPPO, *et al.* 2014; MISHRA *et al.*, 2011; CHEENPRACHA *et al.*, 2010). Porém, o seu papel na dor e na inflamação, assim como suas propriedades toxicológicas não estão bem esclarecidas Embora alguns estudos não tenham encontrado toxicidade (Adedapo, Falayi e Oyagbeme (2015) há relatos de propriedades larvicidas, surgimento de

discrasias sanguíneas, morte aborto em roedores (ADEDAPÓ; MOGBOJURI; EMIKPE, 2009; FERREIRA *et al.*, 2009; MARACAJÁ *et al.*, 2010).

O conhecimento sobre produtos naturais é, muitas vezes, o único recurso terapêutico de variadas comunidades e grupos étnicos em todo o mundo. Essa prática vem despertando nas últimas décadas a atenção da comunidade científica na perspectiva de avaliar a eficácia e segurança desses recursos naturais. Compreender as atividades farmacológicas dos compostos presentes na *Moringa oleífera* se faz necessário, visando encontrar componentes tanto eficazes no combate a inflamação quanto seguros para o uso, podendo assim contribuir para a introdução de uma nova abordagem terapêutica no tratamento e manejo da condição álgica e inflamatória da ATM. (MISHRA *et al.*, 2011; CAIRNS, 2010).

Neste trabalho verificamos a toxicidade de um benzilisotiocianato da *Moringa oleífera* Lam e seus sete derivados semi-sintéticos, descrevemos a eficácia anti-inflamatória e antinociceptiva dos derivados MC-D7, MC-D9 e MC-H (não considerados tóxicos) na hipernocicepção inflamatória na ATM de ratos e avaliamos a influência destes derivados na motricidade e coordenação motora de ratos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais

Foram usados camundongos machos e fêmeas (*Mus musculus*) albinos (25-30g) no ensaio de segurança do benzilisotiocianato e de seus 7 derivados e ratos machos (*Rattus norvegicus*) albinos (variação Wistar) (180-220g) na verificação da eficácia antinociceptiva, anti-inflamatória e ação na motricidade dos derivados MC-D7, MC-D9 e MC-H. Os animais foram provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do (UFC) e do biotério local da Faculdade de Medicina de Sobral, da Universidade Federal do Ceará-Campus Sobral. Os animais foram alojados em gaiolas plásticas, em sala com temperatura controlada ($23^{\circ}\text{C} \pm 2$) obedecendo os ciclos de claro e escuro (de 12 em 12 horas) no biotério local, com água e comida disponíveis *at libidum*.

Visando seguir os aspectos éticos o protocolo experimental foi preparado de acordo com o "Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais Para Fins Científicos e Didáticos - DBCA" do Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA) e submetido ao Comitê de Ética e Pesquisa com Animais-CEPA,

da UFC-Campus Fortaleza (CEPA Nº. 03/15). Todos os esforços foram realizados para minimizar o sofrimento animal.

Material Vegetal

Neste estudo foi realizada a obtenção do 4 - (4'-O-acetyl- α -L-ramnosiloxi) benzilisotiocianato (MC-1) a partir das flores de *Moringa oleífera* e posteriormente a hemi-síntese de seus derivados semissintéticos. O isolamento do 4 - [(4'-O-acetyl- α -L-ramnosiloxi) benzil] isotiocianato e a obtenção de seus derivados semissintéticos ocorreram no Laboratório de Biotecnologia e Síntese Orgânica em parceria com o Laboratório de Fitoquímica, do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da UFC, sob coordenação do professor Francisco Geraldo Barbosa.

O produto natural 4-(4'-O-acetil- α -L-ramnosilóxi)benzilisotiocianato, estrutura mostrada na **Figura 4**, foi obtida a partir de flores de *Moringa oleífera* Lamarck (291g) oriundas do horto de plantas medicinais Prof. José de Abreu Matos da Universidade Federal do Ceará, Campus do Pici, que, após coletadas, foram secas em uma estufa a uma temperatura de 60 °C por 24 horas, para a total eliminação de água. Em seguida o material foi extraído com clorofórmio (1 L) durante 48h e o solvente foi removido sob pressão reduzida em um evaporador rotativo, para a obtenção do respectivo extrato.

O extrato clorofórmio (3,78 g) foi transferido para um gral de porcelana seguido da adição de sílica gel comum (6,59 g). Pequenas porções de solvente foram adicionadas à mistura para promover a total dissolução da amostra e aumentar a eficiência da adsorção. O material foi submetido à cromatografia filtrante, utilizando-se como eluentes 1,1L de hexano (para desengordurar e retirar impurezas) e em seguida 800 mL de acetato de etila, fração essa constituída principalmente por 4-[(2'-O-acetil- α -L-ramnosilóxi)benzil]isotiocianato, e por fim 500 mL de metanol. Em seguida os eluentes foram destilados em evaporador rotatório sob pressão reduzida.

A fração acetato de etila (1972,6 mg), obtida da coluna filtrante do extrato clorofórmio, foi adsorvida em 2,0g de sílica gel e submetida à cromatografia de adsorção. A coluna foi eluída inicialmente com 100 mL de hexano, seguido por 200 mL de hexano:acetato de etila (7:3), 150 mL de hexano:acetato de etila (6:4), 200 mL de hexano:acetato de etila (1:1), 200 mL de acetato etila, 100 mL de metanol.

As frações foram coletadas em porções de 5 mL e analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD). As frações contendo 4-[(4'-O-acetil- α -L-ramnosilóxi)benzil]isotiocianato, ainda impuro, foram reunidas, apresentando massa de 862 mg. Não sendo suficiente a coluna para isolar 4-[(4'-O-acetil- α -L-

raminosilóxi)benzil]isotiocianato, realizou-se outra CCD com a intenção de purificar a substância. A CCD foi realizada em um gradiente de eluição usando a mistura diclorometano:acetato de etila (7:3), diclorometano:acetato de etila (1:1) e 100 mL de metanol. Obtendo assim, 599 mg de 4-[(4'-O-acetil- α -L-raminosilóxi)benzil]isotiocianato, produto natural que exibe relevante atividade anti-inflamatória (CHEENPRACHA et al., 2010).

Com finalidade de se obter novas estruturas e verificar a relação entre toxicidade e estrutura, assim como atividade anti-inflamatória e estrutura, alterações foram feitas na estrutura do produto natural.

Síntese do derivado MC-D1 [4-(2',3',4'-O-triacetil- α -L-raminosilóxi)benzil isotiocianato] a partir de MC-1 [4-(4'-O-acetil- α -L-raminosilóxi)benzilisotiocianato]

Para a obtenção de MC-D1 foi realizada uma reação de O-acetilação, que ocorreu em um frasco de vidro de 10 mL, contendo 0,085 mmol (30,0 mg) de benzilisotiocianato (MC-1) dissolvido em 1 mL de CH₂Cl₂. Em seguida adicionou-se 0,85 mmol (80 μ L) de anidrido acético, 0,85 mmol (118 μ L) de trietilamina e 0,085 mmol (10,4 mg) de 4dimetilaminopiridina (DMAP). A mistura foi mantida sob agitação magnética à temperatura ambiente e monitorada por CCD. O término da reação foi observado após 3 h, então se evaporou o solvente da mistura em evaporador rotativo e submeteu-se à cromatografia de adsorção sob 1,52 g de gel de sílica, usando 100 mL de hexano:acetato de etila (3:2), obtendo-se 35,6 mg do produto, na forma de óleo, com 96% de rendimento.

Síntese do derivado MC-D3 [4-(4'-O-acetil-2',3'-dimetóxi- α -L-raminosilóxi)benzil isotiocianato] a partir de MC-1 [4-(4'-O-acetil- α -L-raminosilóxi)benzilisotiocianato]

Para a obtenção de MC-D3 foi realizada a reação de metilação, que ocorreu em um frasco de vidro de 10 mL, contendo 0,085 mmol (30,0 mg) do benzilisotiocianato MC-1 dissolvido em 1 mL de MeCN, posteriormente foi adicionado 4,25 mmol (270 μ L) de iodeto de metila e 0,17 mmol (39,4mg) de óxido de prata. O progresso da reação foi monitorada por CCD. Depois de 24 horas, o meio reacional foi submetido a uma filtração. Posteriormente, a fase orgânica foi concentrada em um

evaporador rotativo sob pressão reduzida com posterior purificação. O produto foi obtido com massa de 21 mg, correspondendo a 65% de rendimento.

Síntese do derivado MC-D6 [*N*-(4'-*O*-acetil- α -L-raminosilóxi)benzil]hidrazina carbotoamida] a partir de MC-1 [4-(4'-*O*-acetil- α -L-raminosilóxi)benzilisotiocianato]

Para a obtenção de MC-D6, em um balão de fundo redondo de 10mL adicionou-se MC-1 0,085 mmol (30,0mg) em 2 mL THF seco e 0,17 mmol (10 μ L) hidrazina. A mistura de reação foi mantida sob agitação a temperatura ambiente até a formação do produto da reação, analisado por CCD. Após o término da reação, adicionou-se 2 mL de água. A fase orgânica foi separada da fase aquosa por uma partição líquido-líquido com acetato de etila (3x5 mL). O solvente foi removido sob pressão reduzida e o produto foi purificado por cromatografia em coluna contendo 2,47 g de gel de sílica e usando 100 mL de acetato de etila (100%). O rendimento do produto purificado foi de 81% (26,5mg).

Síntese do derivado MC-D7 (*N*-(4-(4'-*O*-acetil- α -L-raminosilóxi)benzil]-2-(piridinil-4-carbonil)hidrazina-1-carbotoamida) a partir de MC-1 [4-(4'-*O*-acetil- α -L-raminosilóxi)benzilisotiocianato]

Para a obtenção de *N*-(4-(4'-*O*-acetil- α -L-raminosilóxi)benzil]-2-(piridinil-4-carbonil)hidrazina-1-carbotoamida (**Figura 1**), o produto natural 4-(4'-*O*-acetil- α -L-raminosilóxi)benzil]isotiocianato foi colocado em um balão de fundo redondo 10mL e a ele foi adicionado 30,0mg em 2mL THF anidro e seguido da adição de 24 mg isoniazida. A mistura da reação foi mantida sob agitação à temperatura ambiente até a formação do produto da reação, analisado por CCD. O solvente foi removido sob pressão reduzida e o produto reacional foi purificado por cromatografia em coluna. O rendimento do produto purificado foi de 78%.

Síntese do derivado MC-D8 [4-(4'-*O*-acetil-2',3'-dimesilóxi- α -L-raminosilóxi)benzilisotiocianato] a partir de MC-1 [4-(4'-*O*-acetil- α -L-raminosilóxi)benzilisotiocianato]

Para a obtenção de MC-D8 foi realizada uma reação de mesilação, que ocorreu em um balão de fundo redondo de 50 mL, contendo 0,142mmol (50,0 mg) de MC-1 em 1mL de CH₂Cl₂. Em seguida, adicionou-se 0,425mmol (33 μ L) de cloreto de

metanossulfonila (MsCl) e 0,425mmol (59 μ L) de trietilamina (Et₃N) (lentamente). O sistema reacional foi mantido sob agitação magnética e em banho de gelo (0 °C) por 5h. A formação do produto foi monitorada por CCD. O solvente foi removido sob pressão reduzida e o produto purificado em cromatografia em coluna contendo 3,01 g de gel de sílica e usando 100 mL de hexano:acetato de etila (1:1). O produto foi obtido com 55% (39,5mg) de rendimento.

Síntese do derivado MC-D9 {4-[4'-O-acetil-2',3'-O-bis(decanoiloxi)- α -L-raminosiloxi]benzilisotiocianato} a partir de MC-1 [4-(4'-O-acetil- α -L-raminosilóxi)benzilisotiocianato]

Para a obtenção de 4-[[4'-O-acetil-2',3'-O-bis(decanoiloxi)- α -L-raminosiloxi]benzil]isotiocianato foi realizado o processo de O-acilação. Utilizou-se 5 equivalentes molar do cloreto de decanoíla, e DMAP, em CH₂Cl₂ seco. A mistura foi mantida sob agitação magnética à temperatura ambiente e monitorada por CCD. O término da reação foi observado após 24h e em seguida evaporou-se o solvente da mistura sob pressão reduzida em evaporador rotativo e submeteu-se à cromatografia de adsorção eluída com uma mistura de hexano:acetato de etila (9.1). Obtendo-se o produto com 51 % de rendimento.

Síntese do derivado MC-H {4-[(2',3',4'-O-triacetil- α -L-raminosiloxi)/N-benzil]hidrazinacarbotioamida} a partir de MC-1 [4-(4'-O-acetil- α -L-raminosilóxi)benzilisotiocianato]

Para a obtenção de 4-[(2',3',4'-O-triacetil- α -L-raminosiloxi)/N-benzil]hidrazinacarbotioamida foi necessária a realização de dois processos químicos. Inicialmente, uma reação de O-acilação, seguida da reação de adição da hidrazina ao grupo isotiocianato. A primeira reação ocorreu em um frasco de vidro de 10mL, contendo 30,0mg do benzilisotiocianato dissolvido em CH₂Cl₂. Em seguida adicionou-se 80 μ L de anidrido acético, e um excesso de trietilamina e DMAP em quantidade catalítica. A mistura foi mantida sob agitação magnética à temperatura ambiente e monitorada por CCD (cromatografia em camada delgada). O término da reação foi observado após 3h, então evaporou-se o solvente da mistura em evaporador rotativo e submeteu-se à cromatografia de adsorção obtendo o produto como óleo, com 96% de rendimento. A segunda etapa reacional consistiu da adição do produto acetilado em 2mL THF e 10 μ L de uma solução de hidrazina 51%. A mistura de reação foi

mantida sob agitação a temperatura ambiente até a formação do produto da reação, analisado por CCD. Após o término da reação, adicionou-se 2mL de água. A fase orgânica foi separada da fase aquosa por uma partição líquido-líquido com acetato de etila (3x5mL). Após todas as etapas, o produto final foi obtido com 77% de rendimento.

Estudo da toxicidade de MC-1 e dos 7 derivados semissintéticos extraídos das flores de *Moringa oleifera*

Para avaliar e mensurar se os compostos apresentam alguma toxicidade, local ou sistêmica, assim como morbimortalidade, antes que fosse avaliado se os derivados têm efeito anti-inflamatório ou antinociceptivo foi realizado inicialmente um ensaio de segurança baseado no protocolo 420 (2001) da OCDE (*Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico*). Neste mesmo estudo foram feitos ensaios com doses únicas e repetidas.

Foram usados 110 camundongos albinos *Mus musculus*, 55 machos e 55 fêmeas. Para cada derivado existiu um grupo de machos (n=5) e um grupo de fêmeas (n=5), assim como o grupo controle. A substância controle utilizada foi solução salina 0,9%. O composto MC-H foi testado em um momento posterior aos outros, utilizando um grupo controle diferente devido a essa substância ter sido a última a ser elaborada e enviada ao laboratório. As doses testadas foram as seguintes: MC-1 1µg/kg; MC-D1 1µg/kg; MC-D3 100µg/kg; MC-D6 1µg/kg; MC-D7 1µg/kg; MC-D8 1µg/kg; MC-D9 10mg/kg e MC-H 1µg/kg, devido à baixa disponibilidade dos compostos.

O estudo de dose única consistiu na administração da substância testada via oral (gavagem, *per os*) em uma única dose por um período que não superior a 24 horas. Após 24 horas o estudo de dose única foi finalizado e os animais passaram a fazer parte do estudo de doses repetidas (os estudos são contínuos), onde diariamente os animais receberam a mesma dose do composto, baseando-se no peso do animal, durante 14 dias.

No estudo de toxicidade aguda (dose única, 24 horas), após a administração da dose do composto os animais foram observados por examinadores calibrados nos intervalos de 15 minutos, 30 minutos, uma hora, duas horas, 4 horas, 6 horas, 12 horas e 24 horas, visando observar se houveram alterações de comportamento que pudessem indicar morbidade e também mortalidade, a saber: piloereção, agressividade, sonolência, contorção abdominal, lambidas, cambalhotas, agitação, pulsão sexual, perda de peso e morte (VAL, *et al.* 2014).

Após as 24 horas iniciais (fim do experimento de toxicidade aguda, com dose única), iniciou-se o experimento de toxicidade subcrônica (doses repetidas), que consistiu na administração da dose do derivado de acordo com o peso do animal, durante 14 dias consecutivos, no mesmo horário e a observação dos mesmos parâmetros comportamentais de morbimortalidade utilizados no estudo de toxicidade aguda, porém durante apenas 15 minutos seguidos, subsequentemente à administração do derivado ou substância controle. No 15º dia os animais foram anestesiados com quetamina+xilasina e tiveram sangue coletado pelo plexo oftálmico para se realizarem dosagens bioquímicas das enzimas hepáticas aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) e metabólitos renais (creatinina), para confirmar se houveram ou não alterações no funcionamento destes 2 órgãos. Em seguida os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical. A fim de avaliar alterações não detectáveis a olho nu ou por meios laboratoriais naqueles animais que não apresentaram alterações comportamentais foi realizada, após a eutanásia, a remoção do coração, fígado, baço e rim para a realização da análise microscópica por patologista, realizadas em microscópio óptico acoplado a sistema de captura de imagens digitais. Os aumentos utilizados foram: 100x, para aspectos morfológicos gerais e 400x, para análise detalhada dos eventos histológicos, tanto celulares quanto na matriz extra celular (MEC), com análise cega de grupos experimentais (fármacos-teste), seguindo a norma ISO 10993-11.

Eficácia antinociceptiva e anti-inflamatória de MC-D7, MC-D9 e MC-H (derivados semissintéticos obtidos das flores de *Moringa oleífera*) no modelo de hiperalgesia inflamatória induzida na articulação temporomandibular (ATM) de ratos.

Delineamento Experimental

Os animais foram pré-tratados via oral com os derivados MC-D7 (0,01µg/kg; 0,1µg/kg ou 1µg/kg), MC-D9 (0,1µg/kg; 1µg/kg ou 10µg/kg) e MC-H (0,01µg/kg; 0,1µg/kg ou 1µg/kg). Uma hora após o pré-tratamento com as substâncias supracitadas, os animais receberam uma injeção intra-articular (formalina a 1.5%) e tiveram o comportamento nociceptivo quantificado. Imediatamente após os testes comportamentais os animais foram anestesiados e eutanasiados por decapitação. Cada grupo possuiu n=5 animais (ratos machos, *Rattus norvegicus* albinos Wistar

entre 180 a 220g). As melhores doses obtidas no teste da formalina foram utilizadas no teste da serotonina (injeção de Serotonina 225mg i.a. na ATM), visando minimizar o número de animais utilizados.

Injeções intra-articulares

Os animais foram anestesiados com isoflurano e receberam uma injeção do agente inflamatório (Formalina a 1,5% ou Serotonina 225mg) (ROVERONI *et al.*, 2001; OLIVEIRA-FUSARO *et al.*, 2012). Para a administração do agente inflamatório na ATM, uma agulha 30G conectada a uma seringa 50µl (705 N 50µl, Hamilton) por um tubo de polietileno P50 foi inserida na porção inferior da borda do arco zigomático da ATM esquerda do animal, sendo avançada na direção ventral até contactar a região dorsolateral do côndilo.

Testes comportamentais para a avaliação da resposta nociceptiva induzida pela Formalina e pela Serotonina

Os testes comportamentais foram realizados durante a fase clara, entre 9h e 17h em uma sala silenciosa, com temperatura controlada entre $23^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ} \text{C}$ (ROSLAND, 1991). No momento do teste os animais não tiveram acesso à água e comida. Para minimizar o estresse durante o experimento os pesquisadores manipularam os animais previamente por um período de 7 dias. A realização da análise comportamental para ambos os testes se deu em caixas de observação medindo 30x30x30cm com sua base e 3 lados espelhados e um vidro transparente na frente. A região superior não possui proteção. Cada animal foi previamente colocado na caixa por 10 minutos (imediatamente antes da injeção de formalina) para sua adaptação ao local do experimento, visando também minimizar o estresse (ABBOTT *et al.*, 1986). Imediatamente após a injeção intra-articular, o animal já acordado foi colocado na caixa espelhada e suas respostas comportamentais de coçar a área com as patas dianteiras ou traseiras e levantar reflexamente a cabeça foram quantificadas durante 45 minutos no teste da Formalina, divididos em 15 blocos de 3 minutos. O tempo em segundos que o animal permaneceu coçando a região orofacial foi quantificada através de cronometro digital e o número de vezes que o animal levantou reflexamente a cabeça foi quantificada através de um contador manual de células (ROVERONI *et al.*, 2001; FUSARO *et al.*, 2012). Devido ao ato de levantar a cabeça reflexamente possuir um padrão de duração de 1s a intensidade da resposta nociceptiva foi medida

adicionando-se esse comportamento ao tempo total de coçar a região orofacial, como foi previamente padronizado (ROVERONI et al., 2001; FUSARO et al., 2012). Imediatamente após o teste comportamental os animais foram anestesiados e eutanasiados por decapitação.

Análise da permeabilidade vascular por extravasamento de azul de Evans

Os animais receberam tribromo (1%, i.p., 0,1mL/100g), e em seguida injeção intrarticular de formalina (1,5%, 50µL) na ATM. Para averiguação da inflamação todos os animais receberam uma dose de 50mg/kg do corante Azul de Evans (TORRES-CHÁVEZ et al., 2011) e.v. (veia peniana) imediatamente após a aplicação de formalina (1,5%, 50µL) na ATM e, após 45 minutos, os animais foram eutanasiados por decapitação. Baseando-se na propriedade do corante Azul de Evans de ligar-se às proteínas plasmáticas, o local da injeção de formalina foi identificado visualmente, devido à maior concentração de corante no referido tecido (HAAS et al., 1992), permitindo assim a remoção adequada dos tecidos para posterior análise do extravasamento através de técnicas espectrofotométricas.

Para a extração do corante, o tecido periarticular de cada animal foi pesado e colocado em microtubos tipo eppendorf contendo 1mL de formamida e mantido por 24 horas a 60°C (FIORENTINO *et al.*, 1999). Após a extração, a quantidade de corante extravasada no tecido foi determinada em um leitor de microplacas, afim de medir as absorbâncias (em 620nm) das diferentes soluções de formamida. Os resultados dessas leituras foram posteriormente comparados com os resultados de leituras de soluções com concentrações conhecidas (curva de calibração com 4µg, 2µg, 1µg e 0,5µg de corante por mL de formamida). A quantidade de corante extravasada (µg) em cada solução foi dividida pelo peso (g) do respectivo tecido incubado. O extravasamento de foi calculado em microgramas de corante por grama de tecido dissecado. Foram realizados 5 grupos com n=5: Salina, Formalina, MC-D7 maior dose no teste da formalina, MC-D9 maior dose no teste da Formalina e MC-H maior dose no teste da formalina.

Teste Rota Rod para analisar atividade ansiolítica dos derivados MC-D7, MC-D9 e MC-H

O teste do *Rota Rod* mensura o efeito do relaxamento muscular ou desordem da coordenação motora ocasionada pela ação de drogas em animais (CARLINI;

BURGOS, 1979). Os animais foram colocados com as quatro patas sobre uma barra giratória separada por amplas abas que possibilitam a análise comportamental de cada animal. No modelo para ratos, são quatro divisões, cujo rotor apresenta diâmetro de 7 cm, possibilitando o estudo simultâneo de 4 animais, com uma rotação de 4 a 40 rpm, por um período de 5 minutos, após 1 hora a administração de MC-D7 MC-D9 e MC-H (maiores doses respectivas no teste da formalina) ou veículo (salina 0,9% *per os*). Foram registrados: tempo de latência (segundos), tempo de permanência na barra giratória (segundos), e o número de quedas (PIEL, 2014; DUNHAM; MIYA, 1957).

Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Para comparação múltipla dos dados paramétricos dos testes comportamentais e farmacológicos foi utilizada a análise de variância (ANOVA) e o nível de significância entre os grupos foi determinado pelos testes Bonferroni para detectar as diferenças entre o grupo controle e os grupos em tratamento. Em todas as análises estatísticas foi considerado o nível crítico para rejeição da hipótese de nulidade menos que 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Estruturas químicas dos derivados

A **Figura 1** mostra a estrutura final dos compostos obtidas pelas reações químicas descritas na metodologia. As modificações estruturais no produto natural podem ter sido responsáveis tanto pelas alterações comportamentais, presença ou ausência de toxicidade, bem como efeito antinociceptivo observado nos compostos, como pode ser visto à frente.

Ensaio de toxicidade aguda e subcrônica

Taxa de sobrevivência dos animais submetidos ao uso dos derivados

Antes de avaliar a atividade antinociceptiva e anti-inflamatória dos derivados, foi realizado um ensaio de segurança para avaliar a toxicidade do bezilisotiocianato e de seus 7 derivados, baseando-se no protocolo 420 da OCDE (OCDE, 2001), com algumas adaptações. A avaliação da toxicidade de MC-H foi realizada em momento

Figura 1: Estruturas químicas dos derivados semissintéticos obtidos a partir de 4-[(4'-O-acetil- α -L-ramnolisolxi)benzil]isotiocianato.

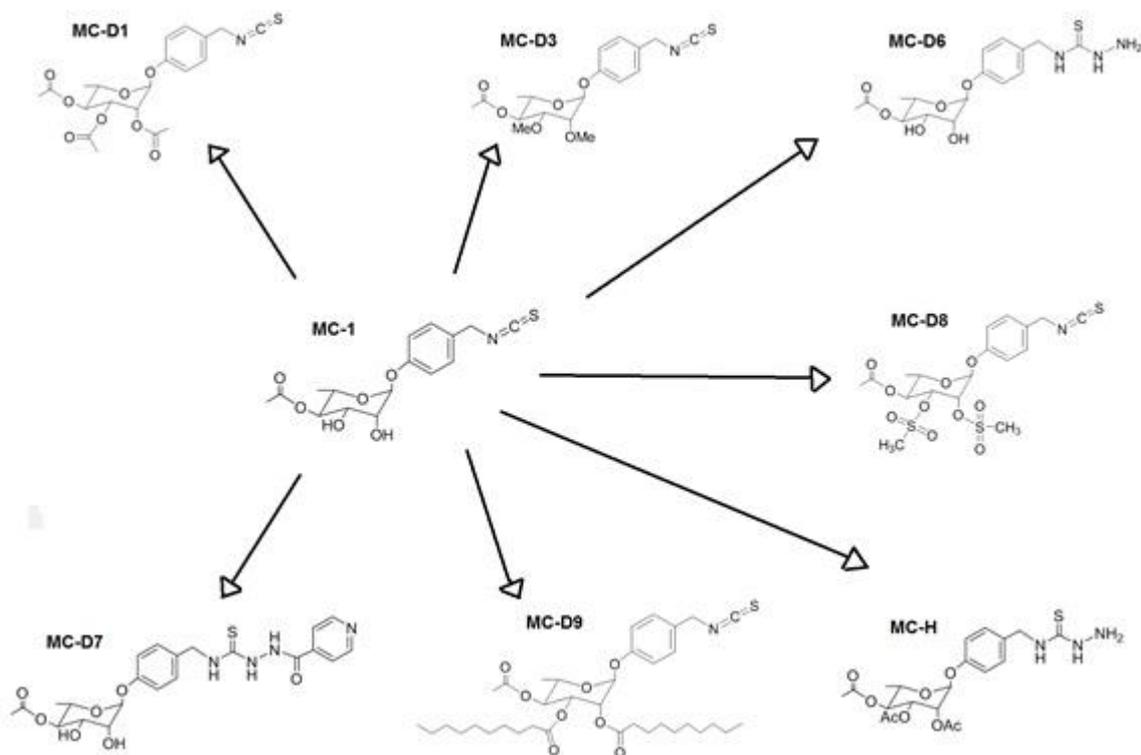
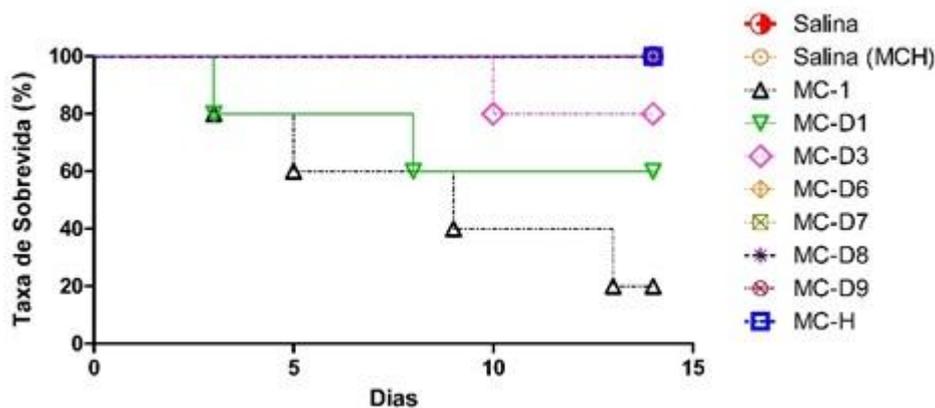


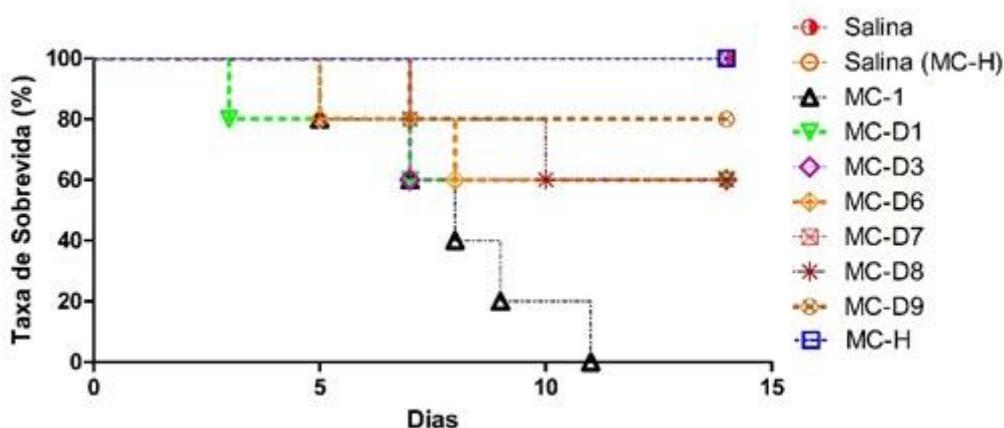
Figura 2: Taxa de sobrevivência dos animais machos no ensaio de segurança de MC1 e seus 7 derivados. Cada grupo é representado por um símbolo colorido com uma linha pontilhada. Cada decréscimo na curva representa e sua aproximação do percentual 0 (eixo y) representa a morte de um animal naquele grupo no dia em questão (eixo x). Esta queda na curva representa portanto decréscimo de percentual de sobrevivência.



posterior aos demais derivados, devido a ele ter sido o último derivado a ser sintetizado, utilizando um processo híbrido de obtenção com os reagentes e

processos utilizados para as obtenções de MC-D1 e MC-D6. As doses usadas para teste foram MC-1: 1µg/kg, MC-D1: 1µg/kg, MC-D3: 100µg/kg, MC-D6: 1µg/kg, MC-D7: 1µg/kg, MC-D8: 1µg/kg, MC-D9: 10µg/kg e MC-H: 1µg/kg. A **Figura 2** mostra a taxa de sobrevivida dos animais machos. O grupo MC-1 apresentou menor taxa de sobrevivida dentre todos os grupos (20%), com 4 mortes (dias 3, 5, 9 e 13). O grupo MC-D1 apresentou a segunda menor taxa de sobrevivida (60%), com 2 mortes (dias 3 e 8). O grupo MC-D3 apresentou taxa de sobrevivida de 80%, com apenas uma morte (dia 10). Os grupos MC-D6, MC-D7, MC-D8, MC-D9, MC-H e Salina (ambos) não apresentaram mortalidade nos animais machos.

Figura 3: Taxa de sobrevivida dos animais fêmeas no ensaio de segurança de MC1 e seus 7 derivados. Cada grupo é representado por um símbolo colorido com uma linha pontilhada. Cada decréscimo na curva representa e sua aproximação do percentual 0 (eixo y) representa a morte de um animal naquele grupo no dia em questão (eixo x). Esta queda na curva representa portanto decréscimo de percentual de sobrevivida.



A **Figura 3** mostra a taxa de sobrevivida dos animais fêmeas. A taxa de sobrevivida do grupo MC-1 foi 0%, com a última morte acontecendo no 11º dia (dias 5, 7, 8, 9 e 11). Os grupos MC-D1, MC-D3, MC-D6 e MC-D8 apresentaram taxa de sobrevivida de 60%, MC-D9, por sua vez, apresentou taxa de sobrevivida de 80%. Os grupos Salina (ambos), MC-D7 e MC-H não apresentaram mortalidade para as fêmeas.

Ao realizar a soma dos grupos de machos e fêmeas dos respectivos derivados semissintéticos é possível observar o número total de mortes e o percentual de sobrevivida de cada derivado (**Tabela 1**).

Tabela 1: Número total de mortes (machos e fêmeas) no ensaio de segurança de MC-1 e seus derivados semissintéticos. A maior taxa de mortalidade ocorreu no grupo MC-1. As maiores taxas de sobrevivência foram encontradas nos grupos MC-D7, MC-D9 e MC-H.

Grupos	Fêmeas (nº de mortes)	Machos (nº de mortes)	Total	Sobrevivência (%)
Salina	-	-	0	100%
Salina (controle de MC-H)	-	-	0	100%
MC-1	5	4	9	10%
MC-D1	2	2	4	60%
MC-D3	2	1	3	70%
MC-D6	2	-	2	80%
MC-D7	-	-	0	100%
MC-D8	2	-	2	80%
MC-D9	1	-	1	90%
MC-H	-	-	0	100%

A maioria dos grupos tratados apresentou mortalidade dos animais, excetuando-se MC-D7 (nenhuma morte), o que significa este derivado pode ser considerado seguro para o uso em experimentos e possivelmente em humanos, enquanto que as drogas que causaram mais de uma morte por grupo não são seguras para o uso (MC-1, MC-D1, MC-D3, MC-D6, MC-D8).

Os grupos tratados com MC-D9, por sua vez, apresentaram baixa mortalidade (uma morte, animal fêmea), o que é aceitável segundo o protocolo seguido (OCDE, 2001). Nos grupos de animais tratados com MC-H não houve mortes, o que significa que este derivado também é seguro para o uso em laboratório e possivelmente em humanos. Embora estes resultados mostrem que MC-D7, MC-D9 e MC-H podem ser considerados seguros para o uso, estes resultados ainda devem ser confrontados com as análises bioquímicas, análises comportamentais e posteriormente análises histológicas para se obter a confirmação de sua segurança para os usos mencionados acima.

Alterações comportamentais

Para saber se o uso dos derivados em dose única ou repetidas poderia causar alterações no comportamento que possam estar relacionadas à taxa de mortalidade, as alterações comportamentais durante os 14 dias foram avaliadas. A **Tabela 2** mostra as alterações comportamentais dos machos e a **Tabela 3** a das fêmeas.

Nos machos, os grupos MC-D7 e MC-H não apresentaram alterações comportamentais, de maneira semelhante aos grupos controles (Salina e Salina controle de MC-H). Apenas um animal do grupo MC-D9 apresentou agressividade e

pulsão sexual. Nos demais grupos os comportamentos de piloereção (MC-1, MC-D1, MC-D3 e MC-D6) e sonolência (MC-1, MC-D1, MC-D3 e MC-D8) foram as alterações de comportamento mais presentes. Agressividade foi observada também no grupo MC-D1, assim como agitação. Nas fêmeas, os grupos MC-D7, MC-D9 e MC-H não apresentaram alterações comportamentais, semelhantemente aos seus controles (Salina e Salina controle de MC-H). Os comportamentos observados nos demais grupos foram piloereção (MC-1, MC-D1, MC-D3, MC-D6 e MC-D8), sonolência (MC-1, MC-D3, MC-D6 e MC-D8) e contorção abdominal (MC-D3 e MC-D6). Estas alterações comportamentais foram prioritariamente observadas nos grupos com taxas de sobrevivência não aceitáveis (MC-1, MC-D1, MC-D3, MC-D6 e MC-D8), o que corrobora com a hipótese de que os derivados supracitados podem ser tóxicos.

Tabela 2: Alterações comportamentais dos animais machos no ensaio de segurança. Os comportamentos mais comuns apresentados foram piloereção e sonolência. As alterações comportamentais foram observadas imediatamente a administração do derivado e durante os 10 minutos seguintes.

Grupos	Alterações comportamentais	Nº de animais
Saline	-	-
Saline (MC-H control)	-	-
MC-1	Piloereção, Sonolência.	5
MC-D1	Piloereção, Sonolência, Agressividade, Agitação	5
MC-D3	Piloereção, Sonolência	3
MC-D6	Sonolência.	3
MC-D7	-	-
MC-D8	Sonolência	5
MC-D9	Agressividade, Pulsão sexual.	-
MC-H	-	-

Tabela 3: Alterações comportamentais dos animais fêmeas no ensaio de segurança. Os comportamentos mais comuns apresentados foram piloereção e sonolência. As alterações comportamentais foram observadas imediatamente a administração do derivado e durante os 10 minutos seguintes.

Grupos	Alterações comportamentais	Nº de animais
Saline	-	-
Saline (MC-H control)	-	-
MC-1	Piloereção, Sonolência.	5
MC-D1	Piloereção	5
MC-D3	Piloereção, Sonolência, Contorção.	3
MC-D6	Piloereção, Sonolência, Contorção.	3
MC-D7	-	-
MC-D8	Piloereção, Sonolência.	5
MC-D9	-	-
MC-H	-	-

Níveis séricos de enzimas hepáticas (AST e ALT)

A **Tabela 4** mostra os níveis séricos de AST e ALT correspondentes aos grupos dos derivados MC-1, MC-D1, MC-D3, MC-D6, MC-D7, MC-D8 e MC-D9 machos e fêmeas juntos. Nos grupos MC-1 ($120,5 \pm 0,0$, de apenas um animal), MC-D1 ($90,3 \pm 17,4$), MC-D3 ($104,0 \pm 19,0$), MC-D6 ($125,5 \pm 9,4$), MC-D8 ($94,98 \pm 16,0$) e MC-D9 ($83,26 \pm 11,1$) os níveis de AST foram maiores do que o grupo salina, porém sem significância estatística. Os níveis de ALT de apenas 2 derivados, MC-1 ($36,6 \pm 0,0$, de apenas um animal) e MC-D3 ($33,7 \pm 7,3$) foram maiores do que os níveis encontrados no grupo Salina ($32,5 \pm 5,6$), porém, sem significância estatística.

Tabela 4: Níveis séricos de AST e ALT dos grupos MC-1, MC-D1, MC-D3, MC-D6, MC-D7, MC-D8 e MC-D9. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Salina. Os dados são representados como média \pm E.P. M. (n=5). (ANOVA, Bonferroni).

Grupos	AST	ALT
Salina	$81,7 \pm 15,87$	$32,5 \pm 5,6$
MC-1	$120,5 \pm 0,0$	$36,6 \pm 0,0$
MC-D1	$90,3 \pm 17,4$	$27,6 \pm 5,8$
MC-D3	$104,0 \pm 19,0$	$33,7 \pm 7,3$
MC-D6	$125,5 \pm 9,4$	$32,5 \pm 7,7$
MC-D7	$79,89 \pm 13,1$	$30,0 \pm 3,3$
MC-D8	$94,98 \pm 16,0$	$31,3 \pm 2,2$
MC-D9	$83,26 \pm 11,1$	$23,1 \pm 3,6$

A **Tabela 5** mostra os níveis de AST e ALT do grupo MC-H em relação ao seu controle (Salina controle MC-H). Embora os níveis de AST tenham sido maiores em MC-H ($256,8 \pm 44,2$) do que no grupo Salina controle de MC-H ($192,3 \pm 33,16$) não houve diferença estatisticamente significativa. Os níveis de ATL também foram maiores no grupo MC-H ($63,9 \pm 7,3$), em relação ao grupo Salina controle de MC-H ($52,1 \pm 4,9$), mas novamente não houve diferença estatisticamente significativa.

Níveis séricos de creatinina

Não foi possível dosar os níveis séricos de creatinina dos animais de todos os grupos devido a quantidade coletada de sangue não ter sido suficiente (principalmente naqueles grupos em onde houve maior mortalidade ou onde os animais se encontravam em morte eminente). Os níveis séricos de creatinina dos grupos que receberam os derivados estão representados nas **Tabelas 6 e 7**.

Tabela 5: Níveis séricos de AST e ALT do grupos MC-H. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Salina. Os dados são representados como média \pm E.P. M. (n=5). (ANOVA, Bonferroni).

Grupos	AST	ALT
Salina	192,3 \pm 33,16	52,1 \pm 4,9
MC-H	256,8 \pm 44,2	63,9 \pm 7,3

Tabela 6: Níveis séricos de creatinina de MC-D7, MC-D8 e MC-D9. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Salina. Os dados são apresentados como média \pm E.P.M. (n=5). (ANOVA, Bonferroni).

Grupos	Creatinina
Salina	0,33 \pm 0,04
MC-D7	0,37 \pm 0,02
MC-D8	0,50 \pm 0,02 *
MC-D9	0,43 \pm 0,03

Tabela 7: Níveis séricos de creatinina de MC-H. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Salina. Os dados são apresentados como média \pm E.P.M. (n=5). (ANOVA, Bonferroni).

Grupos	Creatinina
Salina	0,50 \pm 0,14
MC-H	0,37 \pm 0,02

Na **Tabela 6** os grupos MC-D7 (0,37 \pm 0,02) e MC-D9 (0,43 \pm 0,03) apresentaram níveis séricos de creatinina maiores do que o grupo Salina (), porém não houveram diferenças estatisticamente significativas, diferentemente do grupo MC-D8 (0,33 \pm 0,04), que apresentou valores mais altos e diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$). O derivado MC-H apresentou, por sua vez (**Tabela 7**) nível sérico menor do que o seu controle (0,37 \pm 0,02), o grupo salina (0,50 \pm 0,14) e não houve diferença estatisticamente significativa.

Peso dos órgãos dos animais

Foram observadas as variações no peso dos órgãos (coração, baço, fígado e rim dos animais), com a finalidade de detectar alguma visceromegalia. O peso dos órgãos é mostrado nas **Tabelas 8 e 9**.

Tabela 8: Peso dos órgãos dos grupos MC-1, MC-D1, MC-D3, MC-D6, MC-D7, MC-D8 e MC-D9. Foram removidos o coração, fígado, baço e rim. Dados são mostrados como média \pm E.P.M. . * $p < 0,05$ em relação ao grupo Salina. (ANOVA, Bonferroni)

Grupo	Coração (g)	Fígado (g)	Rim (g)	Baço (g)
Salina	0,234 \pm 0,017	1,514 \pm 0,070	0,265 \pm 0,025	0,095 \pm 0,006
MC-1	0,175 \pm 0	1,540 \pm 0	0,299 \pm 0	0,072 \pm 0
MC-D1	0,206 \pm 0,017	1,511 \pm 0,120	0,250 \pm 0,022	0,095 \pm 0,005
MC-D3	0,203 \pm 0,010	1,621 \pm 0,184	0,271 \pm 0,024	0,106 \pm 0,008
MC-D6	0,180 \pm 0,011	1,641 \pm 0,095	0,265 \pm 0,025	0,184 \pm 0,047 *
MC-D7	0,222 \pm 0,015	1,480 \pm 0,058	0,264 \pm 0,013	0,090 \pm 0,007
MC-D8	0,205 \pm 0,010	1,460 \pm 0,091	0,253 \pm 0,018	0,085 \pm 0,002
MC-D9	0,192 \pm 0,009	1,463 \pm 0,059	0,248 \pm 0,014	0,103 \pm 0,010

Tabela 9: Peso dos órgãos do grupo MC-H. Foram removidos o coração, fígado, baço e rim. Dados são mostrados como média \pm E.P.M. Não houve diferenças significativas em relação ao grupo Salina. (ANOVA, Bonferroni)

Grupo	Coração (g)	Fígado (g)	Rim (g)	Baço (g)
Salina	0,187 \pm 0,012	1,559 \pm 0,070	0,268 \pm 0,021	0,096 \pm 0,005
MC-H	0,164 \pm 0,006	1,518 \pm 0,076	0,241 \pm 0,016	0,104 \pm 0,010

A **Tabela 8** mostra que o peso do coração de todos os grupos foi menor do que o grupo Salina. O peso do fígado de MC-1 (1,540 \pm 0), MC-D3 (1,621 \pm 0,184) e MC-D6 (1,641 \pm 0,095) foi maior que o peso de Salina (1,514 \pm 0,070), porém não houve diferença significativa estatisticamente. Os pesos dos rins dos grupos MC-1 (0,299 \pm 0) e MC-D3 (0,271 \pm 0,024) foram maiores do que o grupo Salina (0,265 \pm 0,025), mas novamente não houve diferença estatisticamente significativa. Os pesos dos baços dos grupos MC-D3 (0,106 \pm 0,008), MC-D6 (0,184 \pm 0,047) e MC-D9 (0,103 \pm 0,010) foram maiores do que o de Salina (0,095 \pm 0,006), porém, apenas a diferença entre o peso de MC-D6 e o de Salina foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

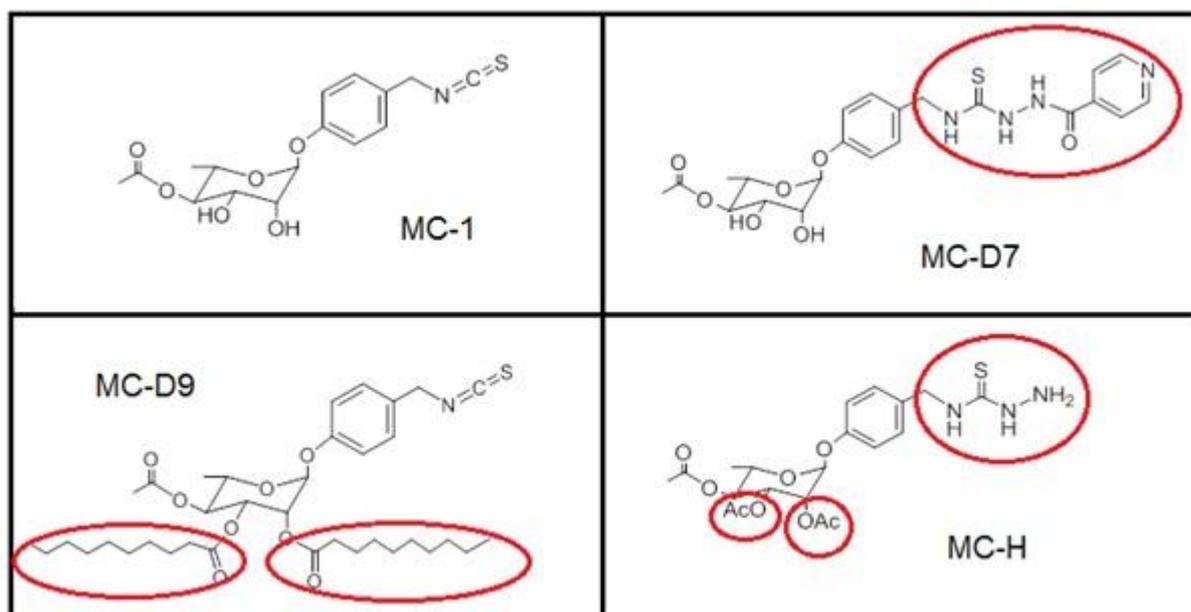
Na **Tabela 9** é possível observar que os pesos dos órgãos de MC-H (coração: 0,164 \pm 0,006; fígado: 1,518 \pm 0,076; rim: 0,241 \pm 0,016) foram menores do que os do grupo Salina (coração: 0,187 \pm 0,012; fígado: 1,559 \pm 0,070; rim: 0,268 \pm 0,021;).

Embora o peso médio do baço de MC-H ($0,104 \pm 0,010$) tenha sido superior ao de Salina ($0,096 \pm 0,005$), não houve diferença estatisticamente significativa.

Mudanças estruturais e redução da toxicidade

Neste ensaio de segurança foi possível observar que os derivados semissintéticos MC-D7, MC-D9 e MC-H estiveram relacionados a maiores taxas de sobrevivência, ausência de alterações comportamentais e níveis séricos de enzimas hepáticas e creatinina dentro dos valores normais. Estes valores indicam menor toxicidade destes derivados em comparação a MC-1 e aos demais derivados, podendo assim serem considerados seguros para o uso. Estas modificações podem ser visualizadas na **Figura 4**.

Figura 4: Alterações estruturais nas moléculas de MC-D7, MC-D8 e MC-H em comparação com o isotiocianato constituinte da *Moringa oleifera* (MC-1). As alterações estão destacadas por elipses em vermelho.



As modificações estruturais promovidas nas moléculas dos derivados semissintéticos estão destacadas por elipses em vermelho. Na molécula de MC-D7 (*N*-[4-(4'-*O*-acetil- α -L-raminosiloxi)benzil]-2-(piridinil-4-carbonil)hidrazina-1-carbotioamida) é possível observar a remoção do grupo isotiocianato ($N=C=S$) e adição do grupo (piridinil-4-carbonil)hidrazina-1-carbotioamida. Na molécula de MC-D9 (4-[[4'-*O*-acetil-2',3'-*O*-bis(decanoiloxi)- α -L-raminosiloxi]benzil]isotiocianato) a

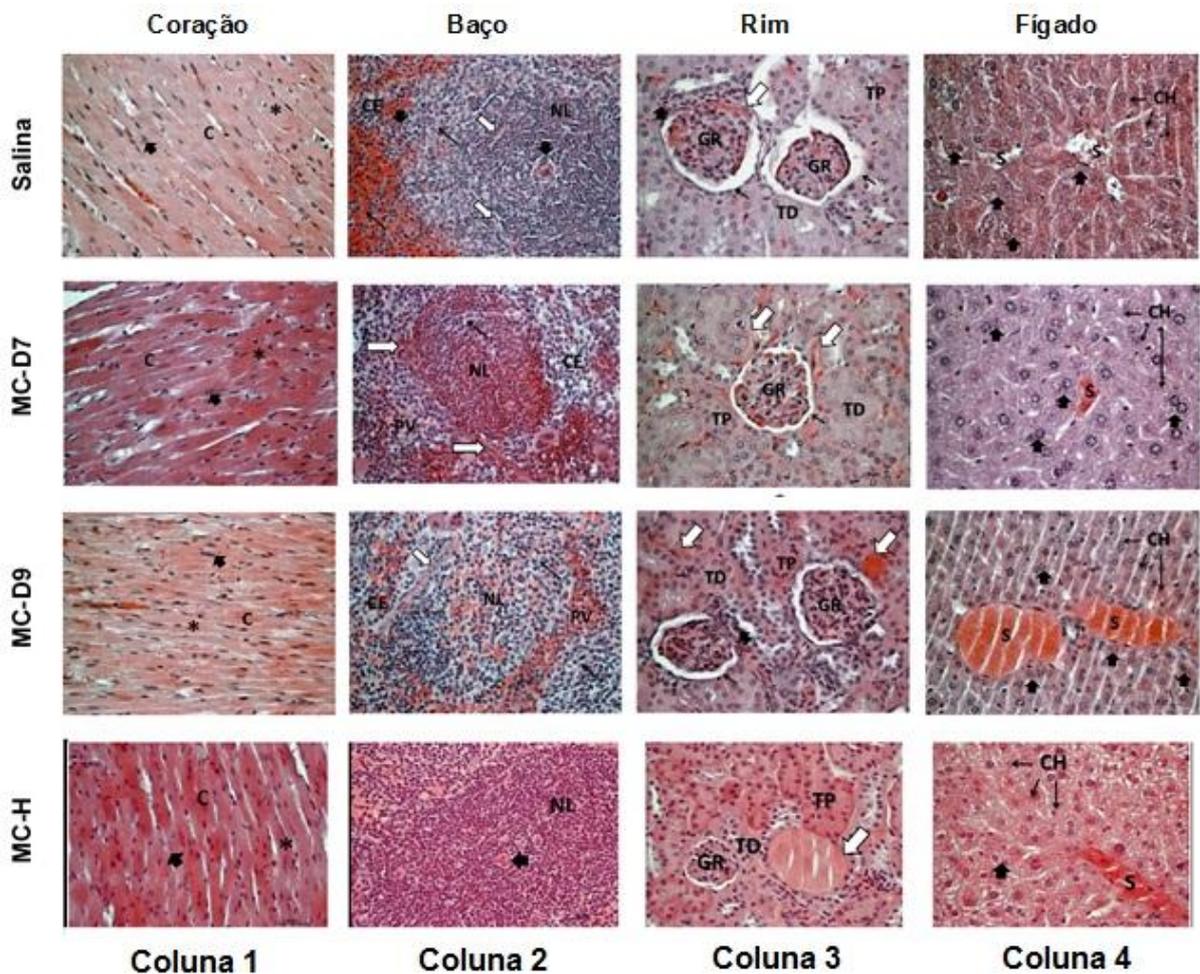
mudança foi a acilação de duas hidroxilas osídicas, com a inserção de dois grupos de cadeia alifática extensa (10 C). As mudanças estruturais em MC-H (4-[(2',3',4'-O-triacetil- α -L-raminosiloxi)*N*-benzil]hidrazinacarbotioamida) foram a substituição do grupo isotiocianato por um grupo hidrazinacarbotioamida e também a acilação de duas hidroxilas osídicas, com a inserção de mais dois grupos acetilas na molécula. Estas mudanças estruturais, portanto, podem ter sido determinantes na redução da toxicidade destas drogas.

Análise histopatológica

Os derivados MC-D7, MC-D9 e MC-H além de estarem relacionados a taxas de sobrevivência mais altas dentre as substâncias testadas, também apresentaram alterações comportamentais e bioquímicas mínimas, sendo que nenhuma alteração nestes grupos foi estatisticamente significativa. Para corroborar com estes dados foi realizada a análise histopatológica de quatro órgãos, a saber: coração, baço, fígado e rim.

A **Figura 5** mostra que nos órgãos animais dos grupos tratados com Salina, MC-D7, MC-D9 e MC-H (em análise histopatológica cega dos 3 grupos testados em modelo murinho), não foi observada toxicidade. Os órgãos tiveram sua morfologia geral preservada, bem como a integridade de suas células parenquimatosas (típicas da constituição de cada tecido) e estromais (tecido conjuntivo de permeio e endotelial/vasos sanguíneos). Os grupos tratados com MC-D7 e MC-H exibiram no baço nódulos linfáticos de maior dimensão frente aos demais grupos, sugerindo maior reatividade na produção linfocitária na polpa branca. Nos rins dos animais tratados com MC-H houve aumento progressivo de eosinofilia (característica de rica presença de aminoácidos) nos túbulos proximais e distais, indicando maior filtração, reabsorção e excreção renal, porém mantendo íntegra a morfologia néfrica cortico-medular. Esses resultados podem indicar que os produtos testados não geram toxicidade sistêmica de acordo com o ensaio de toxicidade aguda e subaguda e apresenta biocompatibilidade *in vivo*, segundo os critérios da norma ISO 10993-11.

Figura 5: Análise Histopatológica dos órgãos (magnificação: 400x, coloração: HE). Coluna 1: coração de Salina, MC-D7, MC-D9 e MC-H respectivamente. Cardiomiócitos (C) com aspectos morfológicos dentro do padrão de normalidade. Células com eosinofilia citoplasmática característica (*) e núcleos basofílicos múltiplos e preservados (seta preta). Coluna 2: baço de Salina, MC-D7, MC-D9 e MC-H respectivamente. Presença de nódulos linfáticos (NL), envoltos por polpa vermelha (PV), capilares sinusóides (seta branca) e cordões esplênicos (CE) com predomínio de linfócitos. Dentro do nódulo linfático, pequena presença de áreas mais claras correspondentes ao centro germinativo (seta fina) sugerindo uma linfocitopoiese intensa (MC-D7 e MC-H) e moderada (Salina, MC-D9). Coluna 3: rim de Salina, MC-D7, MC-D9 e MC-H respectivamente. Salina, MC-D7 e MC-D9: Região cortical do rim, com corpúsculos renais formados por glomérulos renais (GR) e cápsula renal (setas finas), capilares sanguíneos hiperêmicos (setas brancas), mácula densa (seta preta, se houver) e túbulos contorcidos proximais (TP, mais eosinofílicos) e distais (TD, citoplasma mais pálido), dentro do padrão morfológico de normalidade. MC-H: TP e TD encontram-se com maior eosinofilia citoplasmática frente aos demais grupos experimentais. Coluna 4: fígado Salina, MC-D7, MC-D9 e MC-H respectivamente. Cordões de hepatócitos (CH), que podem apresentar binucleação típica (setas pretas), entremeados por capilares sinusóides (S). Salina, MC-D7 e MC-D9: todos os órgãos dentro dos padrões de normalidade. MC-H: hepatócitos apresentam moderado depósito de glicogênio.



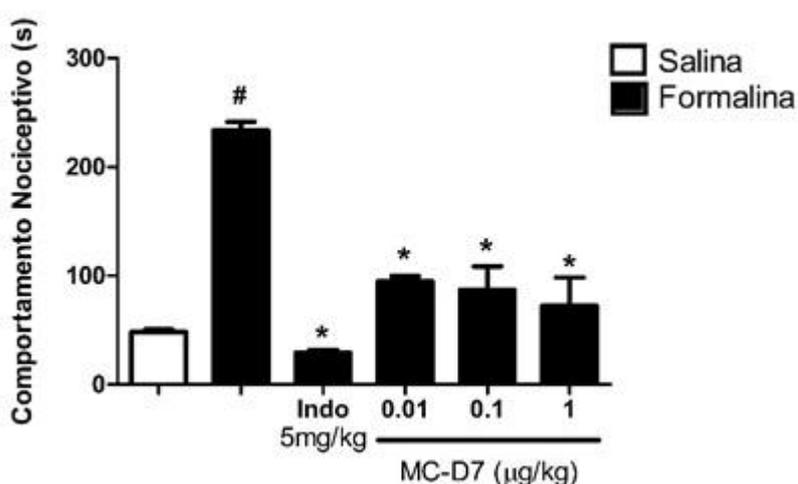
Eficácia antinociceptiva dos derivados semissintéticos MC-D7, MC-D9 e MC-H na hipernocicepção inflamatória induzida pela Formalina

Devido à toxicidade dos derivados semissintéticos MC-1, MC-D1, MC-D3, MC-D6 e MC-D8, comprovada no ensaio de segurança resolveu-se verificar se havia efeito

antinociceptivo na hipernocicepção inflamatória induzida pela Formalina apenas dos compostos MC-D7, MC-D9 e MC-H. Nestes experimentos houve um grupo controle positivo (indometacina 5mg/kg *per os*, grupo Indo).

A **Figura 6** mostra o comportamento nociceptivo dos animais submetidos ao pré-tratamento com MC-D7 no teste da Formalina. Nos animais submetidos apenas a aplicação de Formalina (grupo Formalina) i.a. na ATM (1,5%), o comportamento nociceptivo foi significativamente maior ($p < 0.05$) ($233 \pm 7,77$) do que o grupo Sham (grupo Salina) ($48 \pm 2,24$). Os animais pré-tratados com MC-D7 mostraram redução estatisticamente significativa ($p < 0.05$) do comportamento nociceptivo em relação ao grupo Formalina nas três doses testadas, $0,01 \mu\text{g}/\text{kg}$ ($94,8 \pm 4,87$), $0,1 \mu\text{g}/\text{kg}$ ($86,8 \pm 21,7$) e $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ ($72,4 \pm 26$), respectivamente. A dose que apresentou maior redução foi escolhida para os experimentos posteriores, neste caso $1 \mu\text{g}/\text{kg}$. Os animais pré-tratados com o composto MC-D9 (**Figura 7**) mostraram redução do comportamento nociceptivo de maneira estatisticamente significativa ($p < 0.05$) nas doses de $0,1 \mu\text{g}/\text{kg}$ ($87,2 \pm 10,4$), $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ ($128,4 \pm 13,7$) e $10 \mu\text{g}/\text{kg}$ ($78,8 \pm 11$) em relação ao grupo Salina ($233 \pm 7,77$). A dose que apresentou maior redução foi escolhida para os experimentos posteriores, neste caso $1 \mu\text{g}/\text{kg}$.

Figura 6: Eficácia antinociceptiva de MC-D7 na hipernocicepção inflamatória induzida por Formalina. # $p < 0,05$ em relação ao grupo Salina. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Formalina. Dados são apresentados como média \pm E.P.M. ($n=5$). (ANOVA, Bonferroni).



Os animais pré-tratados com o composto MC-H também mostraram redução do comportamento nociceptivo de maneira estatisticamente significativa ($p < 0.05$) nas 3

doses testadas, 0,01 μ g/kg (108,8 \pm 17,25), 0,1 μ g/kg (63,40 \pm 8,95) and 1 μ g/kg (56,1 \pm 7,46) em relação ao grupo Formalina (233 \pm 7.77), como mostra a **Figura 8**.

Figura 7: Eficácia antinociceptiva de MC-D9 na hipernocicepção inflamatória induzida por Formalina. # p<0,05 em relação ao grupo Salina. * p<0,05 em relação ao grupo Formalina. Dados são apresentados como média \pm E.P.M. (n=5). (ANOVA, Bonferroni).

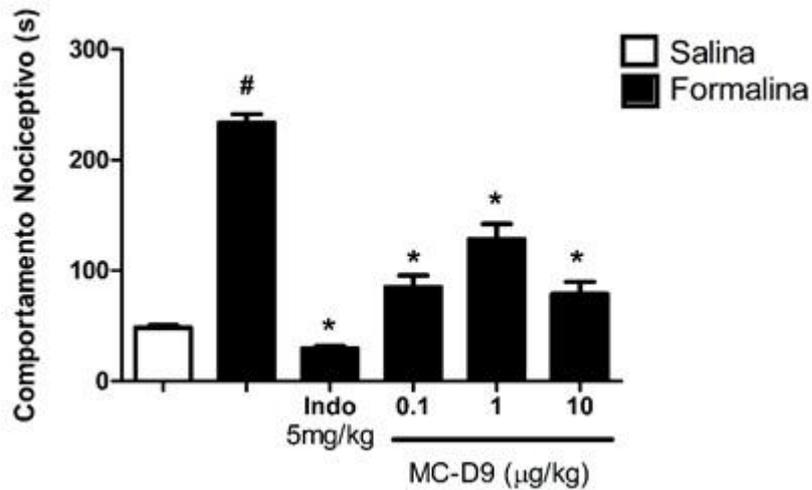
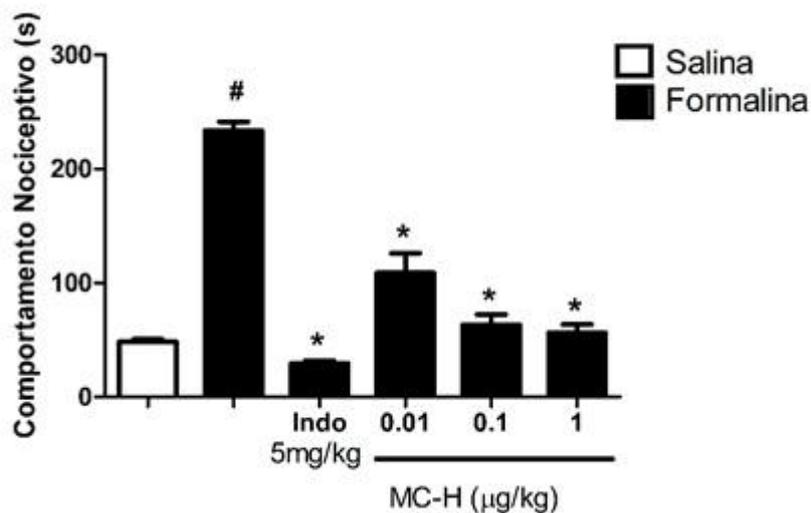


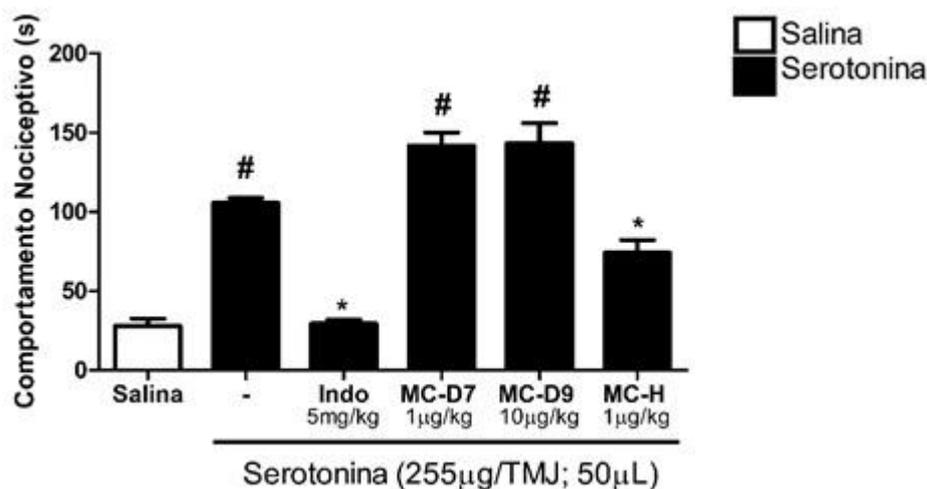
Figura 8: Eficácia antinociceptiva de MC-H na hipernocicepção inflamatória induzida por Formalina. # p<0,05 em relação ao grupo Salina. * p<0,05 em relação ao grupo Formalina. Dados são apresentados como média \pm E.P.M. (n=5). (ANOVA, Bonferroni).



Eficácia antinociceptiva dos derivados semissintéticos MC-D7, MC-D9 e MC-H na hipernociceção inflamatória induzida pela Serotonina

Também foi mensurada a eficácia antinociceptiva dos derivados semi-sintéticos em animais sujeitos a hipernociceção inflamatória induzida pela Serotonina i.a (ATM). As respectivas doses de cada derivado foram: MC-D7 1 μ g/kg, MC-D9 10 μ g/kg e MC-H 1 μ g/kg. Neste experimento houve um grupo controle positivo pré-tratado com indometacina 5mg/kg *per os* (grupo Indo).

Figura 9: Eficácia antinociceptiva de MC-D7, MC-D9 e MC-H na hipernociceção inflamatória induzida por Serotonina. # $p < 0,05$ em relação ao grupo Salina. * $p < 0,05$ em relação ao grupo Serotonina. Dados são apresentados como média \pm E.P.M. (n=5). (ANOVA, Bonferroni).

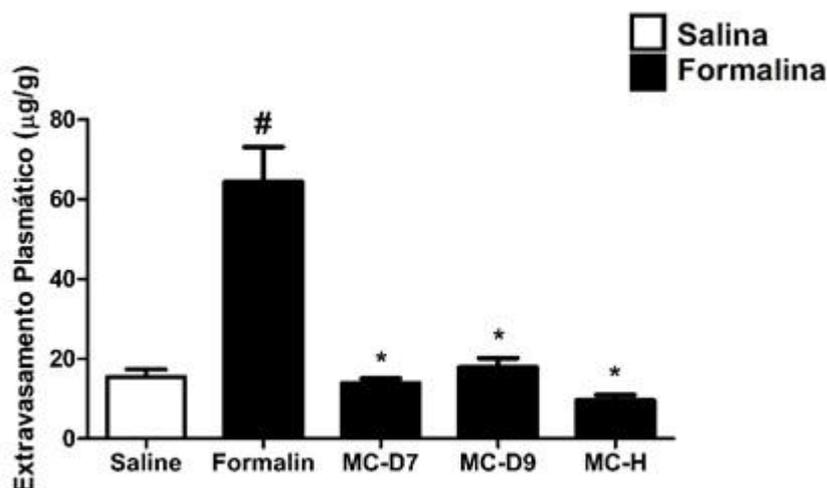


O comportamento nociceptivo foi significativamente maior ($p < 0,05$) no grupo que recebeu apenas a Serotonina i.a na ATM (grupo Serotonina) (105,6 \pm 3) ao ser comparado com o grupo que recebeu Salina i.a na ATM (grupo Salina) (27,8 \pm 4,7), como mostra a **Figura 9**. O efeito nociceptivo induzido pela Serotonina foi reduzido de maneira estatisticamente significativa ($p < 0,05$) no grupo Indo (29,33 \pm 2,4), porém, este efeito não foi reduzido pelo derivado MC-D7 (117,6 \pm 25) nem por MC-D9 (143,3 \pm 12,7), que, por sua vez, apresentaram valores significativamente mais altos do que o grupo Salina. Dos três derivados testados apenas MC-H reduziu (74 \pm 8,2) o comportamento hipernociceptivo induzido pela serotonina de maneira estatisticamente significativa ($p < 0,05$).

Eficácia anti-inflamatória dos derivados semissintéticos MC-D7, MC-D9 e MC-H verificada através do extravasamento plasmático com azul de Evans (Inflamação induzida por Formalina)

A fim de verificar se os derivados MC-D7 (1 μ g/kg), MC-D9 (10 μ g/kg) e MC-H (1 μ g/kg) possuem também efeito anti-inflamatório na ATM de ratos foi realizado o teste de extravasamento plasmático com Azul de Evans. Na **Figura 10** é possível observar que houve diferença significativa entre o grupo Salina (15,4 \pm 1,9) e o grupo Formalina (64,3 \pm 8,7). Os derivados MC-D7 (13,9 \pm 1,1), MC-D9 (17,9 \pm 2,2) e MC-H (9,6 \pm 1,3) reduziram o extravasamento plasmático de maneira estatisticamente significativa em relação ao grupo Formalina, sugerindo possível atividade anti-inflamatória destes compostos.

Figura10: Extravasamento plasmático de corante Azul de Evans de MC-D7, MC-D9 e MC-H na hipernocicepção inflamatória induzida por Formalina. # p<0,05 em relação ao grupo Salina. * p<0,05 em relação ao grupo Formalina. Dados são apresentados como média \pm E.P.M. (n=5). (ANOVA, Bonferroni).



Análise da motricidade e coordenação motora através do Teste Rotarod

Para avaliar se os derivados semi-sintéticos MC-D7, MC-D9 e MC-H podem causar letargia, sonolência relaxamento muscular ou desordem na coordenação motora que impliquem nos testes comportamentais (Formalina e Serotonina), gerando assim um viés, foi realizado o Teste Rotarod. As doses usadas foram: MC-D7 1 μ g/kg, MC-D9 10 μ g/kg e MC-H 1 μ g/kg.

Figura 11. Efeito de MC-D7 (1 μ g/kg), MC-D9 (10 μ g/kg) e MC-H (1 μ g/kg) no teste Rotarod (tempo de latência). Os derivados semissintéticos MC-D7, MC-D9 e MC-H não reduziram o tempo de latência dos animais em comparação ao grupo Salina. Não houve diferenças significativas entre os grupos (ANOVA, Bonferroni).

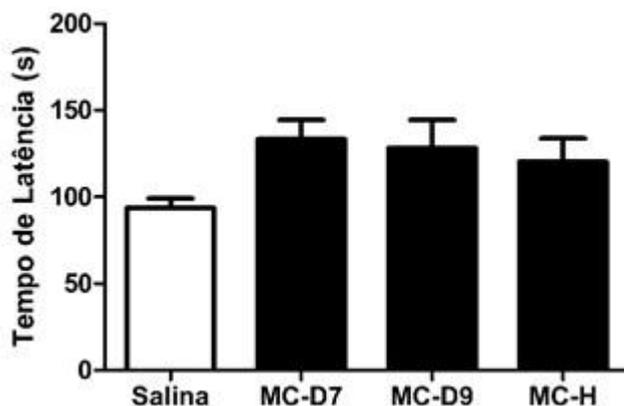
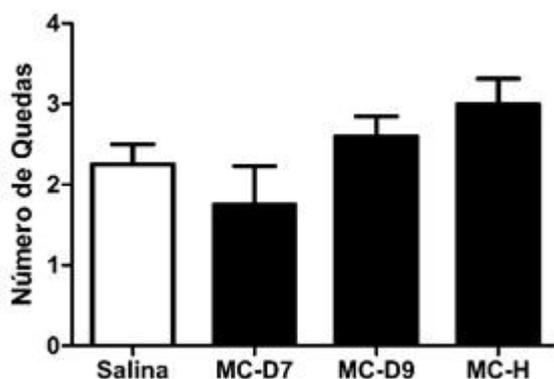


Figura 12. Efeito de MC-D7 (1 μ g/kg), MC-D9 (10 μ g/kg) e MC-H (1 μ g/kg) no teste Rotarod (número de quedas). Os derivados semissintéticos MC-D7, MC-D9 e MC-H tiveram maior número de quedas, porém não houveram diferenças estatisticamente significantes em comparação ao grupo Salina. (ANOVA, Bonferroni).



A **Figura 11** mostra os resultados para o tempo de latência (s) e a **Figura 12** mostra o número de quedas dos animais. Os grupos MC-D7 (133,2s \pm 11.1), MC-D9 (128,3s \pm 16,2) e MCH (120,2s \pm 13,6) tiveram maiores tempos de latência do que o grupo Salina (93.5s \pm 5.6), o que significa que os derivados não apresentaram efeito ansiolítico.

Em relação ao número de quedas os animais tratados com os derivados MC-D9 (2.6 \pm 0.2) e MC-H (3 \pm 0.3) apresentaram maior número de quedas do que o grupo Salina (2.2 \pm 0.2), porém não houve diferença estatisticamente significante. MC-D7

possuiu um menor número de quedas do que o grupo Salina ($1,75 \pm 0.4$), mas também não houve diferença estatisticamente significativa.

DISCUSSÃO

Neste estudo é descrita a hemi-síntese de 7 derivados do 4-(4'-O-acetil- α -L-raminosilóxi)benzilisotiocianato (MC-1) isotiocianato isolado das flores de *Moringa oleifera* Lam. (MC-D1, MC-D3, MC-D6, MC-D7, MC-D8, MC-D9 e MC-H). Também foram verificadas as toxicidades aguda e subaguda do isotiocianato puro e dos 7 derivados semissintéticos, a fim de classificá-los como tóxicos ou seguros para o uso em animais de laboratório e, posteriormente, após outros estudos, em humanos, com finalidade terapêutica e de modo comercial.

Existe atualmente uma grande busca pelo desenvolvimento de fármacos e descoberta de drogas que possam ser mais eficazes e ao mesmo tempo menos tóxicas do que as existentes no mercado para o tratamento de DTM (CAIRNS, 2010). A procura por drogas anti-inflamatórias e analgésicas tanto pode envolver novos usos para produtos naturais já conhecidos como a síntese de novas substâncias a partir destes fitoterápicos objetivando aumentar sua eficiência. Nosso grupo recentemente patenteou produtos semissintéticos extraídos a partir de flavonoides presentes na *Tephrosia toxicaria* Pers., que exibiram atividade anti-inflamatória e antinociceptiva na ATM de ratos, comprovados através de testes comportamentais, dosagens de citocinas e extravasamento plasmático e também foram considerados seguros em ensaio de segurança semelhante ao realizado neste estudo (VAL et al. 2014).

As propriedades farmacológicas da *Moringa oleifera* Lam já são bem conhecidas. Dentre estas propriedades estão: antiespasmódica, antifúngica, antibacteriana, diurética, antiepiléptica, anti-inflamatória, analgésica, anti-helmíntica, usada para distúrbios do sistema nervoso, espleno e hepatomegalias.(MISHRA et al. 2011).

Porém, nosso trabalho mostrou que o isotiocianato isolado (MC-1) e seus derivados MC-D1, MC-D3, MC-D6 e MC-D8 apresentaram toxicidade e altos índices de mortalidade em camundongos. Na literatura, já existem relatos de toxicidade de componentes da *Moringa oleifera* Lam., principalmente no extrato aquoso de folhas, flores e sementes. Ferreira *et al.* (2009) observaram até 100% (5200 μ L) de mortalidade em larvas de *Aedes aegypti*. Também observaram mortalidade em camundongos nas doses de 550 e 700 mg/kg em ensaio de toxicidade aguda e apenas

aumento do timo em ensaio de segurança subaguda em ratos. Kavitha *et al.* (2012), investigando efeitos agudos e subagudos de extrato aquoso de sementes de *Moringa oleifera* Lam. em peixes encontraram alterações hematológicas como: diminuição de glicose, proteínas, hemoglobina (29%), hematócrito (35%), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) (3%), hemácias (28%) e aumento de volume corpuscular médio, hemoglobina corpuscular média (HCM), número de leucócitos, AST, ALT, (em mais de 50%). Nath *et al.* (1992) em estudo de propriedades das plantas indianas evidenciaram que o extrato aquoso de folhas de *Moringa oleifera* Lam. (175 mg/kg) foi 100% abortífero em ratas. Adedapo, Mogbojuri e Emikpe (2009), utilizando extrato aquoso das folhas de *Moringa oleifera* observaram que doses de 2000 mg/kg não causaram mortalidade em camundongos, porém essa e doses menores (1600, 800 e 400 mg/kg) causaram letargia, alterações no número de plaquetas e discreta anemia.

Araújo *et al.* (2013), em ensaio de segurança com extrato aquoso (2000mg/kg), também encontrou apenas redução na contagem de células sanguíneas de camundongos, mas não houve mortalidade. Awodele *et al.* (2012) avaliando a toxicidade aguda do extrato aquoso das folhas de *Moringa oleifera* Lam. não verificaram toxicidade *per os* em camundongos (doses de 400, 800, 1600, 3200 e 6400 mg/kg), apenas letargia, diferentemente da administração intraperitoneal (i.p.), onde verificaram mortalidade nas doses de 1000 mg/kg (20%) e 2000 mg/kg (80%), encontrando como dose letal 50% (DL50) 1585 mg/kg, além de observarem alterações significativas no sangue e órgãos (microscopicamente) e no ganho de peso. Dose de 1500 mg/kg elevou a ureia e creatinina. Não houveram alterações em AST e ALT e nem na motilidade do espermatozoide, apenas oligospermia. Embora presentes nas folhas, sementes e flores, toda a toxicidade observada não deve ser atribuída apenas aos isotiocianatos, devido à grande quantidade de outras substâncias presentes na *Moringa oleifera* Lam. Em nenhum estudo com animais porém foram usadas doses tão baixas e mesmo doses altas obtiveram índices de mortalidade menores ou semelhantes aos nossos (MC-1).

Baseando-se na toxicidade (e citotoxicidade) explanada acima, principalmente referindo-se a mortalidade, aumento na ureia e creatinina (FERREIRA *et al.*, 2009; AWODELE *et al.*, 2012) e a alterações hematológicas (KAVITHA *et al.*, 2012; MOGBOJURI; EMIKPE, 2009), é possível relacionar doses altas de extrato aquoso de *Moringa oleifera* com lesões renais, principalmente. A eritropoietina, produzida nos

rins, é fator de crescimento importante para diferenciação das hemácias. Nas análises histológicas dos rins de MC-D7 e MC-H foi possível observar maior eosinofilia em túbulos contorcidos distais, o que indica discreto aumento da filtração, aumento da quantidade de aminoácidos e menor reabsorção, alterações estas, que, em maiores proporções levam a lesão renal. As doses pequenas destes derivados semissintéticos podem ter sido o fator protetor de lesões renais, enquanto que doses maiores (em alguns casos 10^7 vezes maiores que as utilizadas neste estudo) podem ter causado lesões renais, com conseqüente prejuízo da produção de eritropoietina, evidenciadas pela grande incidência de discrasias sanguíneas. Estudos mais aprofundados se fazem necessários para confirmar esta hipótese.

Dufour, Stahl e Baysse (2015) mencionam a possibilidade dos isotiocianatos exercerem papel de proteção nas plantas contra agressões externas, servindo como bactericida e fungicida, exercendo essa função por meio de inibição de transcrição gênica e respiração celular e formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), assim preservando a vida da planta.

Este é o primeiro estudo que testa a eficiência destes isotiocianatos semissintéticos (MC-D7, MC-D9 e MC-H) na redução da hipernocicepção inflamatória na ATM induzida por formalina e serotonina em ratos. O teste da formalina na ATM, padronizado por Roveroni et al. (2001), é usado como indutor de inflamação aguda e hipernocicepção na ATM, alterando o comportamento dos animais em poucos minutos. O comportamento dos grupos Sham fica em torno do escore de 40 ± 10 (soma de levantamentos de cabeça com tempo de coçar, em segundos), enquanto que os grupos que recebem formalina 1,5% na ATM apresentam escore de 190 ± 10 . Pesquisas recentes vêm utilizando-o com sucesso na investigação de novas substâncias analgésicas inibidoras de PPAR γ (15-deoxy- Δ 12,14-prostaglandin J2) (CLEMENTE-NAPIMOGA *et al.*, 2012). Ele também tem a vantagem de ser bem mais específico para simular distúrbios na ATM do que a indução por injeção subcutânea na face do animal (CLAVELOU *et al.*, 1989).

Nosso estudo revela a redução do escore do teste da formalina de maneira estatisticamente significativa ($p < 0,05$) nos 3 compostos testados, especialmente MC-H (média= escore 56) na dose de $1 \mu\text{g}/\text{kg}$, seguido por MC-D7 (média= escore 76) na dose de $1 \mu\text{g}/\text{kg}$ e MC-D9 (média= escore 78) na dose de $10 \mu\text{g}/\text{kg}$.

Park *et al.* (2011), através da utilização do 4-(2'-O-acetil- α -L-raminosilóxi)benzilisotiocianato nas doses de $1,25 \mu\text{M}$ e $2,5 \mu\text{M}$ em culturas de células

(macrófagos de camundongos RAW 264.7) obtiveram redução de parâmetros cruciais existentes na hipernocicepção inflamatória. Eles observaram que houve redução da expressão de NF- κ B e relacionaram esta redução a uma maior presença do I κ B α (inibidor alfa do fator nuclear kappa beta) não fosforilado, mensurado através de western blot. Como o I κ B α é o inibidor de NF- κ B, sua presença seria, nesse caso, um marcador que indica indiretamente a ativação ou inibição de NF- κ B. Também visualizaram a redução na expressão de iNOS. O NO, embora possa exercer ambos papéis de pró-inflamatório e anti-inflamatório, a depender da quantidade, se mostra na maioria das vezes como crucial na manutenção do processo inflamatório (CHAVES et al., 2011). Outro parâmetro foi a diminuição da expressão de MAPKs (proteínocinas ativadas por mitógeno) (p-ERK1/2, p-SAPK/JNK, mas não p-p38 MAPK), que pode sugerir diminuição de NF- κ B, já que o primeiro exerce papel regulatório no segundo. Porém foi observado que p-ERK1/2 não participa da regulação de NF- κ B, o que sugere a participação de outras MAPKs envolvidas (PARK et al., 2011; KAMINSHKA, 2005),.

O segundo teste utilizado para mensurar redução da hipernocicepção inflamatória foi o teste da serotonina, cuja execução é semelhante ao teste da formalina, porém, realizado em apenas 30 minutos. A ação da serotonina é mais rápida do que a formalina devido a sua direta ativação de vias noradrenalina-dependentes por ligação a receptores β 1 e β 2, sem a utilização de cascatas de citocinas para tal (OLIVEIRA-FUSARO et al., 2012). No teste da serotonina foi possível observar que houve redução do comportamento hipernociceptivo de forma significativa apenas no grupo tratado com o derivado MC-H.

Além de atuar nos receptores neuronais 5HT₃ (que nesse caso, funcionam como canais iônicos) a Serotonina também atua em receptores β 1 e β 2 adrenérgicos, localmente. A dor inflamatória depende de vias de sinalização comuns, que culminam em sensibilização neuronal primária. Basicamente parte da cascata de citocinas envolvidas na dor iniciadas pela liberação de TNF α culmina na liberação de prostaglandinas e, atuando por outra via, a de IL-8, ocorre a liberação tissular de aminas simpatomiméticas, entre elas a Serotonina, que nesse caso, não depende da liberação de TNF α , o que faz com que essa via seja mais direta (menor quantidade de mediadores) (CUNHA et al., 2005). O derivado MC-H portanto pode, devido ao seu efeito antinociceptivo em relação a serotonina, atuar de forma a inibir a ação desta, antagonizando os receptores β 1 e β 2, por exemplo, ao passo que MC-D7 e MC-D9

podem atuar apenas em fases da cascata iniciada por TNF α , não tendo assim efeito na hiperalgesia provocada pela Serotonina (DINIZ *et al.*, 2015; FUSARO *et al.*, 2012; CUNHA *et al.*, 2005).

Os derivados MC-D7, MC-D9 e MC-H também reduziram significativamente o extravasamento plasmático (teste Azul de Evans), na ATM de ratos, em relação ao grupo não tratado (grupo Formalina), sugerindo assim uma redução considerável na inflamação. Esta redução pode explicar em partes o efeito dos 3 derivados no comportamento nociceptivo induzido por formalina, em que a diminuição aconteceria não só pelo efeito antinociceptivo, mas também anti-inflamatório dos 3 derivados (CAIRNS, 2010; BOLETA-CERANTO; VEIGA; ARSATI, 2005).

O teste Rotarod é utilizado para avaliar a motricidade de pequenos animais, sendo um bom modelo coadjuvante em experimentos de osteoartrite. Quando a quantidade de rotações por minuto (rpm) torna-se alta, ela exige adequada performance do animal, em que, com a presença de alguma alteração na motricidade, o mesmo não consegue se manter sobre o cilindro. Os animais tratados com os derivados MC-D7, MC-D9 e MC-H tiveram tempos de latência maiores (embora de maneira não significativa) o que sugere que os derivados não interferiram na motricidade e coordenação motora dos animais (PIEL *et al.*, 2014).

CONCLUSÃO

Neste estudo descrevemos a toxicidade de 7 derivados semi-sintéticos obtidos a partir de um benzilisotiocianato (MC-1) isolado das flores de *Moringa oleifera* Lam. Também relatamos que três derivados semi-sintéticos (MC-D7, MC-D9 e MC-H), além de atóxicos, foram capazes de reduzir a inflamação e a nocicepção mediada por formalina na ATM de ratos e que apenas MC-H reduziu a inflamação e a nocicepção induzida pela serotonina sugerindo que as diferenças estruturais conferem ações distintas nestas vias. Nossos estudos apontam para o potencial uso de MC-D7, MC-D9 e MC-H nas DTMs. Para tanto se faz necessário investigar as vias metabólicas, alvos celulares e moleculares, para assim compreender os mecanismos de ação, possibilitando assim a otimização de seu uso.

REFERÊNCIAS

ABBOTT, F. V., FRANKLIN, K. B. J., CONNELL, B. The stress of a novel environment reduces formalin pain: possible role of serotonin. **Eur. J. Pharmacol.**, Amsterdam, v.126, n.1-2, p.141-144, 1986.

ADEDAPO, A. A.; FALAYI, O. O.; OYAGBEMI, A. A. Evaluation of the analgesic, anti-inflammatory, anti-oxidant, phytochemical and toxicological properties of the methanolic leaf extract of commercially processed *Moringa oleifera* in some laboratory animals. **J Basic Clin Physiol Pharmacol**; v.26, n.5, p. 491–499, set. 2015

ADEDAPO, A. A.; MOGBOJURI, O. M.; EMIKPE, B. O. Safety evaluations of the aqueous extract of the leaves of *Moringa oleifera* in rats. **Journal of Medicinal Plants Research** v. 3, n.8, p. 586-591, ago, 2009.

ARAÚJO, L. C. C. et al. Evaluation of Cytotoxic and Anti-Inflammatory Activities of Extracts and Lectins from *Moringa oleifera* Seeds. **Plos One**. v.8, n.12, p. 1-15, dez., 2013.

BOLETA-CERANTO, D. C. F.; VEIGA, M. C. F. A.; ARSATI, F. Efeito da dexametasona e do meloxicam sobre o extravasamento plasmático induzido por carragenina na ATM de ratos. **Revista Odonto Ciência**, v. 20, n. 50, p. 354-360, out./dez. 2005.

CAIRNS, B.E. Pathophysiology of TMD pain – basic mechanisms and their implications for pharmacotherapy. **J. Oral Rehabil.** v.37, p. 391–410, 2010.

CARLINI E.A.; BURGOS, V. Screening farmacológico de ansiolíticos: Metodologia laboratorial e comparação entre diazepam e clorobenzepam. **Rev. Ass. Bras. Psiquiatria**, v.1, p.25-31, 1979.

CHAVES, H. V. et al. Experimental model of zymosan-induced arthritis in the rat temporomandibular joint: role of nitric oxide and neutrophils. **Journal of Biomedicine & Biotechnology**. v. 2011, p. 1-11, jan. 2011.

CHEENPRACHA, S. et al. Potential anti-inflammatory phenolic glycosides from the medicinal plant *Moringa oleifera* fruits. **Bioorganic & medicinal chemistry**. v.18, n.17, p. 6598-6602, set. 2010.

CLAVELOU, P. et al. Application of the formalin test to the study of orofacial pain in the rat. **Neuroscience Letters**. v. 103, n.3, p. 349-353, set. 1989.

CLEMENTE-NAPIMOGA, J. T. et al. 15d-PGJ2-loaded in nanocapsules enhance the antinociceptive properties into rat temporomandibular hypernociception. **Life Sciences**. v.90, n. 23-24, p. 944-949, jun., 2012.

CUNHA, T. M. et al. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **Proceedings of National Academy of Science of the United States of America**. v. 102, n. 5, p. 1755-1760, fev. 2005.

DINIZ, D. A. et al. Serotonin induces peripheral mechanical antihyperalgesic effects in mice. **European Journal of Pharmacology**. v.767, p. 94-97, nov. 2015.

DUFOUR, V.; STAHL, M.; BAYSSE, C. The antibacterial properties of isothiocyanates. **Microbiology**. v. 161, n.2, p. 229-243, fev. 2015.

DUNHAM, N. W.; MIYA, T. S. A Note on a Simple Apparatus for Detecting Neurological Deficit in Rats & Mice. **J. Am. Pharmaceut. Assoc.**, v.46, n.3, 1957

FERREIRA, P. M. P. et al. Larvicidal activity of the water extract of *Moringa oleifera* seeds against *Aedes aegypti* and its toxicity upon laboratory animals. **An Acad Bras Cienc**. v.81, n. 2, p. 207-217, 2009.

FIORENTINO, P. M.; CAIRNS, B. E.; HU, J. W. Development of inflammation after application of mustard oil or glutamate to the rat temporomandibular joint. **Archs Oral Biol**. v.44, n.1, p.27-32, 1999.

FREITAS, R. S. et al. Lectin from *Abelmoschus esculentus* reduces zymosaninduced temporomandibular joint inflammatory hypernociception in rats via heme oxygenase-1 pathway integrity and tnf- α and il-1 β suppression. **International Immunopharmacology**. v.38, p. 313-323, 2016.

FUSARO, M. C. G. O. et al. 2010. P2X3 and P2X2/3 receptors mediate mechanical hyperalgesia induced by bradykinin, but not by pro-inflammatory cytokines, PGE₂ or dopamine. **European Journal of Pharmacology**. v. 649, p. 177-182, 2010.

GALUPPO, M. et al. Antiinflammatory activity of glucomoringin isothiocyanate in a mouse model of experimental autoimmune encephalomyelitis. **Fitoterapia**. v. 95, p. 160-174, jun. 2014.

GREENE, C. S. Managing patients with temporomandibular disorders: A new "standard of care". **American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics** v. 138, n.1, p.3-4, jul. 2010.

HAAS, D. A. et al. Development of an orofacial model of acute inflammation in the rat. **Archives of Oral Biology**. v. 35, n. 5, p. 417-422, mai. 1992.

ISO 10993-11. Biological Evaluation of Medical Devices – Parts 11: tests for systemic toxicity. 1. ed. 1992.

KAMINSHKA, B. MAPK signalling pathways as molecular targets for anti-inflammatory therapy--from molecular mechanisms to therapeutic benefits. **Biochem. Bioph. Acta**. v.1754, n.1-2, p. 253-262, dez. 2005.

KAVITHA, C. et al. Toxicity of *Moringa oleifera* seed extract on some hematological and biochemical profiles in a freshwater fish, *Cyprinus carpio*. **Experimental and Toxicology Pathology**. v.64, n. 7-8, p. 681-687, nov. 2012.

MARACAJÁ, P. B. et al. Efeito tóxico do extrato de flores de *Moringa oleifera* L. para abelhas *Apis mellifera* africanizadas. **Agropecuária Científica no Semi-árido**. v.6, n. 3, p. 33 – 37, jul./set., 2010

MISHRA, G. et al. Traditional uses, phitochemistry and pharmacology properties of *Moringa oleifera* plants: an overview. **Der Pharmacia Lettre**. v.3, n.2, p. 141-164, 2011.

NATH, D. et al. Commonly used Indian abortifacient plants with special reference to their teratologic effects in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 36, n.2, p. 147-154, abr., 1992.

OKUSE, K. Pain signalling pathways: from citokynes to ions channels. **The international Journal of Biochemistry & Cell Biology**. v.39, n.3, p. 490-496, 2007.

ORGANIZATION FOR ECONOMICS CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. 420 OECD Guidelines for Teste of Chemical: Acute Toxicity – fixed dose procedure. dez. 2001.

PARK, E. J. et al. Inhibition of lipopolysaccharide-induced cyclooxygenase-2 expression and inducible nitric oxide synthase by 4-[(2'-Oacetyl- α -L-rhamnosyloxy)benzyl]isothiocyanate from *Moringa oleifera*. **Nutr. Cancer**. v.63, n.6, p. 971-982, 2011.

PIEL, M. J. et al. Pain assessment in animal models of osteoarthritis. **Gene**. v. 537, n.2, p. 184-188, mar., 2014.

RAGASA, C. Y. et al. Cytotoxic Isothiocyanates from *Moringa oleifera* Lam Seeds. **Philippine Science Letters**, v.5, n.1, p. 46-52, 2012.

RIVANOR, R. L. C. et al. A lectin from the green seaweed *Caulerpa cupressoides* reduces mechanical hyper-nociception and inflammation in the rat temporomandibular joint during zymosan-induced arthritis. **International Immunopharmacology**. v.21, p. 34-43, 2014

ROSLAND, J. H. The formalin test in mice: the influence of ambient temperature. **Pain**. v.45, n.2, p. 211-216, mai. 1991.

ROVERONI, R. C. et al. Development of a behavioral model of TMJ pain in rats: The TMJ formalin test. **Pain**. v. 94, n.2, p. 185-191, nov. 2001.

SESSLE, B. J. The Neural Basis of Temporomandibular Joint and Masticatory Muscle Pain. **Journal of Orofacial Pain**. v. 13, n.4, p. 238-245, 1999.

SESSLE, B. J. Peripheral and central mechanisms of orofacial pain and their clinical correlates. **Minerva Anesthesiology**. v. 71, n. 4, p. 117-136, 2005.

TORRES-CHAVEZ, K. E. et al. Effect of gonadal steroid hormones on formalin-induced temporomandibular joint inflammation. **Eur. J. Pain**. v.16, n.2, p. 204-216, 2011

VAL, D. R. et al. Tephrosia toxicaria Pers. reduces temporomandibular joint inflammatory hypernociception: the involvement of the HO-1 pathway. **European Journal of Pain**. Londres. v. 18, n. 9, p. 1280-1289, out. 2014.

WADHWA, S.; KAPILA, S. TMJ Disorders: Future Innovations in Diagnostics and Therapeutics. **Journal of Dental Education**. v. 72, n. 8, p. 930-947, ago. 2008.

WATERMANN, C. et al. Stable, water extractables isothiocyanates from *Moringa oleifera* leaves attenuates inflammation in vitro. **Phytochemistry**. v. 103, p. 114-122, jul. 2014.

WU, X, et al. Isorhithiocyanates induce oxidative stress and suppress the metastasis potential of human non-small cell lung cancer cells. **BMC Cancer**. v.269, n.10, 2010